



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

KEILLA MARIA PAZ E SILVA

**Análise da frequência de Papilomavírus humano e *Chlamydia trachomatis*
em amostras anais de pacientes com lesão cervical**

Recife
2014

KEILLA MARIA PAZ E SILVA

**Análise da frequência de Papilomavírus humano e *Chlamydia trachomatis*
em amostras anais de pacientes com lesão cervical**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Orientadora:

Profa. Dra. Danyelly Bruneska Gondim Martins

Departamento de Bioquímica, CCB/UFPE;

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA.

Coorientador:

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

Departamento de Bioquímica, CCB/UFPE;

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA.

Recife
2014

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Silva, Keilla Maria Paz e
Análise da frequência de Papilomavírus humano e *Chlamydia trachomatis* em amostras anais de pacientes com lesão cervical / Keilla Maria Paz e Silva. – Recife: O Autor, 2014.

119 folhas: il.

Orientador: Danyelly Bruneska Gondim Martins

Coorientador: José Luiz de Lima Filho

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde, 2014.

Inclui bibliografia e anexos

1. Papilomavírus 2. HIV (Vírus) I. Martins, Danyelly Bruneska Gondim (orient.) II. Lima Filho, José Luiz de Lima (coorient.) III. Título.

579.2445

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2013-086

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: SILVA, Keilla Maria Paz.

Título: Análise da frequência de Papilomavírus humano e *Chlamydia trachomatis* em amostras anais de pacientes com lesão cervical.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovada em: 25/02/2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Mario Ribeiro de Melo Junior

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Patologia, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami.

Assinatura: _____

Profa. Dra. Rosângela Ferreira Frade de Araújo

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Bioquímica, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami.

Assinatura: _____

Profa. Dra. Danyelly Bruneska Gondim Martins

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Bioquímica, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami.

Assinatura: _____

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Sílvio Romero Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

**COORDENAÇÃO ADMINISTRATIVA DO LABORATÓRIO DE
IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI**

Profa. Dra. Rosângela Ferreira Frade de Araújo

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE**

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Keilla Maria Paz e Silva

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais volta
ao
Seu tamanho original”*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À **Deus** por Seu amor incondicional, pelos dons e graças concedidas em minha vida e por ter me dado forças para superar todos os obstáculos para realizar este sonho. Obrigada por mais uma etapa concluída na minha vida profissional.

Aos meus pais, **José Clemente (in memorian)** pelo eterno amor e incentivo, tenho certeza de que você estaria muito feliz e orgulhoso e **Maria do Carmo**, que de uma forma ou de outra me direcionou para esse caminho. Vocês são exemplos de trabalho e dedicação, sem o esforço de vocês teria sido impossível chegar até aqui.

A minha irmã **Kelly Maria Paz e Silva**, pela amizade verdadeira, amor, incentivo e solidariedade. Amo muito você.

Ao meu eterno amor, **Dácio Vieira**, que tantas vezes deixou seu estudo em segundo plano para que eu pudesse desenvolver o meu, demonstrando todos os dias de forma incansável sua compreensão, paciência, carinho, amor e incentivo. O amor que sinto por você me dá coragem todos os dias para enfrentar minhas lutas. Obrigada!

À toda minha família, pelo suporte afetivo, apoio e incentivo em todas as fases de minha vida.

A Professora Doutora **Danyelly Brunaska Gondim Martins** minha amiga e orientadora, agradeço primeiramente por abrir as portas do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami em 2011, me deixando fazer parte do Grupo de Prospecção Molecular e Bioinformática (ProspecMol), o qual fiquei conhecida por “Ksilva”, pela credibilidade, incentivo, ensinamentos e generosidade de todos os seus atos na orientação dessa dissertação. Pela mulher extraordinária, extremamente competente e dinâmica. Por quem eu tenho o privilégio de tê-la como verdadeira mestra. Minha admiração e agradecimento são eternos.

Ao Professor Doutor **José Luiz de Lima Filho** pela coorientação, dedicação, fundamental contribuição científica para o desenvolvimento dessa pesquisa e por ter me aberto inúmeras portas as quais eu nunca ousaria e nem conseguiria entrar sozinha. Minha admiração e agradecimento.

A Professora **Adrya Lúcia Peres Medeiros** por ter sido a primeira a acreditar em mim... e que de uma forma ou de outra me mostrou o caminho... e por ter me iniciado neste instigante mundo acadêmico...

Ao Doutor **Carlos Henrique Madeiros Castelletti** pela incansável busca na bioinformática em relação a correta identificação da *Chlamydia trachomatis*.

Keilla Maria Paz e Silva

*A minha amiga e professora, Doutora **Flávia Regina Gonçalves de Araújo**, minha grande amiga, obrigada por toda a dedicação, apoio, auxílio, pelo ombro amigo em todos os momentos difíceis dessa travessia e pelo sorriso sempre estimulante de que o amanhã vai ser melhor do que hoje.*

*Ao programa de pós-graduação em **Biologia Aplicada à Saúde**, pela oportunidade de crescimento pessoal e científico e à todos os membros que fazem o **Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami**.*

*A Doutora **Deyse Soares** pela contribuição, sem a qual essa pesquisa não seria possível.*

*Ao **Serviço de Colposcopia** do Hospital das Clínicas de Pernambuco, em que conheci profissionais muito competentes e especiais, como: **Dra. Mariléa Guimarães, Dra. Angelina Maia, Dr. Jefferson Valença**, obrigada pela atenção e auxílio prestados durante a coleta ginecológica das pacientes.*

*Ao **CNPq** pelo apoio financeiro.*

Às pessoas que indiretamente me deram suporte para a realização deste trabalho e a todos aqueles cujos nomes deixo de citar, mas que ao lerem estas palavras incorporarão meus sinceros agradecimentos.

A todas as voluntárias deste estudo, que nos ensinaram muito com os resultados dos exames, mas muito mais com suas histórias de vida.

RESUMO

O Papilomavírus Humano (HPV) é um agente sexualmente transmissível que se destaca por infectar o trato anogenital, e devido à sua associação etiológica com uma grande variedade de carcinomas, encontra-se entre as mais importantes infecções sexualmente transmissíveis (IST) da atualidade. Acredita-se que a presença do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e da *Chlamydia trachomatis* parecem favorecer a infectividade viral, proporcionando o surgimento de lesões que podem levar ao câncer. Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo avaliar os genótipos do HPV presentes em amostras cervicais e anais, correlacionando com a infecção por *Chlamydia trachomatis*. Realizou-se um estudo incluindo 73 mulheres com idade entre 17 e 65 anos, atendidas no Hospital das Clínicas de Pernambuco (HC/UFPE) entre novembro de 2010 e fevereiro de 2013. As amostras foram obtidas e a extração do DNA foi realizada através de kits específicos. Posteriormente, os genótipos do HPV foram determinados pelo PapilloCheck[®] (GreinerBio-One) e a identificação da *Chlamydia trachomatis* por PCR em Tempo-Real. A prevalência do HPV no canal anal foi de 83,6%, estando associado com história de intercurso anal ($p=0.0295$) e infecção por HIV ($p=0.0104$). Infecção múltipla por HPV foi observada em 50,8% das pacientes, sendo o HPV44 o mais comum. Nos grupos HIV-positivo e HIV-negativo, o genótipo de alto risco mais frequente foi o HPV16, enquanto que HPV44 e o HPV43 foram os genótipos de baixo risco mais encontrados, respectivamente. A taxa de concordância entre os genótipos de HPV cervical e anal chegou a 52%. Apenas um paciente apresentou infecção por *Chlamydia trachomatis* em canal anal. Os resultados sugerem que o canal anal pode ter participação na infecção cervical funcionando como reservatório do vírus. Desta forma, o rastreamento dessas pacientes no serviço público de saúde pode favorecer um diagnóstico precoce, auxiliando os médicos no acompanhamento e prevenindo a evolução da infecção, principalmente em pacientes HIV-positivas.

Palavras chave: Papilomavírus humano; Vírus da imunodeficiência humana; *Chlamydia trachomatis*; Infecções do trato anogenital.

ABSTRACT

The Human Papillomavirus (HPV) is a sexually transmitted agent that stands out to infect the anogenital tract, and because of its etiology with a wide variety of carcinomas association is among the most important sexually transmitted infections (STI) today. It is believed that the presence of the human immunodeficiency virus (HIV), *Chlamydia trachomatis* and seem to favor viral infectivity, giving the appearance of lesions that may lead to cancer. Thus, the present study aimed to evaluate the genotypes of HPV in cervical and anal specimens, correlating with *Chlamydia trachomatis*. We conducted a study including 73 women aged 17 to 65 years, the Hospital das Clínicas de Pernambuco (HC/UFPE) between November 2010 and February 2013. The samples were obtained and DNA extraction was performed using specific kits. Subsequently, HPV genotypes were determined by PapilloCheck® (GreinerBio-One) and identification of *Chlamydia trachomatis* by PCR in Real-Time. The prevalence of HPV in the anal canal was 83.6% which is associated with a history of anal intercourse ($p=0.0295$) and HIV infection ($p=0.0104$). Multiple HPV infection was observed in 50.8% of patients, the most common HPV44. In HIV-positive and HIV - negative groups, the most frequent genotype high-risk HPV16 was the, HPV44 and HPV43 while genotypes were found more low risk, respectively. The concordance rate between the genotypes of HPV cervical and anal reached 52%. Only one patient had *Chlamydia trachomatis* infection in the anal canal. The results suggest that the anal canal may be involved in cervical infection functioning as a reservoir of virus. Thus monitoring these patients in the public health service can facilitate early diagnosis, assisting physicians in monitoring and preventing the progression of the infection, especially in HIV-positive patients.

Keywords: Human papillomavirus; Human immunodeficiency virus; *Chlamydia trachomatis*; Genital tract infections.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Número estimado de novas infecções sexualmente transmissíveis nos EUA | 18 |
| Figura 2 - (A) Estrutura do HPV16; (B) Organização esquemática do genoma do HPV16 | 19 |
| Figura 3 - Desenho esquemático do ciclo replicativo do HPV a partir do tecido infectado | 21 |
| Figura 4 - Desenho esquemático da progressão das lesões no colo do útero, evidenciando a inserção do DNA viral ao genoma humano..... | 22 |
| Figura 5 - Representação espacial das taxas brutas de incidência de neoplasia maligna do colo do útero por 100 mil mulheres, estimadas para 2014..... | 24 |
| Figura 6 - Estrutura genômica do HIV-1, apresentando as localizações relativas dos principais genes e as proteínas que codificam..... | 30 |
| Figura 7 - Prevalência da infecção por HIV entre adultos (15% -49%)..... | 31 |
| Figura 8 - Coeficiente de incidência de AIDS (por 100 mil habitantes), segundo a região de residência e ano de diagnóstico – Brasil, de 1998 a 2010 | 32 |
| Figura 9 - Taxa de incidência (por grupo de 100 mil habitantes) dos casos de AIDS em jovens de 15 a 24 anos de idade, segundo sexo, por ano de diagnóstico e razão de sexos. Brasil, 1990-2010..... | 32 |
| Figura 10 - Fluxograma da classificação dos testes de HPV..... | 34 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Proteínas de expressão precoce do HPV e suas principais funções no mecanismo viral..... | 20 |
| Tabela 2 - Métodos de amplificação de ácidos nucleicos para HPV..... | 35 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|--------------|--|
| CDC | <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> |
| CCE | Carcinoma de Células Escamosas |
| CE | Corpúsculo Elementar |
| CH II | Captura Híbrida II |
| CI | <i>Confidence Interval</i> – Intervalo de Confiança |
| CR | Corpúsculo Reticular |
| DIP | Dor Inflamatória Pélvica |
| E | Gene que Codifica Proteína <i>Early</i> ou Imediata |
| EBV | <i>Epstein-Barr virus</i> – Vírus Epstein-Barr |
| <i>env</i> | Envelope |
| <i>et al</i> | E colaboradores |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| <i>gag</i> | <i>Group Specific Antigen</i> |
| HBV | <i>Hepatitis B virus</i> - Vírus da Hepatite B |
| HIV | <i>Human Immunodeficiency Virus</i> - Vírus da Imunodeficiência Humana |
| HPV | <i>Human Papillomavirus</i> - Papilomavírus humano |
| HSV-2 | <i>Herpes Simplex Virus 2</i> – Vírus Herpes <i>Simplex</i> |
| IARC | <i>International Agency for Research on Cancer</i> |
| ICTV | <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> |
| INCA | Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva |
| ISTs | Infecções Sexualmente Transmissíveis |
| L | Gene que Codifica Proteína <i>Late</i> ou Tardia |
| LCR | <i>Long Control Region</i> – Região Controladora não Codificante |
| MS | Ministério da Saúde |
| NIA | Neoplasia Intraepitelial Anal |
| NIC | Neoplasia Intraepitelial Cervical |
| OR | <i>Odds ratio</i> |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| ORF | <i>Open Reading Frame</i> |

| | |
|------------|--|
| ORI | Origem de Replicação |
| p53 | Proteína 53 |
| pb | Pares de Bases Nitrogenadas (em uma sequência no DNA) |
| <i>pol</i> | <i>Reverse transcriptase</i> |
| pRb | Proteína do Retinoblastoma |
| PVs | Papilomavírus |
| RR | <i>Relative Risk</i> |
| S | Período de Síntese (Replicação) Celular |
| SIM | Sistema de Informação sobre Mortalidade |
| SISCEL/SI | Sistema de Controle de Exames Laboratoriais da Rede Nacional de Contagem de |
| CLOM | Linfócitos CD4+/CD8+ e Carga Viral e o Sistema de Controle Logístico de Medicamentos |
| SUS | Sistema Único de Saúde |
| SINAM | Sistema Nacional de Atendimento Médico |
| WHO | <i>World Health Organization</i> |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----|
| INTRODUÇÃO | 16 |
| 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 17 |
| 1.1 INFECCÕES SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS..... | 17 |
| 1.1.1 Papilomavírus humano | 18 |
| 1.1.1.1 <i>Biologia viral</i> | 18 |
| 1.1.1.2 <i>Ciclo da infecção viral</i> | 20 |
| 1.1.1.3 <i>Infectologia cervical</i> | 22 |
| 1.1.1.4 <i>Infectologia anal</i> | 24 |
| 1.1.1.5 <i>Cofatores na infecção</i> | 25 |
| 1.1.2. Chlamydia trachomatis | 27 |
| 1.1.2.1 <i>Epidemiologia da infecção</i> | 27 |
| 1.1.3 Vírus da Imunodeficiência Humana | 29 |
| 1.1.3.1 <i>Biologia viral</i> | 29 |
| 1.1.3.2 <i>Epidemiologia da infecção</i> | 30 |
| 1.2 DIAGNÓSTICO MOLECULAR | 33 |
| 1.2.1 Papilomavírus humano | 33 |
| 1.2.1.1 <i>Técnicas de hibridização de ácidos nucleicos</i> | 34 |
| 1.2.1.2 <i>Técnicas de amplificação de sinal</i> | 34 |
| 1.2.1.3 <i>Métodos de amplificação de ácidos nucleicos</i> | 35 |
| REFERÊNCIAS | 37 |
| 2 OBJETIVOS | 47 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 47 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 47 |
| 3 MANUSCRITO I | 48 |
| 4 MANUSCRITO II | 79 |
| 5 CONCLUSÕES | 100 |
| 6 PERSPECTIVAS | 101 |
| 7 RESULTADOS ADICIONAIS | 102 |
| 8 INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES | 114 |
| ANEXOS | 115 |

INTRODUÇÃO

As infecções anogenitais ocasionadas pelo Papilomavírus humano (HPV) constituem um problema de saúde pública devido a sua elevada frequência mundial, sendo este o patógeno mais comumente transmitido por contato sexual (STANLEY, 2010) e associado ao câncer, o que gera implicações clínicas de alto impacto psicológico nos indivíduos acometidos (BASEMAN; KOUTSKY, 2005).

