



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

**AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA DO ÍNDICE DE DNA EM
AMOSTRAS CERVICAIS DE MULHERES CO-
INFECTADAS HIV-HPV ATENDIDAS EM CENTROS DE
REFERÊNCIA PARA HIV-AIDS EM RECIFE**

ALBERT EDUARDO SILVA MARTINS

RECIFE/PE

2014

ALBERT EDUARDO SILVA MARTINS



**AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA DO ÍNDICE DE DNA EM
AMOSTRAS CERVICAIS DE MULHERES CO-
INFECTADAS HIV-HPV ATENDIDAS EM CENTROS DE
REFERÊNCIA PARA HIV-AIDS EM RECIFE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Medicina Tropical.

Orientador : Prof^ª. Dr. Ricardo Arraes de Alencar Ximenes, PhD

Co-orientadora : Prof^ª. Dra^a Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva, PhD

RECIFE/PE

2013

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Gláucia Cândida - CRB4-1662

M386a Martins, Albert Eduardo Silva.
Avaliação prognóstica do índice de DNA em amostras cervicais de mulheres co-infectadas HIV-HPV atendidas em centro de referência para HIV-AIDS em Recife / Albert Eduardo Silva Martins. – Recife: O autor, 2013.
177 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Ricardo Arraes de Alencar Ximenes.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2013.
Inclui Referências, apêndices e anexos.

1. Vírus do Papiloma. 2. HIV. 3. Fatores de Risco. 4. Ploidias. I. Ximenes, Ricardo Arraes de Alencar. (Orientador). II. Título.

618.9883 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2014-041)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO (PROPESQ)
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DO DOUTORANDO

ALBERT EDUARDO SILVA MARTINS

No dia 30 de Outubro de 2013, às 09h00, no Auditório do Departamento de Enfermagem do Centro de Ciências da Saúde (CCS/UFPE), os Membros Doutores: a Profª. Drª. Maria Rosângela Cunha Duarte Cêlho – Presidente da Banca (UFPE), a Profª. Drª. Maria Luiza Bezerra Menezes (UPE), o Profª. Drª. Marcus Vinícius Aragão Batista (UFSE), o Profª. Drª. Luiz Cláudio Arraes de Alencar (UFPE) e o Profª. Drª. Antônio Carlos de Freitas (UFPE), componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguiram o doutorando ALBERT EDUARDO SILVA MARTINS sobre a sua Tese intitulada “AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA DO ÍNDICE DE DNA EM AMOSTRAS CERVICAIS DE MULHERES CO-INFECTADAS HIV-HPV ATENDIDAS EM CENTROS DE REFERÊNCIA PARA HIV-AIDS EM RECIFE”, a qual foi orientada pelo Profª. Drª. Ricardo Arraes de Alencar Ximenes (UFPE) e co-orientada pela Profª. Drª. Norma Lucena Cavalcanti Lício da Silva (UFPE). Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta do doutorando, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Profª. Drª. Maria Rosângela Cunha Duarte Cêlho

APROVADO

Profª. Drª. Maria Luiza Bezerra Menezes

APROVADO

Profª. Drª. Marcus Vinícius Aragão Batista

APROVADO

Profª. Drª. Luiz Cláudio Arraes de Alencar

APROVADO

Profª. Drª. Antônio Carlos de Freitas

APROVADO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

REITOR

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Francisco de Souza Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Nicodemos Teles Pontes Filho

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL**

Valdênia Maria Oliveira de Souza

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL**

Vera Magalhães de Silveira

CORPO DOCENTE PERMANENTE

Ana Catarina de Souza Lopes

Ana Lúcia Coutinho Domingues

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Fábio André dos Santos Brayner

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Maria Amélia Vieira Maciel

Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Marli Tenório Cordeiro

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vera Magalhães da Silveira

Vláudia Maria Assis Costa

CORPO DOCENTE COLABORADOR

Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Rejane Pereira Neves

*À minha mãe **Luziana Martins**,
sem a qual **nada** teria sido possível e à memória de Luziana Martins (avó) que
sempre esteve comigo e sempre estará*

AGRADECIMENTOS

A Deus e todos os espíritos de luz que me guiaram e me concederam paciência, determinação e sabedoria.

Ao setor de oncologia pediátrica (Direção, funcionários, médicos e residentes) do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), pela disponibilização do laboratório de biologia molecular no qual realizei meus experimentos e pela amizade construída ao longo desse tempo.

A todos os funcionários, estagiários, mestrandos e doutorandos do laboratório de biologia molecular do serviço de oncologia molecular do IMIP e do laboratório de Imunogenética do CPqAM pela amizade, carinho e por ter me suportado todo esse tempo: Ester, Juliana, Veruska, Vilma, Manoel, Cordeiro, Vânia, Jéssica, Dalva, Jurandy, João, Carla, Renan, Rossana, André, Lívia, Laís, Renata, Vanessa, Sara, Rafael, Jeane.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), especificamente ao NIT que me ajudou com os sequenciamentos.

À Dra. Valéria Ferreira e o Sr. Vicente Marconi Amorim de Oliveira do Laboratório Central de Pernambuco (LACEN/PE), pela ajuda na coleta de dados referente à contagem de linfócitos CD4+.

Ao Dr. François Figueirôa e Sr. Khaled Almahmoud, da Secretaria Saúde de Pernambuco pela coleta de dados relativos ao uso de TARV.

À Profa. Dra. Terezinha Tenório, pelas coletas de amostras e dados clínicos dos pacientes do Hospital das Clínicas da UFPE e pelo carinho e amizade.

À Prof. Dra. Maria Luiza Bezerra Menezes (CISAM), Coordenadora da pesquisa a qual estive inserido e que possibilitou a execução dessa tese, pela paciência, amizade e admiração.

Ao Prof. Dr. Stefan Welkovic, pelas coletas de amostras e dados clínicos do CISAM e pelo aprendizado e admiração.

Aos funcionários do CISAM que me ajudaram com a coleta e transporte de amostras (Vilma e Ceça) e com os dados de citologia oncológica (Sr. Fernando e Dona Vera).

À Dra. Magda Maruza pelo acesso às informações dos pacientes do Hospital Correia Picanço (HCP).

Aos amigos professores das Faculdades Integradas de Patos-PB, pelo apoio e compreensão durante esse período.

Aos colegas do Doutorado e mestrado e aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A meus pais, pelo amor incondicional, compreensão, apoio e tudo mais que só os pais podem fazer pelos filhos, sem vocês eu não conseguiria alcançar esse objetivo.

A toda minha família e amigos pela compreensão, apoio e carinho: Tio Eudes, Tia Lena, Tia Maíza, Alcione, Allysson, Jamison, Pedro, Alex, Neide, Manoel, Nahum, Júnior, Anderson, Thiago, Macartney.

A Profa. Dra. Norma Lucena, pela orientação, paciência, amizade e por ajudar diretamente e intensamente em meu crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. Ricardo Ximenes, pelo aprendizado, paciência e indiscutível contribuição para minha formação acadêmica e profissional.

A Alessandra de Luna Ramos, pela amizade, carinho e companheirismo que foram determinantes para meu crescimento profissional e pessoal.

“A persistência é o menor caminho do êxito“

Charles Chaplin

RESUMO

Pacientes HIV-positivo possuem uma maior prevalência de co-infecção por HPV de alto risco oncogênico. A presença viral favorece a progressão de lesões escamosas intra-epiteliais e podem induzir ao câncer. O objetivo do presente estudo foi avaliar a prevalência, distribuição dos tipos virais e fatores de risco para a infecção pelo HPV em pacientes infectados por HIV.

Amostras cervicais de 450 mulheres infectadas pelo HIV foram analisadas quanto à citologia oncótica, colposcopia, presença e tipagem de HPV através de PCR e sequenciamento utilizando os iniciadores MY09 e MY11. Os resultados foram analisados comparando dados demográficos, e outros relacionados com a infecção pelo HPV e HIV. A prevalência de HPV foi de 47,5%. Das amostras positivas para o HPV, 59% albergavam tipos de alto risco oncogênico. Análise multivariada confirmou a associação da infecção pelo HPV com a presença de alterações à citologia ($p=0,003$), idade maior ou igual a 35 anos ($p=0,002$); número de parceiros maior que três ($p=0,002$); contagem de linfócitos T CD4+ < 200/mm³ ($p=0,041$), e etilismo ($p=0,004$).

Apesar da presença de HPV de alto risco na maioria das lesões estudadas, a baixa frequência de HPV 16 (3,3%) e o estado imunológico preservado na maioria das pacientes HIV-positivas, são fatores que podem explicar a baixa ocorrência de lesões cervicais pré-cancerosas nessa população.

A persistência da infecção cervical por tipos de alto risco oncogênicos de papiloma vírus humano (HPV) pode levar a neoplasias intra-epiteliais cervicais (NIC). O objetivo do presente estudo foi o de avaliar, em mulheres infectadas pelo HIV, se a presença de aneuploidia em amostras de células cervicais está associada à presença e à evolução de NIC.

O presente estudo constou de 2 etapas. Na primeira etapa, correspondendo a um corte transversal, analisou-se a associação entre a presença de aneuploidia por citometria de fluxo e características sócio-demográficas, hábitos e características ligadas à infecção pelo HPV e HIV. Na segunda etapa, correspondendo a uma coorte, verificou-se se a aneuploidia era preditiva da evolução da NIC.

Não observou-se associação entre a presença de aneuploidia e a infecção por HPV, nem com alterações à citologia oncótica. Por outro lado, a aneuploidia

esteve associada à presença de NIC ($p=0,03?$) no exame histológico e ao não uso de TARV ($p=0,001$). A maioria das mulheres infectadas por HIV (234/272) apresentaram contagem de linfócito T CD4+ normal (acima de 350 células/mm³) e mostraram uma maior taxa de regressão (77,5%) da aneuploidia comparadas à taxa de progressão (23,9%) em até dois anos de seguimento. Embora tenha sido encontrada uma associação entre a presença da lesão tecidual cervical e o índice de DNA, este não foi preditivo da evolução da lesão cervical, sugerindo que a progressão da lesão cervical para o câncer em mulheres HIV-positivas também pode ser alterada pela melhoria do estado imunológico propiciado pelo uso de terapia anti-retroviral (TARV).

Palavras-chave: Prevalência de HPV. Distribuição de tipos de HPV. Co-infecção HIV-HPV. Fatores de risco. Tipos de HPV. Ploidia de DNA.

ABSTRACT

HIV-positive patients have greater prevalence of coinfection with HPV of high oncogenic risk. Presence of the virus favors progression of intraepithelial squamous cell lesions and may induce cancer. The aim of the present study was to evaluate the prevalence of HPV infection, distribution of viral types and HPV risk factors among HIV-positive patients.

Cervical samples from 450 HIV-positive patients were analyzed with regard to oncotic cytology, colposcopy and HPV presence and typing by means of PCR, with sequencing using the primers MY09 and MY11. The results were analyzed by comparing demographic data and other data relating to HPV and HIV infection.

The prevalence of HPV was 47.5%. Among the HPV-positive samples, 59% included viral types of high oncogenic risk. Multivariate analysis showed that there was association between HPV infection and the following: presence of cytological alterations ($p = 0.003$); age greater than or equal to 35 years ($p = 0.002$); number of partners greater than three ($p = 0.002$); CD4+ lymphocyte count $< 200/\text{mm}^3$ ($p = 0.041$); and alcohol abuse ($p = 0.004$).

Although high-risk HPV was present in the majority of the lesions studied, the low frequency of HPV 16 (3.3%), low occurrence of cervical lesions and preserved immunological state in most of the HIV-positive patients were factors that may explain the low occurrence of precancerous cervical lesions in this population.

Persistent cervical infection with oncogenic types of high-risk human papillomavirus (HPV) can lead to cervical intraepithelial neoplasia (CIN). The aim of this study was to evaluate, in HIV-infected women, the presence of aneuploidy in samples of cervical cells is associated the presence and evolution of CIN.

This study consisted of two stages. In the first stage, corresponding to a cross section, we analyzed the association between the presence of aneuloidia by flow cytometry and socio-demographic characteristics, habits, and characteristics related to HPV infection and HIV. In the second stage,

corresponding to a cohort , we determined whether aneuploidy was predictive of the development of CIN .

No association was observed between the presence of aneuploidy and HPV infection, nor with changes to cytology. Furthermore, aneuploidy was associated with CIN ($p = 0.030$) On histologic examination and not using HAART ($p = 0.001$) . The majority of HIV-infected (234/272) women had a count of CD4 + T lymphocytes normal (over 350 cells/mm³), and showed greater regression rate (77.5%) compared to the rate of aneuploidy progression (23.9 %) within two years of follow up .

Although an association has been found between the presence of cervical tissue injury and DNA index, this was not predictive of the development of cervical lesions , suggesting that the progression of cervical lesions to cancer in HIV - positive women can also be changed by improving the immune status afforded by the use of anti - retroviral therapy (HAART) .

Keywords: HPV prevalence; HPV typing distribution; HIV HPV coinfection; risk factors; HPV types, DNA ploidy.

.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática do genoma do HPV	19
Figura 2 – Ciclo vital do HPV.....	22
Figura 3 – Histograma mostrando o resultado da análise de uma amostra com diploidia e outra com aneuploidia.....	29

ARTIGO 1

Figura 1 - Fluxograma mostrando os testes laboratoriais realizados na população estudada, caracterizando as perdas de seguimento.....	43
--	----

ARTIGO 2

Figura 1 - Modelo de progressão de lesão cervical para câncer cervical em mulheres HIV-positivas em tratamento com TARV	74
--	----

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1 – Análise univariada da associação entre infecção por HPV e variáveis sócio-demográficas, hábitos, características associadas a infecção por HPV e características associadas a infecção por HIV em mulheres HIV-positivas atendidas em três centros de referencia para HIV/AIDS em Recife-PE, 2008-2010..... 44

Tabela 2 – Análise multivariada dos fatores de risco para infecção por HPV em mulheres HIV-positivas atendidas em três centros de referência para HIV/AIDS em Recife-PE, 2008 a 2010..... 46

Tabela 3 – Distribuição dos tipos de HPV em amostras cervicais de mulheres co-infectadas com HIV em Recife-PE, 2008 a 2010..... 46

Tabela 4 – Persistência da infecção cervical por HPV em mulheres HIV positivas em Recife-PE, 2008 a 2010..... 47

ARTIGO 2

Tabela 1 - Análise univariada da associação entre índice de DNA e variáveis sócio-demográficas, hábitos, sexuais e reprodutivas relacionadas à infecção por HPV e à infecção por HIV em mulheres HIV-positivas atendidas em três centros de referencia para HIV/AIDS em Recife-PE, 2008-2010..... 67

Tabela 2 - Análise da ploidia celular de acordo com lesões intraepiteliais cervicais em mulheres HIV-positivas atendidas em três centros de referencia para HIV/AIDS em Recife-PE, 2008-2010

Tabela 3 – Associação entre ploidia de células cervicais e resultados de biópsia cervical em mulheres HIV positivas atendida em três centros de referência para HIV/AIDS em Recife-PE, 2008 a 2010..... 71

Tabela 4- Evolução do índice de DNA em mulheres HIV positivas atendidas em três centros de referência para HIV/AIDS em Recife-PE,2008-2010.....	72
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
HIV	Vírus da imunodeficiência (adquirida) humana
HPV	<i>Papillomavirus</i> humano
TARV	Terapia antirretroviral
ASCUS	Atipia de células escamosas de significado indeterminado
ASC-H	Atipia de células escamosas (atípicas) que não permitem excluir lesão de alto grau
LIEBG	Lesão intraepitelial de baixo grau
LIEAG	Lesão intraepitelial de alto grau
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
UNAIDS	Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS
ORF	“Open Reading Frame” (quadro aberto de leitura)
LCR	“Long Control Region” (região controladora longa)
OMS	Organização Mundial de Saúde
INCA	Instituto Nacional de Câncer
DNA	Ácido desoxirribonucleico
JEC	Junção escamo-colunar
IC	Intervalo de confiança
OR	“Odds ratio”
RR	“Relative Risk”
VPP	Valor preditivo positivo
VPN	Valor preditivo negativo
HCP	Hospital Correia Picanço

HC	Hospital das Clínicas
CISAM	Centro Integrado de Saúde Amaury de Medeiros
TE	Tris-EDTA
TAE	Tris-EDTA-ácido acético
DEPC	Dietilpirocarbonato
<i>gapdh</i>	gliceraldeído fosfato desidrogenase
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
RNA	Ácido Ribonucléico
RFLP	Polimorfismo no comprimento de fragmentos obtidos por corte da fita dupla de DNA,
HCl	Ácido clorídrico
ID	Índice de DNA
DST	Doenças sexualmente transmissíveis
fg	Fentogramas
ng	Nanogramas
pb	Pares de bases

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO.....	20
2. REVISAO DA LITERATURA.....	21
2.1. O HPV.....	21
2.2. Epidemiologia do HPV e do câncer cervical.....	22
2.3. Infecção por HPV e câncer cervical	23
2.4. Fatores que influenciam a evolução da lesão cervical.....	25
2.4.1. Fatores associados à infecção pelo HPV.....	25
2.4.2. Co-infecção por HIV e fatores associados.....	27
2.5. Associação de lesão tecidual e alteração da ploidia celular.....	29
2.6. Citometria de fluxo para análise da ploidia celular.....	31
3. PERGUNTAS CONDUTORAS.....	32
4. OBJETIVOS.....	33
4.1. Geral.....	33
4.2. Específicos.....	33
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
5.1. Desenho do estudo.....	34
5.2. Local do estudo.....	34
5.3. População do estudo.....	34
5.4. Variáveis.....	34
5.4.1 Variáveis dependentes.....	34
5.4.2 Variáveis independentes.....	34
5.5. Operacionalização da pesquisa.....	35
5.5.1 Coleta de dados.....	35
5.5.2 Extração de DNA.....	36
5.5.3 Detecção e tipagem de HPV.....	36
5.5.4 Sequenciamento.....	37
5.5.5 Determinação do índice de DNA.....	37
5.6. Considerações éticas.....	38
5.7. Análise estatística.....	38
6. RESULTADOS.....	39
6.1. ARTIGO 1	

Prevalência, distribuição de tipos virais e fatores de risco para a infecção pelo HPV em amostras cervicais de mulheres infectadas por HIV atendidas em três centros de referência para HIV-AIDS no nordeste do Brasil	39
6.2. ARTIGO 2	
Avaliação prognóstica do índice de DNA em amostras cervicais de mulheres co-infectadas HIV-HPV atendidas em centros de referência para HIV-AIDS em Recife	62
7 RECOMENDAÇÕES.....	80
8. CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS.....	82
APÊNDICES.....	93
APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	93
APÊNDICE B – Questionário de Pesquisa.....	95
APÊNDICE C - VERSÃO DO ARTIGO 1 EM INGLÊS.....	102
APÊNDICE D - VERSÃO DO ARTIGO 2 EM INGLÊS.....	133
ANEXOS.....	155
ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UPE.....	155
ANEXO B - Normas para publicação na Memórias do Instituto Oswaldo Cruz	156
ANEXO C - Comprovante eletrônico de submissão (Memórias do Instituto Oswaldo Cruz)	161
ANEXO D – Normas para publicação na Plos One	162
ANEXO E - Comprovante eletrônico de submissão (Plos One)	177

1. APRESENTAÇÃO

O *Papillomavirus* humano (HPV) é o principal agente infeccioso associado a lesões intraepiteliais cervicais. Existem mais de 170 tipos virais, com características de tropismo tecidual e patogenicidade distintos. Os tipos de HPV de baixo risco são responsáveis por lesões benignas na pele, ou no trato genital humano como condilomas acuminados, enquanto os tipos virais de alto risco estão relacionados com lesões pré-cancerosas e câncer cervical.

A infecção pelo HPV geralmente regride em 90% dos casos, nos outros 10% a infecção pode persistir na mucosa cervical e está associada ao desenvolvimento de lesões intraepiteliais mais graves. A infecção por HIV pode contribuir para a evolução desfavorável em pacientes co-infectados pelo HPV, principalmente se esses pacientes estiverem sob imunossupressão (contagem de linfócitos CD4+ <200 células/mm³), condição comumente encontrada em pacientes HIV-positivos sem controle medicamentoso.

Durante o processo de transformação neoplásica, ocorre a integração do genoma do HPV de alto risco oncogênico ao material genético das células cervicais. Este evento leva ao aumento da expressão das proteínas virais E6 e E7 que ao se ligarem as proteínas humanas p53 e pRB respectivamente desregulam o controle sobre o ciclo celular, e conseqüentemente provocam a instabilidade genética, aberrações cromossômicas e desenvolvimento de aneuploidia. A alteração no índice de DNA é um marco na malignização da lesão cervical.

Nesse contexto, no primeiro artigo intitulado “Prevalência, distribuição de tipos virais e fatores de risco para a infecção pelo HPV em amostras cervicais de mulheres infectadas por HIV atendidas em três centros de referência para HIV-AIDS no nordeste do Brasil”, verificou-se a prevalência e distribuição de tipos de HPV em mulheres HIV-positivas, bem como os fatores de risco associados à infecção pelo HPV nessas pacientes. O segundo artigo intitulado “Avaliação Prognóstica do Índice de DNA em amostras cervicais de mulheres co-infectadas HIV-HPV atendidas em centros de referência para HIV-AIDS em Recife”, investigou-se se a técnica de índice de DNA pode ser utilizada na avaliação da progressão/regressão da lesão cervical.

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O HPV

O Papilomavírus humano (HPV) pertence à família *Papillomaviridae*, subfamília *Papillomavirinae* e ao gênero *Papillomavírus* os quais são caracterizados por vírus pequenos, não-envelopados, de DNA dupla-hélice, que se replicam no núcleo de células epiteliais escamosas. O genoma do HPV contém aproximadamente 8 ORFs (*Open Reading Frame* = quadro aberto de leitura) classificados em precoce (E) e tardio (L), no total de aproximadamente 8,000 pares de base (Figura 1) (Favre,1975; Burd,2003). A região E codifica proteínas reguladoras virais, incluindo aquelas necessárias para a iniciação da replicação do DNA viral. Os ORF L1 e L2 codificam proteínas do capsídeo que são expressas somente em células produtivamente infectadas (Sapp et al.,1995). A posição, o tamanho e a função de muitos dos ORF são altamente conservados dentre os papilomavírus (González, 2007).

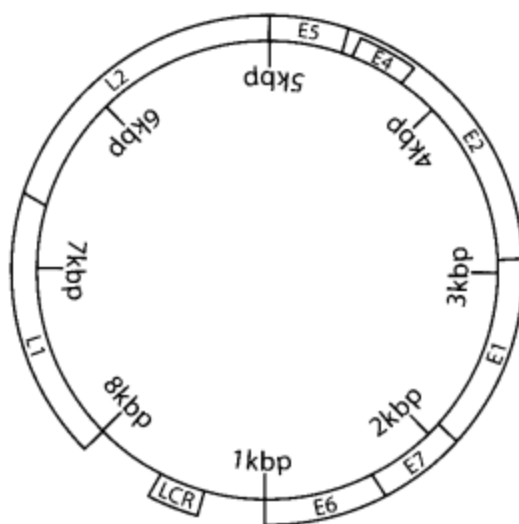


Figura 1. Representação esquemática do genoma do HPV (Burd et al,2003)

As proteínas E1 e E2 são necessárias para a replicação viral do DNA e formam um complexo em torno da origem de replicação. A proteína E2 funciona como um repressor do promotor viral precoce, controlando o mecanismo de

replicação (Stanley, 2008). O gene E3 está presente em poucos tipos de HPV, mas parece não ter função conhecida. A proteína E4 parece estar envolvida em alterações da rede de citoesqueleto. A proteína E5 possui atividade transformante por agir em sinergismo com receptores de fator de crescimento. As proteínas E6 e E7 dos HPV de alto-risco são as principais responsáveis pela transformação das células epiteliais cervicais e atuam na modulação de atividades de proteínas celulares que regulam o ciclo celular (Syrjänen et al.,1999). As regiões tardias L1 e L2 codificam proteínas do capsídeo viral sendo altamente conservadas dentre os papilomavirus e por consistirem em antígenos de superfície são utilizados como alvos para vacinas (Markowitz et al.,2007). Foi demonstrada a importância das proteínas L1 e L2 na ligação a receptores celulares durante os primeiros estágios de infecção celular pelo HPV (Horvath et al.,2010). Variações nas seqüências da região L1 definem a classificação do tipo viral (Kaneshima et al 2003). A região LCR (Long Control Region = região controladora longa) contém elementos reguladores da transcrição e replicação viral (zur Hausen,1996).

2.2 EPIDEMIOLOGIA DO HPV E DO CÂNCER CERVICAL

O HPV é uma das causas mais comuns de doenças sexualmente transmissíveis em mulheres e homens no mundo (zur Hausen,1996). O risco de contrair infecção por HPV é influenciado pela atividade sexual (Walboomers et al.,1999).

Existem mais de 170 tipos de HPV, alguns tipos chamados de baixo grau (tipos 6, 11, 30, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 71, 72, 81, 84, 85, 86) estão relacionados à etiologia de lesões benignas como papilomas, verrugas comuns e condilomas. Os HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, e 82 são vírus de alto risco e são considerados agentes causais de no mínimo 90% dos cânceres de cérvix e também estão relacionados a mais de 50% de outros cânceres anogenitais (zur Hausen,1996; de Villiers, 2004; Bouvard et al.,2009). O HPV 16 é considerado o tipo de alto risco mais comum, encontrado em no mínimo 50% de todos os casos de câncer cervical (Bosch et al.,2008). Há ainda tipos virais cuja classificação de risco não está bem estabelecida, como o HPV 70 que ora é classificado como baixo risco

(Munoz et al., 2003) ou, devido a semelhança filogenética ao HPV18, é considerado de alto risco (de Villiers, 2004).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2008, ocorreram 529.000 casos novos de câncer cervical no mundo. Dentre as 274.000 mulheres que vão a óbito por câncer cervical anualmente, 85% pertencem a países em desenvolvimento (WHO, 2008; Parkin et al., 2005).

No Brasil, as taxas de mortalidade e incidência de câncer cervical em mulheres são de aproximadamente 4,49/100.000 e 19,82/100.000 mulheres respectivamente (INCA, 2012). O câncer cervical é o mais incidente na Região Norte (24/100.000). Nas regiões Centro-Oeste (28/100.000) e Nordeste (18/100.000), o câncer cervical ocupa a segunda posição mais frequente dos tipos de câncer em mulheres e nas regiões Sudeste (15/100.000) e Sul (14/100.000), a terceira posição (INCA, 2012).

2.3 INFECÇÃO POR HPV E CÂNCER CERVICAL

A transmissão do HPV é preferencialmente sexual, haja vista que as lesões em locais extragenitais, como cavidade oral e mamilos, são raras (Doorbar, 2005; Silva et al., 2003).

Mais de 40 tipos de HPV infectam a região anogenital nos seres humanos e podem causar lesões displásicas de baixo e alto grau, sendo que 20 tipos estão associados ao câncer de colo de útero (Schiffman et al., 2005).

A infecção se inicia pela camada basal do epitélio, ocorrendo em locais onde a mesma está exposta, como na junção escamo-colunar (JEC) ou após microtraumas como os que ocorrem durante o coito. Na célula epitelial basal ocorrem as etapas de junção, invaginação da membrana, endocitose e transporte ao núcleo e liberação do DNA viral. Transcrição da região precoce E, tradução das proteínas precoces e a replicação do DNA viral ocorrem na célula epitelial basal e na célula epitelial suprabasal infectada (zur Hausen, 1996). À medida que essas células proliferam e se diferenciam, o HPV produz proteínas virais e se replica utilizando a

maquinaria celular, mantendo assim a infecção latente. A transcrição da região tardia L, produção de proteínas de capsídeo L1 e L2, concentração e liberação de vírions ocorrem no queratinócito diferenciado (Figura 2) (Doorbar, 2005).

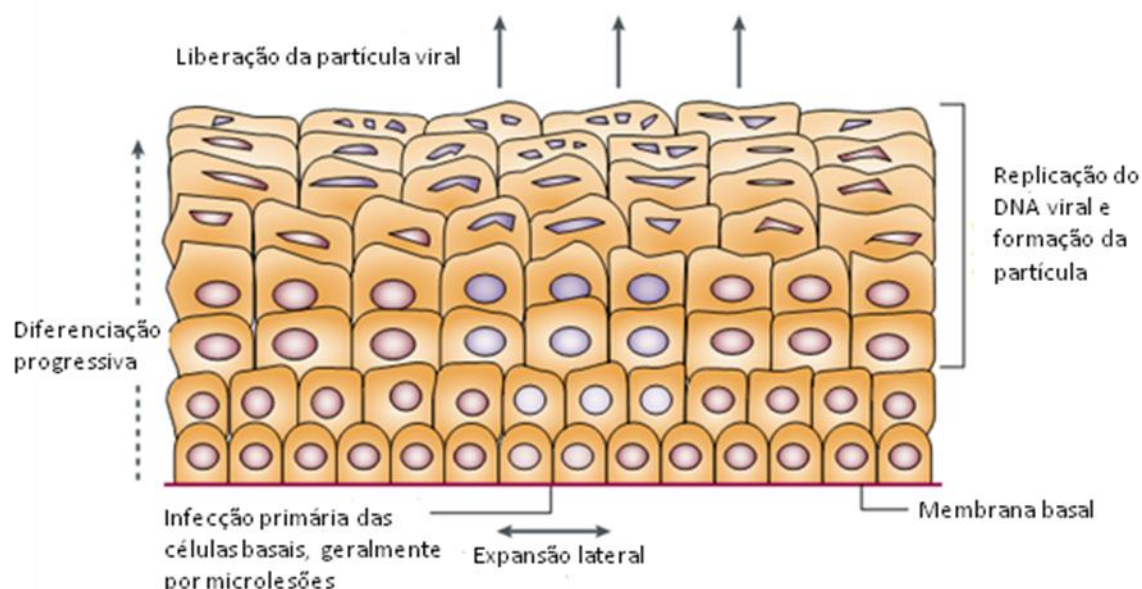


Figura 2. Ciclo vital do HPV (adaptado de zur Hausen, 2002)

A partir da contaminação, o HPV é capaz de estabelecer infecção transitória ou persistente. Na infecção transitória, que ocorre em torno de 80% a 90% das infecções por HPV, o DNA viral torna-se indetectável dentro de 1 a 2 anos após a infecção. A persistência da infecção, determinada pela presença do genoma viral na lesão, está associada aos HPV de alto risco. A persistência de infecção cervical pelos tipos HPV 16/18 por mais de 6 meses mostrou-se associada em 65% das mulheres investigada com desenvolvimento de lesões de alto grau (NIC II/III) (Ho et al., 1998; Stanley, 2008; Trottier et al., 2009).

As lesões por HPV ocorrem em qualquer área da cérvix. Quando ocorre progressão de lesão de baixo grau (infecção por HPV e lesão intraepitelial de baixo grau - LIEBG) para alto grau (lesão intraepitelial de alto grau - LIAG e carcinoma in situ) também ocorre alteração na relação vírus-hospedeiro; e o vírus que nas lesões benignas estava presente na forma episomal e em múltiplas cópias, nas lesões malignas ele passa a forma linear e se integra ao genoma da célula epitelial (Baker et al., 1987; Arends et al., 1998; Thorland et al., 2000; Kalantari et al., 2001 ;

Hudelist et al., 2004; Wentzensen et al., 2004). O sítio de integração do HPV nos cromossomos é aleatório, porém constante em todas as células de um mesmo tumor e parecem ter alguma preferência por alguns sítios no genoma, como aqueles próximos a sequências codificadoras de oncogenes celulares (Wentzensen et al., 2004; Rosty et al., 2006; Couturier et al., 1991; Thorland et al., 2000).

Mulheres com neoplasia intraepitelial cervical (NIC) são assintomáticas. A suspeita diagnóstica é feita através da detecção de células anormais no esfregaço cervical e confirmada na biópsia dirigida pela colposcopia. A divisão da NIC em baixo e alto grau é compatível com a hipótese de que o HPV pode agir como agente infeccioso (NIC de baixo grau) ou neoplásico (NIC de alto grau), produzindo lesões patológicas distintas (Moscicki et al., 2006; Paavonen, 2007).

A NIC de baixo grau causada pela infecção por HPV geralmente é temporária e desaparece com o tempo, embora alguns casos (16%) progridam para NIC de alto grau (Spitzer et al., 1998). As mulheres com NIC de alto grau têm maior risco de desenvolver câncer invasivo, isto geralmente ocorre lentamente no decorrer de muitos anos (Holowaty et al., 1999).

2.4 FATORES QUE INFLUENCIAM A EVOLUÇÃO DA LESÃO CERVICAL

2.4.1 Fatores associados à infecção pelo HPV

A incidência de HPV é mais elevada logo após os primeiros anos de atividade sexual, entre jovens de 18 a 28 anos de idade. Um estudo com adolescentes do Reino Unido (15 a 19 anos de idade) que tiveram só um parceiro sexual revelou que o risco cumulativo de adquirir infecção cervical por HPV em três anos foi de 46% (Collins et al., 2002). Existe declínio visível de sua prevalência com a idade.

Munoz e colaboradores (2004) em um estudo com a população colombiana mostraram risco cumulativo de adquirir infecção cervical por HPV em 5 anos de 42,5% na faixa etária de 15-19 anos e um risco cumulativo de 12,4% na faixa etária ≥ 45 anos. Acredita-se que a causa desse fenômeno dá-se pela redução de exposição a novos parceiros e desenvolvimento de imunidade a alguns tipos de

vírus (Franceschi et al.,2006). Por outro lado, a presença de câncer cervical está associada ao aumento da idade, em decorrência da evolução lenta da lesão cervical a malignidade (Naucler, 2011).

A prevalência da infecção por HPV está associada ao número de parceiros sexuais (Burk et al.,1996; Hariri et AL.,2011), cujo risco em mulheres italianas entre 18 e 24 anos é superior a cinco vezes quando tinham 5 ou mais parceiros (OR= 5,45; IC 95%= 2,62-11,33). Esse estudo italiano mostrou também a associação positiva entre o tabagismo que aumentava em duas vezes o risco de infecção (OR = 2,16; IC 95%= 1.62-2,88); em contraste, o uso de preservativos (OR = 0,50; IC 95%= 0,33-0,77) e a nuliparidade (OR = 0,60; IC 95%= 0,60 – 0,99) mostraram efeito protetor (Confortini et al., 2010).

Os tipos de HPV de alto risco induzem a formação de tumores epiteliais nos seus hospedeiros naturais, além de apresentar um tropismo por células epiteliais escamosas (Schiffman et al,1993), cujo processo de malignidade ao câncer cervical é acelerado pela integração do DNA viral no genoma do hospedeiro, culminado com a alteração na ploidia celular (Klaes et al., 1999).

A integração do DNA viral ocorre com a ruptura da região E2 do genoma viral com perda do seu efeito inibitório sobre o promotor viral da E6 e E7 (Jeon et al., 1995). Conseqüentemente haverá uma maior produção das proteínas E6 e E7, levando a transformação celular e, resultando eventualmente em câncer (De Marco et al., 2007). O potencial oncogênico do vírus está relacionado aos produtos dos genes E6 e E7, que interagem e inativam proteínas celulares codificadas pelos genes supressores de tumores p53 e p105-Rb, promovendo a degradação desses produtos gênicos e bloqueando suas funções (Dyson et al. ,1989; Scheffner et al.,1993). Um exemplo é a redução da expressão da proteína Rb em cultura de queratinócitos expressando proteína E7 do HPV 16 demonstrada recentemente através da técnica de Western blot (Heilman et al.,2009). O resultado da integração do vírus é a instabilidade cromossômica, alteração na ploidia e conseqüente imortalização das células em que o HPV foi integrado, culminando com o surgimento de lesões malignas (Baker et al., 1987; Melsheimer et al., 2004).