O comportamento sexual pode ser um fator determinante para a exposição e a probabilidade de infecção pelo HPV. Desta forma, um dos principais fatores de risco para o desencadeamento da infecção é o elevado número de parceiros sexuais, principalmente em indivíduos menores que 25 anos de idade (ROUSSEAU *et al.*, 2003), devido à ausência de imunidade adquirida oriunda de infecções anteriores, além da imaturidade biológica do colo uterino (BOSCH, 2003). No entanto, a infecção pelo HPV, bem como a presença de múltiplas infecções, também têm sido altamente prevalentes em mulheres infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (LEVI *et al.*, 2004; STRICKLER *et al.*, 2005).

O câncer cervical e suas lesões precursoras são as manifestações ginecológicas mais importantes em mulheres infectadas pelo HIV, que têm cinco vezes mais chance de apresentar tais manifestações clínicas (STRICKLER *et al.*, 2005). Pouco são os relatos sobre a epidemiologia do HPV anal em mulheres imunocompetentes e não há estimativas globais de infecção pelo HPV anal (HERNANDEZ *et al.*, 2013).

Dessa forma, a determinação de genótipos de HPV por biologia molecular torna-se importante no rastreamento populacional, possibilitando o monitoramento do risco para a progressão de carcinomas, o auxílio junto a elaboração de medidas preventivas e a avaliação da eficácia da vacina. Estudos acerca de conhecimentos, atitudes e práticas com relação aos aspectos comportamentais de sexualidade e infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) são necessários para a condução de ações de saúde. Sendo assim, esses dados podem ser utilizados como base para identificar não somente a prevalência da infecção pelo HPV e de seus genótipos na cérvix e no canal anal na população de mulheres soropositivas e soronegativas para o HIV, mas também identificar os fatores de risco mais relevantes neste público alvo.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

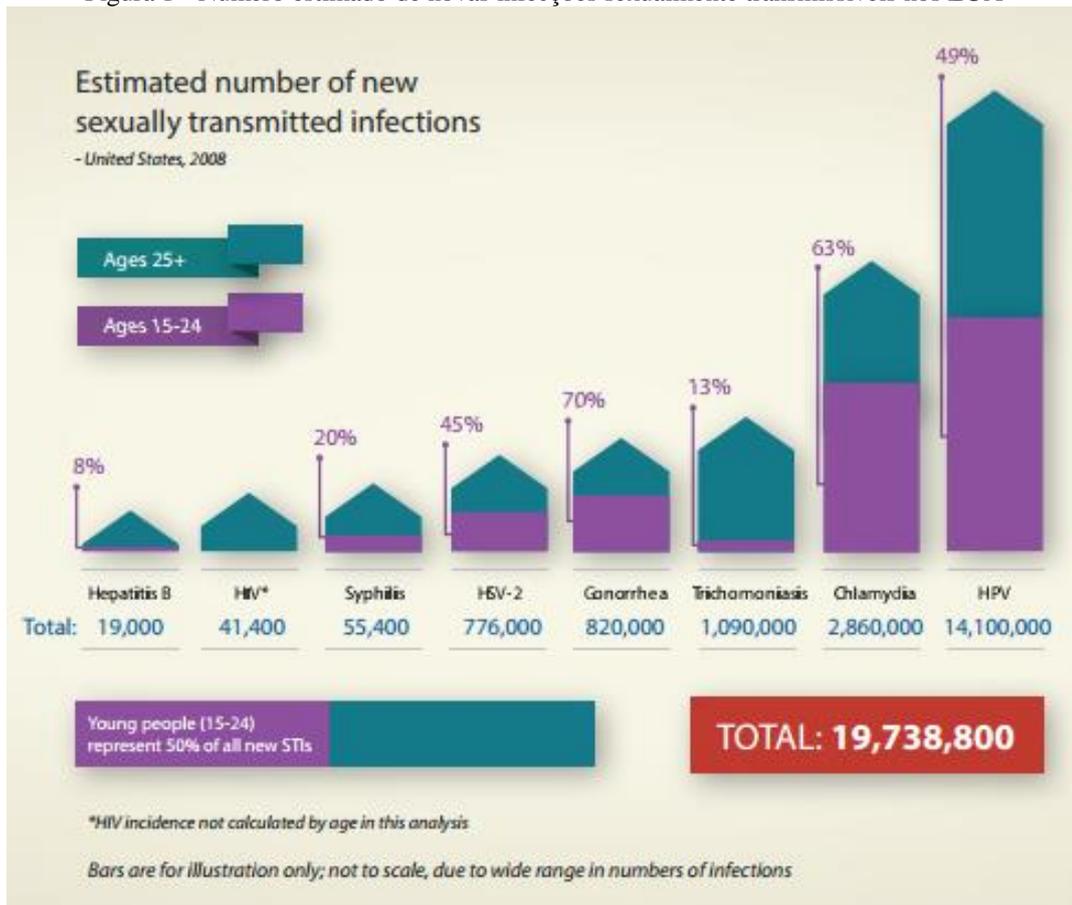
1.1 INFECÇÕES SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS

A nível mundial, as ISTs são consideradas um dos problemas de saúde pública mais comuns, e apesar de sua real dimensão ser desconhecida, estima-se que nos países em desenvolvimento constituem uma das cinco causas mais frequentes de busca por serviços de saúde. Em 1990, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou a sua primeira estimativa da incidência global de ISTs curáveis (gonorréia, clamídia, sífilis e tricomoníase), com base em pareceres emitidos por especialistas (OMS, 2005).

No ano de 1999, estimou-se um total de 340 milhões de novos casos de ISTs por ano em todo o mundo, na faixa etária de 15 a 49 anos, sendo 10 a 12 milhões para o Brasil (WORLD HEALTH ORGANIZATION [WHO], 2005). Ao passo que, em 2008, a estimativa foi de 499 milhões de novos casos (WHO, 2008). A repercussão das sequelas em ambos os sexos; sua relação com o aumento da morbidade e da mortalidade materna e infantil; seu papel facilitador na transmissão sexual do HIV e do câncer anogenital estão bem descritos, o que evidencia a relevância dessas enfermidades como fator de risco importante (FRANCO; HARPER, 2005; GIANNINI *et al.*, 2006; OMS, 2005).

Nos EUA, estimam-se mais de 19,7 milhões de novos casos de ISTs a cada ano, sendo a infecção por HPV a de maior prevalência, correspondendo a 14,1 milhões de casos. *Chlamydia trachomatis* é a segunda mais prevalente. Isso mostra que os jovens de faixa etária entre 15 e 24 anos são os mais afetados, constituindo cerca de 50% desses novos casos, o que faz o sistema de saúde americano custear aproximadamente \$16 bilhões com esses casos (CDC, 2013). Para o Brasil, as estimativas da OMS de novos casos de ISTs na população sexualmente ativa, a cada ano, são: sífilis: 937.000; gonorréia: 1.541.800; clamídia: 1.967.200; HSV-2: 640.900; HPV: 685.400 (**Figura 1**) (BRASIL, 2014).

Figura 1 - Número estimado de novas infecções sexualmente transmissíveis nos EUA



Fonte: CDC, 2013

1.1.1 Papilomavírus humano

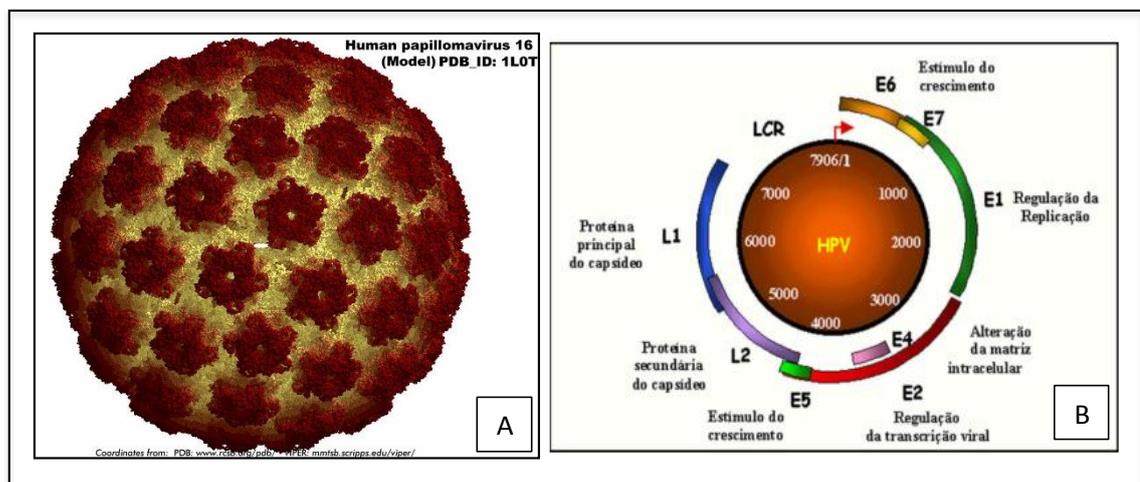
1.1.1.1 Biologia viral

A família *Papillomaviridae* contém 29 gêneros formados por 189 espécies de *papillomavirus* isolados de humanos (120 tipos) (BERNARD *et al.*, 2010). Desses, 40 infectam o trato genital feminino (GARCÍA-ESPINOSA *et al.*, 2009) e são categorizados quanto ao tropismo em vírus: epiteliotrópicos e mucosotrópicos, que afetam a pele e as mucosas, respectivamente, podendo vir a induzir, no sítio infeccioso de seu hospedeiro, várias lesões proliferativas (BERNARD; CALLEJA-MACIAS; DUN, 2006; DE VILLIERS *et al.*, 2004). Os genótipos de HPV que têm afinidade por mucosa são divididos em alto risco e baixo risco com

base em sua associação com a malignidade cervical (WHO-ICO, 2010). Os genótipos de alto risco causam carcinoma cervical, uma das principais causas de morte por câncer no mundo, tendo sido implicados também em cânceres vulvares, vaginais, penianos e anais (VELDHUIJZEN *et al.*, 2010; WHO-ICO, 2010). Já os genótipos de baixo risco estão associados a verrugas genitais, que impactam negativamente na qualidade de vida e no funcionamento psicossocial da população atingida (PIROTTA *et al.*, 2009; WOODHALL *et al.*, 2008).

O HPV é um vírus não envelopado, possui simetria icosaédrica e o seu genoma é composto por DNA dupla fita, circular, com comprimento de 7.900 pb (BRAVO *et al.*, 2010). O material genético está envolvido por uma estrutura denominada capsídeo viral com diâmetro entre 50 nm e 60 nm, com 72 capsômeros, formados por duas proteínas estruturais (L1 e L2) (**Figura 2A e B**) (MODIS; TRUS; HARRISON, 2002).

Figura 2 - (A) Estrutura do HPV16; (B) Organização esquemática do genoma do HPV16



Fonte: Adaptado de Villa, 1997

O genoma do HPV divide-se em três regiões: duas regiões codificadoras, denominadas ORFs, as quais se encontram em uma mesma fita de DNA e que expressam 8 proteínas virais. Os genes de expressão tardia (*Late* – L): L1 (tamanho: cerca de 55 kD) que correspondem a 80% da proteína total viral e é gênero-específica (CHEN *et al.*, 2000) e L2 (tamanho: cerca de 70 kD) responsáveis pela codificação das proteínas que constituem o capsídeo viral. Os genes de expressão precoce (*Early* – E): E1, E2, E4, E5, E6 e E7 são responsáveis pela codificação de proteínas envolvidas nos processos iniciais de replicação, no controle da transcrição e na

transformação viral (**Tabela 1**) (ESQUENAZI *et al.*, 2010). Ainda apresenta uma região não codificante denominada LCR ou NCR, composta por uma ORF com tamanho entre 400 pb e 1000 pb, localizada entre as regiões L1 e E6, aonde estão dispostos a maioria dos promotores de transcrição (BURD, 2003; KISSELJOV, 2000; SILVA; AMARAL; CRUZ, 2003).

Tabela 1 – Proteínas de expressão precoce do HPV e suas principais funções no mecanismo viral

| Proteínas Precoces | Funções |
|-------------------------------|--|
| E1 | Atividade de DNA helicase, ligação de ATP DNA dependente, atividade de ATPase. Papel na replicação e na repressão da replicação. |
| E2 | Regulador da transcrição e replicação viral, controle da região de expressão precoce, necessária para replicação viral eficiente junto com E1. |
| E4 | Expresso primariamente em epitélio em diferenciação, associado ao citoesqueleto de queratina de células epiteliais em cultura. Papel na liberação de vírus. |
| E5 | Atividade de transformação em HPV16 <i>in vitro</i> . Possivelmente estimula o início da proliferação celular <i>in vivo</i> , mas pode ter um papel na iniciação da carcinogênese. |
| E6 | Papel no processo de transformação junto com E7. Propriedades de ativação transcripcional. E6 dos HPVs de alto risco inativa p53 através de degradação rápida através da via da ubiquitina18. Junto com E7 propicia um ambiente celular para a replicação viral. |
| E7 | Induz síntese de DNA em células em repouso. E7 se liga à forma hipofosforilada da proteína do retinoblastoma (pRb), resultando em sua inativação funcional permitindo progressão funcional para a fase S do ciclo celular. Proteína E7 dos tipos de baixo risco (HPV 6 e 11) se liga menos eficientemente do que a proteína E7 dos tipo de alto risco (HPV 16 e 18). |

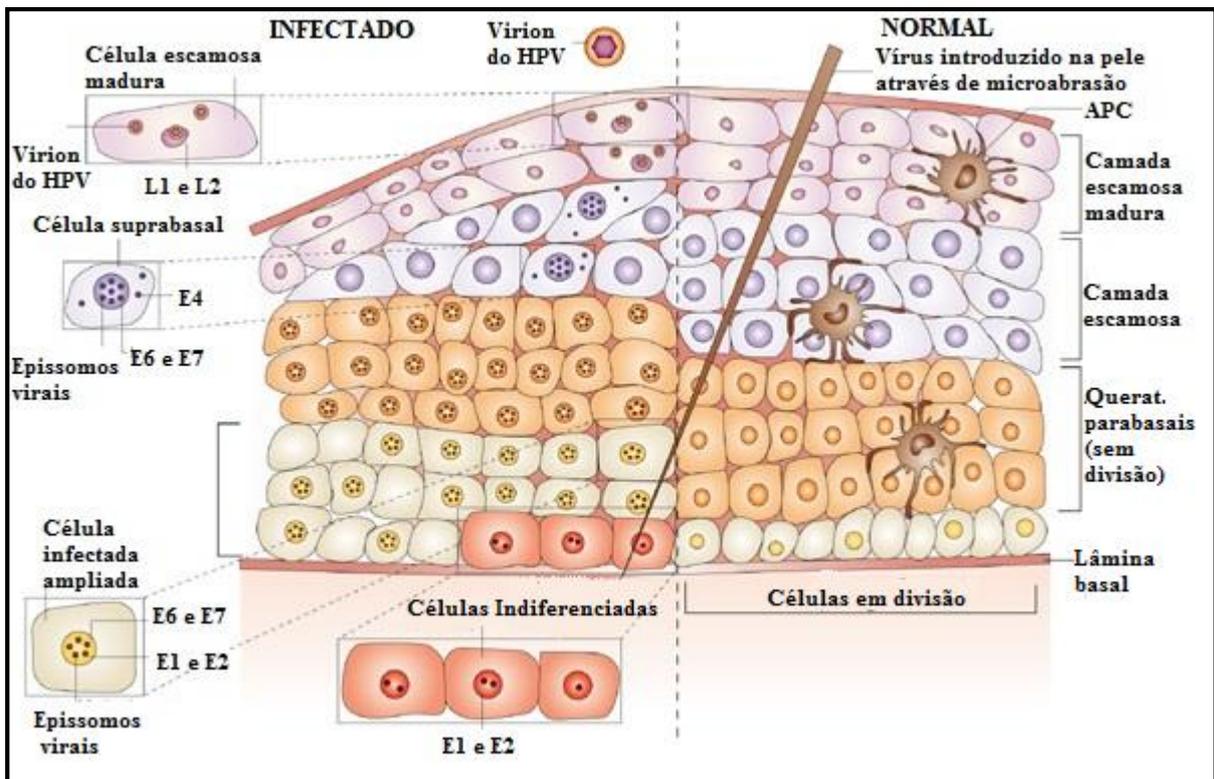
Fonte: Adaptado de Sanclemente; Gill, 2002.

1.1.1.2 Ciclo da infecção viral

O HPV mucosotrópico tem como alvo as células epiteliais basais superficiais da mucosa cervical, sendo altamente infeccioso (VELDHUIJZEN *et al.*, 2010). A internalização do vírus é uma etapa lenta e que pode durar horas (CULP; CHRISTENSEN, 2004; DAY *et al.*, 2003; SELINKA; GIROGLOU; SAPP, 2002). Para o HPV16 e o HPV58, este processo acontece devido a endocitose mediada por clatrin, diferindo do HPV31 o qual é interiorizado através de uma membrana caveolar (BOUSARGHIN *et al.*, 2003). Ao se internalizar, as partículas

virais são desmembradas, acompanhada da passagem do DNA viral para o núcleo celular. Acredita-se que essa transferência de material genético possa ser promovida pelo gene L2 (DAY *et al.*, 2004). A partir de então, o genoma viral comporta-se como um epissomo estável, ainda não integrado ao material genético da célula. Acredita-se que nessa fase, há expressão de proteínas: E1 e E2 (DOORBAR, 2005; WILSON *et al.*, 2002a) que promoverão a segregação dos genomas na fase de divisão celular (MCPHILLIPS *et al.*, 2005; YOU *et al.*, 2004), e a replicação do DNA viral juntamente com o humano, na fase S do ciclo celular (**Figura 3**) (YOU *et al.*, 2004).

Figura 3 - Desenho esquemático do ciclo replicativo do HPV a partir do tecido infectado

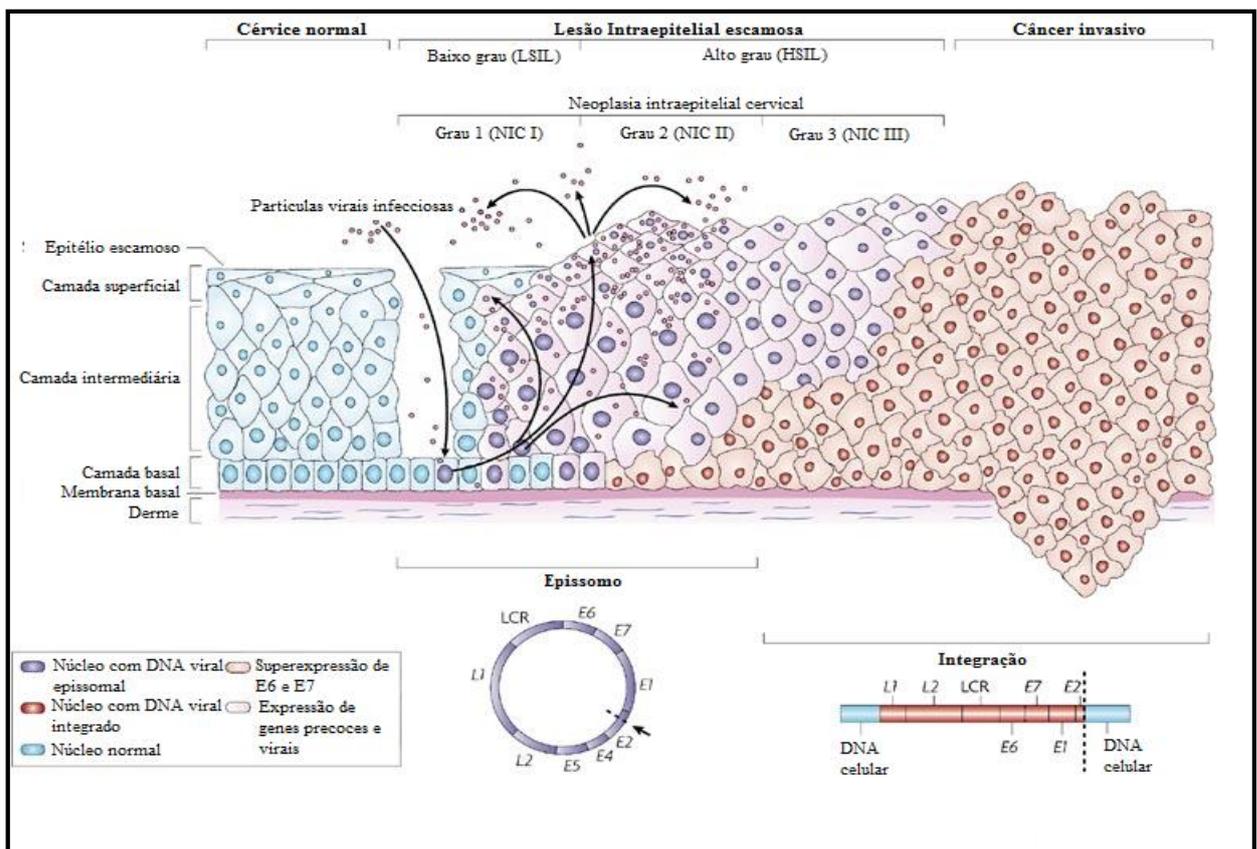


Fonte: Adaptado de Frazer, 2004

O câncer cervical progride a partir de lesões pré-malignas não invasivas, denominadas neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) ou lesões intraepiteliais escamosas (*squamous intraepithelial lesions* – SIL). Elas são classificadas histologicamente com base nas atipias das células epiteliais: NIC I corresponde a uma displasia branda; NIC II à displasia moderada e NIC III à displasia severa, sendo esta precursora do carcinoma *in situ*. NIC I é também classificada citologicamente como lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (*low-grade* SIL – LSIL) e

NIC II/III como lesão intraepitelial escamosa de alto grau (*high-grade SIL*– HSIL) (BASEMAN; KOUTSKY, 2005) (**Figura 4**). Acreditava-se, até então, que o câncer cervical sempre progredia a partir de lesões cervicais de baixo grau para moderado e, posteriormente, para alto grau. As descobertas da história natural da infecção pelo HPV levaram ao questionamento sobre os estágios pré-cancerosos progressivos contínuos, concluindo que lesões de baixo e alto-grau são processos distintos de uma infecção. LSIL parece ser uma manifestação transitória da infecção viral produtiva, onde o epitélio infectado passa pela diferenciação e maturação, exibindo anormalidades celulares. HSIL, precursor do câncer cervical, ocorre quando a infecção pelo HPV impede a diferenciação de células epiteliais, levando à replicação celular contínua e ao acúmulo de anormalidades genéticas, o que levam ao surgimento das células cancerosas. Dessa forma, LSIL pode se estabelecer antes, ao mesmo tempo, ou na ausência de HSIL (MOSCICKI *et al.*, 2006).

Figura 4 - Desenho esquemático da progressão das lesões no colo do útero, evidenciando a inserção do DNA viral ao genoma humano



Fonte: Adaptado de Woodman *et al.*, 2007

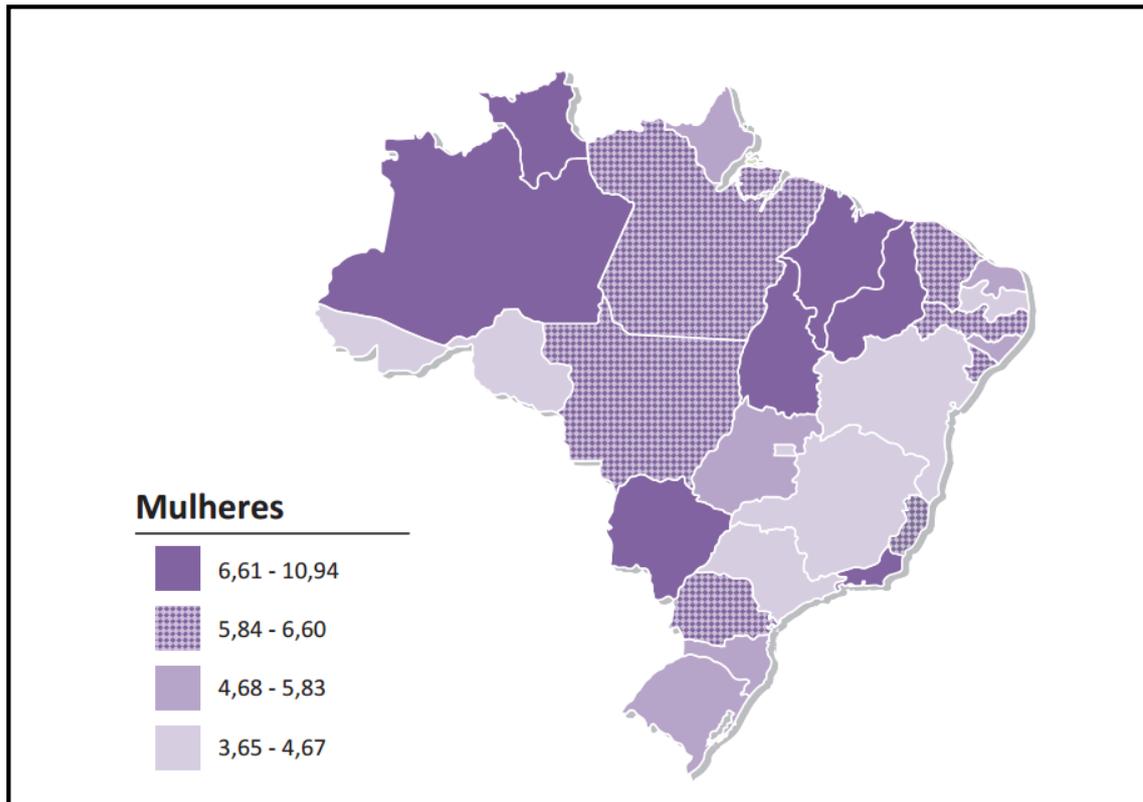
1.1.1.3 Infectologia cervical

A população infectada por HPV corresponde de 15%-20% das ISTs, com taxas de transmissão maiores que qualquer outra IST de etiologia viral. A incidência anual de todos os tipos de infecção genital ocasionada pelo HPV é estimada em 5,5 milhões nos EUA e acredita-se que 75% dos adultos sexualmente ativos se tornarão infectados com HPV alguma vez na vida (VELDHUIJZEN *et al.*, 2010). A prevalência do HPV é estimada entre 1,6%-41,9% entre mulheres (BRUNI *et al.*, 2010) e de 1,0%-95,0% entre os homens (SMITH *et al.*, 2011), variando com a idade e o comportamento sexual (LISSOUBA *et al.*, 2013). Levando-se em consideração a idade, a prevalência da infecção pelo HPV é maior entre mulheres jovens e parece decair com o aumento da idade (SCHIFFMAN, 1992). Na observação de vários estudos internacionais, a prevalência mediana de HPV oncogênico entre todas as mulheres avaliadas foi de 15,1%, enquanto que entre as mulheres de 30 anos ou mais foi de 9,2% (BOSCH; DE SANJOSÉ, 2003).

A prevalência mundial de câncer cervical em 2008 correspondeu à 9% dos casos de câncer feminino, sendo a terceira causa de câncer em mulheres, com mais de 529.000 novos casos e 275.000 mortes por ano (JEMAL *et al.*, 2011). A estimativa global para infecção pelo HPV, principal causador deste tipo de câncer é de 11,7%, onde a mais prevalente é na África Subsaariana (24%), seguida da Europa Oriental (21,4%) e América Latina (16,1%) (BRUNI *et al.*, 2010). Nos EUA, estima-se o diagnóstico de aproximadamente 12.340 novos casos de carcinoma cervical invasivo e de 4.030 mortes por este tipo de câncer (AMERICAN CANCER SOCIETY [ACS], 2013).

Para o ano de 2014, no Brasil, são esperados 15.590 casos novos de câncer do colo do útero, com um risco estimado de 15,33/100 mil mulheres. Com relação a incidência, têm-se que nas regiões Norte (23,57/100 mil), Centro-Oeste (22,19/100 mil) e Nordeste (18,79/100 mil), este tipo é o segundo mais frequente; na região Sudeste (10,15/100 mil), é o quarto e, na região Sul (15,87/100 mil), é o quinto (**Figura 5**) (INCA, 2014).

Figura 5 - Representação espacial das taxas brutas de incidência de neoplasia maligna do colo do útero por 100 mil mulheres, estimadas para 2014



Fonte: INCA, 2014

1.1.1.4 Infectologia anal

Adicionalmente às doenças malignas do colo do útero, o HPV é também a causa da maioria dos casos de câncer anal em mulheres e homens (PARKIN; BRAY, 2006). Embora raro em comparação com doenças malignas do colo do útero, a incidência de câncer anal tem aumentado em ambos os sexos, nos EUA e em outros países (JOHNSON *et al.*, 2004; BREWSTER; BHATTI, 2006). Acredita-se que mulheres com um histórico de câncer de colo uterino, ou até mesmo pré-câncer, tem elevado risco de desenvolverem câncer anal (ACS, 2013). Isso é devido ao local de preferência da infecção, pois há uma semelhança tecidual entre o colo do útero e o ânus. O alvo do HPV é a zona de transformação de ambos os sítios, onde no colo do útero, o epitélio escamoso da ectocérvice encontra o epitélio colunar da endocérvice; enquanto que no canal anal a zona de transição corresponde ao encontro do epitélio escamoso anal com o epitélio do reto (PALEFSKY; RUBIN, 2009). Pesquisadores examinaram

espécimes de colo uterino e ânus de 1.566 mulheres e relataram que a infecção anal por HPV é comum, com prevalência comparável à infecção do colo do útero de mulheres saudáveis e sexualmente ativas (HERNANDEZ; MCDUFFIE, 2005).

Estudos realizados nos EUA e Escandinávia relataram aumento acentuado da incidência de carcinoma de células escamosas (CCE) no ânus, nas últimas três décadas (BJØRGE *et al.*, 2002; CHANG *et al.*, 2002). Observou-se, também, crescimento concomitante da infecção por HPV (BJØRGE *et al.*, 2002; GERVAZ *et al.*, 2003; URONIS & BENDELL, 2007). Apesar da incidência de câncer de ânus em mulheres ter aumentado quase 40%, nenhuma normatização em relação ao rastreamento das mesmas foi proposto (CHANG *et al.*, 2002).

1.1.1.5 Cofatores na infecção

A identificação de cofatores que atuam em conjunto com o HPV, tais como hormônios exógenos, multiparidade (MUÑOZ *et al.*, 2002), tabagismo e outras ISTs (SMITH *et al.*, 2002a) tem grande importância, pois estes podem ser passíveis de prevenção (SMITH *et al.*, 2004). Acredita-se que o início precoce da atividade sexual, a quantidade de parceiros sexuais, o histórico de ISTs e outras características relacionadas ao comportamento sexual estão ligadas ao processo de infecção pelo HPV (ROUSSEAU *et al.*, 2003).