Um estudo realizado na Holanda mostrou que a prevalência de infecção por tipos de alto risco é significativamente maior em pacientes com citologia normal quando comparada à infecção por tipos de baixo risco (72% vs 22%, $p < 0,05$) (Jacobs et al., 2000). A presença de HPV não seja suficiente para induzir carcinogênese cervical, entretanto representa fator indispensável, que associado a outros co-fatores desencadeiam o processo de carcinogênese, como o risco aumentado em três vezes para o surgimento de NIC II/III em mulheres fumantes (Kjellberg et al., 2000; Sarian et al., 2009), contudo, há controvérsias no tabagismo como fator de risco para infecção por HPV (Confortini et al., 2010; Melgaço, 2011; Badano, 2011; Mane, 2012) independente das mulheres serem HIV negativas ou HIV positivas.

2.4.2 Co-infecção por HIV e fatores associados

Segundo a UNAIDS, a AIDS pode hoje, ser considerada como a maior pandemia do século XX com cerca de 34,0 milhões de pessoas infectadas no mundo e cerca de 2,5 milhões de casos novos ao ano. A grande maioria dos infectados vive em países do Terceiro Mundo, notadamente na África Sub-Sahariana, onde estão mais de 69% das pessoas vivendo com AIDS no mundo. As mulheres continuam sendo mais afetadas que os homens (58% dos adultos infectados por HIV na África Sub-Sahariana são mulheres) (UNAIDS/WHO, 2012).

Pacientes HIV-positivos têm maior frequência de infecções por HPV. Em seu estudo realizado em Camarões, África, Desruisseau e colaboradores (2009) encontraram prevalência de 81,3% de infecção por HPV em pacientes HIV-positivos em contraste com pacientes HIV-negativos que tiveram prevalência de 51,7%.

Nas mulheres infectadas pelo HIV há uma maior prevalência de tipos de HPV de alto risco oncogênico comparadas com mulheres HIV negativas (Fakhry et al, 2006; Sahasrabuddhe et al., 2010). Existe uma controvérsia em relação a distribuição de tipos de alto risco em mulheres HIV-positivas. Alguns autores mostraram uma maior frequência de HPV 16 e 18 nas amostras cervicais (Ng`andwe et al., 2007; De Vuyst et al., 2008), enquanto que esse fato não foi verificado por

outros autores onde a frequência desses tipos de HPV foram inferiores a outros tipos como os tipos 58, 53, 31 e 33 (Luque et al.,2006; Macleod et al.,2011; Rahman et al.,2011; Garbuglia et al.,2012).

Em um estudo caso-controle realizado no Recife, a frequência de infecção por HPV foi de 74,5% de mulheres não-grávidas HIV-positivas, 80% em mulheres grávidas HIV-negativas e 96% mulheres grávidas HIV-positivas. Dentre as mulheres grávidas co-infectadas HIV/HPV, 60,4% dos tipos de HPV eram de alto risco. Os tipos HPV 16, 58, 18, 66 e 31 foram os mais frequentes (Brandão et al., 2009).

Na Tanzânia, as mulheres HIV-positivas tiveram cerca de três vezes mais risco de desenvolver câncer cervical ($OR=2,9$; $IC95\%=1,4-5,9$), sugerindo que o risco esteja associado com o aumento da persistência do HPV devido à imunossupressão relacionada à infecção pelo HIV (Kahesa et al.,2008).

Minkoff e colaboradores (2001) demonstraram a associação entre regressão e progressão da lesão cervical em pacientes infectados por tipos HPV oncogênicos e uso da terapia antirretroviral de alta potência (TARV). Nesse estudo, nas mulheres fazendo uso de TARV a regressão da lesão foi 1,4 vezes maior do que os pacientes sem uso de TARV ($OR=1,4$; $IC95\%=1,04-1,82$). Em relação à progressão da lesão, os pacientes sem uso de TARV tiveram risco 1,5 vezes maior de progressão comparado aos pacientes em uso de TARV ($OR=1,5$; $IC95\%=1,3-1,9$).

Em outro estudo realizado na França com 121 mulheres soropositivas para o HIV, tratadas previamente por apresentarem algum grau de neoplasia cervical, verificou-se que a TARV tem efeito protetor para recorrência de neoplasia cervical ($RR=0,3$; $IC95\%=0,1-0,7$), inclusive para as lesões intraepiteliais cervicais de alto grau ($RR=0,2$; $IC95\%=0,1-0,7$) (Delmas et al.,2000).

No entanto, há controvérsias em relação ao efeito da TARV na história natural da NIC em mulheres infectadas com HIV. Sahasrabuddhe e colaboradores (2010) relataram que a TARV foi um fator preditor independente para o aumento da gravidade das NIC ($OR= 2,24$; $IC 95\%=1,17-4,26$, $p<0,01$) em mulheres Indianas, onde a mediana da contagem de linfócitos T CD4+ foi de 343/ μ l. Os autores sugeriram que as mulheres fazendo uso de TARV vivem mais do que as que não

usam TARV, e o estado de moderada imunossupressão contribuiria como risco para a lenta progressão das neoplasias cervicais associadas a infecções persistentes de HPV de alto risco.

A contagem de linfócitos T CD4+ menor que 200/mm³ e alta carga viral são fatores de risco adicionais para a progressão da doença. Assim, à medida que a contagem dos linfócitos T CD4+ diminui e a carga viral aumenta, há maior prevalência das infecções HPV latentes e clinicamente expressas, bem como possível progressão das lesões (Meys et al.,2010).

2.5 ASSOCIAÇÃO DE LESÃO TECIDUAL E ALTERAÇÃO DA PLOIDIA CELULAR

Vários autores têm mostrado que a progressão das lesões de baixo para alto grau e para carcinoma invasivo está acompanhada de aneussomias (ganhos e perdas) de várias regiões cromossômicas, em particular dos cromossomos 1, 7 e X (Anton et al.,1997; Hanselaar et al.,1998; Bulten et al.,1998; Heselmeyer et al.,1996; Heselmeyer et al.,1997).

Skyldberg e colaboradores (2001) mostraram que o aumento do grau das lesões cervicais está associado ao aumento do número de centrosomos e aneuploidia. Da mesma forma, Bollmann e colaboradores (2002) mostraram a existência de aneuploidia em pacientes com atipia de células escamosas de significado indeterminado (ASCUS) e que a infecção com tipos de HPV de alto poder oncogênico, estava associada com uma ploidia alterada em 50% das amostras, das quais 25% estavam associadas a HPV de alto risco.

Recentemente, Singh e colaboradores (2008) mostraram um padrão progressivo de lesão cervical que foi associado à persistência da aneuploidia em um estudo que durou 2 anos. Dos 127 casos de lesões intraepiteliais cervicais de baixo e alto grau, 62,9% dos casos apresentou aneuploidia em contraste ao grupo controle (com citologia normal), e ASCUS que apresentaram 8,7% e 14,0% de aneuploidia, respectivamente. A associação da aneuploidia com o grau de lesão intraepitelial cervical foi significativa ($p \leq 0,001$), i.e., o aumento progressivo na aneuploidia

aumenta a gravidade das lesões (49,3% ,77,7% e 91,6% para NIC I,NIC II e NIC III, respectivamente).

Bollmann e colaboradores (2003) mostraram em 112 casos de mulheres com lesões intraepiteliais a prevalência de 98,2% de positividade para o HPV, desses 84,8% tiveram infecção por HPV de alto risco e quase metade (48,4%) das mulheres com infecção por HPV de alto risco tiveram aneuploidias. A aneuploidia foi encontrada em 91,8% dos casos de LIEAG em contraste com 7,9% dos casos de LIEBG com aneuploidias.

A combinação da citologia, presença de HPV de alto risco e aneuploidias mostrou uma sensibilidade de 100%,valor preditivo positivo (VPP) de 81,8% e especificidade de 91,3% para detectar progressão de LIEBG para LIEAG (Bollmann et al., 2005).

O índice de DNA (ID) é uma técnica utilizada para medir a ploidia celular (diploidia quando ID está entre 1,00 e 1,15 e aneuploidia, subdividindo-se em hipodiploidia com $ID < 1,00$ e hiperdiploidia com $ID \geq 1,16$). Recentemente foi comprovado ser um fator prognóstico em estudo retrospectivo realizado com câncer de endométrio onde a ploidia teve associação estatisticamente significativa com a sobrevida geral ($p < 0,003$), e 0,5% dos pacientes com tumores diplóides morreram em contraste aos 33,4% dos pacientes com tumores aneuplóides (Mangili et al., 2008).

Melsheimer e colaboradores (2001) mostraram que o ID seria capaz de identificar mulheres com NIC I/II que persistiram ou progrediram para NIC III em um período de um ano de seguimento, através da detecção de aneuploidia pela citometria de fluxo com valor preditivo positivo (VPP) de 100% (IC 95% 73.5–100%), valor preditivo negativo (VPN) de 44.8% (IC 95%= 31,7–58,5), especificidade de 100% (IC 95%= 86,6-100) e sensibilidade de 27,3% (IC 95%=14,9-42,8) comparados à histologia. Embora a técnica tenha alcançado uma boa especificidade, a baixa sensibilidade restringiu a aplicação clínica do teste, pois 40% evoluíram para formas avançadas mesmo sendo diplóides.

Look e colaboradores (1985) mostraram a importância prognóstica do ID ao medir a ploidia de crianças com leucemia linfóide aguda e encontraram 34,6% de hiperdiploidia e esses pacientes tiveram melhor resposta ao tratamento comparado aos pacientes diplóides ($p=0,002$). De forma semelhante, o ID e a tipagem do HPV podem fornecer informações adicionais ao seguimento de mulheres com LIEBG.

2.6 CITOMETRIA DE FLUXO PARA ANÁLISE DA PLOIDIA CELULAR

A citometria de fluxo é uma técnica de biologia celular que pode ser utilizada para a determinação da ploidia celular através do índice de DNA. A técnica baseia-se na utilização de um corante fluorescente (iodeto de propídio) que se intercala ao DNA dupla fita e que quando excitado pelo laser de argônio emite fluorescência que é detectada por fotomultiplicadores sendo o sinal convertido de um sistema analógico para digital que é analisado por um programa de computador. O resultado da quantidade de DNA é apresentado em histogramas, onde apenas um pico no canal G0/G1 indica diploidia enquanto que a presença de dois picos, um no canal G0/G1 e outro em um canal diferentes deste, caracterizam aneuploidia (figura 3). O índice de DNA é a razão entre o conteúdo de DNA das células analisadas e de células controles de sangue periférico de indivíduos sadios (diplóides). Existe aneuploidia quando o índice de DNA é menor que 1,0 ou maior que 1,15 (FACSCalibur, Becton Dickinson Biosciences, USA).

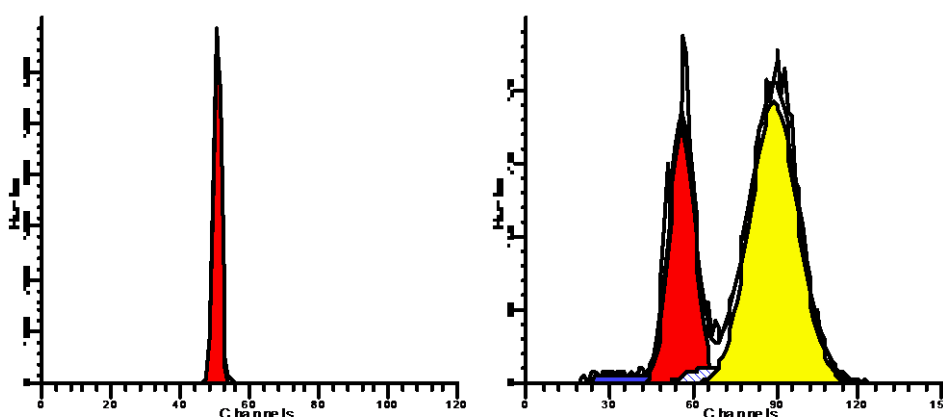


Figura 3. Histograma mostrando o resultado da análise de uma amostra com diploidia (esquerda) e aneuploidia (direita).

3- PERGUNTAS CONDUTORAS

- Qual a prevalência e os tipos de HPV em mulheres HIV - positivas em relação aos dados da literatura para as mulheres HIV - negativas?
- Quais os fatores associados à infecção pelo HPV nas mulheres HIV positivas?
- Qual a frequência de regressão das lesões cervicais em mulheres HIV - positivas infectadas por HPV?
- A determinação do índice de DNA em raspado cervical pode ser um fator preditivo para evolução da lesão cervical em mulheres HIV - positivas?
- Quais os fatores associados à aquisição de aneuploidia em mulheres HIV-positivas?

4- OBJETIVOS

4.1. Geral

Verificar a prevalência, distribuição dos tipos de HPV e evolução da lesão cervical em mulheres infectadas pelo HIV atendidas em centros de referência para HIV/AIDS em Recife, bem como avaliar os fatores de risco para a infecção pelo HPV e aquisição de aneuploidia.

4.2. Específicos

- Determinar a prevalência e a distribuição de tipos de HPV em mulheres infectadas com HIV.
- Determinar fatores clínico, epidemiológicos, virais e imunológicos associados a infecção por HPV e a presença de aneuploidia de células cervicais em mulheres HIV - positivas
- Determinar a persistência da infecção por HPV e progressão/regressão da lesão cervical quanto a aneuploidia das células cervicais nas mulheres co-infectadas HPV-HIV utilizando o índice de DNA.
- Determinar a associação entre NIC e presença de aneuploidias.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Desenho do estudo

Tratou-se de uma coorte prospectiva em um período de um ano e meio. Este tipo de estudo permite avaliar o seguimento das pacientes em relação à evolução da lesão genética (índice de DNA) bem como a infecção pelo HPV. Para a avaliação dos fatores de risco para infecção por HPV e para aneuploidia cervical foi utilizada uma abordagem de caso-controle na avaliação basal da coorte.

5.2. Local do estudo

O estudo foi realizado em três centros de referência para HIV-AIDS em Recife-PE (Hospital Correia Picanço (HCP), Hospital das Clínicas (HC) e Centro Integrado de Saúde Amaury de Medeiros (CISAM).

5.3. População do estudo

A população de estudo foi composta por mulheres infectadas pelo HIV atendidas nos três centros de referência para HIV-AIDS em Recife-PE (HCP, HC e CISAM).

5.4. Categorização das variáveis

5.4.1- Variáveis dependentes

5.4.1.1 Presença de HPV: Variável qualitativa expressando a presença (positividade) ou ausência (negatividade) de HPV

5.4.1.2 Ploidia de células cervicais: Variável qualitativa expressando a presença ou ausência de aneuploidia em células cervicais.

5.4.2 - Variáveis independentes:

A idade foi categorizada considerando a mediana de 35 anos para comparação com os achados na literatura (Garbuglia et al., 2012).

A relação com o tabagismo foi analisada considerando fumantes e ex-fumantes agrupados ou separadamente em relação a não fumantes. Na variável etilismo, o termo “bebedora leve” significa mulheres cuja ingestão alcoólica nos últimos três meses não ultrapassou 14 dias ao mês e cuja dose diária limitou-se a um copo de vinho ou bebida destilada (250 mL), ou uma lata de cerveja (350mL); mulheres com maior ingestão alcoólica foram categorizadas como “bebedoras pesadas”. Usuária de drogas foi considerada aquela que faz ou já fez uso de qualquer droga ilícita (fumada, cheirada ou injetada).

O ponto de corte de 200 células/mm³ de linfócitos T CD4⁺ foi utilizado como expressão da imunossupressão nas pacientes.

5.5 Operacionalização da pesquisa

5.5.1 Coleta de dados

As pacientes incluídas no estudo fizeram parte de uma coorte prospectiva de mulheres infectadas pelo HIV atendidas no Hospital Correia Picanço (HCP), Hospital das Clínicas (HC) e Centro Integrado de Saúde Amaury de Medeiros (CISAM) de Maio de 2007 a Agosto de 2011. Todas as mulheres assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, responderam a um questionário para avaliação clínico-epidemiológica, realizaram colposcopia e exame citológico.

Foram colhidas 2 amostras de material cervical utilizando escova tipo Cytobrush, uma delas foi destinada para a citologia da rotina e a outra para a realização do índice de DNA e biologia molecular. As amostras foram levadas ao laboratório em solução de soro fisiológico para serem processadas. A coleta das amostras das pacientes dos três centros de referência para HIV-AIDS em Recife (HCP, CISAM e HC) ficaram a cargo de médicos especialistas dos respectivos serviços .

A colposcopia foi realizada por um membro da equipe da pesquisa obedecendo à Classificação da Nomenclatura Internacional dos Aspectos Colposcópicos de Roma (SBPTGIC, 2003). Durante o exame colposcópico foram coletados raspados cervicais usando cytobrushes para análise citopatológica e para análise molecular. Os resultados das citologias foram classificados de acordo com

as normas contidas nas diretrizes brasileiras para rastreamento do câncer do colo do útero (INCA, 2013). Nos casos os quais foram identificadas atipias colposcópicas, fragmentos de biópsia cervical foram enviados em formol a 10% para análise histopatológica considerando critérios descritos na literatura (Schneider; Schneider, 1998).

5.5.2 Extração de DNA

Foram utilizados 200 µl da suspensão de células obtidas da cérvix para a extração de DNA, onde foram adicionados 10,8 µl de Tween 20 (20%) e 5 µl de proteinase K (10mg/ml). A amostra foi vortexada e incubada a 65°C por 20 minutos. Foi adicionado 1 volume de fenol-clorofórmio (1:1) à amostra seguindo-se de homogeneização e centrifugação a 12.000 rpm em uma microcentrífuga refrigerada (Eppendorf, modelo 5415R) por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e colocado em tubo eppendorf limpo e adicionado 1 volume de clorofórmio, seguindo-se de homogeneização e centrifugação a 12.000 rpm em microcentrífuga por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e colocado em tubo eppendorf limpo e adicionado 450 µl de isopropanol 100% seguindo-se de incubação a -20°C por 18 horas.

As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 4°C, a 12.000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com etanol a 75%. Após 5 minutos de centrifugação a 10.000rpm, o tubo foi colocado invertido em papel toalha para secar e então foi adicionado solução de TE ou água DEPC de acordo com o tamanho do precipitado. As amostras foram estocadas a 4°C.

5.5.3 Detecção e tipagem de HPV

A qualidade do DNA extraído foi avaliada pela capacidade de amplificação do gene humano constitutivo *gapdh* (que codifica a enzima gliceraldeído fosfato desidrogenase). A reação de PCR foi preparada em um volume final de 25µl contendo 1x tampão da Platinum *Taq* (Invitrogen, São Paulo/Brasil), 1,5mM MgCl₂, 200µM dNTP's, 1,0µM de iniciadores específicos para amplificação do gene *gpdH*, 1,0 unidade de Platinum *Taq* e 2µl da solução de DNA genômico. As condições de reação de PCR foram: 94°C por 5 min; seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 55°C por 40 seg e extensão a 72°C por 45 seg, e finalmente, um ciclo de 72°C por 10 min. Como controle positivo da reação foi utilizada uma amostra de paciente portador de HPV diagnosticado através de

captura híbrida e como controle negativo, a reação na ausência de amostra. O produto amplificado foi visualizado em gel de agarose a 2,0% em tampão TAE corado com 0,5µg/µl de brometo de etídeo sob luz ultravioleta e fotografado com máquina polaróide GelCam. Amostras positivas para *gapdh* e negativas para MY09 e MY11 foram re-amplificadas com outro par de iniciadores (gp5+ e gp6+). A tipagem de HPV foi realizada por sequenciamento.

5.5.4 Sequenciamento

O fragmento amplificado do gene L1 do HPV foi removido do gel de agarose e submetido a purificação com o kit Sephaglas™ BandPrep (Amersham Pharmacia Biotech, USA) como recomendado pelo fabricante e submetido ao sequenciamento. A reação de sequenciamento foi preparada com 10 fg do produto de PCR purificado, 3,2 pmol do primer, 0,5 µl do reagente “Bigdye” (Applied Biosystem, São Paulo/Brasil), 1 µl do reagente “Save money” (200mM of Tris-HCl, pH 9.0 plus 5mM of MgCl₂). As condições de reação foram 1 ciclo a 96°C por 2 min seguidos de 35 ciclos a 96°C por 45 seg, 50°C por 30 seg e 60°C por 4 min. As seqüências foram determinadas pelo equipamento Genetic Analyzing ABI 3100 de 96 capilares (Applied Biosystem). Os cromatogramas foram inicialmente visualizados usando o programa Mega 5.0 (Tamura et al., 2011) para avaliação da qualidade da seqüência. Amostras apresentando picos definidos e baixo background no cromatograma foram submetidas ao programa Blastn do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para identificação do tipo de HPV.

5.5.5 Determinação do índice de DNA

O índice de DNA foi determinado por citometria de fluxo após a permeabilização das células cervicais obtidas, remoção de RNA da amostra, coloração do DNA com iodeto de propídio, excitação com laser 488nm e leitura acima de 600nm. Os histogramas foram analisados pelo programa ModFitLT V3.0 (Verity Software House Inc., Topshame, USA). A presença de dois picos em um histograma com índice acima de 1,15 (hiperplóidia) ou abaixo de 1,00 (hipoploidia), cada um com mais de 10% da população das células analisadas na área correspondente a G0-G1 do ciclo celular, foi considerada aneuploidia (Melsheimer et al., 2004).

5.6 Considerações éticas

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Saúde Amaury de Medeiros (CEP-CISAM, # 0011.0.250.000-05) e todas as mulheres convidadas a participar do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

5.7 Análise estatística

Os dados clínico-epidemiológicos e laboratoriais foram digitados em banco de dados utilizando o programa Excel 2007. Para o estudo de prevalência da infecção pelo HPV foram consideradas como positivas as mulheres que apresentaram pelo menos uma amostra positiva a PCR. A classificação dos tipos de HPV está de acordo com as suas características filogenéticas já previamente discutidas pela literatura (de Villiers et al, 2004).

Para a análise estatística foi usado o programa Stata 10.0 (Stata-Corp LP, College Station, TX). Na análise univariada, foram utilizados o odds ratio (OR) e os respectivos intervalos de confiança (IC) e foi estimado o valor de p (teste χ^2 e a razão de verossimilhança). Associações produzindo valor de $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significantes. Utilizou-se como critério de inclusão das variáveis na análise multivariada um valor de $p < 0,25$ e, para permanecer no modelo, um valor de p menor que 0,05 ou o ajuste do valor de OR de outra variável por um valor superior a 10%. O teste Mann-Whitney foi utilizado na análise de medianas de valores contínuos de grupos não pareados. O teste kappa foi utilizado para medir a concordância entre duas análises consecutivas no estudo.

6 . RESULTADOS

6.1. ARTIGO 1

Artigo submetido à Revista *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* (ANEXO B)

Prevalência, distribuição de tipos virais e fatores de risco para a infecção pelo HPV em amostras cervicais de mulheres infectadas por HIV atendidas em três centros de referência para HIV-AIDS no nordeste do Brasil.

Título resumido: Prevalência, distribuição de tipos virais e fatores de risco para a co-infecção pelo HIV-HPV.

Albert Eduardo Silva Martins ^{1,2},

¹Laboratório de imunogenética, Centro de pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 50670-420, Brasil;

²Laboratório de biologia molecular, Departamento de oncologia pediátrica, Hospital IMIP, Recife, 50070-550, Brasil;

.

Autor para correspondência: Albert Eduardo Silva Martins, Laboratório de imunogenética, Centro de pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife-PE, 50670-901, Brasil (aesmartins@hotmail.com)

Resumo

Introdução. Pacientes HIV-positivo possuem uma maior prevalência de co-infecção por HPV de alto risco oncogênico. A presença viral favorece o desenvolvimento de lesões escamosas intra-epiteliais e podem progredir ao câncer. O objetivo do presente estudo foi avaliar a prevalência, distribuição dos tipos virais e fatores de risco para a infecção pelo HPV em pacientes infectados por HIV.

Métodos. Amostras cervicais de 450 mulheres infectadas pelo HIV foram analisadas quanto à citologia oncótica, colposcopia, presença e tipagem de HPV através de PCR e sequenciamento utilizando os iniciadores MY09 e MY11. Os resultados foram analisados comparando dados demográficos, e outros relacionados com a infecção pelo HPV e HIV.

Resultados. A prevalência de HPV foi de 47,5%. Das amostras positivas para o HPV, 59% albergavam tipos de alto risco oncogênico. Análise multivariada confirmou a associação da infecção pelo HPV com a presença de alterações à citologia ($p=0,003$), idade maior ou igual a 35 anos ($p=0,002$); número de parceiros maior que três ($p=0,002$); contagem de linfócitos T CD4+ < 200/mm³ ($p=0,041$), e etilismo ($p=0,004$).

Conclusões. Apesar da presença de HPV de alto risco na maioria das lesões estudadas, a baixa frequência de HPV 16 (3,3%) e o estado imunológico preservado na maioria das pacientes HIV-positivas, são fatores que podem explicar a baixa ocorrência de lesões cervicais pré-cancerosas nessa população.

Palavras-chave: Prevalência de HPV; Distribuição de tipos de HPV; co-infecção HIV-HPV; fatores de risco ; tipos de HPV.

Introdução

O Papilomavírus humano (HPV) é o principal agente etiológico das lesões cervicais em todo o mundo [1]; e a persistência da infecção por HPV de alto risco está intimamente associada ao desenvolvimento de neoplasias intraepiteliais e câncer cervical [2].

A distribuição de tipos de HPV varia de acordo com a área geográfica e com fatores de risco para aquisição da infecção [3,4]. Em algumas regiões da Europa e América do Norte, a prevalência de HPV 16 é em torno de 43% independente das mulheres serem HIV-negativas e/ou HIV-positivas [5,6,7). Porém, em outras regiões, como na África, os HPV 39, HPV 52 e HPV 58 são igualmente prevalentes em pacientes HIV-positivas [8,9]. Apesar das diferenças regionais na distribuição do tipo viral, a presença de HPV 16 em pacientes com câncer de colo é alta em relação a ausência de câncer, independente das mulheres serem portadoras de HIV ou não [2].

Na região sul/sudeste do Brasil, a prevalência de HPV em mulheres HIV-positivas varia de 49% a 78,8% [10,11,12,13]. No Rio de Janeiro, os tipos mais encontrados foram HPV 16, HPV 53 e HPV 58 [10], sugerindo uma maior circulação de tipos virais não vacinais no país. O presente estudo tem como objetivo avaliar a prevalência da infecção por HPV e a distribuição de tipos virais e identificar os fatores de risco para infecção por HPV em uma coorte de mulheres infectadas com HIV atendidas em três centros de referência para HIV/AIDS na região nordeste do Brasil.

Materiais e métodos

Desenho do estudo

As pacientes incluídas no estudo fizeram parte de uma coorte prospectiva de mulheres infectadas pelo HIV atendidas no Hospital Correia Picano (HCP), Hospital das Clínicas (HC) e Centro Integrado de Saúde Amaury de Medeiros (CISAM) de Maio de 2007 a Agosto de 2011. Os resultados relacionados à prevalência do HPV e à identificação dos fatores de risco para essa infecção foram obtidos na avaliação basal da coorte, enquanto que os dados referentes à evolução da infecção foram obtidos durante o período de acompanhamento. Participaram do estudo 450 mulheres adultas HIV-positivas atendidas no serviço de ginecologia dos três

hospitais centros de referência para HIV-AIDS citados acima. Dessas, 219 pacientes retornaram pelo menos uma vez ao serviço para acompanhamento.

Coleta de dados e padronização das técnicas

Todas as mulheres responderam a um questionário para avaliação clínico-epidemiológica, realizaram colposcopia e exame citológico. A colposcopia foi realizada por um membro da equipe da pesquisa obedecendo à Classificação da Nomenclatura Internacional dos Aspectos Colposcópicos de Roma [14]. Durante o exame colposcópico foram coletados raspados cervicais usando cyto-brushes para análise citopatológica e para análise molecular. Os resultados das citologias foram classificados de acordo com as normas contidas nas diretrizes Brasileiras para rastreamento do câncer do colo do útero [15]. Nos casos onde foram identificadas atipias colposcópicas, fragmentos de biópsia cervical foram enviados em formol a 10% para análise histopatológica considerando critérios descritos na literatura [16].

As amostras de raspado cervical foram armazenadas a -20°C e posteriormente utilizadas para a análise molecular que incluíram a pesquisa do genoma do HPV e nos casos positivos a tipagem molecular.

Detecção de HPV

A extração de DNA genômico das amostras cervicais foi realizada usando proteinase K e a qualidade da amostra foi avaliada pela capacidade de amplificação do gene humano constitutivo *gapdh* (gliceraldeído fosfato desidrogenase). As amostras positivas para a amplificação do gene *gapdh* foram submetidas a PCR usando os iniciadores MY09 e MY11 que amplifica um fragmento de 450 pb da região L1 do HPV [17]. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 2,0 % em tampão TAE corado com 0,5 µg/ml de brometo de etídeo, visualizados sob luz ultravioleta e fotografado com máquina polaróide GelCam.

Tipagem de HPV.

Os produtos da PCR positivos para HPV foram submetidos ao sequenciamento de DNA em ambas as direções com os mesmos iniciadores usados na etapa de amplificação para caracterização do tipo viral, usando o protocolo do “Bigdye” (Applied Biosystem, São Paulo/Brasil) conforme descrito pelo fabricante, e o equipamento Genetic Analyzing ABI 3100 (Applied Biosystem). Os cromatogramas

foram inicialmente visualizados usando o programa Mega 5.0 [18] para avaliação da qualidade da sequência. Amostras apresentando picos definidos e baixo background no cromatograma foram submetidas ao programa Blastn do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para identificação do tipo de HPV.

Análise estatística

Os dados clínico-epidemiológicos e laboratoriais foram digitados em banco de dados utilizando o programa Excel 2007. Para o estudo de prevalência da infecção pelo HPV foram consideradas como positivas as mulheres que apresentaram pelo menos uma amostra positiva a PCR. A classificação dos tipos de HPV está de acordo com as suas características filogenéticas já previamente discutidas pela literatura [19]. A idade foi categorizada considerando a mediana de 35 anos para comparação com os achados na literatura [5]. A relação com o tabagismo foi analisada considerando fumantes e ex-fumantes agrupados ou separadamente em relação a não fumantes. Na variável etilismo, o termo “bebedora leve” significa mulheres cuja ingestão alcoólica nos últimos três meses não ultrapassou 14 dias ao mês e cuja dose diária limitou-se a um copo de vinho ou bebida destilada (250 mL), ou uma lata de cerveja (350mL); mulheres com maior ingestão alcoólica foram categorizadas como “bebedoras pesadas”. Usuária de drogas foi considerada aquela que faz ou já fez uso de qualquer droga ilícita (fumada, cheirada ou injetada). O ponto de corte de 200 células/mm³ de linfócitos T CD4⁺ foi utilizado como expressão da imunossupressão nas pacientes. Para a análise estatística foi usado o programa Stata 10.0 [Stata-Corp LP, College Station, TX]. Na análise univariada, foram utilizados o odds ratio (OR) e os respectivos intervalos de confiança (IC) e foi estimado o valor de p (teste χ^2 e a razão de verossimilhança). Associações produzindo valor de $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significantes. Utilizou-se como critério de inclusão das variáveis na análise multivariada um valor de $p < 0,25$ e, para permanecer no modelo, um valor de p menor que 0,05 ou o ajuste do valor de OR de outra variável por um valor superior a 10%. O teste Mann-Whitney foi utilizado na análise de medianas de valores contínuos de grupos não pareados. O teste kappa foi utilizado para medir a concordância entre duas análises consecutivas no estudo.

Considerações éticas

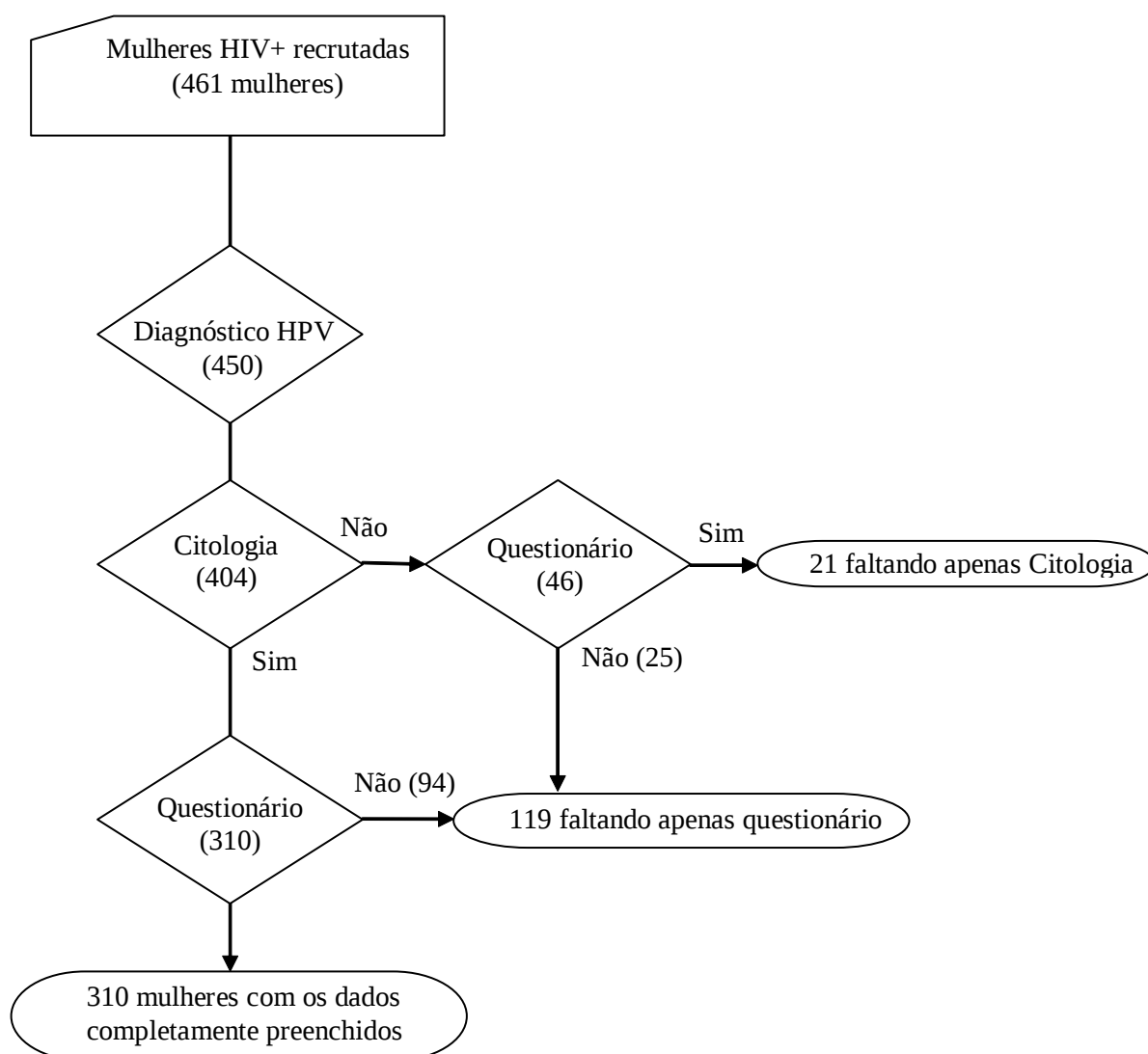
O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Saúde Amaury de Medeiros (CISAM) sob o registro 0011.0.250.000-05. Todas as mulheres que concordaram em participar do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

RESULTS

Identificação de fatores de risco para infecção por HPV

A infecção por HPV foi investigada em 450 mulheres infectadas por HIV atendidas em três serviços de referência para HIV-AIDS em Pernambuco, das quais 214 (47,5%) estavam co-infectadas pelo HPV. Trezentos e dez (68,9%) mulheres responderam ao questionário da pesquisa. As perdas estão descritas na Figura 1.

Figura 1. Fluxograma mostrando os testes laboratoriais realizados na população estudada, caracterizando as perdas de seguimento.