Estudo realizado na Costa Rica, encontrou aumento significativo de HSIL e câncer cervical associado ao aumento do número filhos (HILDESHEIM *et al.*, 2001). Acredita-se que o estado nutricional, traumatismos e mecanismos imunológicos seriam fatores correlacionados para explicar esse tipo de associação. As trocas hormonais induzidas pela gestação também estariam relacionadas à persistência ou à progressão da infecção. Na mulher não-grávida, a soro-reatividade é mais alta, o que sugere uma redução da resposta imunológica humoral contra o HPV, durante a gestação (MUÑOZ *et al.*, 2002), enquanto que o declínio da paridade poderia explicar a redução de carcinomas em alguns países (ROSA, 2007).

Uma consistente associação entre tabagismo e câncer cervical tem sido demonstrada por várias pesquisas, evidenciando o papel do fumo como fator de risco para esse câncer (HAVERKOS *et al.*, 2003; KUPER *et al.*, 2002). Acredita-se também que o tabagismo passivo possa estar associado ao câncer cervical, pois estudos realizados em Washington, no período de 1963-1978 e 1975-1994, encontraram um risco relativo aumentado, sendo estatisticamente significativo somente na primeira coorte. Os autores discutem a possibilidade de que a

proporção de mulheres que trabalham externas de suas residências aumentou nos últimos anos, diminuindo o tempo de exposição das mesmas ao efeito do tabagismo passivo (TRIMBLE *et al.*, 2005). Resultados semelhantes foram encontrados por Wu *et al.* (2003), com mulheres tailandesas, concluindo que o tempo de exposição ao tabagismo passivo é o maior determinante para se contrair a enfermidade.

Há fortes evidências da associação do HSV-2 com HPV (SMITH *et al.*, 2003). Estudos demonstraram associações entre câncer cervical e ISTs causadas por *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* ou HSV-2 em análises controladas pelo *status* da infecção por HPV (SMITH *et al.*, 2002), o que sugere que as mesmas podem ser cofatores no desenvolvimento de lesões cancerosas (SAMOFF *et al.*, 2005). No entanto, permanece ainda pouco entendido o papel dessas e o seu efeito biológico no desenvolvimento de lesões precursoras e câncer. O mecanismo mais provável é a indução da inflamação da cérvix uterina, levando a dano por metabólitos oxidativos (CASTLE; GIULINAO, 2003).

O vírus Epstein-Barr (EBV), um vírus gama-herpes ubíquo humano responsável pela mononucleose (NAHER *et al.*, 1992), poderia também ser um dos cofatores da infecção. Ele pode ser transmitido sexualmente (NAHER *et al.*, 1992) e se replica em células do colo uterino (SIXBEY; LEMON; PAGANO, 1986). Esse tipo de infecção, amplamente difundida entre a população (RICKINSON; KIEFF, 2001) tem sido associada com um aumento do número de cânceres epiteliais linfocíticos e, principalmente, o linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin, linfoma de células T, carcinoma da nasofaringe e adenocarcinoma gástrico (DECAUSSIN *et al.*, 2000; ZUR HAUSEN *et al.*, 2000). No entanto, a relação oncogênica entre os dois vírus não está bem elucidada. Somado a isso, a presença de EBV no carcinoma colo do útero continua a ser igualmente um tema de grande debate entre virologistas, confirmada por alguns autores (NICHOLS *et al.*, 2011; SASAGAWA *et al.*, 2000), mas refutada por outros (DE OLIVEIRA *et al.*, 1999; WEINBERG *et al.*, 1993).

Na população geral, a infecção por HPV está associada à cofatores biológicos e ambientais comuns aos do HIV; entretanto, em mulheres que são portadoras do HIV, o estado imunológico desempenha um fator adicional na susceptibilidade à infecção (PALEFSKY, 2007). A soropositividade para HIV está intimamente relacionada com a elevada prevalência e incidência da infecção por HPV (BANURA *et al.*, 2008; DIDELOT-ROUSSEAU *et al.*, 2006; MARAIS *et al.*, 2008; NG'AYO *et al.*, 2008; NG'ANDWE *et al.*, 2007; SAFAEIAN *et al.*, 2008; YAMADA *et al.*, 2008), assim como uma menor probabilidade de eliminação da mesma, resultando em um maior risco de aparecimento de lesões (BANURA *et al.*, 2008; ROWHANI-

RAHBAR *et al.*, 2007; SAFAEIAN *et al.*, 2008) e prevalência aumentada de múltiplos genótipos de HPV (BANURA *et al.*, 2008; MARAIS *et al.*, 2008).

As lesões geradas pelo HPV aparecem mais precocemente em mulheres positivas para HIV do que em mulheres negativas para este vírus (MBULAITEYE *et al.*, 2003; MOUGIN *et al.*, 2001). Um estudo com adolescentes infectadas pelo HPV, positivas e negativas para HIV, observaram que jovens HIV-negativas controlavam a expressão do HPV, neutralizando-o, em um curto período de tempo quando comparadas as jovens HIV-positivas (MOSCICKI *et al.*, 2004). Já foi relatado que mulheres HIV-positivas têm o curso da infecção por HPV alterado, com um decréscimo das taxas de regressão da doença e uma progressão rápida para altos níveis de lesões invasivas (CLARKE; CHETTY, 2002). A associação observada entre a infecção por HPV e a aquisição do HIV tem importantes implicações para a saúde pública. Se a associação causal é verificada, a vacinação contra o HPV juntamente com outras intervenções, tem o potencial de ser uma estratégia adicional de controle do HIV, o que proporcionará benefícios a longo prazo tanto para a população feminina quanto a masculina (LISSOUBA *et al.*, 2013).

Em comparação com a infecção cervical pelo HPV, poucas informações são descritas a respeito da infecção anal por este vírus em mulheres HIV-positivas e HIV-negativas de alto risco (PALEFSKY *et al.*, 2001). A associação entre a infecção por genótipos de alto risco oncogênico e a neoplasia de ânus também já está admitida frente a homens e mulheres portadores de imunodeficiência ou imunossupressão (MANZIONE; NADAL; CALORE, 2004; NADAL *et al.*, 2004; SOBHANI *et al.*, 2001). No entanto, para os que não portam deficiências de imunidade, a associação não está clara, o que colabora para a falta de normatização quanto ao diagnóstico do HPV e prevenção de possíveis cânceres de ânus (VÉO *et al.*, 2008).

1.1.2. *Chlamydia trachomatis*

1.1.2.1 Epidemiologia da infecção

No ano de 2012, um total de 1.422.976 casos (456/100.000 habitantes) de infecção por *Chlamydia trachomatis* foram reportados ao CDC. Com base em estimativas de pesquisas nacionais realizadas entre 1999-2008, a sua prevalência é de 6,8% entre as mulheres sexualmente ativas com faixa etária entre 14-19 anos (CDC, 2013). Estudos demonstraram no

Brasil, prevalência em torno de 11,4-16% em mulheres jovens (CODES *et al.*, 2002; MIRANDA *et al.*, 2004). Em Goiânia, a prevalência da infecção por *Chlamydia trachomatis* em adolescentes e mulheres jovens entre 2000 e 2001, foi de 19,6% (ARAÚJO *et al.*, 2006). Já no estado de São Paulo, um estudo com mulheres portadoras de condiloma acuminado no ano de 2007, apresentou uma prevalência de 33,3% de *Chlamydia trachomatis*. Esta foi superior a maioria dos estudos realizados (MARCOLINO *et al.*, 2008).

Essa espécie bacteriana é responsável por acometer não só o trato geniturinário (WHO, 2007), mas também o tecido ocular (GOLIJOW *et al.*, 2005). É um grande problema de saúde pública, com estimativa de 89 milhões de novos casos por ano ocorrendo em todo o mundo, onde indivíduos sexualmente ativos são a maior razão de morbidade. Estima-se que 10-40% das mulheres portadoras de infecções não tratadas por clamídia desenvolvem a doença inflamatória pélvica (DIP), como: infertilidade, gravidez ectópica e dor pélvica crônica (NAVARRO *et al.*, 2002). Dados de um estudo em ambiente de assistência gerenciada sugeriu que os programas de rastreio podem levar a uma redução de 60% na incidência de DIP (CDC, 2013).

Dessa forma, o sistema de reprodução feminino é o mais afetado (DA ROS; SCHMITT, 2008; KJAER *et al.*, 2000), pois um histórico de infecção por essa bactéria e nuliparidade foi relacionado ao desenvolvimento da infecção cervical e anal concomitantemente (HERNANDEZ *et al.*, 2005).

Tal como acontece com outras ISTs inflamatórias, a infecção por *Clamidia trachomatis* pode facilitar a transmissão do HIV. Além disso, as mulheres grávidas infectadas podem transmitir esta bactéria para seus bebês durante o parto, resultando em oftalmia neonatal e pneumonia. Por causa da grande carga de doenças e riscos associados com a infecção, o CDC recomenda que todas as mulheres sexualmente ativas com menos de 26 anos de idade sejam rastreadas anualmente (CDC, 2013).

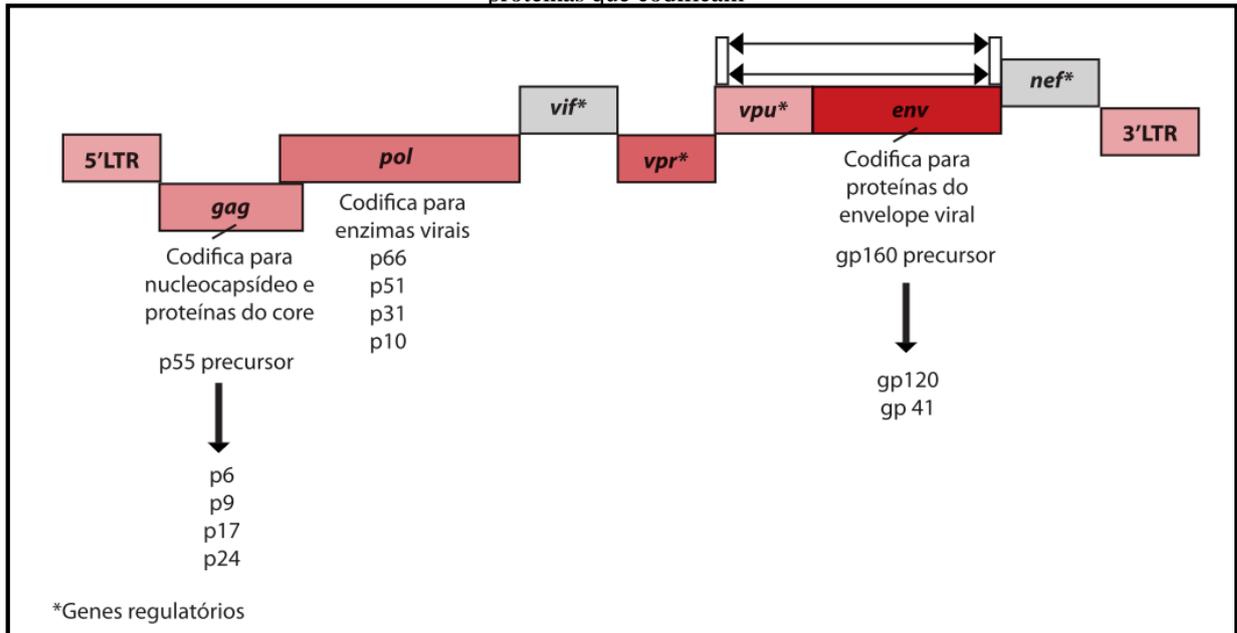
1.1.3 Vírus da Imunodeficiência Humana

1.1.3.1 Biologia viral

O HIV é uma partícula esférica, que mede de 100 nm a 120 nm de diâmetro, e pertence ao gênero *Lentivirinae* e a família *Retroviridae*, tendo em seu núcleo duas cópias de RNA (cadeia simples), encapsuladas por uma camada proteica ou núcleo-capsídeo, capsídeo e um envelope externo formado por uma bicamada fosfolipídica. No seu genoma há três genes principais que codificam as proteínas estruturais e as enzimas virais: *gag*, *env* e *pol*. O gene *gag* codifica uma proteína precursora (p55), onde a partir dela quatro proteínas estruturais do capsídeo serão formadas, que compreende a p24, a p6 e a p9, enquanto a p17 se encontra em uma camada entre o núcleo proteico e o invólucro, denominada matriz proteica, a qual reveste a superfície interna da membrana viral (MATSUOKA *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2008).

O gene *env* codifica as glicoproteínas gp160, gp120, e gp41, que são encontradas no envelope viral. A gp160 é uma precursora, que quando clivada forma gp120 e gp41. A gp120 se projeta na superfície viral na forma trimérica, enquanto a gp41 é uma glicoproteína transmembrana que se associa à gp120. O terceiro gene estrutural, *pol*, codifica as enzimas p66 e p51, que compõem a enzima transcriptase reversa (RT), necessária à replicação viral. Essas proteínas são subunidades da transcriptase reversa p31, ou integrase, a qual medeia a integração do DNA viral no genoma das células do hospedeiro, e a p10, uma protease que cliva precursores proteicos em unidades ativas menores. A proteína p66 também está envolvida na degradação do RNA original do HIV. Essas proteínas estão localizadas no núcleo, sendo associadas ao RNA do HIV (**Figura 6**) (SANTOS *et al.*, 2008). Vários outros genes no genoma do HIV codificam produtos com função reguladora ou acessória (genes *tat*; *rev*; *nef*; *vpu*; *vpr*; *vif*) (ROMANI; ENGELBRECHT, 2009).

Figura 6 - Estrutura genômica do HIV-1, apresentando as localizações relativas dos principais genes e as proteínas que codificam



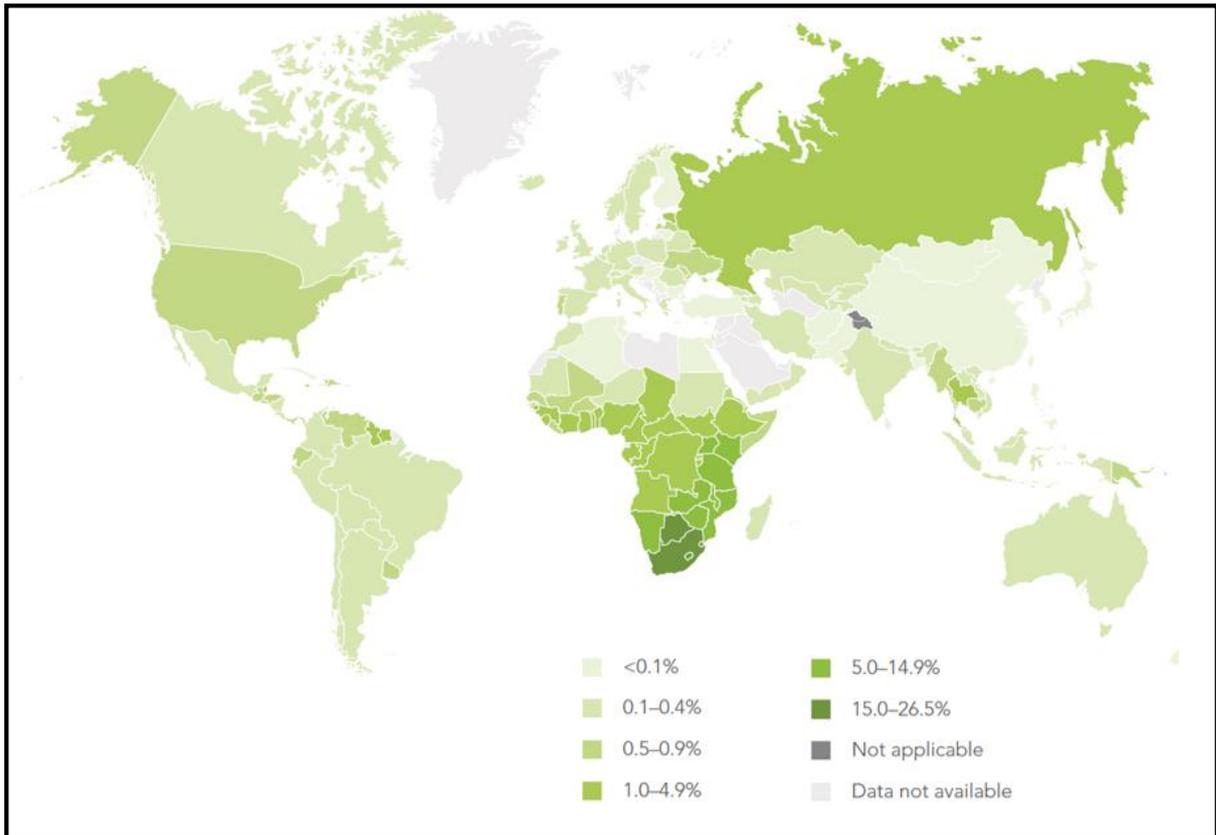
Fonte: Adaptado de Miller, 2010

O HIV-2 também apresenta os genes *gag*, *env*, *pol* e genes regulatórios e acessórios com funções semelhantes às observadas no HIV-1. A homologia entre os genomas dos dois vírus é de aproximadamente 50%. As regiões *gag* e *pol* do genoma viral apresentam maior homologia entre os diferentes tipos virais, ao contrário da região *env*, que apresenta diferenças significativas no HIV-1 e HIV-2. As proteínas do HIV-2 têm funções equivalentes às do HIV-1; entretanto, apresentam diferenças na composição de aminoácidos e no peso molecular.