A análise univariada da associação entre infecção por HPV e variáveis sócio-demográficas, hábitos, características associadas à infecção por HPV e características associadas a infecção por HIV estão na Tabela 1 . O perfil das mulheres co-infectadas pelo HPV mostrou-se semelhante ao das mulheres HIV positivas sem infecção detectável pelo HPV em relação ao rendimento familiar ($p=0,352$), tabagismo ($0,384$), etilismo ($0,184$), uso de drogas ($p=0,350$) e gravidez ao diagnóstico ($p=0,357$). Por outro lado, a idade inferior a 35 anos ($p=0,005$), o tempo de infecção pelo HIV inferior a 24 meses ($p=0,026$), o número de parceiros superior a três ($p=0,028$), contagem de CD4+ <200/mm³ ($p=0,044$) e a escolaridade superior a oito anos de estudo ($p=0,026$) mostraram-se associados a co-infecção pelo HPV .

Tabela 1. Análise univariada da associação entre infecção por HPV e variáveis sócio-demográficas, hábitos, características associadas a infecção por HPV e características associadas a infecção por HIV em mulheres HIV-positivas atendidas em três centros de referência para HIV/AIDS na cidade de Recife-PE, 2008-2010.

Característica	HPV positivos (%)	HPV negativos (%)	OR (IC95%)	P
Característica Sócio demográficas				
Idade (mediana de 34 anos)				
>= 35 anos	48(36,92)	104(52,79)	0,52(0,33-0,82)	0,005
<35 anos	82(63,08)	93(47,21)	1,00	
Total	130(100)	197(100)		
Alfabetizada				
Não	19(14,29)	24(11,76)	1,23(0,64-2,35)	0,422
Sim	114(85,71)	178(87,25)	1,00	
Total	133(100)	204(100)		
Escolaridade				
Médio/superior	54(40,60)	58(28,86)	1,68(1,06-2,67)	0,026
Fundamental	79(59,40)	143(71,14)	1,00	
Total	133(100)	201(100)		
Rendimento				
<1 salário mínimo	38(32,76)	49(27,68)	1,27(0,76-2,11)	0,352
>=1salário mínimo	78(67,24)	128(72,32)	1,00	
Total	116(100)	177(60,41)		
Hábitos				
Tabagismo				
Fumantes	29(24,58)	31(17,92)	1,50(0,83-2,74)	0,177
Ex-fumantes	27(22,88)	42(24,28)	1,03(0,58-1,84)	0,902
Não fumantes	62(52,54)	100(57,80)	1,00	

Total	118(100)	173(100)		
Etilismo				
Bebedor pesado	10(7,75)	24(12,12)	0,50(0,22-1,14)	0,102
Bebedor leve	66(51,16)	110(55,56)	0,72(0,45-1,16)	0,184
Abstêmio	53(41,09)	64(32,32)	1,00	
Total	129(100)	198(100)		
Usuário de drogas fumadas				
Sim	22(16,92)	26(13,07)	1,35(0,73-2,51)	0,333
Não	108(83,08)	173(86,93)	1,00	
Total	130(100)	199(100)		
Usuário de drogas cheiradas				
Sim	15(11,72)	20(10,10)	1,18(0,58-2,40)	0,645
Não	113(88,28)	178(89,90)	1,00	
Total	128(100)	198(100)		
Usuário de drogas				
Sim	24(19,51)	30(15,46)	1,32(0,73-2,39)	0,350
Não	99(80,49)	164(84,54)	1,00	
Total	123(100)	194(100)		
Características associadas à infecção por HPV				
Número de parceiros				
>=4 parceiros	56(45,90)	64(33,51)	1,68(1,05-2,68)	0,028
1-3 parceiros	66(54,10)	127(66,49)	1,00	
Total	122(100)	191(100)		
Gravidez ao diagnóstico de HPV				
Sim	24(18,75)	29(14,87)	1,32(0,72-2,39)	0,357
Não	104(81,25)	166(85,13)	1,00	
Total	128(100)	195(100)		
Exame Papanicolau				
Não	27 (21,09)	44 (22,22)	0,93 (0,54-1,60)	0,810
Sim	101 (78,91)	154 (77,78)		
Total	128 (100)	198 (100)		
Frequência do Papanicolau				
Outro	39 (32,50)	52 (29,05)	1,18 (0,71-1,94)	0,525
Pelo menos 1 vez ao ano	81 (67,50)	127 (70,95)		
Total	120 (100)	179 (100)		
Presença de alterações citológicas				
Com alguma alteração	31(25,62)	18(9,52)	3,27(1,73-6,17)	0,000
Sem alteração	90(74,38)	171(90,48)	1,00	
Total	121(100)	189(100)}		

Características associadas à infecção por HIV				
Contagem de linfócitos T CD 4+ (*)				
<200/mm ³	23(20,54)	18(10,40)	2,21(1,13-4,31)	0,044
≥200/mm ³	89(79,46)	154(89,02)	1,00	
Total	112(100)	172(100)		
Tempo de diagnóstico de HIV				
≥24 meses	69 (55,20)	133 (67,51)	0,59 (0,37-0,94)	0,026
<24 meses	56 (44,80)	64 (32,49)		
Total	125 (100)	197 (100)		
Uso de TARV				
Não	33(30,28)	41(22,53)	1,49(0,87-2,55)	0,142
Sim	76(69,72)	141(77,47)	1,00	
Total	109(100)	182(100)		

(*)Na contagem de linfócitos T CD4+ foi considerado o resultado mais próximo da entrevista

A presença de lesão cervical mostrou-se predominante em pacientes HPV-positivos ($p < 0,000$). Por outro lado, não houve diferença entre a presença de lesão cervical e o do grau de oncogenicidade ($p = 0,884$) (dado não apresentado na tabela). A presença de lesão cervical, embora tenha apresentado uma associação estatisticamente significativa, não foi incluída no modelo multivariado por não ser considerada um fator de risco para infecção por HPV.

Após a análise multivariada, permaneceram no modelo final a idade inferior a 35 anos ($p = 0,001$); escolaridade ($p = 0,04$), número de parceiros maior que três ($p = 0,01$), contagem de linfócitos T CD4+ < 200/mm³ ($p = 0,018$) e bebedor leve ($p = 0,018$) e pesado ($p = 0,003$) (Tabela 2).

Table 2. Análise multivariada dos fatores de risco para infecção por HPV em mulheres HIV-positivas atendidas em três centros de referência para HIV/AIDS em Recife-PE, 2008 a 2010.

Presença de HPV	Odds Ratio	[95% - Conf. Interval]	p
Idade			
≥35 anos	0.35	0.19-0.64	0.001
< 35 anos	1.00		
Escolaridade			
> 8 anos	1.93	1.03-3.63	0,040
≤ 8 anos	1.00		
Número de parceiros			
≥ 4 parceiros	2.30	1.22-4.33	0.010
1-3 parceiros	1.00		

Linfócitos T CD4+			
< 200/mm ³	2.72	1.19-6.23	0.018
≥200/mm ³	1.00		
Etilismo			
Bebedor leve	0.46	0.24-0.87	0.018
Bebedor pesado	0.12	0.03-0.48	0.003
Abstêmio	1.00		

Em uma análise adicional, considerando todas as amostras de citologia avaliadas (avaliação basal e avaliações subsequentes), a infecção por HPV foi evidenciada em 65,8% (54/82) das amostras com alteração citológicas, enquanto que apenas 31,8% (145/521) das amostras sem alteração à citologia foram positivas para HPV. Das 54 amostras HPV positivas com alteração citológica, sete foram diagnosticadas como ASCUS (13,0%) na citologia, duas como ASC-H (3,7%), três com presença de HPV (5,5%), vinte e sete como LIEBG (50%) e quinze (27,8%) como LIEAG. Das 28 amostras HPV negativas com alteração na citologia oncótica, onze delas tiveram diagnóstico de ASCUS (39,3%), uma com evidência de infecção por HPV (3,6%), doze (42,9%) como LIEBG e quatro (14,3%) como LIEAG.

Tipagem HPV

Dentre as 450 mulheres estudadas, 214 (47,5%) estavam co-infectadas pelo HPV. Destas, 178 tiveram em pelo menos uma ocasião a tipagem do HPV realizada. A Tabela 3 mostra a distribuição do tipo de HPV considerando 149 pacientes com amostras únicas, 23 mulheres com duas amostras, cinco mulheres com três amostras e uma mulher com quatro amostras. Os tipos mais frequentes foram o HPV53 (14,5%), HPV58 (13,5%), HPV31 (10,7%), HPV6 (9,3%), HPV61 (8,9%) e HPV11 (7,5%) representando 64,4% do total de casos. Os tipos HPV-16 (3,3%) e HPV-18 (1,9%) apresentaram baixa frequência.

Tabela 3. Distribuição dos tipos de HPV em amostras cervicais de mulheres co-infectadas com HIV em Recife-PE, 2008 a 2010*

Grupo HPV	Tipos HPV	N	%
Baixo Risco	6	20	9,3
	11	16	7,5

	61	19	8,9
	54, 81, 84	4	1,9
	62, 71, 85	2	0,9
	72, 86	1	0,5
	Todos	75	35,1
	53	31	14,5
	58	29	13,5
	31	23	10,7
	66	11	5,1
	16	7	3,3
Alto Risco	33	6	2,8
	18	4	1,9
	59, 70, 82	3	1,4
	45, 52	2	0,9
	56, 69	1	0,5
	Todos	126	58,8
	MM7	8	3,7
	MM8	3	1,4
Indeterminado	CY09-427, IS887	1	0,5
	Todos	13	6,1
Total		214	100

*O número de amostras refere-se a todas as amostras analisadas considerando o diagnóstico e o retorno.

Das 54 amostras HPV positivas com alteração citológica, 49 (90,7%) tiveram o tipo viral identificado. Das 39 amostras com displasias leves (ASCUS, ASC-H, HPV e LIEBG), 21 (54%) amostras foram tipadas com HPV de alto grau, sendo o tipo HPV 53 o mais frequente (8 amostras). Nas mulheres com displasia moderada (LIEAG), também foi identificado HPV de alto grau em 53% das 15 amostras avaliadas, sendo o HPV 58 o mais prevalente (3/8).

A biópsia foi realizada em 50 das amostras positivas para o HPV que apresentaram atipias na colposcopia, das quais 20 (40%) não apresentaram alteração histológica, oito foram diagnosticadas como HPV (16%), 12 como NIC I (24%), nove como NIC II (18%) e uma amostra como NIC III (2%). Os tipos HPV mais prevalentes na biópsia foram HPV 16 (em 3 casos NIC II), HPV 31 (em 3 casos NIC I) e HPV 53 (em 1 caso NIC I e NIC II). A amostra diagnosticada com NIC III apresentou HPV 33.

Por outro lado, considerando as sete amostras positivas para HPV 16 em nosso estudo, apenas uma foi caracterizada como LIEAG na citologia e NIC II na biópsia; das seis negativas na citologia, três tinham indicação para a realização da biópsia, sendo duas caracterizadas histologicamente como NIC II e uma negativa. As três mulheres, que apresentaram NIC II na histologia, possuíam contagem de

linfócitos T CD4+ acima de 200/mm³. Considerando a imunossupressão imunológica, distribuição de HPV de alto e baixo risco nas mulheres com linfócitos T CD4+ < 200/mm³ não diferiu daquelas com estado imunológico preservado linfócitos T CD4+ ≥ 200/mm³ (p=0,316).

Evolução da infecção por HPV

Dentre as mulheres infectadas pelo HIV e acompanhadas clinicamente, o diagnóstico molecular da infecção pelo HPV foi realizado em duas ou mais amostras cervicais consecutivas em 196 mulheres, das quais 86 (43,8%) foram negativas para HPV nas duas ocasiões (Tabela 4). Das 76 mulheres positivas para o HPV na primeira ocasião, 50 delas tornaram-se negativas em outras amostras, exibindo uma taxa de regressão de 65,8%. Das 120 mulheres negativas para o HPV no primeiro momento, 86 (71,7%) delas permaneceram negativas e 34 (28,3%) tornaram-se positivas. A concordância da detecção de HPV entre a primeira e última amostra analisada foi considerada moderada (k=0,571) de acordo com a interpretação sugerida por Landis and Koch (1977) [41].

Foi observada persistência de infecção pelo HPV em 26 (13,4%) mulheres, das quais em 23 foi possível realizar a tipagem de todas as amostras. Seis mulheres (26,1%) mantiveram o mesmo tipo viral e 17 (74,0%) apresentaram vírus com o mesmo grau de oncogenicidade, porém com um tipo viral diferente.

Tabela 4. Persistência da infecção cervical por HPV em mulheres HIV positivas em Recife-PE, 2008 a 2010.

Amostra inicial	Amostra final		Concordância	
	Positivo	Negativo	Esperada	Kappa
HPV				
Positivo	26	50	0,571	0,061
Negativo	34	86		
Total	60	136		

DISCUSSÃO

Nesse estudo, realizado em mulheres HIV-positivas atendidas em três centros de referência para HIV-AIDS em Pernambuco, encontramos uma prevalência da infecção por HPV de 46,5%, onde os tipos mais frequentes foram o HPV53, HPV58, HPV31, HPV6, HPV61 e HPV11. A infecção por HPV foi associada a idade inferior a 35 anos, o tempo de infecção pelo HIV inferior a 24 meses, o número de parceiros superior a três, contagem de CD4+ <200/mm³ e a escolaridade superior a oito anos de estudo. Em relação à evolução da infecção pelo HPV, foi observada uma taxa de regressão de 65,8% em contraste com a taxa de progressão de 28,3%

Frequencia de HPV nas infecções cervicais em mulheres HIV positivas

A prevalência da co-infecção pelo HPV (47,5%) em mulheres infectadas pelo HIV em Pernambuco, nordeste do Brasil, é semelhante às relatadas na América do Norte e em alguns países da Europa, mas é menor do que a encontrada nas populações do sul e sudeste do Brasil (65%) [20, 10-11]. Nesse aspecto, devemos considerar a influência da técnica utilizada no diagnóstico da infecção pelo HPV. Um estudo espanhol mostrou que a prevalência de co-infecção por HPV dentre 93 mulheres infectadas por HIV-1 com citologia oncológica normal foi de 41% utilizando o método de captura - híbrida II para detecção de HPV, mas de 63% utilizando PCR com 16 iniciadores tipo-específico [21]. A PCR com iniciadores degenerados MY9/MY11 foi o método utilizado no nosso estudo, sendo possível que a baixa prevalência da infecção encontrada seja devido a menor sensibilidade do método em relação a métodos como a nested-PCR ou PCR seguida por hibridização, utilizados em outras casuísticas. A prevalência também irá sofrer influência dos critérios de seleção dos pacientes, se eles são recrutados em serviço de referência para portadores de HIV, tratamento de câncer, ou clínica ginecológica [2].

As mulheres HIV-positivas foram mais susceptíveis a infecção por HPV de alto risco conhecidamente como menos prevalentes, tais como HPV 53 (14,4%), e HPV 58 (13,4%) que os tipos HPV 16 (3,3%) e HPV 18 (1,9%), sendo o tipo HPV 16 o mais encontrado em mulheres HIV-negativas no nosso estado associado a presença de NIC [22,23]. Apesar da literatura mostrar em mulheres HIV-positivas a maior prevalência dos tipos virais HPV 52, 53, 56 e 58 em relação ao HPV 16, a infecção pelo HPV 16 é maior do que a encontrada no presente estudo [5,8,9,24].

Notavelmente, no sudeste do Brasil, mulheres HIV-positivas apresentaram maior frequência de infecção por HPV 16 (21%), seguida por HPV 53 (9%) e HPV 58 (9%), sugerindo que a frequência do tipo viral em mulheres HIV-positivas pode estar relacionada também a distribuição geográfica dos tipos virais [10]. Contudo, não podemos afastar a possibilidade da baixa frequência da infecção por HPV16 e HPV18 no nosso estudo estar relacionada à impossibilidade de determinação do tipo viral em 50 amostras, cujo cromatograma ao sequenciamento sugere a presença de infecção cervical por mais de um tipo de HPV, fato também confirmado pelo padrão de bandejamento obtido através do protocolo de PCR-RFLP (dados não mostrados). Entretanto, mesmo considerando as 50 amostras com infecção múltipla incluindo o HPV 16 como uma possibilidade, ainda assim a frequência desse tipo seria baixa.

Fatores de Risco para infecções por HPV

A relação entre a presença de HPV e a alteração na citologia oncótica cervical e presença de NIC é reconhecida em vários estudos [7,8,9,10]. Há, contudo, controvérsias na casualidade das alterações epiteliais e a infecção pelo HPV, i.e., as lesões epiteliais são fatores de risco para a infecção pelo HPV ou são uma consequência da infecção pelo HPV? Um estudo de coorte com trabalhadoras do sexo, HIV-positivos e negativos, mostrou que infecções crônicas com grande potencial de dano epitelial como a *N. Gonorrhoe* e *Chlamydia* estiveram associadas à aquisição de HPV de alto risco, mas não às bacterioses com menor dano epitelial [25]. Outros autores relatam que a associação entre a infecção pelo HPV e infecções por bacterioses e *Trichomonas* podem ocorrer independente da presença de alteração citológica [26,27], atuando como co-fatores para o desenvolvimento de NIC II [28]. As infecções crônicas vaginais causadas por bactérias anaeróbicas agem como co-fatores no surgimento de NIC independente da infecção por HPV, mediante o mecanismo de perda de barreira natural do lactobacillus, com alteração de pH vaginal e produção de aductos de DNA [29]. A ausência de informação sobre bacterioses associadas e o reduzido número de mulheres com alterações citológicas graves não permitiu uma avaliação mais detalhada sobre a associação da infecção pelo HPV com presença de alterações citológicas. Nesse contexto, consideramos que a lesão tecidual facilita o acesso e instalação do HPV na camada basal cervical, mas não está diretamente relacionada à maior chance de exposição e que o vírus poderá ser eliminado com a resolução da lesão mediante uma resposta imunológica

adequada. Contudo, a persistência da infecção viral ativa pode levar ao agravamento progressivo da lesão tecidual, sugerindo que a lesão citológica possa ser causa e consequência da infecção pelo HPV. Outro aspecto importante a considerar é o fato da própria infecção pelo HIV também aumentar o risco de alterações citológicas e infecção por HPV de forma independente [30].

A diminuição gradual da ocorrência de infecção pelo HPV em mulheres a partir de 35 anos ($p=0,001$) corrobora com os dados da literatura [5, 10], e pode ser explicada pela diminuição de parceiros sexuais e imunidade contra infecções adquiridas no passado [31].

O número de parceiros também esteve associado à infecção pelo HPV nas mulheres estudadas ($p=0,009$). A associação entre número de parceiros e infecção pelo HPV já é conhecida em mulheres HIV-negativas [32] e HIV-positivas [33], o que pode ser explicado pela maior exposição à DSTs [6].

Embora o tempo de diagnóstico do HIV menor que 24 meses não tenha permanecido na análise multivariada, um estudo realizado na cidade brasileira do Rio de Janeiro, considerando um tempo de diagnóstico de HIV inferior a quatro anos ($p<0,008$) mostrou-se associado com a infecção por HPV [10].

Em geral, o tratamento com TARV é iniciado quando os níveis de linfócitos T CD4+ encontram-se abaixo dos $350/\text{mm}^3$, de forma que é possível que pacientes HIV-positivas apresentem certo comprometimento da imunidade no período que antecede o início do tratamento, promovendo aumento da susceptibilidade às infecções [34]. Mulheres com contagem de linfócitos T CD4+ abaixo de $200/\text{mm}^3$, o que caracteriza imunossupressão, apresentaram uma chance quase três vezes maior de adquirir a infecção por HPV ($p=0,016$), corroborando com outros achados na literatura [5,10].

A associação do etilismo pesado ($p=0,102$) ou leve ($p=0,184$) com a infecção cervical pelo HPV mostrou-se com valor de p maior do que 0,05 na análise univariada, mas permaneceu no modelo final da análise multivariada ($p=0,003$ e $p=0,018$, respectivamente). Como não há plausibilidade biológica para o etilismo ser considerado fator de proteção para a aquisição da infecção por HPV, acreditamos que possa ter ocorrido um viés de informação no momento da aplicação dos questionários de pesquisa ou talvez o etilismo esteja expressando outra variável que não tenha sido considerada no estudo. O etilismo não se mostrou associado a

infecção cervical pelo HPV em mulheres HIV-positivas em um estudo no sudeste do Brasil [10].

A associação de tabagismo com câncer cervical em pacientes infectados pelo HIV já foi descrita [2,35]. Contudo, o tabagismo parece não estar envolvido com aquisição de infecção por HPV, embora seu papel na patogênese do desenvolvimento de câncer cervical seja conhecido [36]. Não encontramos associação entre o tabagismo e a infecção pelo HPV em mulheres HIV positivas, talvez pelo fato de na nossa população de estudo termos uma baixa prevalência de NIC (4,6%) e câncer cervical (0,14%).

A associação da infecção pelo HPV com educação é controversa. No nosso estudo, as mulheres HIV-positivas com maior nível educacional, i.e., com pelo menos 8 anos de estudo, apresentaram uma chance duas vezes maior de infecção pelo HPV. Contudo, outros estudos brasileiros mostraram a ausência de relação entre a infecção pelo HPV em mulheres HIV-positivas e seu nível educacional [10,11].

Nesse contexto, nós analisamos a aderência ao programa de Prevenção de Câncer Cervical do Ministério da Saúde do Brasil pelas mulheres HIV-positivas de acordo com seu nível educacional, e encontramos uma associação entre mulheres com maior nível educacional e a não realização do exame papanicolau ($\chi^2=4,43$; $p=0,035$), e as mulheres que realizaram o exame, o faziam em intervalos superiores a 1 ano ($\chi^2=6,45$; $p=0,011$). Talvez, esses achados possam sugerir o menor nível de cuidado com a saúde dessas mulheres.

Evolução da infecção por HPV em mulheres infectadas por HIV

Dentre as 196 mulheres HIV-positivas seguidas por quatro anos encontramos uma persistência de HPV baixa (13,4%) em relação à persistência da infecção pelo HPV em mulheres HIV-negativas relatada nos estudos alemão (56%), holandês (44%) e africano (32%) [25,37-38]. Uma das explicações está na menor prevalência de lesão cervical (13,9%) nas nossas pacientes, possivelmente, devido ao melhor estado imunológico avaliado pela contagem de linfócito T CD4+ superior a 200 células/mm³ em 80% das mulheres, independentes da presença de co-infecção para HPV. Aparentemente, o tipo de HPV, além do tempo de infecção, está associado à maior taxa de persistência. Considerando apenas infecção por HPV de alto risco, um estudo holandês com mulheres HIV-negativas mostrou que a chance de persistência

de HPV em 2 anos de acompanhamento era cinco vezes maior nas mulheres que tiveram a infecção diagnosticada na avaliação basal quando comparadas às infecções diagnosticadas no final do primeiro ano do estudo [38].

A contagem de linfócitos T CD4+ maior que 200/mm³ é um fator associado com a regressão da infecção por HPV em mulheres infectadas por HIV tanto de alto risco quanto de baixo risco [39,40]. Considerando a presença de HPV na amostra cervical em amostras de acompanhamento das nossas pacientes, a taxa de regressão aferida pelo teste negativo, foi de 65,8% dos casos positivos na primeira avaliação, enquanto a taxa de progressão, i.e., presença de HPV na última amostra avaliada em mulheres que inicialmente eram negativas foi de apenas 28,3%, refletindo mais uma vez o bom estado imunológico em que as pacientes se encontram, e a qualidade de atendimento prestado pelo Sistema Único de Saúde Brasileiro, que oferece medicação gratuita para todos os infectados pelo HIV e acompanhamento clínico com contagem de linfócitos T CD4+, e exame citológico cervical anual. Dentre as dificuldades próprias de um estudo de coorte prospectivo, algumas já mencionadas, a baixa taxa de retorno das mulheres para avaliação de seguimento foi uma limitação na avaliação da evolução da doença.

Em conclusão, a baixa prevalência da infecção por HPV16 em mulheres HIV-positivas com citologia normal e um melhor estado imunológico das mulheres avaliadas talvez possa explicar a baixa ocorrência de lesões cervicais graves. Estudos recentes mostraram que a prevalência de HPV-16 variou de 13,9% a 49,4% em nossa região [22,23]. Para a realização desses estudos foram selecionadas mulheres HIV-negativas com prévia positividade para HPV ou mulheres HIV-positivas grávidas. A diferença entre os grupos impossibilitou uma comparação direta com nosso estudo. A variabilidade regional de sub-tipos de HPV mostra-se um fator relevante na política de desenvolvimento de vacinas tipo-específica anti-HPV. Apesar do cenário favorável apresentado nesse estudo, novos estudos poderão esclarecer o efeito da infecção cervical por esses subtipos não HPV 16 com a persistência da doença e a ocorrência de NIC nas pacientes HIV-positivas. Estudos com maior número de amostras e com menor perda de informação poderá ajudar a entender melhor a associação entre a infecção por HPV e HIV. Estudos de persistência de infecção de HPV podem melhorar o entendimento sobre o desfecho da infecção em pacientes HIV-positivos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Sr. Vicente Marconi Amorim de Oliveira do Laboratório Central do Estado de Pernambuco pela coleta de dados referente à contagem de linfócitos CD4+; ao Dr François Figueirôa e Sr. Khaled Almahnoud, da Secretaria Saúde de Pernambuco pela coleta de dados relativos ao uso de TARV.

REFERÊNCIAS

1. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189:12-9.
2. Naucler P, Mabota da Costa F, da Costa JL, et al. Human papillomavirus type-specific risk of cervical cancer in a population with high human immunodeficiency virus prevalence: case-control study. *J Gen Virol* 2011; 92:2784-91.
3. Giuliano AR, Papenfuss M, Schneider A, et al. Risk factors for high-risk type human papillomavirus infection among Mexican-American women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8:615-20.
4. Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, et al. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:1157-64.
5. Garbuglia AR, Piselli P, Lapa D, et al. Frequency and multiplicity of human papillomavirus infection in HIV-1 positive women in Italy. *J Clin Virol* 2012; 54:141-6.
6. Hariri S, Unger ER, Sternberg M, et al. Prevalence of genital human papillomavirus among females in the United States, the National Health And Nutrition Examination Survey, 2003-2006. *J Infect Dis* 2011; 204:566-73.
7. Martín P, Kilany L, García D, López-García AM, Martín-Azaña MJ, Abaira V, Bellas C. Human papillomavirus genotype distribution in Madrid and correlation with cytological data. *BMC Infect Dis* 2011;11:316.
8. Macleod IJ, O'Donnell B, Moyo S, et al. Prevalence of human papillomavirus genotypes and associated cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-infected women in Botswana. *J Med Virol* 2011; 83:1689-95.
9. Rahman M, Sasagawa T, Yamada R, Kingoro A, Ichimura H, Makinoda S. High prevalence of intermediate-risk human papillomavirus infection in uterine cervixes of

Kenyan women infected with human immunodeficiency virus. *J Med Virol* 2011; 83:1988-96.

10. Melgaço FG, Rosa ML, Augusto EF, et al. Human papillomavirus genotypes distribution in cervical samples from women living with human immunodeficiency virus. *Arch Gynecol Obstet* 2011; 283:809-17.

11. Araújo AC, Carvalho NO, Teixeira NC, et al, Incidence of cervical intraepithelial neoplasia in a cohort of HIV-infected women. *Int J Gynaecol Obstet* 2012; 117:211-6.

12. . Luz PM, Velasque L, Friedman RK, et al. Cervical cytological abnormalities and factors associated with high-grade squamous intraepithelial lesions among HIV-infected women from Rio de Janeiro, Brazil. *Int J STD AIDS* 2012; 23:12-7.

13. . Corrêa CM, Teixeira NC, Araújo AC, et al. Prevalence and multiplicity of HPV in HIV women in Minas Gerais, Brazil. *Rev Assoc Med Bras* 2011; 57:425-30.

14. Sociedade Brasileira de Patologia do Trato Genital Inferior e Colposcopia (SBPTGIC). Terminologia colposcópica. *Bol Inf Dir SBPTGIC* 2003; 2003:5-6

15. . INCA. Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero. Available at: <http://www.inca.gov.br>. Accessed 10 January 2013.

16. Schneider M L, Schneider V. Atlas de diagnóstico diferencial em citologia ginecológica. 1st edition. Rio de Janeiro: Revinter, 1998:165.

17. Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 1989; 7:209-214.

18. Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011; 28:2731-9.

19. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324:17-27.
20. Entiauspe LG, Teixeira LO, Mendoza-Sassi RA, Gonçalves CV, Gonçalves P, Martinez AM. Human papillomavirus: prevalence and genotypes found among HIV-positive and negative women at a reference center in the far south of Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010; 43:260-3.
21. Videla S, Darwich L, Cañadas MP, et al. Epidemiological data of different human papillomavirus genotypes in cervical specimens of HIV-1-infected women without history of cervical pathology. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009; 50:168-75.
22. Brandão VCRAB, Lacerda HR, Lucena-Silva N, et al. Frequency and types of human papillomavirus among pregnant and non-pregnant women with human immunodeficiency virus infection in Recife determined by genotyping. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104:755-763.
23. Baldez da Silva MF, Guimarães V, Silva MA, et al. Frequency of human papillomavirus types 16, 18, 31, and 33 and sites of cervical lesions in gynecological patients from Recife, Brazil. *Genet Mol Res* 2012; 11:462-6.
24. Luque AE, Jabeen M, Messing S, et al. Prevalence of human papillomavirus genotypes and related abnormalities of cervical cytological results among HIV-1-infected women in Rochester, New York. *J Infect Dis* 2006; 194:428-34.
25. Veldhuijzen NJ, Braunstein SL, Vyankandondera J, et al. The epidemiology of human papillomavirus infection in HIV-positive and HIV-negative high-risk women in Kigali, Rwanda. *BMC Infect Dis* 2011; 11:333.
26. Rodriguez-Cerdeira C, Sanchez-Blanco E, Alba A. Evaluation of Association between Vaginal Infections and High-Risk Human Papillomavirus Types in Female Sex Workers in Spain. *ISRN Obstet Gynecol* 2012; 2012:240190.

27. Watts DH, Fazzari M, Minkoff H, et al. Effects of bacterial vaginosis and other genital infections on the natural history of human papillomavirus infection in HIV-1-infected and high-risk HIV-1-uninfected women. *J Infect Dis* 2005; 191:1129-39.
28. Bhatla N, Puri K, Joseph E, et al. Association of Chlamydia trachomatis infection with human papillomavirus (HPV) & cervical intraepithelial neoplasia - a pilot study. *Indian J Med Res* 2013; 137:533-9.
29. Gillet E, Meys JF, Verstraelen H, et al. Association between bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia: systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2012; 7:e45201.
30. Yamada R, Sasagawa T, Kirumbi LW, et al. Human papillomavirus infection and cervical abnormalities in Nairobi, Kenya, an area with a high prevalence of human immunodeficiency virus infection. *J Med Virol* 2008; 80:847-55.
31. Confortini M, Carozzi F, Zappa M, et al. Human papillomavirus infection and risk factors in a cohort of Tuscan women aged 18-24: results at recruitment. *BMC Infect Dis* 2010; 10:157
32. Burk RD, Ho GY, Beardsley L, Lempa M, Peters M, Bierman R. Sexual behavior and partner characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection in young women. *J Infect Dis* 1996; 174:679-89.
33. Grinsztejn B, Veloso VG, Levi JE, et al. Factors associated with increased prevalence of human papillomavirus infection in a cohort of HIV-infected Brazilian women. *Int J Infect Dis* 2009; 13:72-80.
34. Palefsky J. Biology of HPV in HIV Infection. *Adv Dent Res* 2006; 19:99-105.
35. Fonseca-Moutinho JA. Smoking and Cervical Cancer. *ISRN Obstet Gynecol* 2011; 2011:1-6.

36. Frega A, Biamonti A, Maranghi L, et al. Follow-up of high-grade squamous intra-epithelial lesions (H-SILs) in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and human papillomavirus (HPV)-positive women. analysis of risk factors. *Anticancer Res* 2006; 26:3167-70.
37. Melsheimer P, Klaes R, von Knebel Doeberitz M, Bastert G. Prospective clinical study comparing DNA flow cytometry and HPV typing as predictive tests for persistence and progression of CIN I/II. *Cytometry* 2001; 46:166-171.
38. Schmeink CE, Melchers WJG, Siebers AG, Quint WGV, Massuger LFAG, Bekkers RLM. Human Papillomavirus Persistence in Young Unscreened Women, a Prospective Cohort Study. *PLoS One* 2011; 6:e27937.
39. Louvanto K, Syrjänen KJ, Rintala MA, Grénman SE, Syrjänen SM. Genotype-specific clearance of genital human papillomavirus (HPV) infections among mothers in the Finnish family HPV study. *J Clin Microbiol* 2010; 48:2665-71.
40. Kravchenko J, Akushevich I, Sudenga SL, Wilson CM, Levitan EB, Shrestha S. Transitional probability-based model for HPV clearance in HIV-1-positive adolescent females. *PLoS One* 2012; 7:e30736.
41. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977; 33:159-174.

6.2 ARTIGO 2

Artigo submetido à revista Plos One (APÊNDICE B)

Avaliação Prognóstica do Índice de DNA em amostras cervicais de mulheres co-infectadas HIV-HPV atendidas em centros de referência para HIV-AIDS em Recife

Título resumido: Índice de DNA cervical em pacientes co-infectados HIV-HPV

Albert Eduardo Silva Martins ^{1,2},

¹Laboratório de imunogenética, Centro de pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 50670-420, Brasil;

²Laboratório de biologia molecular, Departamento de oncologia pediátrica, Hospital IMIP, Recife, 50070-550, Brasil;

Autor para correspondência: Albert Eduardo Silva Martins, Laboratório de imunogenética, Centro de pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife-PE, 50670-901, Brasil (aesmartins@hotmail.com)

Resumo

Introdução. A persistência da infecção cervical por tipos de alto risco oncogênicos de Papilomavírus humano (HPV) pode levar a neoplasias intra-epiteliais cervicais (NIC). O objetivo do presente estudo foi avaliar, em mulheres infectadas pelo HIV, se a presença de aneuploidia em amostras de células cervicais está associada à presença e à evolução de NIC.

Métodos. O presente estudo constou de 2 etapas. Na primeira etapa, correspondendo a um corte transversal, analisou-se a associação entre a presença de aneuploidia por citometria de fluxo e características sócio-demográficas, hábitos e características ligadas à infecção pelo HPV e HIV. Na segunda etapa, correspondendo a uma coorte, verificou-se se a aneuploidia era preditiva da evolução da NIC.

Resultados. Não se observou associação entre a presença de aneuploidia e a infecção por HPV, nem com alterações à citologia oncológica. Por outro lado, a aneuploidia esteve associada à presença de NIC ($p=0,030$) no exame histológico e ao não uso de terapia antiretroviral (TARV) ($p=0,001$). A maioria das mulheres infectadas por HIV (234/272) apresentaram contagem de linfócitos T CD4+ normal (acima de 350 células/mm³) e mostraram maior taxa de regressão (77,5%) da aneuploidia comparadas à taxa de progressão (23,9%) em até dois anos de seguimento.

Conclusão. Embora tenha sido encontrada associação entre a presença da lesão tecidual cervical e o índice de DNA, este não foi preditivo da evolução da lesão cervical, sugerindo que a progressão da lesão cervical para o câncer em mulheres HIV-positivas também pode ser alterada pela melhoria do estado imunológico propiciado pelo uso de terapia antirretroviral (TARV).

Palavras-chave: Papillomavírus humano, HIV, citometria de fluxo, Ploidia de DNA.

Introdução

A persistência de infecções cervicais por Papillomavírus humano (HPV) é fator de risco para o desenvolvimento de câncer de colo uterino, sendo em pacientes co-infectadas pelo HIV as lesões cervicais mais graves e de pior prognóstico [1,2,3]. O papel do vírus na patogênese do câncer de colo envolve a interação entre as proteínas E6 e E7 dos tipos de HPV de alto risco com as proteínas nucleares supressoras de tumor p53 e pRB, respectivamente. A proteína E7 liga-se a pRB e desloca o fator de transcrição E2F, originalmente ligado à pRB, o qual aumenta a expressão de proteínas envolvidas na progressão para a fase S do ciclo celular. A proteína E6 suplementa a função da proteína E7 inativando a p53 e impedindo a indução da apoptose nessas células [4,5]. O prolongamento da fase S pela ação da E6 e E7 pode levar a instabilidade cromossômica e consequentemente a alteração da ploidia celular. Esses eventos são agravados pelo fenômeno de integração viral, o qual pode ocorrer em infecções persistentes por HPV de alto risco, embora a fase de transformação possa ocorrer em estágios que antecedem a integração viral [6,7, 8,9].

O índice de DNA (ID) tem sido utilizado na caracterização da ploidia celular no câncer de endométrio [10], cirrose hepática [11] e leucemia linfóide aguda [12], sendo importante no prognóstico de neoplasias [13]. Alguns autores também consideram a determinação do ID como um parâmetro prognóstico prospectivo nas lesões cervicais causadas pela infecção por HPV [14,15], ou seja, evolução para regressão, progressão ou persistência da lesão cervical [16]. Não há estudos em mulheres co-infectados pelo HIV-HPV e progressão de lesão tecidual utilizando essa técnica; de forma que o objetivo desse estudo é avaliar a associação do ID com lesão tecidual em pacientes co-infectados HIV-HPV.

Métodos

População e desenho do estudo

O presente estudo constou de 2 etapas. Na primeira etapa, correspondendo a um corte transversal, analisou-se a associação entre a presença de aneuploidia por citometria de fluxo e características sócio-demográficas, hábitos e características ligadas à infecção pelo HPV e HIV. Na segunda etapa, correspondendo a uma coorte, verificou-se se a aneuploidia era preditiva da evolução da NIC.

O estudo foi realizado em três centros de referência para HIV-AIDS em Pernambuco (Hospital Correia Picanço (HCP), Hospital das Clínicas (HC) e Centro Integrado de Saúde Amaury de Medeiros (CISAM) no período de Maio de 2007 a Agosto de 2011. Todas as 409 mulheres adultas estudadas estavam infectadas pelo HIV e foram atendidas no serviço de ginecologia dos três hospitais centros de referência para HIV-AIDS citados acima. Todas as mulheres concordaram em participar do estudo e assinaram o termo de consentimento

Coleta de dados e padronização das técnicas

Um questionário para avaliação clínico-epidemiológica foi aplicado a todas as mulheres que concordaram em participar do estudo e, em seguida, foram realizados a colposcopia e exame citológico. Os achados colposcópicos foram classificados levando em consideração os critérios de Classificação da Nomenclatura Internacional dos Aspectos Colposcópicos de Roma [17]. Para a análise citopatológica e para análise molecular do HPV, raspados cervicais usando cyto-brushes foram coletados durante a execução do exame colposcópico. Para a classificação dos achados citológicos foi adotada a nomenclatura de Bethesda [18]. Nos casos onde foram observadas alterações colposcópicas, a biópsia cervical foi realizada e fragmentos de tecido cervical foram enviados em formol a 10% para análise histopatológica considerando critérios de Schneider [19].

Os raspados cervicais foram encaminhados para o Laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Oncologia Pediátrica do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira. As amostras foram fracionadas, sendo uma fração utilizada para a determinação do índice de DNA e as demais armazenadas a -20°C para posterior análise molecular que incluíram a pesquisa do genoma do HPV e, nos casos positivos, a tipagem molecular, conforme descrição abaixo.

Deteção e tipagem de HPV

A extração de DNA genômico das amostras cervicais foi realizada usando o protocolo da proteinase K [Invitrogen, CA, USA] e foram submetidas a PCR usando os iniciadores MY09 e MY11 [21]. O tipo de HPV foi determinado por sequenciamento do fragmento de PCR usando o protocolo do “Bigdye” (Applied Biosystem, SP, Brazil) conforme descrito pelo fabricante e comparando-a com as sequências de referência depositadas no banco de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Determinação do índice de DNA

As células cervicais foram submetidas à permeabilização, digestão de RNA e marcação do DNA com iodeto de propídio. O índice de DNA foi determinado por citometria de fluxo por excitação com laser a 488nm e leitura acima de 600nm. Os histogramas foram analisados pelo programa ModFitLT V3.0 (Verity Software House Inc., Topshame, USA). A presença de dois picos em um histograma com índice acima de 1,16 (hiperploidia) ou abaixo de 1,00 (hipoploidia), cada um com mais de 10% da população das células analisadas na área correspondente a G0-G1 do ciclo celular, foi considerada aneuploidia [19].

Análise estatística

Os dados clínico-epidemiológicos e laboratoriais foram digitados em banco de dados utilizando o programa Excel 2007 (Microsoft, CA, US). A idade foi categorizada considerando a mediana de 35 anos para comparação com os achados na literatura [20]. A relação com o tabagismo foi analisada considerando fumantes e ex-fumantes isoladamente e agrupados em relação a não fumantes. Na variável etilismo, o termo “bebedora leve” significa mulheres cuja ingestão alcoólica nos últimos três meses não ultrapassou 14 dias ao mês e cuja dose diária limitou-se a um copo de vinho ou bebida destilada (250 mL), ou uma lata de cerveja (350mL); mulheres com maior ingestão alcoólica foram categorizadas como “bebedoras pesadas”. Usuária de drogas foi considerada aquela que faz ou já fez uso de qualquer droga ilícita (fumada, cheirada ou injetada). O ponto de corte de 200 células/mm³ de linfócitos T CD4⁺ foi utilizado como expressão da imunossupressão nas pacientes. Para a análise estatística foi usado o programa Stata 10.0 [Stata-Corp LP, College Station, TX]. Na análise univariada, foram estimados o odds ratio (OR), com seu respectivo intervalo de confiança, e o valor de p (teste de qui-quadrado ou razão de verossimilhança). Como critério de inclusão no modelo multivariado foi utilizado um valor de $p < 0,25$ e, para permanecer no modelo, um valor de $p < 0,05$ ou um ajuste do valor do OR de outra variável acima de 10%. O teste Mann-Whitney foi utilizado na análise de medianas de valores contínuos de grupos não pareados. O teste kappa foi utilizado para medir a intensidade da concordância entre duas ou mais análises consecutivas no estudo. Associações produzindo $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significantes.

Considerações éticas

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Saúde Amaury de Medeiros (CEP-CISAM, # 0011.0.250.000-05) e todas as mulheres convidadas a participar do estudo deram o consentimento formal.

Resultados

Identificação de fatores de risco para desenvolvimento de aneuploidia em mulheres HIV-positivas

O índice de DNA de células cervicais foi realizado em 617 amostras de 409 mulheres, com mediana de 34 anos, infectadas por HIV atendidas em três serviços de referência para HIV-AIDS em Pernambuco. As características clínico-epidemiológicas e laboratoriais das 320 mulheres que possuíam questionário da pesquisa completamente preenchido, correspondendo a 78,2% da população de estudo, estão mostradas na Tabela 1. Dentre as 409 mulheres, 219 retornaram pelo menos uma vez ao serviço para acompanhamento clínico e laboratorial.

Tabela 1. Análise univariada da associação entre índice de DNA e variáveis sócio-demográficas, hábitos, sexuais e reprodutivas relacionadas à infecção por HPV e à infecção por HIV em mulheres HIV-positivas atendidas em três centros de referência para HIV/AIDS em Recife-PE, 2008-2010

Variáveis	Aneuploidia(%)	Diploidia(%)	OR (IC95%)	p
Variáveis sócio demográficas				
Idade (mediana de 34 anos)				0,609
>= 35 anos	29(46,77)	129(50,39)	0,86(0,49-1,50)	
<35 anos	33(53,23)	127(49,61)	1,00	
Total	62(100)	256(100)		
Alfabetizada				0,501
Não	6(9,68)	33(12,79)	0,73(0,29-1,82)	
Sim	56(90,32)	225(87,21)	1,00	
Total	62(100)	258(100)		
Escolaridade				0,758
Médio/superior	19(30,65)	84(32,68)	0,91(0,49-1,65)	
Fundamental	43(69,35)	173(67,32)	1,00	
Total	62(100)	257(100)		

Rendimento				0,066
<1 salário mínimo	16(30,19)	99(44,00)	0,55(0,28-1,04)	
>=1salário mínimo	37(69,81)	126(56,00)	1,00	
Total	53(100)	225(100)		
Hábitos				
Tabagismo				0,648
Fumantes	12(22,64)	46(20,44)	1,03(0,49-2,18)	
			0,928	
Ex-fumantes	10(18,87)	56(24,89)	0,70(0,32-1,54)	
			0,386	
Não fumantes	31(58,49)	123(54,67)	1,00	
Total	53(100)	225(100)		
Etilismo				0,416
Bebedor pesado	4(6,56)	29(11,42)	0,48(0,15-1,49)	
			0,208	
Bebedor leve	31(50,82)	134(52,76)	0,80(0,45-1,45)	
			0,480	
Abstêmio	26(42,62)	91(35,83)	1,00	
Total	61(100)	254(100)		
Usuário de drogas fumadas				0,535
Sim	10(16,39)	34(13,33)	1,27(0,59-2,74)	
Não	51(83,61)	221(86,67)	1,00	
Total	61(100)	255(100)		
Usuário de drogas cheiradas				0,903
Sim	6(10,00)	24(9,49)	1,06(0,41-2,72)	
Não	54(90,00)	229(90,51)	1,00	
Total	60(100)	253(100)		
Usuário de drogas				0,796
Sim	10(17,24)	39(15,85)	1,10(0,51-2,37)	
Não	48(82,76)	207(84,15)	1,00	
Total	58(100)	246(100)		
Variáveis sexuais e reprodutivas				0,135
Número de parceiros				
>=4 parceiros	18(31,03)	101(41,74)	0,62(0,34-1,15)	
1-3 parceiros	40(68,97)	141(58,26)	1,00	
Total	58(100)	242(100)		
Gravidez ao diagnóstico de HPV				0,334
Sim	7(11,48)	41(16,47)	0,65(0,27-1,54)	
Não	54(88,52)	208(83,53)	1,00	
Total	61(100)	249(100)		

Presença de HPV				0,223
Sim	28(47,46)	95(38,78)	1,42(0,80-2,52)	
Não	31(52,54)	150(61,22)	1,00	
Total	59(100)	245(100)		
Presença de alterações citológicas				0,348
Com alguma alteração	10(17,86)	31(13,03)	1,45(0,66-3,17)	
Sem alteração	46(82,14)	207(86,97)	1,00	
Total	56(100)	238(100)		
Variáveis associadas à infecção por HIV				
Contagem de linfócitos T CD 4+ (*)				0,146
<200/mm ³	4(7,69)	34(15,45)	0,45(0,15-1,34)	
≥200/mm ³	48(92,31)	186(84,55)	1,00	
Total	52(100)	220(100)		
Tempo de diagnóstico de HIV				0,174
≥24 meses	36(61,02)	128(51,20)	1,49(0,83-2,66)	
<24 meses	23(38,98)	122(48,80)	1,00	
Total	59(100)	250(100)		
Uso de TARV				0,006
Não	20(37,04)	44(19,64)	2,40(1,26-4,57)	
Sim	34(62,96)	180(80,36)	1,00	
Total	54(100)	224(100)		

(*)Na contagem de linfócitos T CD4+ foi considerado o resultado mais próximo da entrevista

Fatores associados à alteração no índice de DNA

As características demográficas de idade, escolaridade e rendimento, e hábitos de tabagismo, ingestão de álcool e uso de drogas foram semelhantes nas mulheres HIV positivas que apresentaram aneuploidia ou diploidia nas células cervicais (Tabela 1), com o rendimento apresentando valor de p limítrofe.

A infecção pelo HPV de baixo risco ($p=0,43$) ou de alto risco ($p=0,17$) também não mostrou associação com alteração na ploidia das células cervicais (dados não mostrados), que esteve presente em 40.1% das amostras aneuplóides, e em 34.3% em amostras diplóides ($p=0,25$). Nas amostras aneuplóides, o índice de DNA variou de 0,66 (hipodiplóide) a 3,76 (hiperdiploide) com uma mediana de 1,45.

A maioria das mulheres apresentou contagem de linfócitos T CD4+ maior que 200/mm³, em ambos os grupos diplóide e aneuplóide. O tempo de diagnóstico de HIV não apresentou associação com aneuploidia, por outro lado a aneuploidia mostrou-se associada ao uso de TARV ($p=0,006$) (Tabela 1).

Após a análise multivariada, o uso de TARV ($p=0,001$) e o rendimento ($p=0,007$) permaneceram no modelo final.

Ploidia e alteração das células cervicais

A aneuploidia foi observada em um total de 127 mulheres no período do estudo. Dessas, 12 tiveram amostras de seguimento, perfazendo um total de 139 amostras com aneuploidia. Em relação às mulheres com resultados de citologia oncológica, 56 mulheres com aneuploidia tiveram o ID realizado na avaliação basal da pesquisa. Dessas, 12 retornaram mais uma vez ao serviço. Outras 46 mulheres com aneuploidia não tinham o questionário de pesquisa preenchido. No total, obteve-se 114 amostras aneuplóides e com resultados de citologia oncológica.

Das 19 (16,7%) amostras aneuplóides com alteração citológica, seis (31,6%) foram diagnosticadas com atipia de células escamosas de significado indeterminado (ASCUS), 10 (52,6%) com lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LIEBG) e três (15,8%) com lesão intraepitelial escamosas de alto grau (LIEAG). Das 45 amostras diplóides com alteração citológica, 11 (24,5%) foram classificadas como ASCUS, uma amostra (2,2%) como atipia de células escamosas que não permite excluir lesão de alto grau (ASC-H), duas (4,5%) como presença de HPV, 24 (53,3%) como LIEBG e sete (15,5%) como LIEAG. Considerando as 531 amostras cervicais avaliadas quanto ao índice de DNA e alteração citológica, a ploidia não esteve associada com a presença de alteração citológica ($p=0,348$) (Tabela 2).

Tabela 2. Análise da ploidia celular de acordo com lesões intraepiteliais cervicais em mulheres HIV-positivas atendidas em três centros de referencia para HIV/AIDS em Recife-PE, 2008-2010

Alteração citológica	Aneuploidia (%)	Diploidia (%)
ASCUS	6(31,6)	11(24,5)
ASC-H	0	1(2,2)
HPV	0	2(4,5)
LIEBG	10(52,6)	24(53,3)
LEAG	3(15,8)	7(15,5)
Total	19	45

Em caráter exploratório, foi avaliada a associação entre presença de aneuploidia e lesão histológica naquelas mulheres que tiveram indicação para biópsia pela colposcopia. Considerando exclusivamente as 54 amostras diplóides com resultado de biópsia, encontrou-se a presença de NIC em 31,5% das amostras, enquanto que nas 15 amostras aneuplóides que possuíam avaliação histológica

66,7% evidenciaram NIC, demonstrando uma associação entre lesão histológica e detecção de aneuploidia pelo índice de DNA ($p=0,030$) (Tabela 3).

Tabela 3. Associação entre ploidia de células cervicais e resultados de biópsia cervical em mulheres HIV positivas atendida em três centros de referência para HIV/AIDS em Recife-PE, 2008-2010

Histologia	Aneuploidia (%)	Diploidia (%)	<i>p</i>
Presença de NIC	10 (66,7)	17 (31,5)	0,030
Ausência de NIC	5 (33,3)	37 (68,5)	
Total	15 (100)	54 (100)	

Considerando as 69 amostras que possuíam resultados de biópsia e ID encontrou-se na determinação da ploidia celular uma especificidade de 88.1% (73.6-95.5%), sensibilidade de 37% (20.1-57.5.) para neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) em mulheres HIV-positivas.

Evolução do índice de DNA e infecção por HPV em mulheres HIV-positivas

Das 409 mulheres estudadas, 219 (47,5%) retornaram pelo menos uma vez ao serviço para seguimento em diferentes intervalos de tempo que variaram de 6 a 48 meses, sendo que 92 (42,2%) retornaram entre 13 e 24 meses desde a primeira consulta e 69 (32,3%) entre 6 a 12 meses. A evolução da lesão cervical quanto ao índice de DNA foi analisada em 178 mulheres, não foi incluída nessa análise as 41 mulheres que possuíam informação de índice de DNA em apenas um momento. Das 178 amostras, 17 possuíam informação de índice de DNA das células cervicais em três ou mais momentos.

Das 40 mulheres com amostras aneuplóides na primeira avaliação, 31 (77,5%) regrediram para diploidia após o período de acompanhamento. Considerando as 137 mulheres com diploidia na primeira avaliação, 105 (76,6%) permaneceram diplóides e 32 (23,4%) progrediram para aneuploidia. Foi utilizada a medida Kappa para avaliar a concordância da detecção de aneuploidia entre a amostra inicial e a última amostra analisada, obtendo-se uma concordância fraca ($k=0,031$) de acordo com a tabela de interpretação do Kappa sugerida por Landis and Koch (1977) [21] (Tabela 4).

Tabela 4. Evolução da índice de DNA em mulheres HIV positivas atendidas em três centros de referência para HIV/AIDS em Recife-PE, 2008-2010

Avaliação inicial	Avaliação final		Concordância	
	Positivo	Negativo	Esperada	Kappa
Aneuploidia				
Positivo	9	31	0,64	0,031
Negativo	32	105		
Total	42	136		

Das 33 mulheres com progressão para aneuploidia, 17 tinham resultado de citologia oncológica na amostra ao diagnóstico e na consulta de retorno. Dentre essas 17 mulheres, 13 não apresentaram qualquer alteração citológica em nenhuma dos dois momentos avaliados; regressão citológica foi observada em duas mulheres, que possuíam na avaliação inicial o diagnóstico de LIEBG e de LIEAG e tornaram-se negativas; persistência de alterações citológicas independente do grau de lesão foi encontrada em uma mulher com diagnóstico inicial de ASC-H e na consulta de retorno de LIEAG; enquanto progressão foi identificada em apenas uma mulher que teve uma amostra negativa no início do estudo seguida de amostra com ASCUS.

Das 105 mulheres com índice de DNA diplóide nas duas ocasiões, o nível de células T CD4+ no sangue periférico apresentou mediana de 455mm^3 , semelhante a mediana de CD4+ de 461mm^3 apresentada pelas nove mulheres com índice de DNA aneuplóide em ambas as ocasiões ($p=0.205$).

Discussão

Índice de DNA, lesão cervical e HPV

A frequência de aneuploidia em células cervicais foi maior nas mulheres HIV positivas que não faziam uso de TARV do que naquelas que faziam. Embora tenha sido encontrada uma associação entre a presença da lesão tecidual cervical e o ID, este não foi preditivo da evolução da lesão cervical, sugerindo que a progressão da lesão cervical para o câncer em mulheres HIV positivas também pode ser alterada

pela melhoria do estado imunológico propiciado pelo uso de terapia antirretroviral (TARV).

Nesse estudo não foi observada associação entre aneuploidia e alterações citológicas ou detecção do HPV. Embora tenha sido encontrada associação entre aneuploidia e a presença da lesão tecidual cervical, o ID obtido pela citometria de fluxo não foi preditivo da evolução da lesão cervical.

Neste estudo, o menor rendimento mostrou efeito protetor para desenvolvimento de aneuploidia; talvez o rendimento esteja medindo um outro fator que não foi avaliado no estudo.

Aneuploidias são frequentemente encontradas em lesões cervicais mais graves em mulheres HIV negativas [22,23], fato que não foi observado neste trabalho em relação à citologia oncótica, talvez pela baixa frequência de citologias alteradas (12,0%). A citologia oncótica é um importante teste de baixo custo para rastreamento de lesões cervicais sendo menos específico do que a histologia na caracterização de lesões pré-cancerosas, onde espera-se encontrar uma frequência maior de aneuploidias [24].

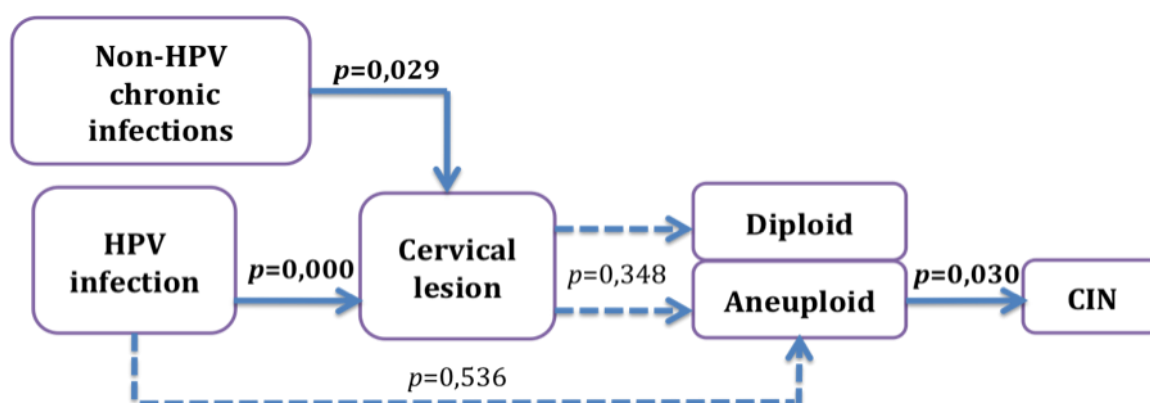
A presença de HPV de alto risco contribui para a lesão cervical, em especial NIC [2,25,26]. Os tipos de HPV de alto risco mostram uma íntima associação com o surgimento e persistência de lesões cervicais pré-neoplásicas [1,2,27], devido as proteínas virais E6 e E7 ligarem-se e inibirem a ação das proteínas humanas p53 e pRB controladoras do ciclo celular, culminando com a instalação de aberrações cromossômicas e, conseqüentemente, aparecimento de aneuploidias [5,28]. Embora esta relação seja conhecida, não se encontrou associação entre aneuploidia e infecção por HPV, talvez devido ao estado imunológico preservado nas mulheres HIV positivas sem alterações citológicas neste estudo, que na sua maioria faziam uso de TARV, e possuíam contagem de linfócitos T CD4+ normais. Contudo, observou-se que o não uso de TARV esteve associado à presença de aneuploidias ($p=0,001$). É sabido que as infecções crônicas vaginais causadas por bactérias anaeróbicas agem como co-fatores no aparecimento de NIC e conseqüente alteração na ploidia celular independente da infecção por HIV e HPV [29]. Neste estudo, não foram avaliados dados sobre bacterioses associadas e outras infecções do trato genital feminino, limitando a compreensão sobre este fato.

A própria infecção pelo HIV também pode aumentar o risco de alterações citológicas e infecção por HPV de forma independente [30]. Nesse aspecto, é

esperado que após o início do uso de TARV, haja exacerbação da inflamação tecidual devido a infecções cervicais oportunistas silenciosas reveladas pela reconstituição imune terapêutica [31,32]. Associação do uso de TARV com a proteção contra o surgimento de NIC foi recentemente demonstrada em mulheres HIV-positivas [33].

Nossos dados sugerem que o modelo de progressão da lesão cervical para o câncer em mulheres HIV-positivas pode ser alterado pela melhoria do estado imunológico das mulheres propiciado pelo uso de TARV e seguimento clínico (Figura 1). No modelo proposto, a ocorrência de NIC está associada a presença de aneuploidias ($p<0.030$), mas a aneuploidia não está associada a presença de alterações citológicas ($p=0,348$), ou infecção por HPV de baixo ($p=0.43$) ou alto ($p=0.17$) grau. Considerando a lesão cervical como expressão de infecção cervical por HPV ou infecções crônicas [25,26,29], mas sabendo que a presença de HPV pode ocorrer na ausência de lesão cervical dependendo do estado imunológico da paciente, a progressão da doença será influenciada pela adesão ao tratamento com TARV em paciente HIV-positivas.

Figura 1. Modelo de progressão de lesão cervical para câncer cervical em mulheres HIV-positivas em tratamento com TARV



Evolução da lesão cervical quanto à aneuploidia

Em relação ao ID, as mulheres HIV positivas mostraram taxa de progressão inferior (23,9%) à taxa de regressão (77,5%), com baixa frequência de alterações citológicas (12,0%). Não foi encontrado na literatura pesquisada outro estudo utilizando o índice de DNA para avaliar evolução da lesão cervical em pacientes HIV-positivas. Contudo, sabe-se que em mulheres HIV-negativas a taxa de

aneuploidia guarda relação com o grau de lesão citológica ao diagnóstico, e que quanto mais grave a lesão citológica nas amostras aneuplóides ao diagnóstico maior a probabilidade de ocorrer a persistência ou progressão da lesão cervical em amostras de seguimento dessas pacientes [22,23].

A presença de alterações na ploidia de células cervicais isoladamente mostrou ter uma baixa sensibilidade (37%) e especificidade (88%) para detecção de NIC. No entanto foi relatado que a combinação de citomorfologia de LIEAG, presença de HPV oncogênico e aneuploidia apresentaram 100% de sensibilidade e 91,3% de especificidade em detectar lesões que progredirão para lesões cervicais graves (NIC II+) [23].

Recentemente, foi demonstrado que alterações na ploidia de células cervicais podem ser identificadas pela citometria de fluxo utilizando-se cinco diferentes parâmetros relacionados ao ciclo celular, com sensibilidade e especificidade de 100% [30]. Nesse mesmo estudo, a aneuploidia isoladamente foi capaz de detectar câncer cervical com sensibilidade de 83,9% (72,3-92,0) e especificidade de 94,7% (82,2-99,2). As principais diferenças entre o presente estudo e o de Chhavi reside no fato do estudo de Chhavi e colaboradores ser um caso-controle de mulheres indianas HIV negativas com 62% das mulheres apresentando câncer cervical (casos) e com 38% mulheres histerectomizadas por causas benignas (controles), enquanto este é um estudo de coorte de mulheres brasileiras HIV positivas com baixa prevalência de alterações citológicas, por isso com pouca indicação para realização de biópsia, sugerindo diferença na sensibilidade do método em populações com diferenças no grau da lesão cervical.

Em resumo, concluiu-se que a presença de aneuploidia guarda relação com a ocorrência de lesões cervicais pré-cancerígenas. O estudo mostrou que a frequência de aneuploidia é baixa nas mulheres com NIC (37%), porém nas mulheres com aneuploidia a frequência de NIC é alta (66%).

Embora tenha sido encontrada associação entre a presença da lesão tecidual cervical e a determinação do ID pela citometria de fluxo, este não foi preditivo da evolução da lesão cervical.

Houve perda de dados importante devido a taxa de retorno relativamente baixa (47,5%), este fato pode ter limitado a exploração da técnica de índice de DNA na detecção e evolução de lesões cervicais em mulheres infectadas por HIV.

Na maioria das amostras não foram observadas atipias colposcópicas que poderiam ser indicativas de realização de biópsias. Talvez outro estudo incluindo um maior número de mulheres com alterações colposcópicas e/ou citológicas, possa contribuir para uma melhor compreensão entre a associação do ID e a presença e evolução de lesões cervicais em mulheres HIV-positivas.

Agradecimentos

Agradecemos ao Sr. Vicente Marconi Amorim de Oliveira do Laboratório Central do Estado de Pernambuco pela coleta de dados referente à contagem de linfócitos CD4+; ao Dr François Figueirôa e Sr. Khaled Almahnoun, da Secretaria de Saúde de Pernambuco pela coleta de dados relativos ao uso de TARV.

REFERÊNCIAS

1. Ahdieh L , Munoz A, Vlahov D, Trimble CL, Timpson LA, et al. (2000) Cervical neoplasia and repeated positivity of human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-seropositive and -seronegative women. *American j of epidemiology* 151:1148-1157.
2. Naucier P, Mabota da Costa F, da Costa JL, Ljungberg O, et al. (2011) Human papillomavirus type-specific risk of cervical cancer in a population with high human immunodeficiency virus prevalence: case-control study. *J Gen Virol* 92:2784-2791.
3. Palefsky J (2006) Biology of HPV in HIV Infection. *Adv Dent Res* 19:99-105.
4. Garnett TO, Duerksen-Hughes PJ (2006) Modulation of apoptosis by human papillomavirus (HPV) oncoproteins. *Arch Virol* 151:2321-2335.
5. Doorbar J (2005) The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 32:S7-15.
6. Heilmann V, Kreienberg R (2002) Molecular biology of cervical cancer and its precursors. *Curr Womens Health Rep* 2:27-33.
7. Doeberitz Mv, Vinokurova S (2009) Host factors in HPV-related carcinogenesis: cellular mechanisms controlling HPV infections. *Arch Med Res* 40:435-442
8. Klaes R, Woerner SM, Ridder R, Wentzensen N, Duerst M, et al. (1999) Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res* 59:6132-6136.
9. Burd EM (2003) Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev* 16:1-17.
10. Mangili G, Montoli S, De Marzi P, Sassi I, Aletti G, et al. (2008) The role of DNA ploidy in postoperative management of stage I endometrial cancer. *Ann Oncol* 19:1278-1283.
11. El-Sayed SS, El-Sadany M, Tabil AA, Soltan A, El-Dosoky I, et al. (2004) Attalah AM. DNA ploidy and liver cell dysplasia in liver biopsies from patients with liver cirrhosis. *Can J Gastroenterol* 18:87-91.
12. Look AT, Roberson PK, Williams DL, Rivera G, Bowman WP, et al. (1985) Prognostic importance of blast cell DNA content in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 65:1079-1086.

13. Torres EM, Williams BR, Amon A (2008) Aneuploidy: Cells Losing Their Balance. *Genetics* 179: 737-746.
14. Dabi MM, Nola M, Tomi I, Dotli S, Petrove M, et al. (2008) Adenocarcinoma of the uterine cervix: prognostic significance of clinicopathologic parameters, flow cytometry analysis and HPV infection. *Acta Obstet Gynecol Scand* 187:366-372.
15. Anton M, Nenutil R, Rejthar A, Kopečný J, Ptáková B, et al. (1997) DNA flow cytometry: a predictor of a high-risk group in cervical cancer. *Cancer Detect Prev* 21:242-246.
16. Melsheimer P, Klaes R, von Knebel Doeberitz M, Bastert G (2001) Prospective clinical study comparing DNA flow cytometry and HPV typing as predictive tests for persistence and progression of CIN I/II. *Cytometry* 46:166-171.
17. Sociedade Brasileira de Patologia do Trato Genital Inferior e Colposcopia (SBPTGIC) (2003) Terminologia colposcópica. *Bol Inf Dir SBPTGIC* 5:5-6.
18. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, et al. (2002) The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*. 287:2114-2119.
19. Schneider M L, Schneider V (1998) Atlas de diagnóstico diferencial em citologia ginecológica. Rio de Janeiro: Revinter. 165p.
20. Garbuglia AR, Piselli P, Lapa D, Sias C, Del Nonno F, et al. (2012) Frequency and multiplicity of human papillomavirus infection in HIV-1 positive women in Italy. *J Clin Virol* 54:141-146.
21. Landis JR, Koch GG (1977) The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33:159-174.
22. Singh M, Mehotra S, Kalra N, Singh U, Shuckla Y (2008) Correlation of DNA ploidy with progression of cervical cancer. *J Cancer Epidemiol* 2008:1-7.
23. Bollmann R, Mehes G, Speich N, Schmitt C, Bollmann M (2005) Aberrant, Highly Hyperdiploid Cells in Human Papillomavirus-Positive, Abnormal Cytologic Samples Are Associated with Progressive Lesions of the Uterine Cervix. *Cancer* 105:1-5.
24. Massad LS, Collins YC, Meyer PM (2001) Biopsy correlates of abnormal cervical cytology classified using the Bethesda system. *Gynecol Oncol* 82:516-522.
25. Entiauspe LG, Teixeira LO, Mendoza-Sassi RA, Gonçalves CV, Gonçalves P, et al. (2010) Martinez AM. Human papillomavirus: prevalence and genotypes found

among HIV-positive and negative women at a reference center in the far south of Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 43:260-263.

26. Macleod IJ, O'Donnell B, Moyo S, Lockman S, Shapiro RL, et al. (2011) Prevalence of human papillomavirus genotypes and associated cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-infected women in Botswana. *J Med Virol* 83:1689-1695.
27. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, et al. (1999) Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189:12-19.
28. Melsheimer P, Vinokurova S, Wentzensen N, Bastert G, von Knebel Doeberitz M (2004) DNA aneuploidy and integration of human papillomavirus type 16 e6/e7 oncogenes in intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the cervix uteri. *Clin Cancer Res* 10:3059-3063.
29. Gillet E, Meys JF, Verstraelen H, Verhelst R, De Sutter P, et al. (2012) Association between bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia: systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 7:e45201. doi: 10.1371/journal.pone.0045201. Epub 2012 Oct 2.
30. Chhavi, Saxena M, Negi MP, Singh S, Singh PK, et al. (2010) DNA content can improve the detection and prognosis of carcinoma of the cervix. *Biosci Trends* 4:103-109
31. Lawn SD, Meintjes G. (2011) Pathogenesis and prevention of immune reconstitution disease during antiretroviral therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 9:415-30.
32. Sharma SK, Soneja M. (2011) HIV & immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS). *Indian J Med Res.* 134:866-77. doi: 10.4103/0971-5916.92632.
33. Firnhaber C, Westreich D, Schulze D, Williams S, Siminya M, et al. (2012) Highly active antiretroviral therapy and cervical dysplasia in HIV-positive women in South Africa. *J Int AIDS Soc.* 15:17382.

7. RECOMENDAÇÕES

De acordo com a literatura, as mulheres infectadas com HIV apresentam uma prevalência alta de infecção por HPV, com o HPV 16 sendo o tipo mais frequente nas amostras cervicais. Esse fato não foi comprovado por nós, haja vista que a prevalência de HPV foi de 47,5% e o tipo mais frequente em nossa região foi o HPV 53. Em nosso estudo também encontramos baixa frequência de alterações citológicas (13,9%) assim como uma baixa taxa de progressão da infecção de HPV (28,3%), o que indica um bom estado imunológico diretamente relacionado a assistência clínica e medicamentosa fornecidos pelo SUS reforçando a importância desse suporte.

8. CONCLUSÕES

A prevalência da infecção cervical por HPV varia quanto a presença de infecção pelo HIV; de acordo com o tipo de amostra analisada – biópsia ou raspado cervical; técnica de detecção da infecção pelo HPV e, se a origem da paciente é centro de referência para pacientes HIV, ou para tratamento de câncer.

A distribuição de tipos de HPV em mulheres HIV-positivas no estado de Pernambuco é diferente comparada aos dados de literatura para as mulheres HIV – negativas em outras regiões do Brasil e do mundo, contudo, a maior frequência de tipos considerados menos frequentes, como o HPV 53, HPV 58 e HPV 31 em mulheres HIV-positivas foi semelhante ao relatado na literatura. Nesse contexto, o tipo HPV 16, considerado o mais frequente em câncer cervical, apresentou baixa frequência no presente estudo, devido a baixa frequência de lesão cervical grave.

Os fatores associados à co-infecção HPV-HIV são: idade (igual ou maior a 35 anos), escolaridade (igual ou maior a 8 anos de estudo), número de parceiros (igual ou maior que 4 parceiros), contagem de linfócitos T CD4+ (menor que 200/mm³), mulheres etilistas leves, pesadas ou dependentes de álcool.

As mulheres HIV-positivas estudadas apresentaram alta taxa de regressão de lesões citológicas, e uma baixa taxa de persistência de HPV, provavelmente devido ao estado imunológico preservado avaliado pela contagem de linfócitos T CD4+.

Embora tenha sido encontrada associação entre a presença da lesão tecidual cervical e o índice de DNA, este não foi preditivo da evolução da lesão cervical, sugerindo que a progressão da lesão cervical para o câncer em mulheres HIV-positivas também pode ser alterada pela melhoria do estado imunológico propiciado pelo uso de terapia anti-retroviral (TARV).

REFERÊNCIAS

Anton, M. et al. DNA flow cytometry: a predictor of a high-risk group in cervical cancer. **Cancer Detectection and Prevention**, Brno, v. 21, n.3, p. 242-246, 1997.