1.1.3.2 Epidemiologia da infecção

Estima-se que existam 35,3 milhões de pessoas portadoras do HIV, com uma prevalência de 15%-49% levando a 1,6 milhões de mortes por AIDS em todo o mundo (**Figura 7**) (WHO, 2013).

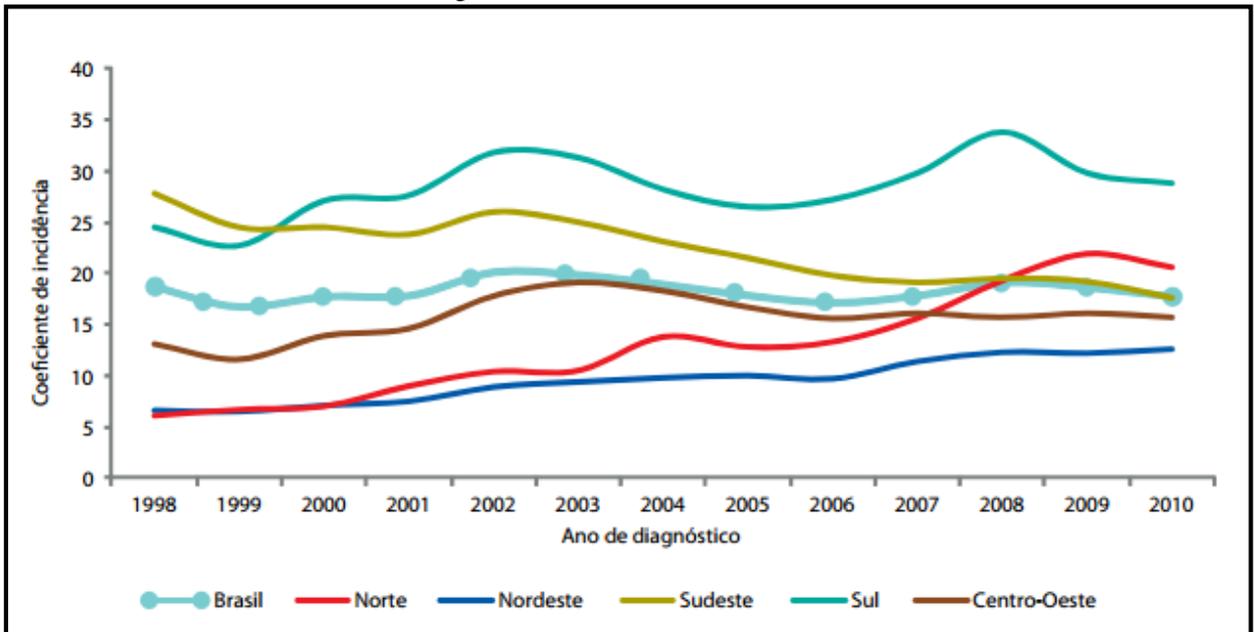
Figura 7 - Prevalência da infecção por HIV entre adultos (15%-49%)



Fonte: WHO, 2013

Segundo dados do Ministério da Saúde (MS), de 1980-2011, foram notificadas 608.230 ocorrências de AIDS no Brasil, segregadas de acordo com as Regiões: Sudeste – 343.095 (56,4%); Sul – 123.069 (20,2%); Nordeste – 78.686 (12,9%); Centro-Oeste – 35.116 (5,8%); e Norte – 28.248 (4,7%) que foram comunicadas ao Sistema Nacional de Atendimento Médico (SINAM), informadas ao Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM) e registradas no Sistema de Controle de Exames Laboratoriais da Rede Nacional de Contagem de Linfócitos CD4+/CD8+ e Carga Viral e o Sistema de Controle Logístico de Medicamentos (SISCEL/SICLOM) (**Figura 8**) (BRASIL, 2011).

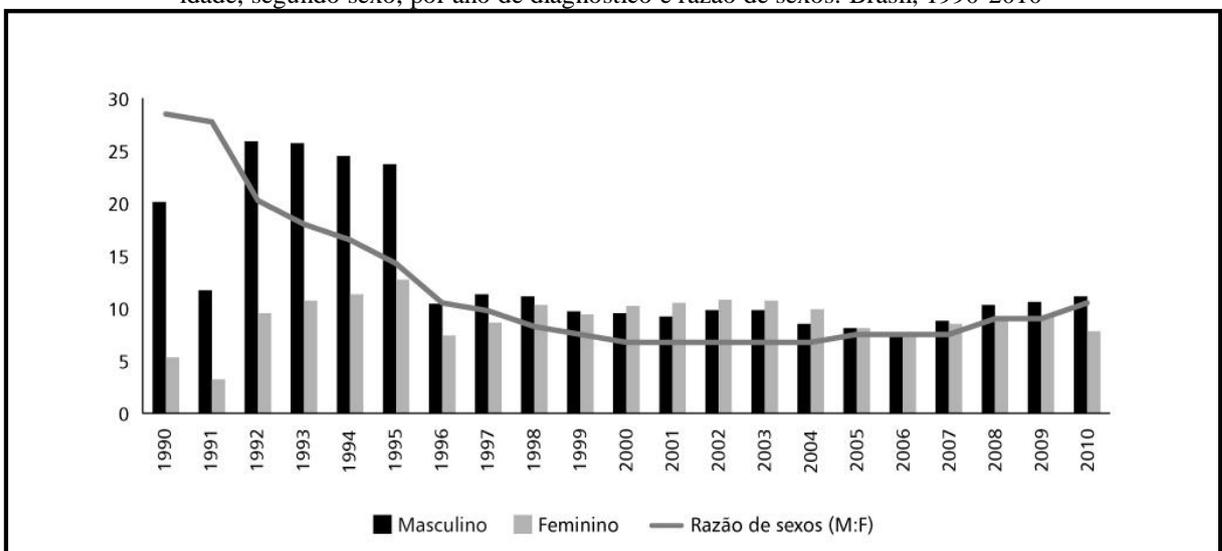
Figura 8 - Coeficiente de incidência de AIDS (por 100 mil habitantes), segundo a região de residência e ano de diagnóstico – Brasil, de 1998 a 2010



Fonte: SVS/MS

De acordo com o Boletim Epidemiológico 2012, observou-se uma tendência aumentada na prevalência da infecção pelo HIV em jovens. A prevalência na população em 2002 era de 0,09%, e passou para 0,12% em 2007. Em 2010, a taxa de incidência para as mulheres entre 15 e 24 anos foi de 1,6 casos de AIDS para cada 100 mil habitantes (**Figura 9**).

Figura 9 - Taxa de incidência (por grupo de 100 mil habitantes) dos casos de AIDS em jovens de 15 a 24 anos de idade, segundo sexo, por ano de diagnóstico e razão de sexos. Brasil, 1990-2010



Fonte: MS/SVS/Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais

Mulheres imunocompetentes apresentam uma frequência menor (2%-2,5%) de infecções múltiplas, do que mulheres HIV positivas que apresentam uma frequência maior (42%-52%), o que pode ser consequência de atividade sexual sem proteção e demais fatores de risco que essa população apresenta (LEVI *et al.*, 2004; LUQUE *et al.*, 2006).

1.2 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

As taxas de ISTs vem aumentando consideravelmente na população com faixa etária entre 15 e 25 anos. No entanto, ainda não está bem estabelecida a melhor forma de resolução dessas infecções, apesar de vários testes terem sido desenvolvidos, os quais visam novas oportunidades para o rastreio, a detecção precoce e a prevenção dessas infecções, assim como as suas complicações. Sabe-se que estudos de investigação utilizam esses testes, principalmente em relação à *Chlamydia trachomatis*, HSV-2 e o HPV, embora sua introdução na prática clínica ainda envolva questões complexas (GILSON; MINDEL, 2001).

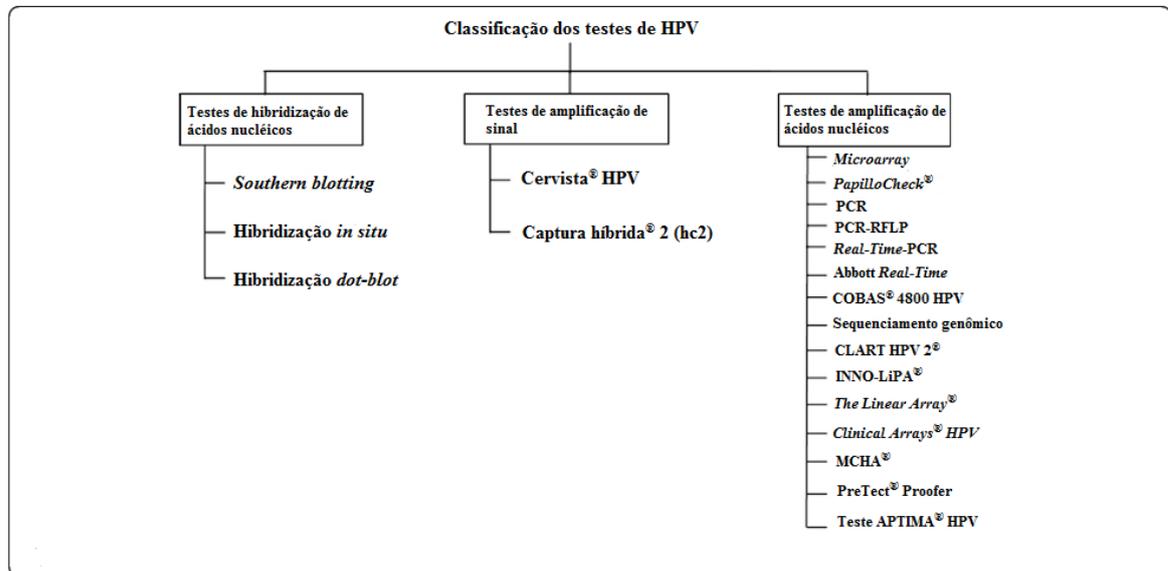
1.2.1 Papilomavírus humano

A vacina contra o HPV é uma ferramenta promissora no combate ao câncer do colo do útero. Em 2014, o MS implementará no Sistema Único de Saúde (SUS) a vacinação gratuita de meninas na faixa etária entre 9 e 13 anos, com a vacina tetravalente, que protege contra quatro principais tipos oncogênicos de HPV (6, 11, 16 e 18) (INCA, 2014). Esse advento traz uma perspectiva otimista na prevenção contra a infecção e consequentemente o câncer cervical; e com a melhoria no método citológico e definição do desempenho dos testes moleculares para a detecção da infecção, modificações nas recomendações de rastreio provavelmente ocorrerão ainda nos próximos tempos (MUÑOZ *et al.* 2004).

Dessa forma, para o diagnóstico da infecção por HPV o teste ideal deve detectar os múltiplos genótipos infectantes e a carga viral de cada tipo encontrado, com alta sensibilidade e especificidade (IFTNER; VILLA, 2003). Neste aspecto, há diversas metodologias para

identificação do HPV que podem ser utilizadas na rotina laboratorial (**Figura 10**) (ABREU *et al.*, 2012).

Figura 10 - Fluxograma da classificação dos testes de HPV



Fonte: Adaptado de Abreu *et al.*, 2012

1.2.1.1 Técnicas de hibridização de ácidos nucleicos

Inicialmente, as técnicas de *Southern blotting*, hibridização *in situ*, e hibridização *dot-blot* eram utilizadas para detectar a infecção por HPV em amostras cervicais. Embora os seus resultados gerem informação de alta qualidade, as desvantagens incluem a baixa sensibilidade, necessidade de grandes quantidades de DNA purificado, além de serem procedimentos demorados (VILLA; DENNY, 2006).

1.2.1.2 Técnicas de amplificação de sinal

O teste de HPV Digene®, que utiliza a tecnologia de Captura híbrida® 2 (hc2) e o teste para HPV de alto risco Cervista®, são os únicos métodos que atualmente tem a aprovação do

Food and Drug Administration (FDA) para diagnóstico nos EUA (HWANG; SHROYER, 2012).

O sistema de Captura híbrida[®] 2 (hc2, Digene Corp., USA) é um método de amplificação de sinal não radioativo baseado na hibridização do alvo, que é o DNA do HPV. Este sistema detecta dois grupos de HPV de acordo com a oncogenicidade, apresentando os resultados para infecção por HPV de alto risco, que detecta 13 genótipos (-16,-18,-31,-33,-35,-39,-45,-51,-52,-56,-58,-59 e -68) ou por HPV de baixo risco, capaz de detectar 5 genótipos (-6,-11,-42,-43, e -44). Apesar desse teste fazer uma distinção entre grupos de alto e baixo risco, o mesmo não é capaz de identificar o genótipo individualmente (HWANG; SHROYER, 2012).

O Cervista[®] (Hologic, Inc., Marlborough, MA, USA) determina a presença ou ausência do grupo de 14 HPVs de alto risco (-16,-18,-31,-33,-35,-39,-45,-51,-52,-56,-58,-59,-66 e -68). No entanto, não é capaz de identificar um grupo de HPV de baixo risco, tampouco identificar cada genótipo individualmente (HWANG; SHROYER, 2012).