Arends, M.J.; Buckley, C.H.; Wells, M. Aetiology, pathogenesis, and pathology of cervical neoplasia. **Journal of Clinical Pathology**, Edinburgo, v. 51, n. 2, p. 96-103, 1998.

Badano, I. et al. Human papillomavirus (HPV) detection and Papanicolaou cytology in low-resource women in Posadas city, Misiones, Argentina. **Revista Argentina de Microbiologia**, Posadas, v. 43, n. 4, p. 263-267, 2011.

Baker, C.C. et al. PM Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. **Journal of Virology**, Maryland, v. 61, n. 4, p. 962-971, 1987.

Bollmann, R. et al. Determination of feactures indicating progression in atypical squamous cells with undetermined significance:human papillomavirus typing and DNA ploidy analysis from liquid-based cytologic samples. **Cancer cytopathology**, Bonn, v. 99, n. 2, p. 113-117, 2002.

Bollmann, R. et al. Human papillomavirus typing and DNA ploidy determination of squamous intraepithelial lesions in liquid-based cytologic samples. **Cancer cytopathology**; Bonn, v. 99, n. 1, p. 57-62, 2003.

Bollmann, R. et al. Highly Hyperdiploid Cells in Human Papillomavirus-Positive, Abnormal Cytologic Samples Are Associated with Progressive Lesions of the Uterine Cervix.**Cancer cytopathology**, Bonn,v.105, n. 2, p.1-5, 2005.

Bosch, F.X. et al. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. **Vaccine**, Barcelona, v. 26, n. 10, p. K1–K16, 2008.

Bouvard, V. et al. A review of human carcinogens—Part B: biological agents. **The Lancet Oncology**, Lyon, v. 10, p. 321-322, 2009.

Brandão,V.C.R.A.B. et al. Frequency and types of human papillomavirus among pregnant and non-pregnant women with human immunodeficiency virus infection in Recife determined by genotyping. **Memórias do instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 5, p. 755-763, 2009.

Bulten, J. et al. Interphase cytogenetic analysis of cervical intraepithelial neoplasia. **American Journal of Pathology**, Nijmegen, v. 152, p.495–503, 1998.

Burd, E.M. Human papillomavirus and cervical cancer ,**Clinical Microbiology Reviews**, Detroit, v. 16, n. 1, p. 1-17, 2003.

Burk, R.D. et al. Sexual behavior and partner characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection in young women. **The Journal of Infectious Diseases**, New York, v. 174, p. 679-689, 1996.

Collins, S. et al. High incidence of cervical human papillomavirus infection in women during their first sexual relationship. **An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, Withington, v. 109, n. 1, p. 96-98, 2002.

Confortini, M. et al. Human papillomavirus infection and risk factors in a cohort of Tuscan women aged 18-24: results at recruitment. **BMC Infectious Diseases**, Florença, v. 10, p.157, 2010.

Couturier, J. et al. Integration of papillomavirus DNA near myc genes in genital carcinomas and its consequences for proto-oncogene expression. **Journal of Virology**, v. 65, n. 8, p. 4534-4538, 1991.

de Villiers, E.M. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, Heidelberg, v. 324, n. 1, p. 17-27, 2004.

De Vuyst, H. et al. Human papillomavirus types in women with invasive cervical carcinoma by HIV status in Kenya. **International Journal of Cancer**, Lyon, v. 122, n. 1, p. 244–246, 2008.

Desruisseau, A.J.; Schmidt-Grimminger, D.; Welty, E. Epidemiology of HPV in HIV-Positive and HIV-Negative Fertile Women in Cameroon, West Africa **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, Nashville, v. 2009, Article ID 810596, 6 pages, 2009.

Delmas, M.C. et al. Cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-infected women: prevalence, incidence and regression. European Study Group on Natural History of HIV Infection in Women, **AIDS**, Saint-Maurice, v. 14, n.12, p. 1775-1784, 2000

Doorbar, J. The papillomavirus life cycle. **Journal of Clinical Virology**, Londres, v. 32S, p. S7-S15, 2005.

Dyson, N. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. **Science**, Nova York, v. 243, p. 934–937, 1989.

Fakhry, C. et al. Relationship between Prevalent Oral and Cervical Human Papillomavirus Infections in Human Immunodeficiency Virus-Positive and -Negative Women. **Journal of clinical microbiology**, Chicago, v. 12, n. 12, p. 4479–4485, 2006.

Favre, M. Structural polypeptides of rabbit, bovine, and human papillomaviruses. **Journal of Virology**, Paris, vol. 15, n. 5, p.1239–1247, 1975.

Franceschi, S. et al. Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. **International Journal of Cancer**, Lyon, vol. 119, p. 2677–2684, 2006.

Garbuglia, A.R. et al. Frequency and multiplicity of human papillomavirus infection in HIV-1 positive women in Italy. **Journal of Clinical Virology**, Roma, v. 54, n. 2, p.141-146, 2012.

González, M. A. Molecular biology of cervical cancer **Clinical and Translational Oncology**, Madrid, v. 9, n. 6, p. 347-354, 2007.

Hanselaar, A.G. et al. DNA-cytometry of progressive and regressive cervical intraepithelial neoplasia. **Analytical Cellular Pathology**, Nijmegen, v. 16, n. 1, p. 11–27 , 1998.

Hariri, S. et al. Prevalence of genital human papillomavirus among females in the United States, the National Health And Nutrition Examination Survey, 2003-2006. **The Journal of Infectious Diseases**, Atlanta, v. 204, n. 4, p. 566-573, 2011.

Heilman, S.A. et al. Abrogation of the Postmitotic Checkpoint Contributes to Polyploidization in Human Papillomavirus E7-Expressing Cells. **Journal of virology**, Worcester, v. 83, n. 6, p. 2756–2764, 2009.

Heselmeyer, K. et al. Gain of chromosome 3q defines the transition from severe dysplasia to invasive carcinoma of the uterine cervix. **Proceedings of the National Academy of Sciences** , Bethesda, v. 93, n. 1, p. 479–484, 1996.

Heselmeyer, et al. Advanced-stage cervical carcinomas are defined by a recurrent pattern of chromosomal aberrations revealing high genetic instability

and a consistent gain of chromosome arm 3q. **Genes Chromosomes Cancer**, Bethesda, v. 19, n. 4, p. 233–240, 1997.

Ho, G.Y. et al. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. **New England Journal of Medicine**, Nova York, v. 338, n. 7, p. 423–428, 1998.

Holowaty, P. et al. Natural history of dysplasia of the uterine cervix. **Journal of the National Cancer Institute**, Ontario, v. 91, n. 3, p. 252–258 , 1999.

Horvath, C.A.J. et al. Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. **Virology Journal**, Antuérpia, v. 7, n. 11, p. 1-7, 2010.

Hudelist, G. et al. Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. **Gynecologic Oncology**, Viena, v. 92, n. 3, p.873-880, 2004.

INCA, Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. **INCA** , Rio de Janeiro, 118p, 2011

Jacobs, M.V. et al. Distribution of 37 muscosotropic HPV types in women with cytologically normal cervical smears: te age-related patterns for high-risk and low-risk types. **International Journal of Cancer**, Amsterdã, v. 87, n. 2, p. 221–227, 2000.

Kahesa, C. et al. Association between invasive cancer of the cervix and HIV-1 infection in Tanzania: the need for dual screening. **BMC Public Health**, Dar es Salaam, v. 8, n. 262, p. 1-8, 2008.

Kalantari, M. et al. Physical state of HPV16 and chromosomal mapping of the integrated form in cervical carcinomas. **Diagnostic Molecular Pathology**. , Huddinge , v. 10, n. 1, p. 46-54, 2001.

Kaneshima, E.N. et AL. Aplicação do método PCR-RFLP para tipagem de HPV em infecções cervicais de pacientes atendidas no Lepac, Universidade Estadual de Maringá . **Acta Scientiarum. Health Science**, Maringá, v. 23, 2001.

Kjellberg, L. et al. Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as risk factors for cervical intra-epithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection . **British Journal of Cancer**, Umeå, v. 82, n. 7, p. 1332–1338, 2000.

Klaes, R. et al. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. **Cancer Research**, Heildeberg, v. 59, n. 24, p. 6132-6136, 1999.

Look, A.T.et al. Prognostic importance of blast cell DNA content in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v.65, n. 1079-1086, 1985;

Luque, A.E. et al. Prevalence of human papillomavirus genotypes and related abnormalities of cervical cytological results among HIV-1-infected women in Rochester, New York. **The Journal of Infectious Diseases**, Rochester, v. 194, n. 4, p. 428-434. 2006;

Macleod, I.J. et al. Prevalence of human papillomavirus genotypes and associated cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-infected women in Botswana. **Journal of Medical Virology**, v. 83, n. 10, p. 1689-1695, 2011.

Mane, A. et al. HPV genotype distribution in cervical intraepithelial neoplasia among HIV-infected women in Pune, India. **PLoS One**, Pune, v. 7, n. 6, p. 1689-1695, 2012.

Mangili, G. et al. The role of DNA ploidy in postoperative management of stage I endometrial câncer. **Annals of Oncology** , Milão, v. 19, n. 7, p. 1278–1283, 2008.

Markowitz, L.E. et al. Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **MMWR Recommendations and Reports**, Atlanta, v. 56, n. RR-2, p. 1-24, 2007.

Melgaço, F.G. et al. Human papillomavirus genotypes distribution in cervical samples from women living with human immunodeficiency virus. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, Niterói, v. 283, n. 4, p. 809-817, 2011.

Melsheimer, P. et al. Prospective clinical study comparing DNA flow cytometry and HPV typing as predictive tests for persistence and progression of CIN I/II. **Cytometry**, Heidelberg, v. 46, n. 3, p. 166 – 171, 2001.

Melsheimer, P. et al. DNA aneuploidy and integration of human papillomavirus type 16 e6/e7 oncogenes in intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the cervix uteri. **Clinical Cancer Research**, Heidelberg, v. 10, n. 9, p. 3059-3063, 2004.

Meys, R.; Gotch, F.M.; Bunker, C.B. Human papillomavirus in the era of highly active antiretroviral therapy for human immunodeficiency virus: an immune reconstitution-associated disease? **British Journal of Dermatology**, Londres, v. 162, n. 1, p. 6-11, 2010.

Minkoff, H. et al. The effect of highly active antiretroviral therapy on cervical cytologic changes associated with oncogenic HPV among HIV-infected women. **AIDS**, Nova York, v. 15, n. 16, p. 2157–2164, 2001.

Moscicki, A.B. et al. Chapter 5:Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. **Vaccine**, São Francisco, v. 24, n. 3, p. S42–51, 2006.

Munoz, N. et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **The New England Journal of Medicine**, Lyons, v. 348, n. 6, p. 518–527, 2003.

Munoz, N. et al. Incidence, duration, and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results. **The Journal of Infectious Diseases**, Bogota, v. 190, n. 12, p. 2077-2087, 2004.

Naucle, P. et al. Human papillomavirus type-specific risk of cervical cancer in a population with high human immunodeficiency virus prevalence: case-control study. **Journal of General Virology**, Estocolmo, v. 92, n. 12, p. 2784-2791, 2011.

Ng'andwe, C. et al. The distribution of sexually-transmitted human papillomaviruses in HIV positive and negative patients in Zambia, Africa. **BMC Infectious Diseases**, Lincoln, v. 7, n. 77, p. 1-10, 2007.

Paavonen, J. Human papillomavirus infection and the development of cervical cancer and related genital neoplasias. **International Journal of Infectious Diseases**, Helsinki, v. 11, Suppl 2, p. S3-9, 2007.

Parkin, D.M. et al. Global cancer statistics, 2002. **A Cancer Journal for Clinicians**, Lyon, v. 55, n. 2, p. 74–108, 2005.

Rahman, M. et al. High prevalence of intermediate-risk human papillomavirus infection in uterine cervixes of Kenyan women infected with human immunodeficiency virus. **Journal of Medical Virology**, Kahuku, v. 83, n. 11, p. 1988-1996, 2011.

Rosty, C.P.M. et al. MYC activation associated with the integration of HPV DNA at the MYC locus in genital tumors. **Oncogene**, Paris, v. 25, n. 44, p. 5985-5993, 2006.

Sahasrabudhe, V.V. et al. Prevalence and Predictors of Colposcopic-histopathologically Confirmed Cervical Intraepithelial Neoplasia in HIV-Infected Women in India. **Plos One**, Nashville, v. 5, n. 1, p. e82010, 2010.

Sapp, M. et al. Organization of the major and minor capsid proteins in human papillomavirus type 33 virus-like particles. **Journal of General Virology**, Mainz, v. 76, n. 9, p. 2407–2412, 1995.

Sarian, L.O. et al. Increased risk of oncogenic human papillomavirus infections and incident high-grade cervical intraepithelial neoplasia among smokers: experience from the Latin American screening study. **Sexually Transmitted Diseases**, Campinas, v. 36, n. 4, p. 241-248, 2009.

Scheffner, M. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. **Cell**, Bethesda, v. 75, n. 3, p. 495–505, 1993.

Schiffman, M.H. et al. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. **Journal of National Cancer Institute**, Bethesda, v. 85, n. 12, p. 958–964, 1993.

Schiffman, M. et al. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. **Virology**, Bethesda, v. 337, n.1, p. 76–84, 2005.

Silva, A.M.T.C. et al. Genotipagem de Papiloma Vírus Humano em paciente com papilomatose laríngea recorrente. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Goiânia, v. 49, n. 3, p. 167-174, 2003.

Singh, M. et al. Correlation of DNA ploidy with progression of cervical cancer. **Journal of cancer epidemiology**, Lucknow, v. 2008, p. 1-7, 2008.

Skyldberg, B. et al. Human papillomavirus infection, centrosome aberration, and genetic stability in cervical lesions. **Modern Pathology**, Estocolomo, v. 14, n. 4, p. 279–284, 2001.

Spitzer, M. Cervical screening adjuncts: recent advances. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, Nova York, v. 179, n. 2, p. 544–556, 1998.

Stanley, M. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. **Gynecologic Oncology**, Cambridge, v. 109, n. 2, p. S15-21, 2008.

Syrjänen, S. M.; Syrjänen, K.J. New concepts on the role of human papillomavirus in cell cycle regulation. *Annals of Internal Medicine*, Turku, v. 31, n. 3, p. 175–187, 1999.

Tamura, K. et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, Tokyo, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

Thorland, E.C. Human papillomavirus type 16 integrations in cervical tumors frequently occur in common fragile sites. **Cancer Research**, Rochester, v. 60, n. 21, p. 5916-5921, 2000.

Trottier, H. et al. Persistence of an Incident Human Papillomavirus Infection and Timing of Cervical Lesions in Previously Unexposed Young Women. **Cancer, Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, Quebec, v. 18, n. 3, p. 854-862, 2009.

UNAIDS/WHO, Report on the global AIDS epidemic , **World Health Organization**, Geneva, 212p, 2012

Walboomers. J.M. et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **The Journal of Pathology**, Amsterdã, vol. 189, n. 1, p. 12—9, 1999.

Wentzensen, N.; Vinokurova, S.; von Knebel Doeberitz, M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. **Cancer Research**, Heidelberg, vol. 64, n. 11, p. 3878-3884, 2004.

WHO, The global burden of disease: 2004 update. Geneva, **World Health Organization**, Geneva, 2008.

zur Hausen, H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers
Biochim Biophys Acta. 1996; 1288:F55-78

zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical
application. Nat Rev Cancer. 2002; 2:342-50.

APÊNDICES

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

EVOLUÇÃO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA DA INFECÇÃO CERVICAL PELO HPV EM MULHERES CO-INFECTADAS COM O HIV ATENDIDAS EM CENTROS DE REFERÊNCIA PARA HIV/AIDS EM RECIFE - PE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Bom dia (ou boa tarde) Meu nome é (_____) e estou aqui para convidá-la a participar de uma pesquisa.

O Ministério da Saúde, através do Programa Nacional de DST/Aids, em conjunto com a UNESCO está financiando esta pesquisa que está sendo realizada neste serviço que presta assistência a pessoas com HIV e Aids.

O objetivo deste estudo é verificar o aparecimento de doenças no colo do útero que possam significar um pré-câncer e gostaríamos de contar com sua colaboração. Se aceitar, faremos além da rotina de atendimento recomendada para seu caso, ou seja a “prevenção” (coleta para Papanicolaou) e colposcopia, uma coleta de material do colo do útero para avaliar se a senhora possui um vírus chamado HPV e que pode estar associado a uma doença. Se o HPV for identificado, faremos a cada seis meses, por duas vezes, novamente esses mesmos exames para acompanhar se a infecção permaneceu, se desapareceu ou se evoluiu. O estudo não prevê o uso de nenhum medicamento ou droga nova, mas todo tratamento recomendado será garantido para a senhora, independentemente se a senhora aceitar participar ou não desta pesquisa. Se aceitar, seus dados pessoais serão mantidos em segredo e ao final da pesquisa estaremos divulgando informações científicas para que melhorias na prevenção, diagnóstico e tratamento dessas doenças possam ocorrer. Os exames promovem apenas o desconforto causado pela introdução do espéculo (“bico de pato”) na vagina para realizar a colposcopia (“visualização do colo com uma lente de aumento, como se fosse um binóculo”) e para coleta do material, que consiste em esfregar uma pequena escovinha no colo.

Além disso, a cada seis meses, como de rotina já se faz, será necessária coleta de 5 a 10 ml de sangue a cada visita semestral por um ano e meio de seguimento, e a resposta a perguntas feitas por uma entrevistadora. A senhora mesmo aceitando participar poderá se recusar responder ao questionário ou parte dele e poderá desistir de fazer uma ou mais destas coletas, e sair do estudo em qualquer momento, sem prejuízo ao seu atendimento nesta unidade. Sempre que possível, as coletas de sangue e as entrevistas serão obtidas durante uma visita regular ao Serviço, como para consultas ou coletas de exames de rotina, não se necessitando assim de novas coletas ou visitas.

Após a realização do estudo aqui proposto, o restante do seu sangue ficará armazenado pelo tempo necessário para realização de eventuais testes para confirmar ou complementar a avaliação laboratorial necessária ao seu adequado seguimento clínico.

Após leitura do texto acima concordei em participar deste estudo.

Nome: _____

Assinatura: _____

Data: ____/____/____

Quaisquer dúvidas favor contatar Dra. Maria Luiza Bezerra Menezes no fone 3427-3911 – ramal 261 no horário das 8:00h às 12:00h ou o Comitê de Ética em Pesquisas do CISAM pelo fone 33021716

Eu, abaixo assinado, me responsabilizo pelo cumprimento das condições aqui expostas.

Recife, ____ de _____ de 200__

Dra. Maria Luiza Bezerra Menezes
Coordenadora da pesquisa

APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO DA PESQUISA

EVOLUÇÃO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA DA INFECÇÃO CERVICAL PELO HPV EM MULHERES CO-INFECTADAS COM O HIV ATENDIDAS EM CENTROS DE REFERÊNCIA PARA HIV/AIDS EM RECIFE - PE

QUESTIONÁRIO

Seção 1. Dados Gerais	
1.1 – Serviço de Saúde 1. CISAM 2. Correia Picanço 3. Outros 4. HC	1.2 – No. do Prontuário:
	1.3 – Data da Entrevista: / /
Seção 2. Dados da mulher	
2.1 – Nome: _____	
2.2 – Nome da Mãe: _____	
2.3 – Dt. Nascimento: / /	2.4 – Idade:
2.5 – Endereço: _____ No. _____ Bairro _____ Ponto de referência: _____ Fone: _____ / Contato: _____	
Município	
01. Recife 06. Itamaracá 11. Moreno 02. Olinda 07. Cabo 12. Camaragibe 03. Paulista 08. Jaboatão dos guararapes 13. São Lourenço 04. Igarassu 09. Ipojuca 14. Outra Cidade/Estado (especificar) 05. Itapissuma 10. Abreu e lima	
2.6 – Atualmente você é: 1. Solteira; 2. Casada; 3. Vive junto; 4. Separada/divorciada; 5. Viúva; 8. Não Sabe Informar; 9. Inaplicável	
2.7 – Sabe ler e escrever? 1. Sim; 2. Não (passe para 10) ; 8. Não Informou; 9. Inaplicável	
2.8 – Qual o curso que completou ou está cursando? 1. Ensino Fundamental ou primeiro grau; 2. Ensino Médio ou Segundo Grau; 3. Pré Vestibular; 4. Superior – Graduação; 5. Mestrado ou Doutorado; 6. Não concluiu nenhum curso; 8. Não Sabe Informar	
2.9 – Você trabalha em alguma atividade remunerada? 1. Sim; 2. Não	
2.10 – Qual foi essa atividade? (especificar) _____	
2.11 – Você é pensionista do INSS? 1. Sim; 2. Não	
2.12 – Qual seu rendimento de sua família? R\$ 0. Não teve; 8. Não informou	
2.13 – Quantas pessoas moram na sua casa (com você)? _____	
Seção 3 – História de contato.	

3.1 – Fez tratamento dentário nos últimos cinco anos?	1.Sim; 2.Não; 8.Não informou	
3.2 – Fez transfusão de sangue nos últimos cinco anos?	1.Sim; 2.Não; 8.Não informou	
3.3 – Tem ou teve tatuagem?	1.Sim; 2.Não; 8.Não informou	
3.4 – Tem ou teve piercing ?	1.Sim; 2.Não; 8.Não informou	
3.5 – Divide objetos cortantes como tesoura, lâmina de barbear, navalha, alicate com outras pessoas em casa ou em salões de beleza (manicure, pedicure, etc.) ?	1.Sim; 2.Não; 3.Às vezes	
3.6 – Como você acha que contraiu o HIV?	1.Transfusão sanguínea; 2.Objetos cortantes; 3.Relações sexuais; 8.Não informou	
3.7 – Há quanto tempo você sabe que é HIV positiva? ☐ ☐	1.Meses; 2.Anos; 8.não informou; 9.ign.	

Seção 4 – Atividade sexual, história reprodutiva e métodos anticoncepcionais

4.1 – Você já iniciou sua vida sexual?	1.Sim; 2.Não ou não informou (agradece e encerra a entrevista)	
4.2 – Quantos anos você tinha quando teve a primeira relação sexual?	99 = ignorado	
4.3 – Você tem algum(a) parceiro(a) sexual?	1. Sim; 2.Não (siga para a questão 4.5); 8.Não informou (siga para a questão 4.5)	
4.4 – Você já teve outro parceiro sexual além do atual ?	1.Sim; 2.Não; 8.Não informou	
4.5 – Quantos parceiros sexuais você teve?	99 = ignorado	
4.6 – Você já manteve relações sexuais com parceiro que faz sexo com pessoa do mesmo sexo?	1.Sim; 2.Não; 8.Não informou	
4.7 – Você já teve relações sexuais com parceiro(s) que você sabia que era(m) HIV-positivo(s)?	1.Sim; 2.Não; 8.Não informou	
4.8 – Você tem ou teve alguma doença que se pega através do sexo?	1.Sim; 2.Não (passe para 4.12) 8.Não informou (passe para 4.12)	
4.11 – Qual foi essa doença? (especificar)		
4.12 – Você costuma ou costumava praticar sexo anal?	1.Sim; 2.Não; 3. Às vezes; 8.Não informou	
4.13 – Você costuma ou costumava praticar sexo oral?	1.Sim; 2.Não; 3. Às vezes; 8.Não informou	
4.14 – Você costuma ou costumava praticar sexo com pessoa do mesmo sexo?	1.Sim; 2.Não; 3. Às vezes; 8.Não informou	
4.15 - Você costuma ou costumava praticar sexo com mais de uma pessoa ao mesmo tempo?	1.Sim; 2.Não; 3. Às vezes; 8.Não informou	

4.16 - Você tem filhos?	1.Sim; 2.Não (siga para a questão 4.18)	
4.17 – Quantos (filhos)?		
4.18 - Você já teve algum aborto?	1.Sim; 2.Não (siga para a questão 4.20); Não informou (siga para a questão 4.20)	
4.19 – Quantos (abortos)?		
4.20 – Você está grávida?	1.Sim; 2.Não; Não informou	
4.21 – Você tem trompas ligadas?	1.Sim; 2.Não; Não informou	
4.22 – Você está evitando engravidar no momento?	1.Sim; 2.Não; Não informou	
4.23 – Você toma pílula anticoncepcional?	1. Sim; 2. Não (siga para questão 4.25)	
4.24 – Há quanto tempo toma pílula?	1. Meses; 2. Anos	
4.25 – Você já tomou pílula anticoncepcional antes?	1. Sim; 2. Não (siga para questão 4.27)	
4.26 – Há quanto tempo parou de tomar?	1. Meses; 2. Anos	
4.27 – Tomou pílula por quanto tempo?	1. Meses; 2. Anos	
4.28 – Você toma injeção para evitar gravidez?	1. Sim; 2. Não (siga para questão 4.30)	
4.29 – Há quanto tempo você toma injeção para evitar gravidez?	1. Meses; 2. Anos	
4.30 – Você já tomou injeção para evitar gravidez antes?	1. Sim; 2. Não (siga para questão 4.33)	
4.31 – Há quanto tempo parou de tomar essa injeção?	1. Meses; 2. Anos	
4.32 – Tomou essa injeção por quanto tempo?	1. Meses; 2. Anos	
4.33 – Você já ouviu falar em camisinha masculina ?	1. Sim; 2. Não (siga para a questão 4.36)	

4.34 – Quando você transa o seu (sua) parceiro(a) tem o hábito de usar camisinha? 1.Sim; 2.Não; 3.Às vezes; 8.Não informou; 9.Inaplicável	
4.35 – Antes de saber que era portadora do vírus da AIDS, quando você transava seu parceiro usava camisinha? 1.Sim; 2.Não; 3.Às vezes; 8.Não informou; 9.Inaplicável	
4.36 – Você já ouviu falar em camisinha feminina ? 1. Sim; 2. Não (siga para a seção 5)	
4.37 – Quando você transa tem o hábito de usar camisinha? 1.Sim; 2.Não; 3.Às vezes; 8.Não informou; 9.Inaplicável	
4.38 – Antes de saber que era portadora do vírus da AIDS, quando você transava usava camisinha? 1.Sim; 2.Não; 3.Às vezes; 8.Não informou; 9.Inaplicável	
Seção 5 – Tabagismo	
5.1 - Você fuma cigarro? 1.Sim; 2.Não (siga para a questão 5.4)	
5.2 - Há quanto tempo fuma? 1. Meses; 2. Anos	
5.3 – Quantos cigarros você fuma por dia? (siga para a seção 6)	
5.4 – Você já fumou cigarro? 1.Sim; 2. Não (siga para a seção 6)	
5.5 – Por quanto tempo fumou? 1. Meses; 2. Anos	
5.6 – Há quanto tempo parou de fumar? 1. Meses; 2. Anos	
5.7 – Quantos cigarros você fumava por dia? 99=ignorado	

Seção 6 – Etilismo	
6.1 – Na sua vida inteira, você já tomou pelo menos 8 drinks de qualquer tipo de bebida alcoólica (1 drink quer dizer meia cerveja, 1 copo de vinho, 1 dose de pinga, 1 dose de whisky)? 1.Sim; 2. Não (siga para a seção 7)	
6.2 – Já houve algum período na sua vida em que em um ano você tomou pelo menos 8 drinks contendo álcool ? 1.Sim; 2.Não (siga para a seção 7)	
6.3 – Durante os últimos 30 dias você bebeu pelo menos uma dose de alguma bebida alcoólica? 1.Sim; 2.Não	
6.4 – Durante os últimos 3 meses, com que frequência você geralmente tomou cerveja, vinho, pinga ou qualquer outro tipo de bebida alcoólica? (pontuação a ser colocada pelo coordenador, coloque apenas o no. de 1 a 7) 1. Todos os dias (7 pontos); 2. Quase todos os dias (5,5 pontos); 3. 3 a 4 dias por semana (3,5 pts.); 4. 1 a 2 dias por semana (1,5 pontos) 5. 2 a 3 dias por mês (0,62 pontos); 6. Uma vez por mês (0,25 pontos); 7. Menos de uma vez por mês (0,10 pontos); 9. Não se aplica	
6.5 – Nos dias em que bebeu nos últ. 3 meses quantos drinks geralmente tomou num único dia ? 99. Não se aplica	
6.6 – Você está atualmente em tratamento para um problema com álcool? 1.Sim; 2.Não; 9. Não se aplica	
6.7 – Você acha que o álcool interfere na sua vida sexual? 1. Sim; 2. Não; 3. Não sei; 9. Não se aplica	
6.8 – Classificação do etilismo (a ser realizada pelos coordenadores) 1.Abstêmio (resposta negativa às perguntas 6.1 ou 6.2) 2.Bebedor leve (produto da questão 6.4 pela 6.5 menor que 14) 3.Bebedor pesado (produto da questão 6.4 pela 6.5 maior ou igual a 14) 4.Dependente do álcool (Caso tenha respondido sim na questão 6.6)	
Seção 7 – Uso de drogas	
7.1 – Você já fez uso de drogas fumadas? 1. Sim; 2. Não	
7.2 – Você já cheirou cola? 1. Sim; 2. Não	
7.3 – Você já fez uso de drogas cheiradas? 1. Sim; 2. Não (vá para questão 7.5)	
7.4 – Qual droga cheirada você fez uso? 1. Sim; 2. Não	
7.5 – Você já fez uso de drogas injetáveis? 1. Sim; 2. Não (siga para Seção 8)	
7.6 – Qual droga injetável? (especificar)	
Seção 8 – Atenção a Saúde	
8.1 – Você sabe o que é exame preventivo? 1. Sim; 2. Não	

Citologia:	Colposcopia (pode ter mais de 1):	Biópsia/CAF:
1. Negativa 2. ASCUS 3. ASC-H 4. AGUS 5. HPV 6. LIEBG (NIC I) 7. LIEAG 8. LIEAG (NIC II) 9. LIEAG (NIC III) 10. In situ 11. CA invasor 12. Não fez	1. Sem atipias 2. Epitélio acetobranco (EAB) plano 3. EAB denso 4. Pontilhado fino 5. Pontilhado grosseiro 6. Mosaico fino 7. Mosaico grosseiro 8. Vasos atípicos 9. Iodo parcialmente neg 10. Iodo negativo 11. Colpite mosaic iforme 12. Outros	1. Negativa 2. HPV 3. NIC I 4. NIC II/NICIII 5. NIC II 6. NIC III 7. In situ 8. CA invasor

APÊNDICE C – VERSÃO DO ARTIGO 1 EM INGLÊS

Prevalence of HPV infection, distribution of viral types and HPV risk factors in cervical samples from HIV-positive women attended at three HIV-AIDS reference centers in northeastern Brazil

Albert Eduardo Silva Martins ^{1,2}, Norma Lucena-Silva ^{1,2}, Renan Gomes Garcia ¹, Stefan Welkovic ³, Aureliana Barboza ⁴, Maria Luiza Bezerra Menezes ⁴, Magda Maruza ⁵, Terezinha Tenório ⁶, Ricardo A A Ximenes ⁷.

¹Laboratório de imunogenética, Centro de pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 50670-420, Brasil;

²Laboratório de biologia molecular, Departamento de oncologia pediátrica, Hospital IMIP, Recife, 50070-550, Brasil;

³Disciplina de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Ciências Médica da Universidade de Pernambuco – Centro Integrado de Saúde Amaury de Medeiros (CISAM-UPE), 52030-010, Brasil;

⁴Departamento Materno-Infantil, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Pernambuco, 50100-130, Brasil;

⁵Hospital Correia Picanço, Secretaria de Saúde de Pernambuco, Recife, 52050-150, Brasil.

⁶Departamento Materno-Infantil, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 50100-130, Brasil.

⁷Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, 50670-901, Brasil.

Corresponding author: Albert Eduardo Silva Martins, Laboratório de imunogenética, Centro de pesquisas Aggeu Magalhães, Av. Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária, Recife, 50670-420, Brasil. (aesmartins@hotmail.com)

Summary

Background. HIV-positive patients have greater prevalence of coinfection with HPV of high oncogenic risk. Presence of the virus favors progression of intraepithelial squamous cell lesions and may induce cancer. The aim of this study was to evaluate the prevalence of HPV infection, distribution of HPV types and risk factors among HIV-positive patients.

Methods. Cervical samples from 450 HIV-positive patients were analyzed with regard to oncotic cytology, colposcopy and HPV presence and typing by means of PCR and sequencing. The results were analyzed by comparing demographic data and data relating to HPV and HIV infection.

Results. The prevalence of HPV was 47.5%. Among the HPV-positive samples, 59% included viral types of high oncogenic risk. Multivariate analysis showed that there was association between HPV infection and the presence of cytological alterations ($p=0.003$); age greater than or equal to 35 years ($p=0.002$); number of partners greater than three ($p=0.002$); CD4+ lymphocyte count $<200/\text{mm}^3$ ($p=0.041$); and alcohol abuse ($p=0.004$).

Conclusions. Although high-risk HPV was present in the majority of the lesions studied, the low frequency of HPV16 (3.3%), low occurrence of cervical lesions and preserved immunological state in most of the HIV-positive patients were factors that may explain the low occurrence of precancerous cervical lesions in this population.

Keywords: HPV prevalence; HPV typing distribution; HIV HPV coinfection; risk factors; HPV types.

Sponsorships

The Program for Technological Development in Tools for Health-PDTISFIOCRUZ gave financial support for gene sequencing. A.E.S.M was a Ph.D. student supported by FACEPE (APQ-IBPG-1802-4). N.L.S. is the recipient of a postdoctoral fellowship from CNPq (grant # 150572/2011-5). This work was supported by Brazilian Health Ministry (Grant # 322/2005). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

INTRODUCTION

The human papillomavirus (HPV) is the main etiological agent for cervical lesions worldwide (Walboomers et al. 1999) and persistence of high-risk HPV infection is closely associated with development of intraepithelial neoplasia and cervical cancer (Naucler et al. 2011).

The distribution of HPV types varies according to the geographical area and the risk factors for acquiring the infection (Giuliano et al. 1999, Clifford et al 2005). In some regions of Europe and North America, the prevalence of HPV 16 is around 43%, regardless of whether the women are HIV-positive or negative (Hariri et al. 2011, Martín et al. 2011, Garbuglia et al. 2012,). However, in other regions, like in Africa, HPV 39, HPV 52 and HPV 58 are equally prevalent in HIV-positive patients (Macleod et al. 2011, Rahman et al. 2011). Despite regional difference in the distribution of viral types, HPV 16 is highly prevalent in cervical cancer patients, in comparison with individuals without cancer, regardless of whether these women have HIV or not (Naucler et al. 2011).

In the southern and southeastern regions of Brazil, the prevalence of HPV among HIV-positive women ranges from 49% to 78.8% (Melgaço et al.2011, Corrêa et al. 2011, Araújo et al.2012, Luz et al. 2012). In Rio de Janeiro, the types most frequently found have been HPV 16, HPV 53 and HPV 58 (Melgaço et al. 2011), which suggests that there is greater circulation of non-vaccinal viral types in Brazil. The present study had the objectives of evaluating the prevalence and identifying risk factors of HPV infection, and of describing the distribution of viral types in a cohort of HIV-positive women who were attended at three reference centers for HIV/AIDS in the northeastern region of Brazil.

METHODS

Study design

The patients included in this study formed part of a prospective cohort of HIV-positive women who were attended at Hospital Correia Picanço (HCP), Hospital das Clínicas (HC) and the Integrated Health Center Amaury de Medeiros (CISAM), between May 2007 and August 2011. These three hospitals are reference centers for HIV-AIDS. The results related to the prevalence of HPV and the identification of risk factors for infection were obtained at the baseline evaluation of the cohort, whereas the data regarding the evolution of infection were obtained during the monitoring period. The study included 450 adult HIV-positive women who were attended at the gynecology services of these three hospitals and who agreed to participate in the study and signed the consent statement. Among these, 219 patients returned to the service at least once for follow-up.

Data-gathering and standardization of techniques

All the women answered a questionnaire for a clinical-epidemiological assessment and underwent colposcopy and cytological examination. The colposcopy was performed by a member of the research team, and was done in accordance with the Rome international nomenclature for classifying colposcopic features (SBPTGIC 2003). During the colposcopic examination, cervical scrapings were collected for cytopathological and molecular analyses, using cytobrushes. The results from the cytological tests were classified in accordance with the standards in the Brazilian guidelines for screening for uterine cervical cancer (INCA 2011). In cases in which colposcopic atypia were identified, cervical biopsy fragments were sent (preserved in 10% formol) for histopathological analysis, taking into consideration the criteria described in the literature (Schneider & Schneider 1998).

The cervical scraping samples were stored at -20°C and were subsequently used for molecular analysis, which included investigation of the HPV genome and, in positive cases, molecular typing.

HPV detection

Genomic DNA was extracted from the cervical samples using proteinase K, and the sample quality was assessed in terms of its capacity to amplify the human constitutive gene *gapdh* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase). The samples that were positive for amplification of the *gapdh* gene were then subjected to PCR using the primers MY09 and MY11, which amplify a 450 bp fragment from the L1 region of HPV (Manos et al. 1989). The amplified products were viewed under ultraviolet light on 2.0% agarose gel in TAE buffer, stained with 0.5 µg/ml of ethidium bromide, and were photographed using a GelCam Polaroid camera.

HPV typing.

The PCR products that were HPV-positive were subjected to DNA sequencing in both directions, using the same primers as in the amplification stage, in order to characterize the viral type. This was done using the BigDye® protocol (Applied Biosystems, São Paulo, Brazil), as described by the manufacturer, in the ABI 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems). The chromatograms were firstly viewed using the Mega 5.0 software (Tamura et al. 2011) in order to evaluate the quality of the sequence. Samples presenting defined peaks and low background on the chromatogram were subjected to the NCBI Blastn software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) in order to identify the HPV types.

Statistical analysis

The clinical-epidemiological and laboratory data were entered into a database using the Excel 2007 software. In order to assess the prevalence of HPV infection, women presenting at least one sample that had been found to be positive using PCR were considered

to be positive. The HPV types were classified according to their phylogenetic characteristics, as previously discussed in the literature (de Villiers et al. 2004). Age was categorized taking a median of 35 years, so as to enable comparisons with findings in the literature (Garbuglia et al. 2012). The association with smoking was analyzed by considering smokers and former smokers either together or separately in relation to nonsmokers. Regarding the variable of alcohol abuse, the term “light drinker” was used to mean women whose alcohol intake over the last three months did not exceed 14 days per month and whose daily dose was limited to one glass of wine or distilled drink (250 mL), or one can of beer (350 mL), while women with greater alcohol intake were categorized as “heavy drinkers”. Drug users were considered to be individuals who were using or had used any illegal drug (smoked, sniffed or injected). The cutoff point for CD4⁺ T lymphocytes of 200 cells/mm³ was used as an expression of immunosuppression in the patients.

The Stata 10.0 software (Stata Corp LP, College Station, TX, USA) was used for the statistical analysis. In the univariate analysis, the odds ratio (OR) and their respective 95% confidence intervals (95%-CI), and the p-values (χ^2 test and the likelihood ratio) were estimated. Associations producing p-value <0.05 were considered statistically significant. It was used as a criterion for inclusion of variables in the multivariate analysis a p-value <0.25, and to remain in the model, a p-value < 0.05, or adjusting the value of another variable OR for a value higher than 10%. The Mann-Whitney test was used in the analysis of medians of continuous variables groups. The kappa statistic was used to measure the agreement between two consecutive analyses in the study.

Ethics

This study was approved by the Research Ethics Committee of the “Amaury de Medeiros” Healthcare Center (CISAM), under the registration number 0011.0.250.000-05. All women who agreed to participate in the study signed an informed consent form.

RESULTS

Identification of risk factors for HPV infection

HPV infection was investigated among 450 HIV-positive women who were attended at three reference services for HIV-AIDS in Pernambuco. Among these, 214 (47.5%) were coinfecting with HPV. A total of 310 women (68.9%) filled out the research questionnaire completely. The losses are characterized in Figure I.

Univariate analysis of the association between HPV infection and socio-demographic variables, habits, characteristics associated with HPV infection and characteristics associated with HIV infection are shown in Table I. The characteristics of the women coinfecting with HPV was found to be similar to that of the HIV-positive women without detectable HPV infection, in relation to family income ($p = 0.352$), smoking ($p = 0.384$), drinking ($p = 0.184$), use of drugs ($p = 0.350$) and pregnancy on diagnosis ($p = 0.357$). On the other hand, age under 35 years ($p = 0.005$), length of time since HIV infection less than 24 months ($p = 0.026$), number of partners greater than three ($p = 0.028$), CD4+ count $< 200/\text{mm}^3$ ($p = 0.044$) and schooling level greater than eight years ($p = 0.026$) were shown to be associated with HPV coinfection.

The HPV-positive patients predominantly presented cervical lesions ($p < 0.000$). There was no association between the presence of cervical lesion and the degree of oncogenicity ($p = 0.884$) (data not shown in table). The presence of cervical lesion, although statistically associated with HPV infection, was not included in the multivariate model because it is not considered a risk factor for HPV infection.

In the multivariate analysis, the following factors remained in the final model: age under 35 years ($p = 0.001$), schooling level ($p = 0.04$), number of partners greater than three ($p = 0.01$), CD4+ T lymphocyte count $< 200/\text{mm}^3$ ($p = 0.018$), light drinking ($p = 0.018$) and heavy drinking ($p = 0.003$) (Table II).

In an additional analysis, considering all cytology specimens evaluated (baseline and subsequent assessments), HPV infection was shown in 65.8% (54/82) of the samples with cytological alterations, while only 31.8% (145/521) of the samples without cytological alterations were HPV-positive. Out of the 54 HPV-positive samples with cytological alterations, seven were diagnosed as ASCUS (13.0%) in cytological evaluation, two as ASC-H (3.7%), three with presence of HPV (5.5%), 27 as LIEBG (50%) and 15 (27.8%) as LIEAG. Out of the 28 HPV-negative samples with alterations in oncotic cytological evaluations, 11 had a diagnosis of ASCUS (39.3%), one had evidence of HPV infection (3.6%), 12 (42.9%) were diagnosed as LIEBG and four (14.3%) as LIEAG.

HPV typing

Among the 450 women studied, 214 (47.5%) were coinfecting with HPV. Of these, 178 had had HPV typing done on at least one occasion. The types found most frequently were HPV 53 (14.5%), HPV 58 (13.5%), HPV 31 (10.7%), HPV 6 (9.3%), HPV 61 (8.9%) and HPV 11 (7.5%), which represented 64.4% of all the cases. The types HPV 16 (3.3%) and HPV 18 (1.9%) presented low frequencies.

Among the 54 HPV-positive samples with cytological alterations, the viral type was identified in 49 (90.7%). Out of the 39 samples with mild dysplasia (ASCUS, ASC-H, HPV and LIEBG), 21 (54%) were typed as presenting high-grade HPV, among which HPV 53 was the most frequent type (8 samples). Among the women with moderate dysplasia (LIEAG),

high-grade HPV was also identified in 53% of the 15 samples evaluated, among which HPV 58 was the most prevalent type (3/8).

Biopsies were performed in HPV-positive samples that presented atypia on colposcopy, among which 20 (40%) did not present any histological alteration, eight were diagnosed as HPV (16%), 12 as CIN I (24%), nine as CIN II (18%) and one as CIN III (2%). The most prevalent HPV types in the biopsies were HPV 16 (in three CIN II cases), HPV 31 (in three CIN I cases) and HPV 53 (in one CIN I and CIN II case). The sample diagnosed with CIN III presented HPV 33.

On the other hand, among the seven samples positive for HPV 16 in our study, only one was characterized as LIEAG from cytology and CIN II from biopsy. Out of the six that were negative from cytology, three had an indication for performing biopsy, among which two were histologically characterized as CIN II and one was negative. The three women who presented CIN II in histological evaluations had CD4⁺ T lymphocyte counts greater than 200/mm³. Taking into account immunological state, the distribution of high and low-risk HPV among the immunosuppressed women with CD4⁺ T lymphocytes < 200/mm³ did not differ from the distribution among the women whose immunological state had been preserved, i.e. with CD4⁺ T lymphocytes ≥ 200/mm³ ($p = 0.316$).

Evolution of HPV infection

Among the HIV-positive women who were followed up clinically, the molecular diagnosis of HPV infection was made on two or more consecutive cervical samples in the cases of 196 women, of whom 86 (43.8%) were negative for HPV on both occasions (Table III). Out of the 76 women who were positive for HPV on the first occasion, 50 of them became negative in other samples, thus showing a regression rate of 65.8%. Among the 120 women who were negative for HPV on the first occasion, 86 (71.7%) of them remained negative and 34 (28.3%) became positive. The concordance regarding HPV detection between

the first and last samples was considered to be moderate ($k = 0.571$), in accordance with the interpretation suggested by Landis and Koch (1977).

Persistence of HPV infection was observed in 26 women (13.4%), among whom it was possible to do typing on all samples from 23 of them. Six women (26.1%) kept the same viral type and 17 (74.0%) presented the virus with the same degree of oncogenicity but with a different viral type.

DISCUSSION

In this study performed in HIV-positive women treated in three centers for HIV-AIDS in Pernambuco, the prevalence of HPV infection was 46.5%, and the most frequent viral types were HPV53, HPV58, HPV31, HPV6, HPV61 and HPV11. HPV infection was associated with age less than 35 years, time elapsed since the diagnosis of HIV infection less than 24 months, the number of partners higher than three, CD4 + count $<200/\text{mm}^3$ and more than eight years of study. Regarding the evolution of HPV infection, it was observed a regression rate of 65.8% in contrast to the rate of progression of 28.3%

Frequency of HPV in cervical infections in HIV-positive women

The prevalence of coinfection with HPV (47.5%) among HIV-positive women in Pernambuco, northeastern Brazil, is similar to what has been reported in North America and some European countries, but is lower than has been found in populations in southern and southeastern Brazil (65%) (Table IV) (Entiauspe et al. 2010, Melgaço et al. 2011, Araújo et al. 2012). In this regard, the influence of the technique used for diagnosing HPV infection needs to be taken into consideration. A Spanish study showed that the prevalence of HPV coinfection among 93 women with HIV-1 infection and normal oncotic cytology was 41%, using the hybrid capture II method for detecting HPV, but was 63% using PCR with 16 type-specific primers (Videla et al. 2009). PCR with degenerated MY9/MY11 primers was the method used in our study, and it is possible that the low prevalence of infection encountered

was due to the lower sensitivity of the method, in relation to methods such as nested PCR or PCR followed by hybridization, which were used in other groups of patients. The prevalence will also be influenced by the patient selection criteria, i.e. whether they are recruited at referral services for HIV patients, cancer treatment or gynecological treatment (Naucler et al. 2011).

The HIV-positive women were more susceptible to infection by high-risk HPV that is known to be less prevalent, such as HPV 53 (14.4%) and HPV 58 (13.4%) than to the types HPV 16 (3.3%) and HPV 18 (1.9%). HPV 16 is the type found most frequently in HIV-negative women in the state of Pernambuco in association with the presence of CIN (Brandão et al. 2009, Baldez et al. 2012). Although greater prevalence of the viral types HPV 52, 53, 56 and 58 than of HPV 16 has been shown among HIV-positive women in the literature, the HPV 16 infection rate was higher than what was found in the present study (Luque et al. 2006, Macleod et al. 2011, Rahman et al. 2011, Garbuglia et al. 2012). In southeastern Brazil, HIV-positive women have presented notably higher frequency of infection with HPV 16 (21%), followed by HPV 53 (9%) and HPV 58 (9%), thus suggesting that the frequencies of viral types in HIV-positive women may also be related to the geographical distribution of the viral types (Melgaço et al. 2011). However, we cannot rule out the possibility that the low frequency of HPV 16 and HPV 18 infection in our study may have been related to the impossibility of determining the viral type in 50 of our samples. The chromatograms from sequencing on these samples suggested that cervical infection due to more than one type of HPV was present, and this was also confirmed by the banding pattern obtained through the PCR-RFLP protocol (data not shown). However, even considering the possibility that these 50 samples with multiple infection might have included HPV 16, the frequency of this type would still be low.

Risk factors for HPV infection

The relationship between the presence of HPV and cervical oncotic cytological alterations with presence of CIN has been recognized in several studies (Martín et al. 2011, Macleod et al. 2011, Rahman et al. 2011, Melgaço et al. 2011). However, there is some controversy regarding the causal relationship between epithelial alterations and HPV infection, i.e. between whether epithelial lesions are risk factors for HPV infection or whether they are a consequence of HPV infection. A cohort study among HIV-positive and negative sex workers showed that chronic infections with high potential for epithelial damage, such as due to *N. Gonorrhoe* and *Chlamydia*, are associated with acquisition of high-risk HPV, but not the bacterial infections that produce less epithelial damage (Veldhuijzen et al. 2011). Other authors have reported that an association between HPV infection and bacterial infections and *Trichomonas* (Rodriguez-Cerdeira et al. 2012) may occur regardless of any presence of cytological alterations (Watts et al. 2005), thus acting as cofactors for development of CIN II (Bhatla et al. 2013). Chronic vaginal infections caused by anaerobic bacteria act as cofactors for the appearance of CIN, independent of HPV infection, through the mechanism of loss of the natural barrier of lactobacillus, with alteration of the vaginal pH and production of DNA adducts (Gillet et al. 2012). The lack of information on associated bacterial infections and the small number of women with severe cytological alterations did not allow a more detailed assessment on the association between HPV infection and the presence of cytological alterations. In this context, we considered that a tissue lesion would facilitate access and establishment of HPV in the cervical basal layer, but would not be directly related to greater chance of exposure; and that the virus might be eliminated with resolution of the lesion through an appropriate immunological response. On the other hand, persistence of the active viral infection might lead to progressive worsening of the tissue lesion, thus suggesting that the cytological lesion might be the cause and consequence of the HPV infection. Another

important point to be considered is that the HIV infection might in itself increase the risk of cytological alterations and HPV infection, independently (Yamada et al. 2008).

The gradual decrease in occurrences of HPV infection in women after the age of 35 years ($p = 0.001$) corroborates the data in the literature (Melgaço et al. 2011, Garbuglia et al. 2012), and may be explained by the decreasing number of sexual partners and the immunity against infections that had been acquired (Confortini et al. 2010).

The number of partners was also associated with HPV infection among the women studied ($p = 0.009$). The association between the number of partners and occurrences of HPV infection had previously been reported in HIV-negative women (Burk et al. 1996) and HIV-positive women (Grinsztejn et al. 2009), and can be explained by greater exposure to STDs (Hariri et al. 2011).

Although length of time since being diagnosed with HIV of less than 24 months did not remain in the multivariate model, a study conducted in the city of Rio de Janeiro, among individuals with HIV diagnosed less than four years previously showed an association with HPV infection ($p < 0.008$) (Melgaço et al. 2011).

In general, treatment with antiretrovirals is started when the levels of CD4⁺ T lymphocytes are lower than $350/\text{mm}^3$, such that it is possible that HIV-positive patients may present a certain degree of impairment of immunity after becoming infected but before the treatment starts, increasing the susceptibility to infections (Palefsky 2006). Women with CD4⁺ T lymphocyte counts less than $200/\text{mm}^3$, which characterizes immunosuppression, presented almost three times greater chance of acquiring HPV infection ($p = 0.016$), thus corroborating other findings in the literature (Melgaço et al. 2011, Garbuglia et al. 2012).

The association shown by heavy drinking ($p = 0.102$) or light drinking ($p = 0.184$) with cervical infection due to HPV was observed with p-value greater than 0.05 in the

univariate analysis, but remained in the final model of the multivariate analysis ($p = 0.003$ and $p = 0.018$, respectively). , possibly because of the association between alcohol abuse and a number of partners greater than or equal to four ($\chi^2 = 8.82$; $p = 0.012$), which was also associated with HPV infection, thus suggesting that alcohol abuse may have been a confounding variable in our study. As there is no biological plausibility for alcoholism to be considered a protective factor for acquiring HPV infection, we believe that there may have been an information bias at the time of application of the questionnaires or maybe alcoholism is expressing another variable that has not been considered in the study. Alcohol abuse was not shown to be associated with cervical infection due to HPV among HIV-positive women in a study in southeastern Brazil (Melgaço et al. 2011).

The association between smoking and cervical cancer among HIV-positive patients has been described (Naucler et al. 2011, Fonseca-Moutinho 2011). The association of smoking with cervical cancer in HIV-infected patients has been described (Naucler et al. 2011, Fonseca-Moutinho 2011). However, smoking does not seem to be involved with acquiring HPV infection, although its role in the pathogenesis of the development of cervical cancer is known (Frega et al. 2006) We found no association between smoking and HPV infection in HIV-positive women, perhaps because the our study population had a low prevalence of CIN (4.6%) and cervical cancer (0.14%).

There are controversy regarding the relationship between HPV infection and education level. In our study, the HIV-positive women with higher educational level, i.e. with at least eight years of schooling, presented twice as much chance of having HPV infection. However, other Brazilian studies have shown a lack of relationship between HPV infection among HIV-positive women and their educational level (Melgaço et al. 2011, Araújo et al. 2012).

In this context, we analyzed the HIV-positive women's adherence to the Brazilian Ministry of Health's cervical cancer prevention program according to their educational level.

We found an association among these women between higher educational level and not undergoing the Papanicolaou test ($\chi^2 = 4.43$; $p = 0.035$). In addition, the women who underwent the test did so at intervals greater than one year ($\chi^2 = 6.45$; $p = 0.011$). These findings may suggest that these women have a lower level of care.

Evolution of HPV infection among HIV-positive women

Among the 196 HIV-positive women who were followed up for four years, we found a low level of persistence of HPV (13.4%) in relation to the persistence of HPV infection among HIV-negative women reported in studies conducted in Germany (56%), the Netherlands (44%) and Africa (32%) (Veldhuijzen et al. 2011, Melsheimer et al. 2001, Schmeink et al. 2011). One of the explanations for this is the lower prevalence of cervical lesions in our patients (13.9%), which may have been due to their better immunological state, given that 80% of the women presented CD4+ T lymphocyte counts greater than 200 cells/mm³, independent of the presence of HPV coinfection. Considering only infection with high risk HPV, a Dutch study with HIV-negative women showed that the chance of HPV persistence depends on the type but also on the duration of the infection. The type-specific infection identified since baseline or at month 6 had a greater chance to persist in the 2nd study year, compared to newly detected infections at month 12 (Schmeink et al. 2011).

CD4+ T lymphocyte count greater than 200/mm³ is a factor associated with regression of HPV infection among HIV-positive women, both for high-risk and for low-risk HPV (Louvanto et al. 2010, Kravchenko et al. 2012). Considering the presence of HPV in cervical samples taken during follow-ups on our patients, the regression rate measured in terms of negative tests was 65.8% of the cases that had been positive in the first evaluation. On the other hand, the progression rate, i.e. presence of HPV in the last sample evaluated from women who initially were negative, was only 28.3%. Once again, this reflects the patients' good immunological state. It also reflects the quality of attendance provided through the

Brazilian National Health System, which offers medications free of charge for all HIV-positive patient, clinical follow-up with CD4+ T lymphocyte counts and annual cervical cytological examinations. Among the particular difficulties of prospective cohort studies, some of which were mentioned earlier, the women's low return rate for follow-up evaluations was a limitation in evaluating disease evolution.

In conclusion, the low prevalence of HPV-16 infection in HIV-positive women with normal cytology and a better immune status of women studied might explain the low incidence of severe cervical lesions. Recent studies showed that the prevalence of HPV-16 ranged from 13.9% to 49.4% in our region (Brandão et al. 2009, Baldez et al. 2012). For these studies HIV-negative women with prior HPV infection or HIV-positive pregnant women were selected. The difference between groups precluded a direct comparison with our study. The importance of regional variability of HPV subtypes for policies towards development of vaccines against HPV infection and cervical cancer should be a motive for future studies. It is important to know whether the range of regional variability of HPV subtypes found among HIV-positive women is a reality for the population of HIV-negative women. Despite the favorable scenario presented in this study, there is a need to clarify the effect of cervical infection due to these subtypes other than HPV 16, in relation to persistence of the disease and occurrence of CIN in HIV-positive patients. New follow-up studies, with a greater number of women and less loss of information, may help towards better understanding of HPV-HIV coinfection, the causes of persistence of HPV infection and the infection outcomes among HIV-positive patients.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Viviane Carvalho for invaluable technical assistance and the Program for Technological Development in Tools for Health (PDTISFIOCRUZ), Vicente Marconi Amorim de Oliveira of the Laboratório Central do Estado de Pernambuco for the data on

lymphocytes T CD4⁺ counting and Dr François Figueirôa and Khaled Almahmoud of the Secretaria Saúde de Pernambuco for the data on TARV use.

References

- Araújo AC, Carvalho NO, Teixeira NC, Souza TT, Murta ED, et al. (2012) Incidence of cervical intraepithelial neoplasia in a cohort of HIV-infected women. *Int J Gynaecol Obstet* 117:211-6.
- Baldez da Silva MF, Guimarães V, Silva MA, Medeiros do Amaral CM, Beçak W, et al. (2012) Frequency of human papillomavirus types 16, 18, 31, and 33 and sites of cervical lesions in gynecological patients from Recife, Brazil. *Genet Mol Res* 11: 462-466.
- Bhatla N, Puri K, Joseph E, Kriplani A, Iyer VK, et al. (2013) Association of Chlamydia trachomatis infection with human papillomavirus (HPV) & cervical intraepithelial neoplasia - a pilot study. *Indian J Med Res* 137: 533-539.
- Brandão VCRAB, Lacerda HR, Lucena-Silva N, Ximenes RA. (2009) Frequency and types of human papillomavirus among pregnant and non-pregnant women with human immunodeficiency virus infection in Recife determined by genotyping. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 755-763.
- Burk RD, Ho GY, Beardsley L, Lempa M, Peters M, et al. (1996) Sexual behavior and partner characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection in young women. *J Infect Dis* 174: 679-689.
- Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, Smith JS, Gough G, et al. (2005) Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14: 1157-1164.

Confortini M, Carozzi F, Zappa M, Ventura L, Iossa A, et al. (2010) Human papillomavirus infection and risk factors in a cohort of Tuscan women aged 18-24: results at recruitment. *BMC Infect Dis* 10: 157. doi: 10.1186/1471-2334-10-157.

Corrêa CM, Teixeira NC, Araújo AC, Carvalho Nde O, Castillo DM, et al. (2011) Prevalence and multiplicity of HPV in HIV women in Minas Gerais, Brazil. *Rev Assoc Med Bras* 57: 425-430.

de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. (2004) Classification of papillomaviruses. *Virology* 324: 17-27.

Entiauspe LG, Teixeira LO, Mendoza-Sassi RA, Gonçalves CV, Gonçalves P, et al. (2010) Martinez AM. Human papillomavirus: prevalence and genotypes found among HIV-positive and negative women at a reference center in the far south of Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 43: 260-263.

Fonseca-Moutinho JA. (2011) Smoking and Cervical Cancer. *ISRN Obstet Gynecol* 2011: 1-6.

Frega A, Biamonti A, Maranghi L, Vetrano G, Palazzo A, et al. (2006) Follow-up of high-grade squamous intra-epithelial lesions (H-SILs) in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and human papillomavirus (HPV)-positive women. analysis of risk factors. *Anticancer Res* 26: 3167-3170.

Garbuglia AR, Piselli P, Lapa D, Sias C, Del Nonno F, et al. (2012) Frequency and multiplicity of human papillomavirus infection in HIV-1 positive women in Italy. *J Clin Virol* 54: 141-146.

Gillet E, Meys JF, Verstraelen H, Verhelst R, De Sutter P, et al. (2012) Association between bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia: systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 7:e45201. doi: 10.1371/journal.pone.0045201. Epub 2012 Oct 2.

Giuliano AR, Papenfuss M, Schneider A, Nour M, Hatch K, et al. (1999) Risk factors for high-risk type human papillomavirus infection among Mexican-American women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8: 615-620.

Grinsztejn B, Veloso VG, Levi JE, Velasque L, Luz PM, et al. (2009) Factors associated with increased prevalence of human papillomavirus infection in a cohort of HIV-infected Brazilian women. *Int J Infect Dis* 13: 72-80

Hariri S, Unger ER, Sternberg M, Dunne EF, Swan D, et al. (2011) Prevalence of genital human papillomavirus among females in the United States, the National Health And Nutrition Examination Survey, 2003-2006. *J Infect Dis* 204: 566-573.

INCA. Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero. Available: <http://www.inca.gov.br>. Accessed 10 January 2013.

Kravchenko J, Akushevich I, Sudenga SL, Wilson CM, Levitan EB, et al. (2012) Transitional probability-based model for HPV clearance in HIV-1-positive adolescent females. *PLoS One* 7:e30736. doi: 10.1371/journal.pone.0030736. Epub 2012 Jan 24.

Landis JR, Koch GG (1977) The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33: 159-174.

Louvanto K, Syrjänen KJ, Rintala MA, Grénman SE, Syrjänen SM. (2010) Genotype-specific clearance of genital human papillomavirus (HPV) infections among mothers in the Finnish family HPV study. *J Clin Microbiol* 48: 2665-2671.

Luque AE, Jabeen M, Messing S, Lane CA, Demeter LM, et al. (2006) Prevalence of human papillomavirus genotypes and related abnormalities of cervical cytological results among HIV-1-infected women in Rochester, New York. *J Infect Dis* 194: 428-434.

Luz PM, Velasque L, Friedman RK, Russomano F, Andrade AC, et al. (2012) Cervical cytological abnormalities and factors associated with high-grade squamous intraepithelial lesions among HIV-infected women from Rio de Janeiro, Brazil. *Int J STD AIDS* 23: 12-17.

Macleod IJ, O'Donnell B, Moyo S, Lockman S, Shapiro RL, et al. (2011) Prevalence of human papillomavirus genotypes and associated cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-infected women in Botswana. *J Med Virol* 83: 1689-1695.

Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, et al. (1989) Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 7: 209-214

Martín P, Kilany L, García D, López-García AM, Martín-Azaña MJ, et al. (2011) Human papillomavirus genotype distribution in Madrid and correlation with cytological data. *BMC Infect Dis* 11: 316. doi: 10.1186/1471-2334-11-316.

.Melgaço FG, Rosa ML, Augusto EF, Haimuri JG, Jacintho C, et al. (2011) Human papillomavirus genotypes distribution in cervical samples from women living with human immunodeficiency virus. *Arch Gynecol Obstet* 283: 809-817.

Melsheimer P, Klaes R, von Knebel Doeberitz M, Bastert G (2001) Prospective clinical study comparing DNA flow cytometry and HPV typing as predictive tests for persistence and progression of CIN I/II. *Cytometry* 46: 166-171.

Naucle P, Mabota da Costa F, da Costa JL, Ljungberg O, et al. (2011) Human papillomavirus type-specific risk of cervical cancer in a population with high human immunodeficiency virus prevalence: case-control study. *J Gen Virol* 92: 2784-2791.

Palefsky J (2006) Biology of HPV in HIV Infection. *Adv Dent Res* 19: 99-105.

Rahman M, Sasagawa T, Yamada R, Kingoro A, Ichimura H, et al. (2011) High prevalence of intermediate-risk human papillomavirus infection in uterine cervixes of Kenyan women infected with human immunodeficiency virus. *J Med Virol* 83: 1988-1996.

Rodriguez-Cerdeira C, Sanchez-Blanco E, Alba A. (2012) Evaluation of Association between Vaginal Infections and High-Risk Human Papillomavirus Types in Female Sex Workers in Spain. *ISRN Obstet Gynecol* 2012: 240190. doi: 10.5402/2012/240190. Epub 2012 Jul 31.

SBPTGIC Sociedade Brasileira de Patologia do Trato Genital Inferior e Colposcopia (2003) Terminologia colposcópica. *Bol Inf Dir SBPTGIC* 5: 5-6

Schneider M L, Schneider V (1998) Atlas de diagnóstico diferencial em citologia ginecológica. Rio de Janeiro: *Revinter*. 165p.

Schmeink CE, Melchers WJG, Siebers AG, Quint WGV, Massuger LFAG, et al. (2011) Human Papillomavirus Persistence in Young Unscreened Women, a Prospective Cohort Study. *PLoS One* 6:e27937. doi: 10.1371/journal.pone.0027937. Epub 2011 Nov 23.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, et al. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731-2739.

Veldhuijzen NJ, Braunstein SL, Vyankandondera J, Ingabire C, Ntirushwa J, et al. (2011) The epidemiology of human papillomavirus infection in HIV-positive and HIV-negative high-risk women in Kigali, Rwanda. *BMC Infect Dis* 11:333. doi: 10.1186/1471-2334-11-333.

Videla S, Darwich L, Cañadas MP, Paredes R, Tarrats A, et al. (2009) Epidemiological data of different human papillomavirus genotypes in cervical specimens of HIV-1-infected women without history of cervical pathology. *J Acquir Immune Defic Syndr* 50: 168-175.

Yamada R, Sasagawa T, Kirumbi LW, Kingoro A, Karanja DK, et al. (2008) Human papillomavirus infection and cervical abnormalities in Nairobi, Kenya, an area with a high prevalence of human immunodeficiency virus infection. *J Med Virol* 80: 847-855.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, et al. (1999) Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189: 12-19.

Watts DH, Fazzari M, Minkoff H, , Hillier SL, Sha B, et al. (2005) Effects of bacterial vaginosis and other genital infections on the natural history of human papillomavirus infection in HIV-1-infected and high-risk HIV-1-uninfected women. *J Infect Dis* 191: 1129-1139.

TABLES

Table I - Univariate analysis of the association between HPV infection and socio-demographic variables, habits, characteristics associated with HPV infection and characteristics associated with HIV infection among HIV-positive women attending three reference centers for HIV/AIDS in Recife, Brazil, 2008-2010.

Characteristic	HPV positive (%)	HPV negative (%)	OR (95%-CI)	P
Socio-demographic characteristics				
Age (median: 34 years)				
≥ 35 years	48(36,92)	104(52,79)	0,52(0,33-0,82)	0,005
<35 years	82(63,08)	93(47,21)	1,00	
Illiteracy				
No	19(14,29)	24(11,76)	1,23(0,64-2,35)	0,422
Yes	114(85,71)	178(87,25)	1,00	
Schooling				
> 8 years	54(40,60)	58(28,86)	1,68(1,06-2,67)	0,026
≤ 8 years	79(59,40)	143(71,14)	1,00	
Income				
<1 minimum wage	38(32,76)	49(27,68)	1,27(0,76-2,11)	0,352
≥1 minimum wage	78(67,24)	128(72,32)	1,00	
Habits				
Smoking				
Smokers	29(24,58)	31(17,92)	1,50(0,83-2,74)	0,177
Former smokers	27(22,88)	42(24,28)	1,03(0,58-1,84)	0,902
Non-smokers	62(52,54)	100(57,80)	1,00	
Alcohol intake				

Heavy drinker	10(7,75)	24(12,12)	0,50(0,22-1,14)	0,102
Light drinker	66(51,16)	110(55,56)	0,72(0,45-1,16)	0,184
Abstainer	53(41,09)	64(32,32)	1,00	
Smoked drug use				
Yes	22(16,92)	26(13,07)	1,35(0,73-2,51)	0,333
No	108(83,08)	173(86,93)	1,00	
Sniffed drug use				
Yes	15(11,72)	20(10,10)	1,18(0,58-2,40)	0,645
No	113(88,28)	178(89,90)	1,00	
Drug use				
Yes	24(19,51)	30(15,46)	1,32(0,73-2,39)	0,350
No	99(80,49)	164(84,54)	1,00	
HPV related characteristics				
Number of sexual partners				
≥4 partners	56(45,90)	64(33,51)	1,68(1,05-2,68)	0,028
1-3 partners	66(54,10)	127(66,49)	1,00	
Pregnancy on HPV diagnosis				
Yes	24(18,75)	29(14,87)	1,32(0,72-2,39)	0,357
No	104(81,25)	166(85,13)	1,00	
Papanicolaou testing				
No	27 (21,09)	44 (22,22)	0,93 (054-1,60)	0,810
Yes	101 (78,91)	154 (77,78)		
Frequency of Papanicolaou testing				
Other	39 (32,50)	52 (29,05)	1,18 (0,71-1,94)	0,525
At least once a year	81 (67,50)	127 (70,95)		

Presence of cytological alterations				
Yes	31(25,62)	18(9,52)	3,27(1,73-6,17)	0,000
No	90(74,38)	171(90,48)	1,00	
HIV related characteristics				
CD4+ T lymphocyte count (*)				
<200/mm ³	23(20,54)	18(10,40)	2,21(1,13-4,31)	0,044
≥200/mm ³	89(79,46)	154(89,02)	1,00	
Length of time since HIV diagnosis				
≥24 months	69 (55,20)	133 (67,51)	0,59 (0,37-0,94)	0,026
<24 months	56 (44,80)	64 (32,49)		
Use of TARV				
No	33(30,28)	41(22,53)	1,49(0,87-2,55)	0,142
Yes	76(69,72)	141(77,47)	1,00	

(*)On the CD4 + T cells count, the result closest to the date of the interview was considered

Table II. Multivariate analysis of the association between HPV infection and socio-demographic variables, habits, characteristics associated with HPV infection and characteristics associated with HIV infection among HIV-positive women attending three reference centers for HIV/AIDS in Recife, Brazil, 2008-2010.

HPV infection	Odds Ratio	[95% - Conf. Interval]	P
Age			
≥35 years	0.35	0.19-0.64	0.001
< 35 years	1.00		
Schooling			
> 8 years	1.93	1.03-3.63	0,040
≤ 8 years	1.00		

Number of sexual partners

≥ 4 partners	2.30	1.22-4.33	0.010
1-3 partners	1.00		

CD4+ T lymphocyte count

< 200/mm ³	2.72	1.19-6.23	0.018
≥200/mm ³	1.00		

Alcohol intake

Light drinker	0.46	0.24-0.87	0.018
Heavy drinker	0.12	0.03-0.48	0.003
Abstainer	1.00		

Table III. Persistence of cervical HPV infection in HIV-positive women attending three reference centers for HIV/AIDS in Recife, Brazil, 2008-2010.

First Examination	Last Examination		Agreement	
	Positive	Negative	Expected	Kappa
HPV				
Positive	26	50	0.571	0.061
Negative	34	86		
Total	60	136		

Table IV. Comparison between reported prevalences of HPV infection and methods used for detection of the HPV genome in different populations.