1.2.1.3 Métodos de amplificação de ácidos nucleicos

Considerando a importância da identificação e genotipagem do HPV, uma variedade de métodos foram e estão sendo desenvolvidos para estes fins (ABREU *et al.*, 2012). Há disponibilidade de testes não comerciais utilizados principalmente em pesquisas aplicadas; e o testes comerciais, para fins de diagnóstico (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Métodos de amplificação de ácidos nucleicos para HPV

| Metodologias | Ácido nucleico | Aplicações |
|--|----------------|---|
| Não comerciais | | |
| <i>Microarray</i> | DNA | - Perfil de expressão gênica; - Análise de mutações; - Detecção e genotipagem de acordo com as sondas utilizadas; |
| Microplate colorimetric hybridization assay (MCHA) | DNA | - Genotipagem de 6 genótipos de alto risco; |
| <i>PCR</i> | DNA | - Detecção através de <i>primers consensus</i> ou específicos; |
| <i>PCR/RFLP</i> | DNA | - Genotipagem de acordo com os primers utilizados na amplificação e no padrão de digestão enzimática; |
| <i>Real-Time PCR</i> | DNA | - Detecção e genotipagem; |
| Sequenciamento genômico | DNA/RNA | - Detecção e/ou genotipagem; |
| Comerciais | | |

| | | |
|--|-----|---|
| <i>Abbott Real-Time PCR</i> | DNA | - Detecção de 14 tipos e genotipagem de 2 tipos; |
| <i>CLART[®] HPV 2</i> | DNA | - Identificação de 35 tipos; |
| <i>Clinical arrays[®] HPV</i> | DNA | - Genotipagem de 35 tipos; |
| <i>COBAS[®] 4800 HPV Test</i> | DNA | - Detecção de 14 tipos; |
| <i>INNO-LiPA</i> | DNA | - Genotipagem de 14 tipos; |
| <i>PapilloCheck[®]</i> | DNA | - Detecção e genotipagem de 24 tipos de HPV, o que inclui: 18 de alto risco e 6 de baixo risco; |
| <i>The APTIMA[®] HPV assay</i> | RNA | - Detecção de E6/E7 de 14 tipos; |
| <i>The Linear array[®]</i> | DNA | - Genotipagem de 36 tipos; |
| <i>The Prelect[®] HPV-Proofer</i> | RNA | - Detecção de E6/E7 de 5 tipos. |

REFERÊNCIAS

ABREU, A. L. P. et al. A review of methods for detect human Papillomavirus infection. **Virology Journal**, v. 9, n. 262, p. 2-9, 2012.

AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). **Cancer Facts & Figures 2013**. Atlanta: American Cancer Society, 2013.

ARAÚJO, R. S. et al. Prevalence and risk factors for Chlamydia trachomatis infection in adolescent females and young women in central Brazil. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 25, p. 397-400, 2006.

BANURA C. et al. Prevalence, incidence and clearance of human papillomavirus infection among young primiparous pregnant women in Kampala, Uganda. **International Journal of Cancer**, v. 123, p. 2180-2187, 2008.

BASEMAN, J. G.; KOUTSKY, L. A. The epidemiology of human papillomavirus infections. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, Suppl 1:S16-24, 2005.

BERNARD, H. U.; CALLEJA-MACIAS, I. E.; DUNN, S. T. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. **International Journal of Cancer**, v. 118, n. 5, p. 1071-1076, 2006.

BERNARD, H.-U. et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, v. 401, n. 1, 70-80, 2010.

BJØRGE, T. et al. Human papillomavirus infection as a risk factor for anal and perianal skin cancer in a prospective study. **British Journal of Cancer**, v. 87, n. 1, p. 61-64, 2002.

BOSCH, F. X.; DE SANJOSE, S. Chapter 1: human papillomavirus and cervical cancer - burden and assessment of causality. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**, v. 31, p. 3-13, 2003.

BOUSARGHIN L. et al. Human Papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. **Journal of Virology**, v. 77, p. 3846-3850, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Saúde Brasil 2011: uma análise da situação de saúde. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise de Situação de Saúde. Brasília; 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. HIV: DST no Brasil. Brasília, 2014.

BRAVO, I. G.; DE SANJOSE, S.; GOTTSCHLING, M. The clinical importance of understanding the evolution of papillomaviruses. **Trends in Microbiology**, v. 18, n. 10, p. 432-438, 2010.

BREWSTER, D. H.; BHATTI, L. A. Increasing incidence of squamous cell carcinoma of the anus in Scotland, 1975-2002. **British Journal of Cancer**, v. 95, p. 87-90, 2006.

BRUNI, L. et al. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. **Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 12, p. 1789-1799, 2010.

BURD, E. M. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 1, p. 1-17, 2003.

CASTLE, P. E.; GIULIANO, A. R. Chapter 4: genital tract infections, cervical inflammation, and antioxidant nutrients - assessing their roles as human papillomavirus cofactors. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**, v. 31, p. 29-34, 2003.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Incidence, Prevalence, and Cost of Sexually Transmitted Infections in the United States**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/std/stats/STI-Estimates-Fact-Sheet-Feb-2013.pdf>. Acesso em 13 dez. 2013.

CHANG, G. J. et al. Surgical treatment of high-grade anal squamous intraepithelial lesions. **Diseases of the Colon & Rectum**, v. 45, n. 4, p. 453-59, 2002.

CHEN, X. S. et al. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. **Molecular Cell**, v. 3, p. 557-567, 2000.

CLARKE, B.; CHETTY, R. Postmodern cancer: the role of human immunodeficiency virus in uterine cervical cancer. **Molecular Pathology**, v. 55, p. 19-24, 2002.

CODES, J. S. et al. Detecção de doenças sexualmente transmissíveis em clínica de planejamento familiar da rede pública no Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 24, n. 2, p. 101-106, 2002.

CULP, T. D.; CHRISTENSEN, N. D. Kinetics of in vitro adsorption and entry of papillomavirus virions. **Virology**, v. 319, n. 1, p. 152-161, 2004.

DA ROS, C. T.; SCHMITT CDA, S. Global epidemiology of sexually transmitted diseases. **Asian Journal of Andrology**, v. 10, n. 1, p. 110-114, 2008.

DAY, P. M.; LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. **Virology**, v. 307, n. 1, p. 1-11, 2003.

DAY, P. M. et al. Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 39, p. 14252-14257, 2004.

DECAUSSIN, G. et al. Expression of BARF-1 gene encoded by Epstein-Barr Virus in Nasopharyngeal carcinoma biopsies. **Cancer Research**, v. 60, p. 5584-5588, 2000.

DE OLIVEIRA, D. E., et al. Lack of Epstein-Barr virus infection in cervical carcinomas. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 123, p. 1098-1100, 1999.

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

DIDELOT-ROUSSEAU, M. N. et al. Human papillomavirus genotype distribution and cervical squamous intraepithelial lesions among high-risk women with and without HIV-1 infection in Burkina Faso. **British Journal of Cancer**, v. 95, p. 355-362, 2006.

DOORBAR J. The papillomavirus life cycle. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, n. 1, p. 7-15, 2005.

ESQUENAZI, D. et al. A frequência do HPV na mucosa oral normal de indivíduos sadios por meio da PCR. **Jornal Brasileiro de Otorrinolaringologia**, v.76, n. 1, p. 78-84, 2010.

FRANCO, E.; HARPER, D. M. Vaccination against papillomavirus infection: a new paradigm in cervical cancer control. **Vaccine**, v. 23, p. 2388-94, 2005.

FRAZER, I. H. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 1, p. 46-54, 2004.

GARCIA-ESPINOSA, B. et al. Genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with cervical lesions in Bioko, Equatorial Guinea. **Diagnostic Pathology**, v. 4, p. 31, 2009.

GERVAZ, P. et al. Squamous cell carcinoma of the anus: another sexually transmitted disease. **Swiss Medical Weekly**, v. 133, p. 353-359, 2003.

GIANNINI, S. L. et al. Aumento da imunidades humoral e celular B de memória com o uso de vacina HPV16/18 L1 VLP formulada com a combinação MPL/sal de alumínio (AS04) comparada com vacina apenas com sal de alumínio. **Vaccine**, 2006.

GILSON, R. J. C.; MINDEL, A. Sexually transmitted infections. **British Medical Journal**, v. 322, p. 1160–1164, 2001.

GOLIJOW, C. D. et al. Chlamydia trachomatis and Human papillomavirus infections in cervical disease in Argentine women. **Gynecology Oncology**, v. 96, n. 1, p. 181-186, 2005.

HAVERKOS, H. W. et al. Cigarette smoking and cervical cancer: part I: a meta-analysis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 57, p. 67-77, 2003.

HERNANDEZ, B. Y. et al. Anal human papillomavirus infection in women and its relationship with cervical infection. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 14, n. 11 Pt 1, p. 2550-2556, 2005.

HERNANDEZ, B. Y. et al. Cervical and anal human papillomavirus infection in adult women in American Samoa. **Asia Pacific Journal of Public Health**, v. 25, p. 1, 19-31, 2013.

HILDESHEIM, A. et al. HPV co-factors related to the development of cervical cancer: results from a population-based study in Costa Rica. **British Journal of Cancer**, v. 84, p. 1219-1226, 2001.

HWANG, S. J.; SHROYER, K. R. Biomarkers of cervical dysplasia and carcinoma. **Journal of Oncology**, p. 1-9, 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Ministério da Saúde Brasil. **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil**; 2014.

IFTNER, T.; VILLA, L. L. Chapter 12: Human papillomavirus technologies. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**, v. 31, n. 80-88, 2003.

JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. **CA: A Cancer Journal of Clinicians**, v. 61, n. 2, p. 69-90, 2011.

JOHNSON, L. G. et al. Anal cancer incidence and survival: the surveillance, epidemiology, and end results experience, 1973-2000. **Cancer**, v. 101, p. 281-288, 2004.

KJAER, H. O. et al. Recurrence of urogenital Chlamydia trachomatis infection evaluated by mailed samples obtained at home: 24 weeks prospective follow-up study. **Sexually Transmitted Infections**, v. 76, p. 169-172, 2000.

KISSELJOV, F. L. Virus-associated human tumors: cervical carcinomas and papilloma viruses. **Biochemistry**, v. 65, n. 1, p. 68-77, 2000.

KUPER, H.; BOFFETTA, P.; ADAMI, H. O. Tobacco use and cancer causation: association by tumour type. **Journal of Internal Medicine**, v. 252, p. 206-224, 2002.

LEVI, J. E. et al. Presence of multiple human papillomavirus types in cervical samples from HIV-infected women. **Gynecologic Oncology**, v. 92, n. 1, p. 225-231, 2004.

LISSOUBA, P.; VAN DE PERRE, P.; AUVERT, B. Association of genital human papillomavirus infection with HIV acquisition: a systematic review and meta-analysis. **Sexually Transmitted Infections**, v. 89, n. 5, p. 350-356, 2013.

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**, v. 194, p. 428-434, 2006.

MANZIONE, C.R.; NADAL, S.R.; CALORE, E.E. Oncogenicidade do Papilomavírus Humano e o grau de neoplasia intraepitelial anal em doentes HIV positivo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 50, n. 3, p. 282-285, 2004.

MARAIS, D. J. et al. Cervical and oral human papillomavirus types in HIV-1 positive and negative women with cervical disease in South Africa. **Journal of Medical Virology**, v. 80, p. 953-959, 2008.

MARCOLINO, L. D. et al. Coinfecção de *Chlamydia trachomatis* e HPV em mulheres com condiloma acuminado. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 20, n. 2, p. 87-92, 2008.

MATSUOKA, S. et al. Modulation of HIV-1 infectivity and cyclophilin A-dependence by Gag sequence and target cell type. **Retrovirology**, p. 6-21, 2009.

MBULAITEYE, S. M. et al. Immune deficiency and risk for malignancy among persons with AIDS. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome**, v. 32, p. 527-533, 2003.

MCPHILLIPS, M. G.; OZATO, K.; MCBRIDE, A. A. Interaction of Bovine Papillomavirus E2 Protein with Brd4 Stabilizes Its Association with Chromatin. **Journal of Virology**, v. 79, p. 8920-8932, 2005.

MILLER, L. E. **Laboratory Diagnosis of HIV Infection**. In: STEVENS, C.D. Clinical immunology and serology: a laboratory perspective. Philadelphia: F.A. Davis Company, 2010. 476 p. 3. ed.

MIRANDA, A. E. et al. Prevalence and Risk Behaviors for Chlamydial Infection in a Population-Based Study of Female Adolescents in Brazil. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 31, n. 9, p. 542-546, 2004.

MODIS, Y.; TRUS, L. B.; HARRISON, S. T. Atomic model of the papillomavirus capsid. **The European Molecular Biology Organization Journal**, v. 21, p. 4754-4762, 2002.

MOSCICKI, A.-B. et al. Persistence of Human Papillomavirus Infection in HIV-Infected and -Uninfected Adolescent Girls: Risk Factors and Differences, by Phylogenetic Type. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 190, p. 37-45, 2004.

MOSCICKI, A.-B. et al. Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. **Vaccine**, v. 24, p. 42-51, 2006.

MOUGIN, C. et al. Epidémiologie des infections cervicales à papillomavirus. Recent Knowledge. **La Presse Médicale**, v. 30, n. 20, p. 1017-1023, 2001.

MUÑOZ, N. et al. International Agency for Research on Cancer. Multicentric Cervical Cancer Study Group. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case control study. **The Lancet**, v. 359, p. 1093-1101, 2002.

MUÑOZ, 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**, v. 190, n. 12, p. 2077-2087, 2004.

NADAL, S.R. et al. Sistematização do atendimento dos portadores de infecção perianal pelo Papilomavírus Humano (HPV). **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 24, n. 4, p. 322-328, 2004.

NAHER, H. et al. Subclinical Epstein- Barr virus infection of both the male and female genital tract: Indication for sexual transmission. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 98, p. 791-793, 1992.

NAVARRO, C. et al. Risk factors for genital chlamydial infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 3, p. 195-207, 2002.

NG'ANDWE, C. et al. The distribution of sexually-transmitted Human Papillomaviruses in HIV positive and negative patients in Zambia, Africa. **BMC Infectious Diseases**, v. 7, p. 77, 2007.

NG'AYO, M. O. et al. Epidemiology of human papillomavirus infection among fishermen along Lake Victoria Shore in the Kisumu District, Kenya. **Sexually Transmitted Infections**, v. 84, p. 62-66, 2008.

NICHOLS, W. et al. **Epstein-Barr virus as a Potential Biomarker for Cervical Dysplasia**. In (Abstract) 27th International Papillomavirus Conference, Clinical Workshop. Berlin, Germany, p. 14-15, 2011.

OMS. **Guías para el tratamiento de las infecciones de transmisión sexual**. OMS, 2005. Disponível em: http://www.who.int/hiv/pub/sti/STIguidelines2003_es.pdf. Acesso em 26 jan. 2014.

PALEFSKY, J. M. Prevalence and risk factors for anal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and high-risk HIV-negative women. **Journal of Infectious Diseases**, v. 183, n. 3, p. 383-391, 2001.

PALEFSKY J. Human Papillomavirus Infection in HIV-infected persons. **Topics in HIV medicine: a publication of the International AIDS Society, USA**, v. 15, n. 4, p. 130-133, 2007.

PALEFSKY, J. M.; RUBIN, M. The epidemiology of anal human papillomavirus and related neoplasia. **Obstetrics & Gynecology Clinics of North America**, v. 36, n. 1, p. 187-200, 2009.

PARKIN, D. M.; BRAY, F. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. **Vaccine**, v. 24, n. 3, p. S3/11-S3/25, 2006.

PIROTTA, M. et al. The psychosocial burden of human papillomavirus related disease and screening interventions. **Sexually Transmitted Infections**, v. 85, p. 508–13, 2009.

RICKINSON, A. B.; KIEFF, E. **Epstein-Barr Virus**. In Fields Virology. 4th edition. Edited by Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, ROIZMAN B, STRAUSS SE. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; p. 2575-2627, 2001.

ROMANI, B; ENGELBRECHT, S. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr: functions and molecular interactions. **Journal of General Virology**, v. 90, p. 1795-1805, 2009.

ROWHANI-RAHBAR, A. et al. The impact of HIV status and type on the clearance of human papillomavirus infection among Senegalese women. **Journal of Infectious Diseases**, v. 196, p. 887-894, 2007.

ROSA, M. I. et al. Accuracy of telomerase in cervical lesions: a systematic review. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 17, p. 1205-1214, 2007.

ROUSSEAU, M. C. et al. Predictors of cervical coinfection with multiple human papillomavirus types. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 12, p. 1029-1037, 2003.

SAFAEIAN, M. et al. Determinants of incidence and clearance of high-risk human papillomavirus infections in rural Rakai, Uganda. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 17, p. 1300-1307, 2008.