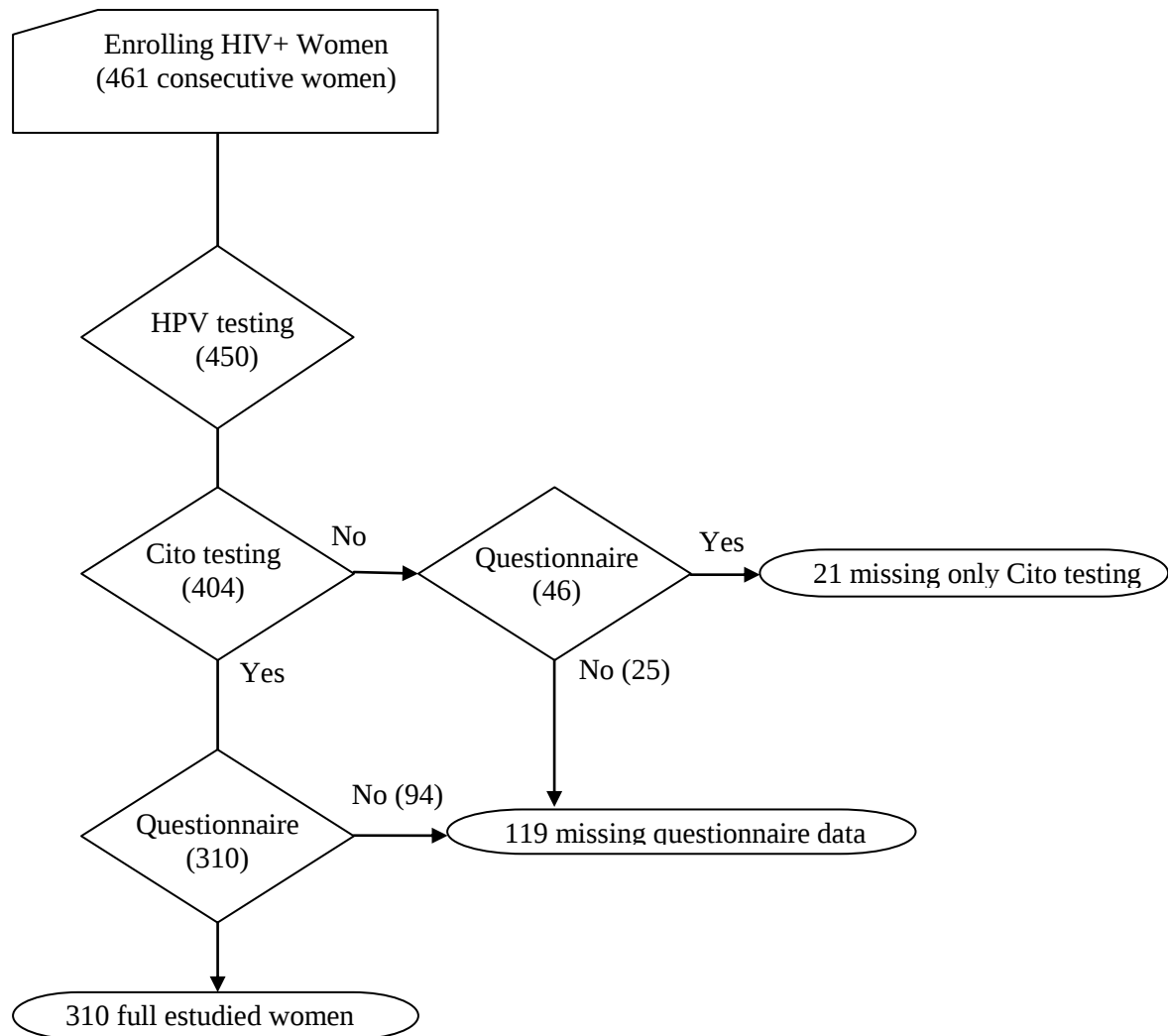
Reference	local	HPV +	Prevalence	Method
This study	PE-Brazil	HIV+ (211/464)	47,5%	PCR + sequencing

		HIV+ (1764/4150		
Hariri et al., 2011	USA	)	42,5%	PCR + hybridization
Martin et al., 2011	Spain	HIV- (1062/2461)	43,2%	PCR + hybridization
Garbuglia et al.,				
2012	Italy	HIV+ (244/553)	44,1%	RFLP
Luz et al., 2012	RJ-Brazil	HIV+ (324/703)	48,9%	Hybrid capture II
Rahman et al., 2011	Kenya-Africa	HIV+ (487/240)	49,3%	Chip assay
Luque et al., 2006	NY-USA	HIV+ (105/202)	52,0%	PCR + hybridization
Entiauspe et al.,				
2011	RS-Brazil	HIV- (35/60)	58,3%	Nested PCR/specífic
Melgaço et al.,				
2011	RJ-Brazil	HIV+ (84/140)	60,0%	RFLP
Entiauspe et al.,				
2011	RS-Brazil	HIV+ (30/38)	66,0%	Nested PCR/specífic
Araújo et al., 2012	MG-Brazil	HIV+ (237/348)	68,0%	Nested PCR/specífic
Levi et al.,2002	SP-Brazil	HIV+(204/208)	98,0%	SFP-PCR/LiPA

FIGURE LEGENDS

Figure I. Fluxogram showing the population stratification according the performed testing and missing data.

Figure I



APÊNDICE D - VERSÃO DO ARTIGO 2 EM INGLÊS

Prognostic evaluation of DNA index in HIV-HPV co-infected women cervical samples attending in reference centers for HIV-AIDS in Recife.

Short title: Cervix DNA index in HIV-HPV co-infection

Albert Eduardo Silva Martins ^{1,2}, Norma Lucena-Silva ^{1,2}, Renan Gomes Garcia ¹, Stefan Welkovic³, Aureliana Barbosa ³, Maria Luiza Bezerra Menezes ³, Terezinha Tenório⁴, Magda Maruza ⁵, , Ricardo A A Ximenes⁶.

¹Laboratório de imunogenética, Centro de pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 50670-420, Brasil;

²Laboratório de biologia molecular, Departamento de oncologia pediátrica, Hospital IMIP, Recife, 50070-550, Brasil;

³Departamento Materno-Infantil e Centro Integrado de Saúde Amaury de Medeiros (CISAM-UPE), Universidade de Pernambuco, Recife, 50100-130, Brasil;

⁴Departamento Materno-Infantil, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 50100-130, Brasil.

⁵Hospital Correia Picanço, Secretaria de Saúde de Pernambuco, Recife, 52050-150, Brasil.

⁶Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco(UFPE), 50670-901, Brasil.

Author for correspondence: Albert Eduardo Silva Martins, Laboratório de imunogenética, Centro de pesquisas Aggeu Magalhães, Av. Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária, Recife, 50670-420, Brasil
(aesmartins@hotmail.com)

Abstract

Introduction. Persistence of cervical infection caused by human papillomavirus (HPV) types with high oncogenic risk may lead to cervical intraepithelial neoplasia (CIN). The aim of the present study was to evaluate whether, in HIV-positive women, the presence of aneuploidy in cervical cell samples is associated with presence and evolution of CIN.

Methods. The present study had two stages. In the first stage, comprising a cross-sectional study, the association between the presence of aneuploidy seen via flow cytometry and sociodemographic characteristics, habits and characteristics relating to HPV and HIV infection was analyzed. In the second stage, comprising a cohort study, it was investigated whether aneuploidy was predictive of CIN evolution.

Results. No association was observed between the presence of aneuploidy and HPV infection, or between its presence and alterations seen in oncotic cytological analysis. On the other hand, aneuploidy was associated with the presence of CIN ($p = 0.030$) in histological analysis and with nonuse of antiretroviral therapy ($p = 0.001$). Most of the HIV-positive women (234/272) presented normal CD4⁺ T lymphocyte counts (greater than 350 cells/mm³) and showed a greater aneuploidy regression rate (77.5%) than a progression rate (23.9%) over a follow-up of up to two years.

Conclusion. Although there was an association between the presence of cervical tissue lesions and the DNA index, the latter was not predictive of progression of the cervical lesion. This suggests that progression of the cervical lesion to cancer in HIV-positive women may also be changed through improvement of the immunological state enabled by using antiretroviral therapy.

Key words: Human papillomavirus, HIV, flow cytometry, DNA ploidy.

INTRODUCTION

Persistence of cervical infection caused by the human papillomavirus (HPV) is a risk factor for the development of cervical cancer and, in patients coinfecting with HIV, the cervical lesions are more severe and have a worse prognosis [1,2,3]. The role of HPV in the pathogenesis of cervical cancer involves interaction of the proteins E6 and E7 of high-risk HPV types with the tumor-suppressor nuclear proteins p53 and pRB, respectively. The protein E7 binds to pRB and displaces the transcription factor E2F, which was originally bound to pRB, thereby increasing the expression of proteins involved in progression to the S phase of the cell cycle. The protein E6 supplements the function of the protein E7 by inactivating p53 and impeding the induction of apoptosis in these cells [4,5]. Prolongation of the S phase through the action of E6 and E7 may lead to chromosome instability and consequently to alteration of cell ploidy. These events are worsened by the phenomenon of viral integration, which may occur in situations of persistent infection by high-risk HPV, although the transformation phase may occur in stages that precede the viral integration [6,7, 8,9].

The DNA index has been used to characterize cell ploidy in cases of endometrial cancer [10], liver cirrhosis [11] and acute lymphoid leukemia [12], and it is important in the prognosis for neoplasia [13]. Some authors have also taken DNA index determinations to be a prospective prognostic parameter for cervical lesions caused by HPV infection [14,15], i.e. evolution comprising regression, progression or persistence of the cervical lesion [16]. There are no studies on women with HIV-HPV coinfection regarding tissue lesion progression using this technique; and therefore the aim of the present study was to evaluate the association between the DNA index and tissue lesions in patients with HIV-HPV coinfection.

METHODS

Population and study design

The present study had two stages. In the first stage, comprising a cross-sectional study, the association between the presence of aneuploidy seen via flow cytometry and sociodemographic characteristics, habits and characteristics relating to HPV and HIV infection was analyzed. In the second stage, comprising a cohort study, it was investigated whether aneuploidy was predictive of CIN evolution.

The study was conducted in three referral centers for HIV-AIDS in Pernambuco (Hospital Correia Picano (HCP), Hospital das Clínicas (HC) and Centro Integrado de Saúde Amaury de Medeiros (CISAM)), between May 2007 and August 2011. All the 409 adult women studied were infected with HIV and were attended at the gynecology services of the abovementioned three referral center hospitals for HIV-AIDS. All the women agreed to participate in the study and signed a consent statement.

Data-gathering and standardization of techniques

A questionnaire for clinical-epidemiological evaluation was applied to all the women who agreed to participate in the study. Following this, colposcopy and cytological examination were performed. The colposcopic findings were classified taking into consideration the classification criteria of the International Colposcopic Nomenclature of Rome [17]. For the cytopathological analysis and for the molecular analysis on HPV, cervical scrapings were obtained using cytobrushes while performing the colposcopic examination. To classify the cytological findings, the Bethesda nomenclature was used [18]. In cases in which colposcopic alterations were observed, a cervical biopsy was performed and the ensuing cervical tissue fragments were sent in 10% formol for histopathological analysis, taking into consideration the Schneider criteria [19].

The cervical scrapings were sent to the Molecular Biology Laboratory of the Pediatric Oncology Service of Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira. The samples

were subdivided: one fraction was used to determine the DNA index, while the others were stored at -20°C for subsequent molecular analysis, which included investigating the HPV genome and, in positive cases, molecular typing as described below.

HPV detection and typing

Extraction of genomic DNA from the cervical samples was performed using the proteinase K protocol [Invitrogen, CA, USA]. The samples were subjected to PCR using the primers MY09 and MY11 [21]. The HPV type was determined by sequencing the PCR fragment using the Big Dye protocol (Applied Biosystems, SP, Brazil), in accordance with the manufacturer's description, and comparisons were made with the reference sequences deposited in the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Determination of the DNA index

The cervical cells were subjected to permeabilization, RNA digestion and DNA labeling using propidium iodide. The DNA index was determined using flow cytometry, through laser excitation at 488 nm and reading above 600 nm. The histograms were analyzed using the ModFitLT V3.0 software (Verity Software House Inc., Topsham, USA). The presence of two peaks on a histogram with an index greater than 1.16 (hyperploidy) or less than 1.00 (hypoploidy), each with more than 10% of the cell population analyzed in the area corresponding to G0-G1 of the cell cycle, was considered to be aneuploidy [19].

Statistical analysis

The clinical-epidemiological and laboratory data were typed into a database using the Excel 2007 software (Microsoft, CA, US). Age was categorized taking the median of 35 years, for comparison with findings in the literature [20]. The relationship with smoking was

analyzed taking smokers and former smokers both separately and as a group, in comparison with nonsmokers. For the variable of alcohol abuse, the term “light drinker” was used to mean women whose frequency of alcohol intake over the preceding three months did not exceed 14 days per month and whose daily dosage was limited to one glass of wine or distilled drink (250 mL), or one can of beer (350 mL); women with greater alcohol intake were categorized as “heavy drinkers”. Drug users were considered to be individuals who were using or had used any illicit drug (smoked, sniffed or injected). The cutoff point for CD4⁺ T lymphocytes of 200 cells/mm³ was used as an expression of the patients’ immunosuppression. For the statistical analysis, the Stata 10.0 software was used [Stata-Corp LP, College Station, TX, USA]. In the univariate analysis, odds ratios (OR) with their respective confidence intervals and p values (chi-square or likelihood ratio test) were estimated. The criterion used for inclusion in the multivariate model was a p value < 0.25. For variables to remain in the model, the criterion was a p value < 0.05 or an adjustment of the OR value of another variable that was greater than 10%. The Mann-Whitney test was used to analyze the medians of continuous values of unpaired groups. The kappa test was used to measure the intensity of agreement between two or more consecutive analyses in the study. Associations producing p < 0.05 were considered to be statistically significant.

Ethical issues

This study was approved by the Research Ethics Committee of Centro Integrado de Saúde Amaury de Medeiros (CEP-CISAM, # 0011.0.250.000-05), and all the women invited to participate gave their formal consent.

RESULTS

Identification of risk factors for development of aneuploidy in HIV-positive women

The DNA index of cervical cells was measured in 617 samples from 409 HIV-positive women of median age 34 years who were attended at three HIV-AIDS referral centers in Pernambuco. The clinical-epidemiological and laboratory characteristics of the 320 women who completely filled out their research questionnaires, corresponding to 78.2% of the study population, are shown in Table 1. Among the 409 women, 219 returned to the hospital service at least once, for clinical and laboratory follow-up.

Factors associated with changes to the DNA index

The demographic characteristics of age, schooling level and income level and the habits of smoking, alcohol intake and drug use were similar between the HIV-positive women who presented aneuploidy and diploidy in their cervical cells (Table 1), with income presenting a threshold p value.

Infection with low-risk HPV ($p = 0.43$) or high-risk HPV ($p = 0.17$) also did not show any association with alteration of ploidy in the cervical cells (data not shown), which was present in 40.1% of the aneuploid samples and in 34.3% of the diploid samples ($p = 0.25$). In the aneuploid samples, the DNA index ranged from 0.66 (hypodiploid) to 3.76 (hyperdiploid), with a median of 1.45.

Most of the women presented CD4⁺ T lymphocyte counts greater than 200/mm³, in both the diploid and the aneuploid group. The length of time with a diagnosis of HIV did not present any association with aneuploidy but, on the other hand, aneuploidy was shown to be associated with use of antiretroviral treatment ($p = 0.006$) (Table 1).

After the multivariate analysis, use of antiretroviral treatment ($p = 0.001$) and income ($p = 0.007$) remained in the final model.

Ploidy and alteration of cervical cells

Aneuploidy was observed in a total of 127 women over the study period. Of these, 12 provided follow-up samples, thus making a total of 139 samples with aneuploidy. Among the

women with oncotic cytology results, the DNA index was measured in the baseline evaluation of this study in 56 women with aneuploidy. Of these, 12 returned more than once to the hospital service. Another 46 women with aneuploidy did not fill out the research questionnaire. In total, 114 aneuploid samples with oncotic cytology results were obtained.

Out of the 19 aneuploid samples (16.7%) showing cytological alterations, six (31.6%) were diagnosed with atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS), 10 (52.6%) with low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) and three (15.8%) high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL). Out of the 45 diploid cells showing cytological alterations, 11 (24.5%) were classified as ASCUS, one (2.2%) as atypical squamous cells that did not allow high-grade lesions to be ruled out (ASC-H), two (4.5%) as presence of HPV, 24 (53.3%) as LSIL and seven (15.5%) as HSIL. Considering the 531 cervical samples that were evaluated regarding the DNA index and cytological alterations, ploidy was not associated with the presence of cytological alterations ($p = 0.348$) (Table 2).

In an exploratory manner, the association between presence of aneuploidy and histological lesions was evaluated among women with an indication for biopsy by means of colposcopy. Considering only the 54 diploid samples with biopsy results, it was found that CIN was present in 31.5% of the samples, while in the 15 aneuploid samples with histological evaluation, 66.7% showed CIN, thus demonstrating an association between histological lesions and detection of aneuploidy through the DNA index ($p = 0.030$) (Table 3)

Considering the 69 samples that had biopsy and DNA index results, it was found that in determining the cell ploidy, the specificity was 88.1% (73.6-95.5%) and the sensitivity was 37% (20.1-57.5%) for CIN in HIV-positive women.

Evolution of the DNA index and HPV infection in HIV-positive women

Out of the 409 women studied, 219 (47.5%) returned to the hospital service at least once, for follow-up over different time intervals ranging from 6 to 48 months, among whom 92 (42.2%) returned between 13 and 24 months after the first consultation and 69 (32.3%) between 6 and 12 months afterwards. The evolution of the cervical lesion regarding the DNA index was analyzed in relation to 178 women. The 41 women for whom information on the DNA index was only available from a single occasion were not included in this analysis. Among the 178 samples, information on the DNA index from cervical cells was available from three or more occasions.

Out of the 40 women with aneuploid samples at the first evaluation, 31 (77.5%) regressed to diploidy by the end of the follow-up period. Considering the 137 women with diploidy at the first evaluation, 105 (76.6%) remained diploid and 32 (23.4%) progressed to aneuploidy. Kappa measurements were used to evaluate the concordance of aneuploidy detection between the initial sample and the last sample analyzed. This showed weak concordance ($k = 0.031$), according to the kappa interpretation table proposed by Landis and Koch (1977) [21] (Table 4).

Among the 33 women with progression to aneuploidy, 17 had oncotic cytology results from their samples at diagnosis and at the return consultation. Among these 17 women, 13 did not present any cytological alteration at either of the two times evaluated; cytological regression was observed in two women who had diagnoses of LSIL and HSIL at the initial assessment and became negative; persistence of cytological alterations independent of the lesion grade was found in one woman with an initial diagnosis of ASC-H and a diagnosis of HSIL at the return consultation; and progression was identified in only one woman who had a negative sample at the beginning of the study, followed by a sample with ASCUS.

Out of the 105 women with a diploid DNA index on both occasions, the median level of CD4⁺ T cells in peripheral blood was 455 mm^3 , which was similar to the median CD4⁺

level of 461 mm^3 presented by the nine women with an aneuploid DNA index on both occasions ($p = 0.205$).

DISCUSSION

DNA index, cervical lesion and HPV

The frequency of aneuploidy in cervical cells was greater in the HIV-positive women who were not using antiretroviral treatment than in those who were doing so. Although an association was found between the presence of cervical tissue lesions and the DNA index, the latter was not predictive of the evolution of the cervical lesion, thus suggesting that the progression of the cervical lesion to cancer in HIV-positive women may also be altered through the improvement in immunological state that is provided by use of antiretroviral therapy.

In the present study, no association was observed between aneuploidy and cytological alterations or HPV detection. Although there was an association between aneuploidy and the presence of cervical tissue lesions, the DNA index obtained through flow cytometry was not predictive of the evolution of the cervical lesion.

Furthermore, in the present study, higher income had a protective effect against development of aneuploidy. It is possible that the income level was measuring another factor that was not evaluated in this study.

Aneuploidy is frequently found in severe cervical lesions in HIV-negative women [22,23], but this was not observed in the present study in relation to oncotic cytology, perhaps because of the low frequency of cases of altered cytology (12.0%). Oncotic cytological analysis is an important low-cost test for screening for cervical lesions, but it is less specific than histological analysis for characterizing precancerous lesions, in which higher frequency of aneuploidy would be expected [24].

The presence of high-risk HPV contributes towards cervical lesions, especially CIN [2,25,26]. High-risk HPV types are closely associated with appearance and persistence of pre-neoplastic cervical lesions [1,2,27], given that the viral proteins E6 and E7 bind to and inhibit the action of the human proteins p53 and pRB, which control the cell cycle. This culminates in establishment of chromosomal aberrations and, consequently, appearance of aneuploidy [5,28]. Although this relationship is known, no association between aneuploidy and HPV infection was found in the present study, perhaps because of the preserved immunological state of the HIV-positive women in this study, who did not present cytological alterations, were mostly using antiretrovirals and had normal CD4⁺ T lymphocyte counts. However, it was observed that nonuse of antiretrovirals was associated with the presence of aneuploidy ($p = 0.001$). It is known that chronic vaginal infections caused by anaerobic bacteria act as cofactors for CIN to appear, with consequent change of cell ploidy, independent of HIV and HPV infection [29]. In the present study, no data on associated bacteriosis and other infections of the female genital tract were evaluated, thereby limiting the understanding of this issue.

HIV infection may in itself increase the risks of cytological alterations and HPV infection independently [30]. In this regard, it is expected that after use of antiretrovirals starts, there will be exacerbation of tissue inflammation caused by silent opportunistic cervical infections that are revealed through the reconstitutive immunotherapy [31,32]. An association between antiretroviral use and protection against emergence of CIN was recently demonstrated in HIV-positive women [33].

Our data suggest that the model for cervical lesion progression to cancer in HIV-positive women may be altered through the improvement of their immunological state that is provided by antiretroviral use and clinical follow-up (Figure 1). In the proposed model, occurrences of CIN are associated with the presence of aneuploidy ($p < 0.030$), but

aneuploidy is not associated with the presence of cytological alterations ($p = 0.348$), or with HPV infection of low grade ($p = 0.43$) or high grade ($p = 0.17$) in HIV positive patients; on the other hand, in HIV-negative patients were observed association between aneuploidy and cervical lesion. If cervical lesions are taken to be an expression of cervical HPV infection or chronic infections [25,26,29], while knowing that HPV may be present in the absence of cervical lesions (depending on the patient's immunological state), the progression of the disease among HIV-positive patients will be influenced by their adherence to antiretroviral treatment.

Evolution of cervical lesions with regard to aneuploidy

In relation to the DNA index, the HIV-positive women showed a progression rate (23.9%) that was lower than the regression rate (77.5%), with a low frequency of cytological alterations (12.0%). In the literature investigated, no other study using the DNA index to evaluate the evolution of cervical lesions in HIV-positive women was found. However, it is known that in HIV-negative women, the aneuploidy rate has a relationship with the grade of the cytological lesion at diagnosis, and that the greater the severity of the cytological lesions in aneuploid samples is at diagnosis, the greater the likelihood will be that the cervical lesions will persist or progress in follow-up samples from these patients [22,23].

The presence of changes in ploidy in cervical cells alone was shown to have low sensitivity (37%) and specificity (88%) for detecting CIN. However, it has been reported that a combination of HSIL cytomorphology, presence of oncogenic HPV and aneuploidy presented 100% sensitivity and 91.3% specificity for detecting lesions that progress to severe cervical lesions (CIN II+) [23].

Recently, it was demonstrated that changes to the ploidy of cervical cells can be identified through flow cytometry, using five different parameters relating to the cell cycle,

with sensitivity and specificity of 100% [30]. In the same study, aneuploidy alone was capable of detecting cervical cancer with sensitivity of 83.9% (72.3-92.0) and specificity of 94.7% (82.2-99.2). The main differences between the present study and the study by Chhavi et al. were that the latter was a case-control study on HIV-negative Indian women in which 62% of the women presented cervical cancer (cases) and 38% of the women had been hysterectomized due to benign causes (controls), while the present study was a cohort study on HIV-positive Brazilian women with low prevalence of cytological abnormalities and thus with few indications for performing biopsies. This suggests that there is a difference in the sensitivity of the method in populations with differences in the grade of the cervical lesion.

In summary, it can be concluded that the presence of aneuploidy has a relationship with occurrences of precancerous cervical lesions. This study showed that the frequency of aneuploidy was low among women with CIN (37%), but in women with aneuploidy, the frequency of CIN was high (66%).

Although an association was found between the presence of cervical tissue lesions (CIN) and determination of the DNA index through flow cytometry, the latter was not predictive of the evolution of the cervical lesion.

There was a significant loss of data, given that the return rate was relatively low (47.5%). This may have limited the exploitation of the DNA index technique for detecting cervical lesions and evaluating their evolution among HIV-positive women.

In most of the sample, no colposcopic atypias that could have been indicative for performing biopsies were observed. It is possible that another study with a larger number of women with colposcopic and/or cytological alterations might contribute towards better comprehension of the association between the DNA index and the presence and evolution of cervical lesions in HIV-positive women.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Viviane Carvalho for invaluable technical assistance and the Program for Technological Development in Tools for Health (PDTISFIOCRUZ), Vicente Marconi Amorim de Oliveira of the Laboratório Central do Estado de Pernambuco for the data on lymphocytes CD4⁺ counting and Dr François Figueirôa and Khaled Almahnoun of the Secretaria Saúde de Pernambuco for the data on TARV use.

REFERENCES

1. Ahdieh L , Munoz A, Vlahov D, Trimble CL, Timpson LA, et al. (2000) Cervical neoplasia and repeated positivity of human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-seropositive and -seronegative women. *American j of epidemiology* 151:1148-1157.
2. Naucle P, Mabota da Costa F, da Costa JL, Ljungberg O, et al. (2011) Human papillomavirus type-specific risk of cervical cancer in a population with high human immunodeficiency virus prevalence: case-control study. *J Gen Virol* 92:2784-2791.
3. Palefsky J (2006) Biology of HPV in HIV Infection. *Adv Dent Res* 19:99-105.
4. Garnett TO, Duerksen-Hughes PJ (2006) Modulation of apoptosis by human papillomavirus (HPV) oncoproteins. *Arch Virol* 151:2321-2335.
5. Doorbar J (2005) The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 32:S7-15.
6. Heilmann V, Kreienberg R (2002) Molecular biology of cervical cancer and its precursors. *Curr Womens Health Rep* 2:27-33.
7. Doeberitz Mv, Vinokurova S (2009) Host factors in HPV-related carcinogenesis: cellular mechanisms controlling HPV infections. *Arch Med Res* 40:435-442
8. Klaes R, Woerner SM, Ridder R, Wentzensen N, Duerst M, et al. (1999) Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res* 59:6132-6136.
9. Burd EM (2003) Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev* 16:1-17.
10. Mangili G, Montoli S, De Marzi P, Sassi I, Aletti G, et al. (2008) The role of DNA ploidy in postoperative management of stage I endometrial cancer. *Ann Oncol* 19:1278-1283.
11. El-Sayed SS, El-Sadany M, Tabil AA, Soltan A, El-Dosoky I, et al. (2004) Attalah AM. DNA ploidy and liver cell dysplasia in liver biopsies from patients with liver cirrhosis. *Can J Gastroenterol* 18:87-91.
12. Look AT, Roberson PK, Williams DL, Rivera G, Bowman WP, et al. (1985) Prognostic importance of blast cell DNA content in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 65:1079-1086.
13. Torres EM, Williams BR, Amon A (2008) Aneuploidy: Cells Losing Their Balance. *Genetics* 179:737-746.

14. Dabi MM, Nola M, Tomi I, Dotli S, Petrove M, et al. (2008) Adenocarcinoma of the uterine cervix: prognostic significance of clinicopathologic parameters, flow cytometry analysis and HPV infection. *Acta Obstet Gynecol Scand* 187:366-372.
15. Anton M, Nenutil R, Rejthar A, Kopečný J, Ptáková B, et al. (1997) DNA flow cytometry: a predictor of a high-risk group in cervical cancer. *Cancer Detect Prev* 21:242-246.
16. Melsheimer P, Klaes R, von Knebel Doeberitz M, Bastert G (2001) Prospective clinical study comparing DNA flow cytometry and HPV typing as predictive tests for persistence and progression of CIN I/II. *Cytometry* 46:166-171.
17. Sociedade Brasileira de Patologia do Trato Genital Inferior e Colposcopia (SBPTGIC) (2003) Terminologia colposcópica. *Bol Inf Dir SBPTGIC* 5:5-6.
18. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, et al. (2002) The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*. 287:2114-2119.
19. Schneider M L, Schneider V (1998) Atlas de diagnóstico diferencial em citologia ginecológica. Rio de Janeiro: Revinter. 165p.
20. Garbuglia AR, Piselli P, Lapa D, Sias C, Del Nonno F, et al. (2012) Frequency and multiplicity of human papillomavirus infection in HIV-1 positive women in Italy. *J Clin Virol* 54:141-146.
21. Landis JR, Koch GG (1977) The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33:159-174.
22. Singh M, Mehota S, Kalra N, Singh U, Shuckla Y (2008) Correlation of DNA ploidy with progression of cervical cancer. *J Cancer Epidemiol* 2008:1-7.
23. Bollmann R, Mehes G, Speich N, Schmitt C, Bollmann M (2005) Aberrant, Highly Hyperdiploid Cells in Human Papillomavirus-Positive, Abnormal Cytologic Samples Are Associated with Progressive Lesions of the Uterine Cervix. *Cancer* 105:1-5.
24. Massad LS, Collins YC, Meyer PM (2001) Biopsy correlates of abnormal cervical cytology classified using the Bethesda system. *Gynecol Oncol* 82:516-522.
25. Entiauspe LG, Teixeira LO, Mendoza-Sassi RA, Gonçalves CV, Gonçalves P, et al. (2010) Martinez AM. Human papillomavirus: prevalence and genotypes found among HIV-positive and negative women at a reference center in the far south of Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 43:260-263.

26. Macleod IJ, O'Donnell B, Moyo S, Lockman S, Shapiro RL, et al. (2011) Prevalence of human papillomavirus genotypes and associated cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-infected women in Botswana. *J Med Virol* 83:1689-1695.
27. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, et al. (1999) Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189:12-19.
28. Melsheimer P, Vinokurova S, Wentzensen N, Bastert G, von Knebel Doeberitz M (2004) DNA aneuploidy and integration of human papillomavirus type 16 e6/e7 oncogenes in intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the cervix uteri. *Clin Cancer Res* 10:3059-3063.
29. Gillet E, Meys JF, Verstraelen H, Verhelst R, De Sutter P, et al. (2012) Association between bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia: systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 7:e45201. doi: 10.1371/journal.pone.0045201. Epub 2012 Oct 2.
30. Chhavi, Saxena M, Negi MP, Singh S, Singh PK, et al. (2010) DNA content can improve the detection and prognosis of carcinoma of the cervix. *Biosci Trends* 4:103-109
31. Lawn SD, Meintjes G. (2011) Pathogenesis and prevention of immune reconstitution disease during antiretroviral therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 9:415-30.
32. Sharma SK, Soneja M. (2011) HIV & immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS). *Indian J Med Res.* 134:866-77. doi: 10.4103/0971-5916.92632.
33. Firnhaber C, Westreich D, Schulze D, Williams S, Siminya M, et al. (2012) Highly active antiretroviral therapy and cervical dysplasia in HIV-positive women in South Africa. *J Int AIDS Soc.* 15:17382.

TABLES

Table 1. Univariate analysis of the association between DNA index and socio-demographic variables, habits, characteristics associated with HPV infection and characteristics associated with HIV infection among HIV-positive women attending three reference centers for HIV/AIDS in Recife, Brazil, 2008-2010.

Characteristic	Aneuploidy(%)	Diploidy(%)	OR (95%-CI)	<i>p</i>
Socio-demographic characteristics				
Age (median: 34 years)				0,609
≥ 35 years	29(46,77)	129(50,39)	0,86(0,49-1,50)	
<35 years	33(53,23)	127(49,61)	1,00	
Total	62(100)	256(100)		
Illiteracy				0,501
No	6(9,68)	33(12,79)	0,73(0,29-1,82)	
Yes	56(90,32)	225(87,21)	1,00	
Total	62(100)	258(100)		
Schooling				0,758
> 8 years	19(30,65)	84(32,68)	0,91(0,49-1,65)	
≤ 8 years	43(69,35)	173(67,32)	1,00	
Total	62(100)	257(100)		
Income				0,066
<1 minimum wage	16(30,19)	99(44,00)	0,55(0,28-1,04)	
≥1 minimum wage	37(69,81)	126(56,00)	1,00	
Total	53(100)	225(100)		
Hábits				

Smoking				0,648
Smokers	12(22,64)	46(20,44)	1,03(0,49-2,18)	0,928
Former smokers	10(18,87)	56(24,89)	0,70(0,32-1,54)	0,386
Non-smokers	31(58,49)	123(54,67)	1,00	
Total	53(100)	225(100)		
Alcohol intake				0,416
Heavy drinker	4(6,56)	29(11,42)	0,48(0,15-1,49)	0,208
Light drinker	31(50,82)	134(52,76)	0,80(0,45-1,45)	0,480
Abstainer	26(42,62)	91(35,83)	1,00	
Total	61(100)	254(100)		
Smoked drug use				0,535
Yes	10(16,39)	34(13,33)	1,27(0,59-2,74)	
No	51(83,61)	221(86,67)	1,00	
Total	61(100)	255(100)		
Sniffed drug use				0,903
Yes	6(10,00)	24(9,49)	1,06(0,41-2,72)	
No	54(90,00)	229(90,51)	1,00	
Total	60(100)	253(100)		
Drug use				0,796
Yes	10(17,24)	39(15,85)	1,10(0,51-2,37)	
No	48(82,76)	207(84,15)	1,00	
Total	58(100)	246(100)		
Characteristics associated with HPV infection				
Number of sexual partners				0,135
≥4 partners	18(31,03)	101(41,74)	0,62(0,34-1,15)	

1-3 partners	40(68,97)	141(58,26)	1,00
Total	58(100)	242(100)	
Pregnancy on HPV diagnosis			0,334
Yes	7(11,48)	41(16,47)	0,65(0,27-1,54)
No	54(88,52)	208(83,53)	1,00
Total	61(100)	249(100)	
Presence of HPV			0,223
Yes	28(47,46)	95(38,78)	1,42(0,80-2,52)
No	31(52,54)	150(61,22)	1,00
Total	59(100)	245(100)	
Characteristics associated with HIV infection			
CD4+ T lymphocyte count (*)			0,146
<200/mm ³	4(7,69)	34(15,45)	0,45(0,15-1,34)
≥200/mm ³	48(92,31)	186(84,55)	1,00
Total	52(100)	220(100)	
Length of time since HIV diagnosis			0,174
≥24 months	36(61,02)	128(51,20)	1,49(0,83-2,66)
<24 months	23(38,98)	122(48,80)	1,00
Total	59(100)	250(100)	
Use of TARV			0,006
No	20(37,04)	44(19,64)	2,40(1,26-4,57)
Yes	34(62,96)	180(80,36)	1,00
Total	54(100)	224(100)	

(*)On the CD4 + T cells count, the result closest to the date of the interview was considered.

Table 2. Analysis of cell ploidy in accordance with cervical intraepithelial lesions in HIV-positive women attended in three reference centers for HIV / AIDS in Recife-PE, 2008-2010

Cytological alterations	Aneuploidy (%)	Diploidy (%)
ASCUS	6(31,6)	11(24,5)
ASC-H	0	1(2,2)
HPV	0	2(4,5)
LSIL	10(52,6)	24(53,3)
HSIL	3(15,8)	7(15,5)
Total	19	45

Table 3. Association between ploidy of cervical cells and cervical biopsy results in HIV positive women attended in three reference centers for HIV / AIDS in Recife-PE 0.2008-2010

Histology	Aneuploidy (%)	Diploidy (%)	<i>p</i>
Presence of CIN	10 (66,7)	17 (31,5)	0,030
Absence of CIN	5 (33,3)	37 (68,5)	
Total	15 (100)	54 (100)	

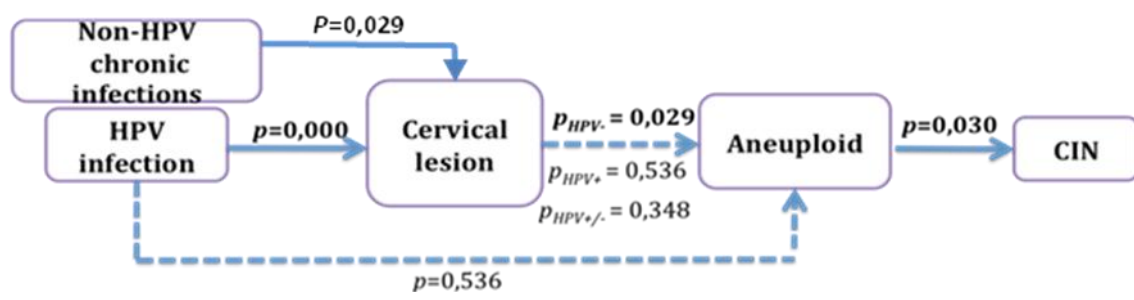
Table 4. Persistence of aneuploidy in HIV-positive women attendees in three reference centers for HIV / AIDS in Recife-PE 0.2008-2010.