SAMOFF, E. et al. Association of Chlamydia trachomatis with persistence of high-risk types of human papillomavirus in a cohort of female adolescents. **American Journal of Epidemiology**, v. 162, n. 7, p. 668-675, 2005.

SANCLEMENTE, G.; GILL, D. K. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 16, p. 231-240, 2002.

SANTOS N. S. O., ROMANOS M. T. V., WIGG M. D. **Introdução a Virologia Humana**. 2ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, págs. 415, 417, 419-425, 427-428, 437-438.

SASAGAWA, T. et al. Epstein-Barr virus (EBV) genes expression in cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer: a comparative study with human papillomavirus (HPV) infection. **Human Pathology**, v. 31, p. 318-326, 2000.

SCHIFFMAN, M. H. Recent progress in defining the epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. **Journal of National Cancer Institute**, v. 84, n. 6, p. 394-398, 1992.

SELINKA, H.-C.; GIROGLOU, T.; SAPP, M. Analysis of the Infectious Entry Pathway of Human Papillomavirus Type 33 Pseudovirions. **Virology**, v. 299, n. 2, p. 279-287, 2002.

SILVA, A. M. T.; AMARAL, M. V. T.; CRUZ, A. D. HPV e Câncer: O papel do papiloma vírus humano na carcinogênese. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 29, p. 48-54, 2003.

SIXBEY, J. W.; LEMON, S. M.; PAGANO, J. S. A second site for Epstein-Barr virus shedding: the uterine cervix. **The Lancet**, v. 2, n. 8516, p. 1122-1124, 1986.

SMITH, J. S. Evidence for *Chlamydia trachomatis* as an HPV cofactor in the etiology of cervical cancer in Brazil and the Philippines. **Journal of Infectious Diseases**, v. 185, p. 324-331, 2002.

SMITH, J. S. et al. Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review. **The Lancet**, v. 361, p. 1159-1167, 2003.

SMITH, J. S. et al. *Chlamydia trachomatis* and invasive cervical cancer: a pooled analysis of the IARC multicentric case-control study. **International Journal of Cancer**, v. 111, n. 3, p. 431-9, 2004.

SMITH, J. S. et al. Age-specific prevalence of human papillomavirus infection in males: a global review. **Journal of Adolescent Health**, v. 48, p. 540-552, 2011.

SOBHANI, I. et al. Prevalence of high-grade dysplasia and cancer in the anal canal in human papillomavirus-infected individuals. **Gastroenterology**, v. 120, n. 4, p. 857-866, 2001.

STANLEY, M. A. et al. HPV infection, anal intra-epithelial neoplasia (AIN) and anal cancer: current issues. **BMC Cancer**, v. 12, n. 1, p. 398, 2012.

STRICKLER, H. D. et al. Natural history and possible reactivation of human papillomavirus in human immunodeficiency virus-positive women. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 97, p. 577-586, 2005.

TRIMBLE, C. L. et al. Active and passive cigarette smoking and the risk of cervical neoplasia. **Obstetrics & Gynecology**, v. 105, p. 174-181, 2005.

URONIS, H.E.; BENDELL, J.C. Anal cancer: an overview. **The Oncologist**, v. 12, n. 5, p. 524-534, 2007.

VELDHUIJZEN, N. J. et al. Factors affecting transmission of mucosal human papillomavirus. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 10, p. 862-74, 2010.

VEO, C. A. et al. Study on the prevalence of human papillomavirus in the anal canal of women with cervical intraepithelial neoplasia grade III. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 140, n. 1, p. 103-107, 2008.

VILLA, L. L. Human papillomaviruses and cervical cancer. **Advances in Cancer Research**, v. 71, p. 321-341, 1997.

VILLA, L. L.; DENNY, L. Methods for detection of HPV infection and its clinical utility. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 94, p. 71-80, 2006.

WEINBERG, E., et al. Uterine cervical lymphoepithelial-like carcinoma: absence of Epstein-Barr virus genomes. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 99, p. 195-199, 1993.

WHO. Global strategy for intervention and control of sexually transmitted infections: 2006-2015. Geneva: World Health Organization; 2007.

WILSON, V. G. et al. Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. **Virus Genes**, v. 24, p. 275-290, 2002a.

WHO. **Sexually Transmitted and Other reproductive tract infections. A guide to essential practice.** 2005.

WHO. **Core Epidemiological slides HIV/AIDS estimates**, 2013.

WHO-ICO. **Human papillomavirus and related cancers: summary report update.** Barcelona: Information Centre on HPV and Cervical Cancer, 2010.

WOODHALL, S. et al. Estimation of the impact of genital warts on health-related quality of life. **Sexually Transmitted Infections**, v. 84, p. 161-166, 2008.

WOODMAN, C. B.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 1, p. 11-22, 2007.

WU, M.T. et al. Lifetime exposure to environmental tobacco smoke and cervical intraepithelial neoplasms among nonsmoking Taiwanese women. **Archives of Environmental Health**, v. 58, p. 353-359, 2003.

YAMADA, R. et al. Human papillomavirus infection and cervical abnormalities in Nairobi, Kenya, an area with a high prevalence of human immunodeficiency virus infection. **Journal of Medical Virology**, v. 80, p. 847-855, 2008.

YOU, J. et al. Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. **Cell**, v. 117, p. 349-360, 2004.

ZUR HAUSEN, A. et al. Unique transcription pattern of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-carrying gastric adenocarcinoma: expression of the transforming BARTF-1 gene. **Cancer Research**, v. 60, p. 2745-2748, 2000.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o genótipo do Papilomavírus humano presente em amostras cervicais e anais, levando em consideração a infecção por *Chlamydia trachomatis*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a frequência de HPV em mulheres infetadas pelo HIV;
- Determinar o genótipo do HPV nas amostras cervicais e anais;
- Identificar a presença de DNA de *Chlamydia trachomatis* nas amostras cervicais e anais;
- Correlacionar os dados clínicos e laboratoriais.

3 MANUSCRITO I

1. TÍTULO: Cofactors in anal human papillomavirus infection: Role of anal intercourse and human immunodeficiency virus infection among women.

2. AUTORES: Keilla Maria Paz e Silva, *MSc*; Deyse Soares do Carmo, *Ph.D.*; Mariléa de Lima Guimarães, *MSc*; José Luiz de Lima Filho, *Ph.D.*; Vera Magalhães da Silveira, *Ph.D.*; Romualda Castro do Rêgo Barros, *Ph.D.*; Danyelly Brunaska Gondim Martins, *Ph.D.*

3. REVISTA: *Sexually Transmitted Diseases* (Fator de impacto: 2.594).



From: *Sexually Transmitted Diseases* std@ucsf.edu
Subject: A manuscript number has been assigned to Cofactors in anal human papillomavirus infection: Role of anal intercourse and human immunodeficiency virus infection among women.
Date: December 19, 2013 at 12:21 PM
To: Danyelly Martins bruneska@prospecmol.org

Dear Dr. Martins,

Your submission entitled "Cofactors in anal human papillomavirus infection: Role of anal intercourse and human immunodeficiency virus infection among women." has been assigned the following number: STD13-408.

You will be able to check on the progress of your submission by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <http://std.edmgr.com/>.

Thank you for submitting your work to *Sexually Transmitted Diseases*.

Kind regards,

Jeanne Moncada, MT
 Managing Editor
Sexually Transmitted Diseases

Sexually Transmitted Diseases

Cofactors in anal human papillomavirus infection: Role of anal intercourse and human immunodeficiency virus infection among women.

--Manuscript Draft--

| | |
|--|--|
| Manuscript Number: | STD13-408 |
| Full Title: | Cofactors in anal human papillomavirus infection: Role of anal intercourse and human immunodeficiency virus infection among women. |
| Article Type: | Original Study |
| Section/Category: | HIV/AIDS |
| Keywords: | Anal canal; Genital tract infections; Human papillomavirus; Human immunodeficiency virus; Sexual intercourse. |
| Corresponding Author: | Danyelly Martins, Ph.D. UFPE recife, pe BRAZIL |
| Corresponding Author Secondary Information: | |
| Corresponding Author's Institution: | UFPE |
| Corresponding Author's Secondary Institution: | |
| First Author: | Keilla Maria Paz e Silva, MSc |
| First Author Secondary Information: | |
| Order of Authors: | Keilla Maria Paz e Silva, MSc |
| | Deyse Soares do Carmo |
| | Mariléa de Lima Guimarães |
| | José Luiz de Lima Filho |
| | Vera Magalhães da Silveira |
| | Romualda Castro do Rêgo Barros |
| | Danyelly Martins, Ph.D. |
| Order of Authors Secondary Information: | |
| Suggested Reviewers: | Sonia Ramamoorthy, Ph.D. Departments of Surgery, University of California, 9500 Gilman Drive, San Diego, California, 92093-0068, USA/ Departments of Rebecca and John Moores Comprehensive Cancer Center, University of California, 9500 Gilman Drive, San Diego, California, 92093-0068 sramamoorthy@ucsd.edu |
| | Erna Milunka Kojic, MD Department of Medicine, Division of Infectious Diseases, Miriam Hospital, The Alpert Medical School of Brown University, Providence, RI ekojic@lifespan.org |
| | George Koliopoulos, Ph.D. Department of Obstetrics and Gynecology, Ioannina University Hospital, Ioannina, Greece georgekoliopoulos@yahoo.com |
| | Sajad Ahmad Salati, MBBS, MS, MRCS (Glasgow) Assistant Professor of Surgery College of Medicine, Qassim University, KSA docsajad@gmail.com |

*Cover letter



Title: Cofactors in anal human papillomavirus infection: Role of anal intercourse and human immunodeficiency virus infection among women.

Article type: Original study

Authors: Keilla Maria Paz e Silva, *MSc*, Deyse Soares do Carmo, *Ph.D.*, Mariléa de Lima Guimarães, *MSc*, José Luiz de Lima Filho, *Ph.D.*, Vera Magalhães da Silveira, *Ph.D.*, Romualda Castro do Rêgo Barros, *Ph.D.*, Danyelly Brunaska Gondim Martins, *Ph.D.*

Dear Editor,

The aim of this research was to identify risk factors for anal HPV infection and to determine the frequency of each HPV genotype in anal samples. HPV was detected in the anal canal of 83.6% of women and was associated with a history of anal intercourse ($p=0.0295$) and HIV infection ($p=0.0104$). HPV16 was the most frequent genotype in the HIV-positive and HIV-negative groups. These data show the importance of monitoring women for anal HPV infection, especially those who are HIV-positive. The journal in question is the most suitable for the publication of our data, due to the focus on key existing sexually transmitted diseases. Enable the reader to obtain updated data on the subject. The manuscript has not been previously published or submitted, all authors have read the manuscript and agreed with the content, follow all applicable ethical guidelines and received approval from the ethics committee for research development.

Conflict of interest and source of funding: The authors declare that they have no competing interests.

Corresponding author: Danyelly Bruneska Gondim Martins, Ph.D.

Av. Prof. Moraes Rego

1235 - Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, P.O. Box: 50670-901, Brazil.

Tel: +55 81 21268484

Fax: +55 81 21268485

E-mail address: bruneska@prospecmol.org

Reviewers:

-Name: Sonia Ramamoorthy

E-mail address: sramamoorthy@ucsd.edu

-Name: Erna Milunka Kojic

E-mail address: ekojic@lifespan.org

-Name: George Koliopoulos

E-mail address: georgekoliopoulos@yahoo.com

-Name: Sajad Ahmad Salati

E-mail address: docsajad@gmail.com

Thanks for your time and consideration with the manuscript.

Best regards,

Danyelly Bruneska.

24

25 **§Corresponding author:**

26 Av. Prof. Moraes Rego

27 1235 - Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, P.O. Box: 50670-901, Brazil.

28 Tel: +55 81 21268484

29 Fax: +55 81 21268485

30 E-mail address: bruneska@prospecmol.org

31

32 **Word count of summary: 29**33 **Word count of abstract: 227**34 **Word count of text: 3093**35 **Number of figures: 2**36 **Number of tables: 3**

37

38 **Conflict of interest and source of funding:** The authors declare that they have no
39 competing interests. The authors thanks to: CNPq (Conselho Nacional de
40 Desenvolvimento Científico e Tecnológico); FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência
41 e Tecnologia do Estado de Pernambuco) and CAPES (Coordenação de
42 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for financial support.

43

44

45 **Short Summary:** HIV alters the progression of anal HPV infection in women. HPV
46 vaccination may reduce the risk of anal cancer; at present, it is a significant comorbidity
47 in HIV/AIDS patients.

48 **ABSTRACT**

49 **Background:** Human papillomavirus (HPV) is a sexually transmitted agent that infects
50 the anogenital tract and is associated with the development of several cancers, including
51 anal cancer. The mechanism of infection differs in each woman according to particular
52 cofactors, such as human immunodeficiency virus (HIV)-associated
53 immunosuppression and exposure to tobacco. The aim of this research was to identify
54 risk factors for anal HPV infection and to determine the frequency of each HPV
55 genotype in anal samples.

56 **Methods:** This was a cross-sectional study of anal samples from 73 women, including
57 those from 38 HIV-positive patients. The presence of HPV was determined by
58 consensus polymerase chain reaction (PCR) analysis using GP05+/GP06+ and
59 MY09/MY11. HPV genotypes were determined by DNA microarray analysis.

60 **Results:** HPV was detected in the anal canal of 83.6% of women, 70.5% of whom were
61 aged 20–44 years. Anal HPV infection was associated with a history of anal intercourse
62 ($p=0.0295$) and HIV infection ($p=0.0104$). Multiple HPV infections were observed in
63 50.8% of cases, with HPV44/55 being the most common. However, HPV16 was the
64 most frequent genotype in the HIV-positive and HIV-negative groups, and HPV44/55
65 and HPV43 were the most common low-risk genotypes in these groups, respectively.

66 **Conclusions:** These data show the importance of monitoring women for anal HPV
67 infection, especially those who are HIV-positive.

68

69 **Keywords:** Anal canal; Genital tract infections; Human papillomavirus; Human
70 immunodeficiency virus; Sexual intercourse.

71 **INTRODUCTION**

72 Colorectal cancer, which includes cancer of the colon, rectum and anus, is the
73 second most common cancer in women. It has a global incidence of 571,000 cases
74 (9.4% of all cancer cases), and 288,000 women die from the disease each year. Cervical
75 cancer accounts for 8.8% of all cancers in women, and is the third most common cancer
76 in women worldwide, with over 530,000 new cases and 275,000 deaths reported each
77 year [1]. In Brazil, the incidence of new cases of colon and rectal cancer in women in
78 2012 was 15,960, corresponding to an estimated risk of 15.94 per 100,000 women [2].

79 The risk factors for developing squamous anal cell carcinoma (SACC) include
80 the presence of an infectious agent such as human papillomavirus (HPV), a history of
81 anogenital warts, a history of another anogenital cancer, a greater number of lifetime
82 sexual partners, anal intercourse, and cigarette smoking [3].

83 Women with cervical cancer or pre-cancer have a higher risk of developing anal
84 cancer [4], probably due to the biological similarity between cervical and anal tissue. In
85 the anal canal, the squamous epithelium meets the columnar epithelium of the rectum,
86 while in the cervix the squamous epithelium of the ectocervix meets the columnar
87 epithelium of the endocervix. HPV targets the transformation zones of both sites,
88 primarily because these sites provide a greater number of proliferative cells [3].

89 Human immunodeficiency virus (HIV)-positive women are more susceptible to
90 infection with oncogenic HPV genotypes and are more likely to develop anal
91 intraepithelial neoplasia (AIN) or cervical intraepithelial neoplasia (CIN) [5]. In
92 immunocompetent women, the incidence of anal cancer (when compared with cervical
93 cancer) has increased in recent decades [3], probably due to the lack of standardized
94 HPV diagnosis systems and methods of anal cancer prevention [6-8]. Indeed, there is an

95 association between high-risk HPV infection and anal cancer in HIV-positive and HIV-
96 negative women [9]. The aim of this study was to identify risk factors associated with
97 anal HPV infection and to determine the most frequent HPV genotypes in anal samples
98 of women, according to HIV status.