Initial evaluation	Final evaluation		Agreement	
	Positive	Negative	Expected	Kappa
Aneuploidy				
Positive	9	31	0,64	0,031
Negative	32	105		
Total	42	136		

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Model of progression of cervical lesions to cervical cancer in HIV-positive women treated with HAART

Figure 1



ANEXOS

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

Andamento do projeto - CAAE - 0011.0.250.000-05				
Título do Projeto de Pesquisa				
EVOLUÇÃO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA DA INFECÇÃO CERVICAL PELO HPV EM MULHERES CO-INFECTADAS COM O HIV ATEN CENTROS DE REFERÊNCIA PARA HIV/AIDS EM RECIFE - PE				
Situação	Data Inicial no CEP	Data Final no CEP	Data Inicial na CONEP	Data Final na CONEP
Aprovado no CEP	21/07/2005 00:00:00	18/10/2005 15:43:38	21/07/2005 00:00:00	
Descrição	Data	Documento	Nº do Doc	
1 - Envio da Folha de Rosto pela Internet	21/07/2005 22:17:57	Folha de Rosto	FR-66960	
2 - Recebimento de Protocolo pelo CEP (Check-List)	21/07/2005 22:24:36	Folha de Rosto	0011.0.250.000-05	
3 - Envio do Protocolo Aprovado para CONEP	18/10/2005 15:43:33	Folha de Rosto	108/05	
4 - Aguardando Protocolo chegar na CONEP	18/10/2005 15:43:37	Folha de Rosto	108/05	

ANEXO B - Normas para publicação na Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

The manuscript should be prepared using standard word processing software and should be printed (font size 12) double-spaced throughout the text, figure captions, and references, with margins of at least 3 cm. The figures should come in the extension tiff, with a minimum resolution of 300 dpi. Tables and legends to figures must be submitted all together in a single file. Figures, must be uploaded separately as supplementary file.

The manuscript should be arranged in the following order:

Running title: with up to 40 characters (letters and spaces)

Title: with up to 250 characters

Author's names: without titles or graduations

Institutional affiliations: full address of the corresponding author only

Summary: up to 200 words (100 words in case of short communications). It should emphasize new and important aspects of the study or observations.

Key words: 3-6 items must be provided. Terms from the Medical Subject Headings (Mesh) list of Index Medicus should be used.

Sponsorships: indicating the sources of financial support and change of address.

Introduction: should set the purpose of the study, give a brief summary (not a review) of previous relevant works, and state what new advance has been made in the investigation. It should not include data or conclusions from the work being reported.

Materials and Methods: should briefly give clear and sufficient information to permit the study to be repeated by others. Standard techniques need only be referenced.

Ethics: when reporting experiments on human subjects, indicate whether the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional or regional) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983. When reporting experiments on animals, indicate whether the institution's or a national research council's guide for, or any national law on the care and use of laboratory animals was followed.

Results: should be a concise account of the new information discovered, with the least personal judgement. Do not repeat in text all the data in the tables and illustrations.

In case of describing New Species, should follow:

Name of the new species, authors (when it is the case), sp. nov., (Figs x-y)
[Ex: *An. (Nyssorhynchus) atacamensis* González and Sallum, sp. nov. (Figs 1-4)]

Previous reference to the new species (when it is the case)
[Ex: *An. pictipennis* of Rueda et al. (2008): 448.]

Diagnosis (or Description; all stages are described);

Type host (when it is the case);

Site of Infection (when it is the case);

Type-locality;

Type data and depository;

Other material examined (when it is the case);

Distribution;

Host-parasite data (such prevalence and other important data, when it is the same case);

Bionomics;

Etymology;

Taxonomic discussion (or simply DISCUSSION as internal title).

Discussion: should be limited to the significance of the new information and relate the new findings to existing knowledge. Only unavoidable citations should be included.

Acknowledgements: should be short and concise, and restricted to those absolutely necessary.

REFERENCES

Must be accurate. Only citations that appear in the text should be referenced. Unpublished papers, unless accepted for publication, should not be cited. Work accepted for publication should be referred to as "in press" and a letter of acceptance of the journal must be provided. Unpublished data should only be cited in the text as "unpublished observations", and a letter of permission from the author must be provided. The references at the end of the paper should be arranged in alphabetic order according to the surname of the first author. [CLICK HERE](#) [+]

THE TITLE OF JOURNALS

Should be abbreviated according to the style used in the Index Medicus.

Consult: <http://www2.bg.am.poznan.pl/czasopisma/medicus.php?lang=eng>

In the text use authors' surname and date

Lutz (1910) or (Lutz 1910)

With two authors it is

(Lutz & Neiva 1912) or Lutz and Neiva (1912)

When there are more than two authors, only the first is mentioned

Lutz et al. (1910) or (Lutz et al. 1910).

AT THE END OF THE PAPER USE THE FOLLOWING STYLES

Journal article

Chagas C, Villela E 1922. Forma cardíaca da tripanosomíase americana. Mem Inst Oswaldo Cruz 14: 15-61.

Book and Thesis

Forattini OP 1973. Entomologia Médica. Psychodidae, Phlebotominae, Leishmaniose, Bartonelose, Vol. IV, Edgard Blucher, São Paulo, 658 pp.

Morel CM 1983. Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual, 2nd ed., Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, xxii + 580 pp.

Mello-Silva CC 2005. Controle alternativo e alterações fisiológicas em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), hospedeiro intermediário de *Schistosoma mansoni* Sambom, 1907 pela ação do látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopianae* N.E.B (Euphorbiaceae), PhD Thesis, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 85 pp.

Chapter in book

Cruz OG 1911. The prophylaxis of malaria in central and southern Brasil. In R Ross, The Prevention of Malaria, John Murray, London, p. 390-398.

Journal article on the Internet

Aboud S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. Am J Nurs [serial on the Internet]. 2002 Jun [cited 2002 Aug 12];102(6):[about 3 p.]. Available from: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>

Monograph on the Internet

Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer [monograph on the Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.nap.edu/books/0309074029/html/>.

Homepage/Web site

Cancer-Pain.org [homepage on the Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [updated 2002 May 16; cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.cancer-pain.org/>.

Part of a homepage/Web site

American Medical Association [homepage on the Internet]. Chicago: The Association; c1995-2002 [updated 2001 Aug 23; cited 2002 Aug 12]. AMA Office of Group Practice Liaison; [about 2 screens]. Available from: <http://www.ama-assn.org/ama/pub/category/1736.html>

DATABASE ON THE INTERNET

Open database

Who's Certified [database on the Internet]. Evanston (IL): The American Board of Medical Specialists. c2000 - [cited 2001 Mar 8]. Available from: <http://www.abms.org/newsearch.asp>

Closed database

Jablonski S. Online Multiple Congenital Anomaly/Mental Retardation (MCA/MR) Syndromes [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). c1999 [updated 2001 Nov 20; cited 2002 Aug 12]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/mesh/jablonski/syndrome_title.html

Part of a database on the Internet

MeSH Browser [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2002 - [cited 2003 Jun 10]. Meta-analysis; unique ID: D015201; [about 3 p.]. Available from:

<http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html> Files updated weekly. Updated June 15, 2005
FIGURES AND TABLES MUST BE UNDERSTANDABLE WITHOUT REFERENCE TO THE TEXT

Figures: presented in tiff format with a minimum of 300 dpi and photographs must be sharply focused, well contrasted, and if mounted onto a plate, the figures should be numbered consecutively with Arabic numbers. Magnification must be indicated by a line or bar in the figure, and referenced, if necessary in the caption (e.g., bar = 1 mm). Plates and line figures should either fit one column (8 cm) or the full width (16.5 cm) of the page and should be shorter than the page length to allow inclusion of the legend. Letters and numbers on figures should be of a legible size upon reduction or printing. A colour photograph illustrates the cover of each issue of the Journal and authors are invited to submit illustrations with legends from their manuscript for consideration for the cover.

Tables: should supplement, not duplicate, the text and should be numbered with Roman numerals. A short descriptive title should appear above each table, with any explanations or footnotes (identified with a, b, c, etc.) below.

Technical Notes: Technical Notes should communicate rapidly single novel techniques or original technical advances. The entire note should occupy no more than three printed pages including figures and/or tables (it means around 10 double-spaced typed Word file maximum). The text must not be divided into sections. Therefore, the state of art must be very briefly presented; results must be rapidly presented and discussed at a time.

Complementary tables and figures may be published as supplementary data. References must be limited to few essential ones and cited at the end of the note, using the same format as in full papers. A brief summary and three key words must be provided.

Short communications: should communicate rapidly single results or techniques. They should occupy no more than three printed pages including figures and/or tables. They should not contain excessive references. References should be cited at the end of the paper using the same format as in full papers. A brief summary and three key words must be provided.

Alternative format: manuscripts may be submitted following the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" produced by the International Committee of Medical Journal Editors also known as the Vancouver Style. In this case, authors should follow the guidelines in the fifth edition (Annals of Internal Medicine 1997; 126: 36-47, or at the website <http://www.acponline.org/journals/resource/unifreqr/htm>) and will be responsible for modifying the manuscript where it differs from the instructions given here, if the manuscript is accepted for publication.

Authors should also follow the Uniform Requirements for any guidelines that are omitted in these Instructions.

In case of clinical trials it's mandatory to inform the registration number of the REBEC platform.

A statement that the data/results of the manuscript are not plagiarism and have not been published elsewhere.

ONCE A PAPER IS ACCEPTED FOR PUBLICATION, THE AUTHORS MUST PROVIDE:

Page charges: there will be no page charges.

Proofs: one set of page proofs will be supplied for the author to check for typesetting accuracy, to be returned by the stipulated date. No changes to the original manuscript will be allowed at this stage.

ANEXO C - Comprovante eletrônico de submissão (Memórias do Instituto
Oswaldo Cruz)

25-Feb-2014

Dear Dr. MARTINS:

Your manuscript entitled "Prevalence of HPV infection, distribution of viral types and HPV risk factors in cervical samples from HIV-positive women attended at three HIV-AIDS reference centers in northeastern Brazil" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

Your manuscript ID is MIOC-2014-0070.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <http://mc04.manuscriptcentral.com/mioc-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc04.manuscriptcentral.com/mioc-scielo>.

Thank you for submitting your manuscript to the Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

Sincerely,
Prof. Ricardo Lourenço de Oliveira
Memórias do Instituto Oswaldo Cruz
memorias@fiocruz.br

ANEXO D – Normas para publicação na Plos One

1. Format Requirements

PLOS ONE does not consider presubmission inquiries. All submissions should be prepared with the following files:

- Cover letter

- Manuscript, including tables and figure legends

- Figures (guidelines for preparing figures can be found at the Figure and Table Guidelines)

Prior to submission, authors who believe their manuscripts would benefit from professional editing are encouraged to use language-editing and copyediting services. Obtaining this service is the responsibility of the author, and should be done before initial submission. These services can be found on the web using search terms like "scientific editing service" or "manuscript editing service." Submissions are not copyedited before publication.

Submissions that do not meet the PLOS ONE Publication Criterion for language standards may be rejected.

Cover Letter

You should supply an approximately one page cover letter that:

- Concisely summarizes why your paper is a valuable addition to the scientific literature

- Briefly relates your study to previously published work

- Specifies the type of article you are submitting (for example, research article, systematic review, meta-analysis, clinical trial)

- Describes any prior interactions with PLOS regarding the submitted manuscript

- Suggests appropriate PLOS ONE Academic Editors to handle your manuscript (view a complete listing of our academic editors)

- Lists any recommended or opposed reviewers

Your cover letter should not include requests to reduce or waive publication fees. Should your manuscript be accepted, you will have the opportunity to include your requests at that time. See PLOS ONE Editorial Policy for more information regarding publication fees.

Manuscript Organization

PLOS ONE considers manuscripts of any length. There are no explicit restrictions for the number of words, figures, or the length of the supporting information, although we encourage a concise and accessible writing style. We will not consider monographs.

All manuscripts should include line numbers and page numbers.

Manuscripts should begin with the ordered sections:

- Title
- Authors
- Affiliations
- Abstract
- Introduction

and end with the sections of:

- Acknowledgments
- References
- Figure Legends
- Tables

Figures should not be included in the main manuscript file. Each figure must be prepared and submitted as an individual file. Find more information about preparing figures [here](#).

The title, authors, and affiliations should all be included on a title page as the first page of the manuscript file.

There are no explicit requirements for section organization between these beginning and ending sections. Articles may be organized in different ways and with different section titles, according to the authors' preference. In most cases, internal sections include:

- Materials and Methods
- Results
- Discussion
- Conclusions (optional)

PLOS ONE has no specific requirements for the order of these sections, and in some cases it may be appropriate to combine sections. Guidelines for individual sections can be found [below](#).

Abbreviations should be kept to a minimum and defined upon first use in the text. Non-standard abbreviations should not be used unless they appear at least three times in the text.

Standardized nomenclature should be used as appropriate, including appropriate usage of species names and SI units.

Manuscript File Type Requirements

Authors may submit their manuscript files in Word (as .doc or .docx), LaTeX (as .pdf), or RTF format. Only RTF and .doc files can be used during the production process.

LaTeX Submissions. If you would like to submit your manuscript using LaTeX, you must author your article using the PLOS ONE LaTeX template and BibTeX style sheet. Articles prepared in LaTeX may be submitted in PDF format for use during the review process. After acceptance, however, .tex

files and formatting information will be required as a zipped file. Please consult our LaTeX guidelines for a list of what will be required.

Submissions with equations. If your manuscript is or will be in .docx format and contains equations, you must follow the instructions below to make sure that your equations are editable when the file enters production.

If you have not yet composed your article, you can ensure that the equations in your .docx file remain editable in .doc by enabling "Compatibility Mode" before you begin. To do this, open a new document and save as Word 97-2003 (*.doc). Several features of Word 2007/10 will now be inactive, including the built-in equation editing tool. You can insert equations in one of the two ways listed below.

If you have already composed your article as .docx and used its built-in equation editing tool, your equations will become images when the file is saved down to .doc. To resolve this problem, re-key your equations in one of the two following ways.

1. Use MathType to create the equation (recommended)
2. Go to Insert > Object > Microsoft Equation 3.0 and create the equation

If, when saving your final document, you see a message saying "Equations will be converted to images," your equations are no longer editable and PLoS will not be able to accept your file.

2. Guidelines for Standard Sections

Title

Manuscripts must be submitted with both a full title and a short title, which will appear at the top of the PDF upon publication if accepted. Only the full title should be included in the manuscript file; the short title will be entered during the online submission process.

The full title must be 150 characters or fewer. It should be specific, descriptive, concise, and comprehensible to readers outside the subject field. Avoid abbreviations if possible. Where appropriate, authors should include the species or model system used (for biological papers) or type of study design (for clinical papers).

Examples:

Impact of Cigarette Smoke Exposure on Innate Immunity: A *Caenorhabditis elegans* Model

Solar Drinking Water Disinfection (SODIS) to Reduce Childhood Diarrhoea in Rural Bolivia: A Cluster-Randomized, Controlled Trial

The short title must be 50 characters or fewer and should state the topic of the paper.

Back to top

Authors and Affiliations

All author names should be listed in the following order:

- First names (or initials, if used),
- Middle names (or initials, if used), and
- Last names (surname, family name)

Each author should list an associated department, university, or organizational affiliation and its location, including city, state/province (if applicable), and country. If the article has been submitted on behalf of a consortium, all author names and affiliations should be listed at the end of the article.

This information cannot be changed after initial submission, so please ensure that it is correct.

To qualify for authorship, a researcher should contribute to all of the following:

- Conception and design of the work, acquisition of data, or analysis and interpretation of data
- Drafting the article or revising it critically for important intellectual content
- Final approval of the version to be published

All persons designated as authors should qualify for authorship, and all those who qualify should be listed. Each author must have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. Those who contributed to the work but do not qualify for authorship should be listed in the acknowledgments.

When a large group or center has conducted the work, the author list should include the individuals whose contributions meet the criteria defined above, as well as the group name.

One author should be designated as the corresponding author, and his or her email address or other contact information should be included on the manuscript cover page. This information will be published with the article if accepted.

See the PLOS ONE Editorial Policy regarding authorship criteria for more information.

Abstract

The abstract should:

- Describe the main objective(s) of the study
- Explain how the study was done, including any model organisms used, without methodological detail
- Summarize the most important results and their significance

Not exceed 300 words

Abstracts should not include:

Citations

Abbreviations, if possible

Back to top

Introduction

The introduction should:

Provide background that puts the manuscript into context and allows readers outside the field to understand the purpose and significance of the study

Define the problem addressed and why it is important

Include a brief review of the key literature

Note any relevant controversies or disagreements in the field

Conclude with a brief statement of the overall aim of the work and a comment about whether that aim was achieved

Materials and Methods

This section should provide enough detail to allow suitably skilled investigators to fully replicate your study. Specific information and/or protocols for new methods should be included in detail. If materials, methods, and protocols are well established, authors may cite articles where those protocols are described in detail, but the submission should include sufficient information to be understood independent of these references.

We encourage authors to submit detailed protocols for newer or less well-established methods as Supporting Information. These are published online only, but are linked to the article and are fully searchable. Further information about formatting Supporting Information files, can be found [here](#).

Methods sections of papers on research using human or animal subjects and/or tissue or field sampling must include required ethics statements. See the Reporting Guidelines for human research, clinical trials, animal research, and observational and field studies for more information.

Methods sections of papers with data that should be deposited in a publicly available database should specify where the data have been deposited and provide the relevant accession numbers and version numbers, if appropriate. Accession numbers should be provided in parentheses after the entity on first use. If the accession numbers have not yet been obtained at the time of submission, please state that they will be provided during review. They must be provided prior to publication.

Methods sections of papers using cell lines must state the origin of the cell lines used. See the Reporting Guidelines for cell line research for more information.

Methods sections of papers adding new taxon names to the literature must follow the Reporting Guidelines below for a new zoological taxon, botanical taxon, or fungal taxon.

Results, Discussion, and Conclusions

These sections may all be separate, or may be combined to create a mixed Results/Discussion section (commonly labeled "Results and Discussion") or a mixed Discussion/Conclusions section (commonly labeled "Discussion"). These sections may be further divided into subsections, each with a concise subheading, as appropriate. These sections have no word limit, but the language should be clear and concise.

Together, these sections should describe the results of the experiments, the interpretation of these results, and the conclusions that can be drawn. Authors should explain how the results relate to the hypothesis presented as the basis of the study and provide a succinct explanation of the implications of the findings, particularly in relation to previous related studies and potential future directions for research.

PLOS ONE editorial decisions do not rely on perceived significance or impact, so authors should avoid overstating their conclusions. See the PLOS ONE Publication Criteria for more information.

[Back to top](#)

Acknowledgments

People who contributed to the work but do not fit the PLOS ONE authorship criteria should be listed in the acknowledgments, along with their contributions. You must ensure that anyone named in the acknowledgments agrees to being so named.

Funding sources should not be included in the acknowledgments, or anywhere in the manuscript file. You will provide this information during the manuscript submission process.

References

Only published or accepted manuscripts should be included in the reference list. Manuscripts that have been submitted but not yet accepted should not be cited. Limited citation of unpublished work should be included in the body of the text only as “unpublished data.”

References must be listed at the end of the manuscript and numbered in the order that they appear in the text. In the text, citations should be indicated by the reference number in brackets. Journal name abbreviations should be those found in the NCBI databases. A number of reference software companies supply PLOS style files (e.g., Reference Manager, EndNote).

Proper formatting of the references is crucial; some examples are shown below.

Published papers. Hou WR, Hou YL, Wu GF, Song Y, Su XL, et al. (2011) cDNA, genomic sequence cloning and overexpression of ribosomal protein gene L9 (rpL9) of the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *Genet Mol Res* 10: 1576-1588.

Note: Use of a DOI number for the full-text article is acceptable as an alternative to or in addition to traditional volume and page numbers.

Accepted, unpublished papers. Same as above, but “In press” appears instead of the page numbers.

Electronic journal articles. Huynen MMTE, Martens P, Hilderlink HBM (2005) The health impacts of globalisation: a conceptual framework. *Global Health* 1: 14. Available: <http://www.globalizationandhealth.com/content/1/1/14>. Accessed 25 January 2012.

Books. Bates B (1992) *Bargaining for life: A social history of tuberculosis*. Philadelphia: University of Pennsylvania Press. 435 p.

Book chapters Hansen B (1991) New York City epidemics and history for the public. In: Harden VA, Risse GB, editors. *AIDS and the historian*. Bethesda: National Institutes of Health. pp. 21-28.

Tables

Tables should be included at the end of the manuscript. All tables should have a concise title. Footnotes can be used to explain abbreviations. Citations should be indicated using the same style as outlined above. Tables occupying more than one printed page should be avoided, if possible. Larger tables can be published as Supporting Information. Please ensure that table formatting conforms to our Guidelines for table preparation.

Figure Legends

Figures should not be included in the manuscript file, but figure legends should be. Guidelines for preparing figures can be found here.

Figure legends should describe the key messages of a figure. Legends should have a short title of 15 words or less. The full legend should have a description of the figure and allow readers to understand the figure without referring to the text. The legend itself should be succinct, avoid lengthy descriptions of methods, and define all non-standard symbols and abbreviations.

Further information about figure legends can be found in the Figure Guidelines.

3. Specific Reporting Guidelines

Human Subject Research

Methods sections of papers on research using human subject or samples must include ethics statements that specify:

The name of the approving institutional review board or equivalent committee(s). If approval was not obtained, the authors must provide a detailed statement explaining why it was not needed

Whether informed consent was written or oral. If informed consent was oral, it must be stated in the manuscript:

Why written consent could not be obtained

That the Institutional Review Board (IRB) approved use of oral consent

How oral consent was documented

For studies involving humans categorized by race/ethnicity, age, disease/disabilities, religion, sex/gender, sexual orientation, or other socially constructed groupings, authors should:

Explicitly describe their methods of categorizing human populations

Define categories in as much detail as the study protocol allows

Justify their choices of definitions and categories, including for example whether any rules of human categorization were required by their funding agency

Explain whether (and if so, how) they controlled for confounding variables such as socioeconomic status, nutrition, environmental exposures, or similar factors in their analysis

In addition, outmoded terms and potentially stigmatizing labels should be changed to more current, acceptable terminology. Examples: "Caucasian" should be changed to "white" or "of [Western] European descent" (as appropriate); "cancer victims" should be changed to "patients with cancer."

For papers that include identifying, or potentially identifying, information, authors must download the Consent Form for Publication in a PLOS Journal (PDF), which the individual, parent, or guardian must sign once they have read the paper and been informed about the terms of PLOS open-access license. The signed consent form should not be submitted with the manuscript, but authors should securely file it in the individual's case notes and the methods section of the manuscript should explicitly state that consent authorization for publication is on file, using wording like:

The individual in this manuscript has given written informed consent (as outlined in PLOS consent form) to publish these case details.

For more information about PLOS ONE policies regarding human subject research, see the Publication Criteria and Editorial Policies.

Clinical Trials

Authors of manuscripts describing the results of clinical trials must adhere to the CONSORT reporting guidelines appropriate to their trial design, available on the CONSORT Statement website. Before the paper can enter peer review, authors must:

Provide the registry name and number in the methods section of the manuscript

Provide a copy of the trial protocol as approved by the ethics committee and a completed CONSORT checklist as Supporting Information (which will be published alongside the paper, if accepted)

Include the CONSORT flow diagram as the manuscript's "Figure 1"

Any deviation from the trial protocol must be explained in the paper. Authors must explicitly discuss informed consent in their paper, and we reserve the right to ask for a copy of the patient consent form.

The methods section must include the name of the registry, the registry number, and the URL of your trial in the registry database for each location in which the trial is registered.

For more information about PLOS ONE policies regarding clinical trials, see the Editorial Policies.

Animal Research

Methods sections of manuscripts reporting results of animal research must include required ethics statements that specify:

The full name of the relevant ethics committee that approved the work, and the associated permit number(s) (where ethical approval is not required, the manuscript should include a clear statement of this and the reason why)

Relevant details for efforts taken to ameliorate animal suffering

For example:

This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health. The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the University of Minnesota (Permit Number: 27-2956). All surgery was performed under sodium pentobarbital anesthesia, and all efforts were made to minimize suffering.

The organism(s) studied should always be stated in the abstract. Where research may be confused as pertaining to clinical research, the animal model should also be stated in the title.

We encourage authors to use the ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) guidelines as a reference.

For more information about PLOS ONE policies regarding animal research, see the Publication Criteria and Editorial Policies.

Observational and Field Studies

Methods sections for submissions reporting on any type of field study must include ethics statements that specify:

Permits and approvals obtained for the work, including the full name of the authority that approved the study; if none were required, authors should explain why

Whether the land accessed is privately owned or protected

Whether any protected species were sampled

Full details of animal husbandry, experimentation, and care/welfare, where relevant

For more information about PLOS ONE policies regarding observational and field studies, see the Publication Criteria and Editorial Policies.

Cell Line Research

Methods sections for submissions reporting on research with cell lines should state the origin of any cell lines. For established cell lines the provenance should be stated and references must also be given to either a published paper or to a commercial source. If previously unpublished de novo cell lines were used, including those gifted from another laboratory, details of institutional review board or ethics committee approval must be given, and confirmation of written informed consent must be provided if the line is of human origin.

For more information about PLOS ONE policies regarding observational and field studies, see the Publication Criteria.

Systematic Review/Meta-Analysis

A systematic review paper, as defined by The Cochrane Collaboration, is a review of a clearly formulated question that uses explicit, systematic methods to identify, select, and critically appraise relevant research, and to collect and analyze data from the studies that are included in the review. These reviews differ substantially from narrative-based reviews or synthesis articles. Statistical methods (meta-analysis) may or may not be used to analyze and summarize the results of the included studies.

Reports of systematic reviews and meta-analyses must include a completed PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) checklist and flow diagram to accompany the main text. Blank templates are available here:

Checklist: PDF or Word document

Flow diagram: PDF or Word document

Authors must also state in their "Methods" section whether a protocol exists for their systematic review, and if so, provide a copy of the protocol as Supporting Information and provide the registry number in the abstract.

If your article is a Systematic Review or a Meta-Analysis you should:

State this in your cover letter

Select "Research Article" as your article type when submitting

Include the PRISMA flowchart as Figure 1 (required where applicable)

Include the PRISMA checklist as Supporting Information

Paleontology and Archaeology Research

Manuscripts reporting paleontology and archaeology research must include descriptions of methods and specimens in sufficient detail to allow the work to be reproduced. Data sets supporting statistical and phylogenetic analyses should be provided, preferably in a format that allows easy re-use.

Specimen numbers and complete repository information, including museum name and geographic location, are required for publication. Locality information should be provided in the manuscript as legally allowable, or a statement should be included giving details of the availability of such information to qualified researchers.

If permits were required for any aspect of the work, details should be given of all permits that were obtained, including the full name of the issuing authority. This should be accompanied by the following statement:

All necessary permits were obtained for the described study, which complied with all relevant regulations.

If no permits were required, please include the following statement:

No permits were required for the described study, which complied with all relevant regulations.

See the PLOS ONE Editorial Policies for more information regarding manuscripts describing paleontology and archaeology research.

Software Papers

Manuscripts describing software should provide full details of the algorithms designed. Describe any dependencies on commercial products or operating system. Include details of the supplied test data and explain how to install and run the software. A brief description of enhancements made in the

major releases of the software may also be given. Authors should provide a direct link to the deposited software from within the paper.

See the PLOS ONE Editorial Policies for more information about submitting manuscripts.

Database Papers

For descriptions of databases, provide details about how the data were curated, as well as plans for long-term database maintenance, growth, and stability. Authors should provide a direct link to the database hosting site from within the paper.

See the PLOS ONE Editorial Policies for more information about submitting manuscripts describing databases.

Back to top

New Zoological Taxon

For proper registration of a new zoological taxon, we require two specific statements to be included in your manuscript.

In the Results section, the globally unique identifier (GUID), currently in the form of a Life Science Identifier (LSID), should be listed under the new species name, for example:

Anochetus boltoni Fisher sp. nov. urn:lsid:zoobank.org:act:B6C072CF-1CA6-40C7-8396-534E91EF7FBB

You will need to contact Zoobank to obtain a GUID (LSID). Please do this as early as possible to avoid delay of publication upon acceptance of your manuscript. It is your responsibility to provide us with this information so we can include it in the final published paper.

Please also insert the following text into the Methods section, in a sub-section to be called "Nomenclatural Acts":

The electronic edition of this article conforms to the requirements of the amended International Code of Zoological Nomenclature, and hence the new names contained herein are available under that Code from the electronic edition of this article. This published work and the nomenclatural acts it contains have been registered in ZooBank, the online registration system for the ICZN. The ZooBank LSIDs (Life Science Identifiers) can be resolved and the associated information viewed through any standard web browser by appending the LSID to the prefix "http://zoobank.org/". The LSID for this publication is: urn:lsid:zoobank.org:pub: XXXXXXXX. The electronic edition of this work was published in a journal with an ISSN, and has been archived and is available from the following digital repositories: PubMed Central, LOCKSS [author to insert any additional repositories].

All PLOS ONE articles are deposited in PubMed Central and LOCKSS. If your institute, or those of your co-authors, has its own repository, we recommend that you also deposit the published online article there and include the name in your article.

New Botanical Taxon

When publishing papers that describe a new botanical taxon, PLOS aims to comply with the requirements of the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (ICN). In association with the International Plant Names Index (IPNI), the following guidelines for publication in an online-only journal have been agreed such that any scientific botanical name published by us is considered effectively published under the rules of the Code. Please note that these guidelines differ from those for zoological nomenclature, and apply only to seed plants, ferns, and lycophytes.

Effective January 2012, "the description or diagnosis required for valid publication of the name of a new taxon" can be in either Latin or English. This does not affect the requirements for scientific names, which are still to be Latin.

Also effective January 2012, the electronic PDF represents a published work according to the ICN for algae, fungi, and plants. Therefore the new names contained in the electronic publication of a PLOS ONE article are effectively published under that Code from the electronic edition alone, so there is no longer any need to provide printed copies.

Additional information describing recent changes to the Code can be found [here](#).

For proper registration of the new taxon, we require two specific statements to be included in your manuscript.

In the Results section, the globally unique identifier (GUID), currently in the form of a Life Science Identifier (LSID), should be listed under the new species name, for example:

Solanum aspersum S.Knapp, sp. nov. [urn:lsid:ipni.org:names:77103633-1] Type: Colombia. Putumayo: vertiente oriental de la Cordillera, entre Sachamates y San Francisco de Sibundoy, 1600-1750 m, 30 Dec 1940, J. Cuatrecasas 11471 (holotype, COL; isotypes, F [F-1335119], US [US-1799731]).

PLOS ONE staff will contact IPNI to obtain the GUID (LSID) after your manuscript is accepted for publication, and this information will then be added to the manuscript during the production phase

In the Methods section, include a sub-section called "Nomenclature" using the following wording:

The electronic version of this article in Portable Document Format (PDF) in a work with an ISSN or ISBN will represent a published work according to the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants, and hence the new names contained in the electronic publication of a PLOS ONE article are effectively published under that Code from the electronic edition alone, so there is no longer any need to provide printed copies.

In addition, new names contained in this work have been submitted to IPNI, from where they will be made available to the Global Names Index. The IPNI LSIDs can be resolved and the associated information viewed through any standard web browser by appending the LSID contained in this publication to the prefix <http://ipni.org/>. The online version of this work is archived and available from the following digital repositories: [INSERT NAMES OF DIGITAL REPOSITORIES WHERE ACCEPTED MANUSCRIPT WILL BE SUBMITTED (PubMed Central, LOCKSS etc)].

All PLOS ONE articles are deposited in PubMed Central and LOCKSS. If your institute, or those of your co-authors, has its own repository, we recommend that you also deposit the published online article there and include the name in your article.

New Fungal Taxon

When publishing papers that describe a new fungal taxon name, PLOS aims to comply with the requirements of the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (ICN). The following guidelines for publication in an online-only journal have been agreed such that any scientific fungal name published by us is considered effectively published under the rules of the Code. Please note that these guidelines differ from those for zoological nomenclature.

Effective January 2012, "the description or diagnosis required for valid publication of the name of a new taxon" can be in either Latin or English. This does not affect the requirements for scientific names, which are still to be Latin.

Also effective January 2012, the electronic PDF represents a published work according to the ICN for algae, fungi, and plants. Therefore the new names contained in the electronic publication of a PLOS ONE article are effectively published under that Code from the electronic edition alone, so there is no longer any need to provide printed copies.

Additional information describing recent changes to the Code can be found [here](#).

For proper registration of the new taxon, we require two specific statements to be included in your manuscript.

In the Results section, the globally unique identifier (GUID), currently in the form of a Life Science Identifier (LSID), should be listed under the new species name, for example:

Hymenogaster huthii. Stielow et al. 2010, sp. nov. [urn:lsid:indexfungorum.org:names:518624]

You will need to contact either Mycobank or Index Fungorum to obtain the GUID (LSID). Please do this as early as possible to avoid delay of publication upon acceptance of your manuscript. It is your responsibility to provide us with this information so we can include it in the final published paper.

Effective January 2013, all papers describing new fungal species must reference the identifier issued by a recognized repository in the protologue in order to be considered effectively published.

In the Methods section, include a sub-section called "Nomenclature" using the following wording (this example is for taxon names submitted to MycoBank; please substitute appropriately if you have submitted to Index Fungorum):

The electronic version of this article in Portable Document Format (PDF) in a work with an ISSN or ISBN will represent a published work according to the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants, and hence the new names contained in the electronic publication of a PLOS ONE article are effectively published under that Code from the electronic edition alone, so there is no longer any need to provide printed copies.

In addition, new names contained in this work have been submitted to MycoBank from where they will be made available to the Global Names Index. The unique MycoBank number can be resolved and the associated information viewed through any standard web browser by appending the MycoBank number contained in this publication to the prefix <http://www.mycobank.org/MB/>. The online version of this work is archived and available from the following digital repositories: [INSERT NAMES OF DIGITAL REPOSITORIES WHERE ACCEPTED MANUSCRIPT WILL BE SUBMITTED (PubMed Central, LOCKSS etc)].

All PLOS ONE articles are deposited in PubMed Central and LOCKSS. If your institute, or those of your co-authors, has its own repository, we recommend that you also deposit the published online article there and include the name in your article.

Qualitative Research

Qualitative research studies use non-quantitative methods to address a defined research question that may not be accessible by quantitative methods, such as people's interpretations, experiences, and perspectives. The analysis methods are explicit, systematic, and reproducible, but the results do not involve numerical values or use statistics. Examples of qualitative data sources include, but are not limited to, interviews, text documents, audio/video recordings, and free-form answers to questionnaires and surveys.

Qualitative research studies should be reported in accordance to the Consolidated criteria for reporting qualitative research (COREQ) checklist. Further reporting guidelines can be found in the Equator Network's Guidelines for reporting qualitative research.

ANEXO E - Comprovante eletrônico de submissão (Plos One)

PONE-D-14-07931

Prognostic evaluation of DNA index in HIV-HPV co-infected women cervical samples attending in reference centers for HIV-AIDS in Recife.

PLOS ONE

Dear Mr. MARTINS,

Thank you for submitting your manuscript entitled "Prognostic evaluation of DNA index in HIV-HPV co-infected women cervical samples attending in reference centers for HIV-AIDS in Recife." to PLOS ONE. Your assigned manuscript number is PONE-D-14-07931.

We will now begin processing your manuscript and may contact you if we require any further information. You will receive an update once your manuscript passes our in-house technical check; you can also check the status of your manuscript by logging into your account at <http://pone.edmgr.com/>.

Please visit EveryONE (<http://blogs.plos.org/everyone>), the PLOS ONE community blog for our published authors and readers, to find out what the journal is thinking, changing and doing.

If you have any inquiries or other comments regarding this manuscript, please contact plosone@plos.org.

Thank you for your support of PLOS ONE.

Kind regards,
PLOS ONE