99

100 **MATERIALS AND METHODS**

101 **Patients and samples**

102 This cross-sectional study included 73 women aged 17–65 years, who attended
103 the Clinical Hospital of the Federal University of Pernambuco (UFPE) between
104 November 2010 and February 2013. Women who were pregnant, in their postpartum
105 period, or had autoimmune diseases were excluded. Anal samples were obtained with a
106 cytobrush during routine gynecologic inspection. Ethical approval was obtained from
107 the Research Ethics Committee of the Health Sciences Center (CEP/CCS/UFPE No.
108 281/10).

109 **Sample processing**

110 All samples were processed for DNA extraction using a commercial kit. Quality
111 control of the DNA extraction was achieved through β -globin amplification using the
112 forward primer 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3' and the reverse primer 5'-
113 CAACTTCATCCACGTTACC-3', which amplify a 268 base-pair region. The
114 polymerase chain reaction (PCR) conditions were as follows: initial denaturation for 10
115 min at 94°C followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 62°C
116 for 1 min, and extension at 72°C for 1 min. The final extension step was performed at
117 72°C for 7 min. Negative controls assays were performed with ultrapure water.

118 HPV identification and genotyping

119 HPV analysis was performed in 2 steps. The first step involved HPV
120 determination by consensus PCR analysis using GP05+/GP06+ [10] and MY09/MY11
121 [11]. The second step involved HPV genotyping using the PapilloCheck® (GreinerBio-
122 One, Frickenhausen, Germany) DNA microarray system. The PapilloCheck® kit was
123 used to genotype 24 strains of HPV, according to the manufacturer's instructions.

124 Statistical analysis

125 Median values are shown with interquartile ranges (IQRs). The Fischer's exact
126 test was used for all analyses. All *p*-values are 2-tailed, and $p \leq 0.05$ was considered
127 statistically significant. All analyses were performed using GraphPad Prism version
128 6.02 software.

129

130 RESULTS

131 A total of 73 patients were enrolled in this study; 83.6% were positive and
132 16.4% were negative for anal HPV infection (Table 1). Women infected with HPV had
133 a median age of 37 years (IQR, 31–45 years), with 70.5% of the population aged 20–44
134 years. There were 3.27% and 26.2% of women aged 10–19 years and ≥ 60 years,
135 respectively. In the HPV-negative group, the median age was 41.5 years (IQR, 34.5–
136 46.5 years), with 66.6% of women aged 20–44 years (33.3% were aged 45–60 years).
137 No HIV-negative women were aged 10–19 years or ≥ 60 years; this age profile differed
138 from that among HPV-positive women.

139 Sexual activity onset before 16 years of age was reported by 43 HPV-positive
140 and 8 HPV-negative women; the median age was 15.5 years in both groups (IQR, 13–
141 18 years). The HPV-positive group had a median of 3 lifetime sexual partners (IQR, 3–

142 11): 57.4% of patients had 1–3 partners, 32.8% had 4–8 partners, and 9.8% had ≥ 11
143 partners. Women with 1–3 children had an increased risk for anal HPV infection
144 (relative risk [RR] = 2.383; 95% confidence interval [CI], 0.3364–16.88), as did women
145 who had heterosexual partners (RR = 3.339; 95% CI, 0.4637–24.05), although the effect
146 was not statistically significant. Otherwise, anal intercourse was found to be the most
147 important risk factor for anal HPV infection ($p = 0.0295$), together with HIV infection
148 ($p = 0.0104$). A total of 60.6% of HPV-positive patients, of whom 40.9% were HIV-
149 positive, reported participating in anal intercourse; these values were 2.42-fold and
150 4.93-fold higher than those in the HPV-negative group, respectively. Despite previous
151 reports of the importance of smoking habits in HPV infection, no significance was
152 observed for this factor (smoking rates were 39.3% and 41.6% in HPV-positive and
153 HPV-negative women, respectively).

154 Lifetime exposure to HPV was shown to be important, with lifetime sexual
155 activity being related to the number of sexual partners. Among patients with anal HPV
156 infection, 35 reported 1–3 sexual partners. Their median duration of sexual activity was
157 23 years (IQR, 15.5–33 years), and 19 were HIV-positive (Fig. 1a). Twenty women
158 reported 4–8 partners; their median duration of sexual activity was 22 years (IQR, 18–
159 27.2 years), and 15 were HIV-positive. Only 6 patients reported 11 or more sexual
160 partners, and among these patients the median duration of sexual activity was 15 years
161 (IQR, 8.5–17 years), and 2 were HIV-positive. Among patients without anal HPV
162 infection, 8 reported 1–3 partners, and their duration of sexual activity was 26.5 years
163 (IQR, 19–30.5 years). Four HPV-negative women reported 4–8 partners, with a median
164 duration of sexual activity of 24.5 years (IQR, 15.2–29.7 years). Each group included 1
165 patient who was HIV-positive. These profiles differed according to the presence of

166 single or multiple HPV infections. Those with a single HPV infection had a median
167 20.5 years of sexual activity (IQR, 14–28.5 years), and 13 patients reported 1–3 partners
168 (Fig. 1b). Six patients reported 4–8 partners, with a median duration of sexual activity
169 of 22.2 years (IQR, 21–27 years). Only one patient reported more than 11 sexual
170 partners. In patients with multiple HPV infections, the median duration of sexual
171 activity was 22 years (IQR, 14–33.7 years), and 17 women reported 1–3 partners; the
172 median duration of sexual activity reduced to 21.2 years (IQR, 17.5–29.5 years) among
173 10 women with 4–8 partners. Four patients who reported 11 or more partners had
174 multiple HPV genotypes and a relatively low median duration of sexual activity (16.2
175 years; IQR, 15–17.2 years). The inverse relationship between the duration of sexual
176 activity and HPV infection risk is interesting: women with HPV infection reported a
177 shorter median duration of sexual activity than the non-infected group, and women with
178 multiple HPV infections reported a shorter median duration than women with a single
179 infection.

180 Table 2 shows the profiles of patients with single and multiple infections
181 according to anal HPV genotyping. Among 51 HPV-positive women, 50.8% had
182 multiple HPV genotypes and 32.8% had single HPV genotypes; and the median ages
183 were 35 years (IQR, 31–45 years) and 37 years (IQR, 32.5–43 years), respectively. Both
184 groups included patients younger than 20 years and older than 60 years. However, the
185 proportion of patients in the age range of 20–44 years was high: rates were 71% and
186 75% in those with multiple and single HPV infection, respectively. In those with
187 multiple HPV infections, 80.6% reported sexual activity onset before the age of 16
188 years, at a median age of 15.5 years (IQR, 13–18 years); this result was of borderline
189 statistical significance ($p = 0.0645$). This group also had a median of 3 lifetime sexual

190 partners (IQR, 3–11), including 54.8% of patients with 1–3 partners, 32.2% of patients
191 with 4–8 partners, and 12.9% of patients with 11 or more partners. A total of 41.9% of
192 women with multiple infections were smokers (this result was not statistically
193 significant). HIV infection was the only factor that was significantly related to multiple
194 anal HPV infections ($p = 0.0314$).

195 The distribution of HPV genotypes according to HIV status among 58 women is
196 shown in Fig. 2. In HIV-positive patients, the most common high-risk genotypes were
197 HPV16 (9.7%) and HPV51 (7.3%), while the most common low-risk genotypes were
198 HPV44/55 (15.8%) and HPV6 (12.2%). HPV16 was also the most frequent high-risk
199 genotype in HIV-negative patients (26.9%), while HPV43 was the most common low-
200 risk genotype observed in this group (11.5%). The most prevalent genotypes found in
201 patients with single and multiple infections were HPV16 (35%) and HPV44/55 (45.2%),
202 respectively.

203 Between 2 and 9 different HPV genotypes were detected in anal samples from
204 women with multiple HPV infection, with several combinations observed, including
205 high-risk and/or low-risk HPV combinations (Table 3). The most frequent combination
206 was HPV11/HPV44/55. Multiple HPV-infected HIV-negative patients were infected by
207 no more than 3 HPV genotypes, while HIV-positive patients had up to 9 HPV
208 genotypes: this could be a consequence of immunosuppression in the HIV-positive
209 patients. A total of 15 HIV-positive patients (60%) had 2 HPV genotypes, while only 1
210 patient had 9 HPV genotypes. In the HIV-negative group, 2 patients had 2 HPV
211 genotypes and 4 patients had 3 HPV genotypes. The unique combination present in both
212 groups of patients was HPV51/HPV53/HPV44/55.

213

214 DISCUSSION

215 HPV, the major etiological agent for anogenital cancer [12], is the most
216 important risk factor for SACC [13], and is found in 83–88% of anal cancers [1].
217 However, there is no global estimate for anal HPV infection.

218 Behaviors that predispose individuals to immunosuppression are also risk factors
219 for anogenital cancer [14]; this is most prominent for HIV-positive individuals, in
220 whom the prevalence of anal HPV infection is greater than cervical HPV infection [15].
221 The prevalence of anal HPV infection in high-risk groups and HIV-positive patients
222 varies from 42%–90% in women in the US [15-17]. This high level of infection was
223 also observed in our study, with a narrower degree of variation (from 41%–59%),
224 corroborating the suggestion that HPV infection is prevalent in this tissue [16]. In fact,
225 HIV-infected patients are more susceptible to HPV-related cancers [18], and 26% of
226 HIV-positive women have AIN [19]. The duration of infection is another important
227 factor; patients who have been infected with HIV for 15 years are 12 times more likely
228 to develop SACC than patients who have been infected for <5 years [20]. This
229 highlights the importance of early diagnosis.

230 Anal HPV infection is better documented in HIV-negative women than in HIV-
231 positive women [12]. A prevalence of anal HPV infection of 42% was observed in HIV-
232 negative women who participated in high-risk behaviors (commercial sex workers and
233 injection drug users) [15], and a prevalence of 45% was reported in women with
234 cervical lesion history [21]. These rates are similar to those in our study. The high
235 prevalence of anal HPV infection in the healthy population can be attributed to the fact
236 that anal HPV infection in heterosexual women progresses slowly [12]. This sort of
237 evolution was observed in a cohort study of Hawaiian women, in whom the anal HPV

238 infection prevalence increased from 27% to 70% after an average follow-up period of
239 1.3 years [7,22].

240 Studies performed in populations between the ages of 18 and 82 years show
241 different prevalence rates in HIV-negative patients, varying from 16% to 70% [7,21].
242 The prevalence among HIV-positive women has been reported to be 70.5%–90% [16-
243 17]. However, reports of the effects of age on anal HPV infection prevalence are
244 discordant. In HIV-negative patients, some authors have found the highest prevalence in
245 women younger than 30 years [7], in accordance with that for cervical HPV infection.
246 Nevertheless, other studies have reported the highest prevalence to be in women older
247 than 45 years [17,22]. We found the highest frequency of anal HPV infection in women
248 aged 20–44 years, which could be related to increased levels of sexual activity during
249 this period of life.

250 There is evidence that HPV can be transmitted to the genitals through non-
251 penetrative sexual contact [23]. This suggests the possibility of alternative routes of
252 transmission, including sexual and nonsexual means [7], which explains how HPV
253 infection can occur even with condom use. In the population in our study, it is clear that
254 there was a tendency for sexual activity to begin before the age of 16 years, which leads
255 to early contact with infectious agents, like HPV [8]. The borderline statistical
256 significance of this finding among HPV-positive patients indicates that a study
257 including a greater number of patients may be able to establish the significance of this
258 factor. If this proves to be true, it could be an important component of sexual education
259 programs and may prompt discussions about HPV vaccination in childhood.

260 Anal intercourse increases the risk of anal cancer in women younger than 30
261 years due to sexual exposure to HPV [19], including those negative for HIV infection

262 [24]. However, the highest incidence of SACC is in women aged >50 years [12]. In
263 2000, the National Survey of Sexual Attitudes and Lifestyles (NATSAL) reported an
264 11.6% prevalence of anal intercourse among women aged 16–44 years in Scotland [25].
265 The proportion of women reporting anal intercourse in our study was 5.22-times higher
266 than that in the Scottish study. The rate in our study was also higher than rates in similar
267 studies in the US, 1 of which reported a 22% prevalence in students aged <30 years
268 [26]. However, the median age in our study was approximately 37 years.

269 We found a high frequency of HPV infection in women with 1–3 sexual
270 partners, and rates decreased as the number of partners increased, even when taking into
271 account the duration of sexual activity. In our group, 56.6% were infected with more
272 than 1 HPV genotype, supporting the idea that men can act as vectors for HPV infection
273 [27], as has been previously suggested for cervical cancer.

274 Considering that the anal canal seems to play a role as a reservoir for HPV [15],
275 the association between an increased number of sexual partners and participation in anal
276 intercourse could be assumed to be associated with risk of HPV infection. In keeping
277 with this idea, we observed an increase in the frequency of multiple HPV infection in
278 women with a greater number of sexual partners, even for those with a relatively short
279 duration of sexual activity. This finding for anal infection conforms with that observed
280 for cervicovaginal HPV, for which a shorter interval between meeting a new partner and
281 engaging in sexual intercourse increases the risk for HPV infection in women [23].

282 Although our study did not find an association between tobacco use and anal
283 HPV infection, previous studies have established smoking as a risk factor for anal
284 cancer [7,28].

285 Once infected with HPV, 2 factors are important for anal cancer development:
286 HPV risk-type and HPV multiple infection [13]. Similar studies have found a high
287 prevalence of HPV16 genotype in HIV-negative patients [22]. In the US, a study has
288 shown HPV53 and HPV16 to be the most prevalent genotypes among HIV-positive
289 patients [17]. In another study involving Brazilian women, the most frequently detected
290 high-risk HPV types were HPV53, HPV18, and HPV16, while HPV61 and HPV6 were
291 the most common low-risk HPV genotypes [6]. Our findings show a different profile for
292 HPV infection: only 2 patients were infected with HPV18, although HPV16 remained
293 as the most frequent genotype in both groups. The risk of infection with a new genotype
294 in the anal canal seems to be increased in the presence of another HPV genotype, and
295 certain genotypes, such as HPV16, have a greater effect on the acquisition of new HPV
296 infections [22]. Only 1 study has reported the prevalence rates of HPV43, HPV44, and
297 HPV55 in women, and showed low frequencies in cervical samples [29] (they did not
298 report the results for anal infection). Therefore, our results seem to be the first to
299 demonstrate a high frequency of this genotype in anal canal samples of HIV-positive
300 women, together with HPV43 for HIV-negative women.

301 There are few studies of anal infection with multiple HPV genotypes, and
302 therefore our understanding of this pathology is limited. A cohort study performed in 3
303 different countries showed multiple anal canal infection rates between 17% and 46%
304 [7,18,21], with the rates varying from 44.6% to 79% in HIV-positive women [6,17].
305 These values are compatible with our data: 19.3% of HIV-negative women were
306 multiply infected with up to 3 HPV genotypes, and the rate increased to 80.6% in HIV-
307 positive women, who were infected with 2–9 HPV genotypes. Only 1 study of samples
308 of anal cancer has reported combinations of genotypes, such as HPV11/HPV16/HPV43

309 [13]. In fact, infection with multiple HPV genotypes is common among subjects with
310 anal cancer, but it remains unclear whether multiple infection is associated with a higher
311 risk of malignancy or a more rapid rate of progression [30]. The differences between
312 previous studies may be due to the methodology used for screening; the use of high-
313 sensitivity methods can increase the HPV detection rate and the rate of multiple
314 infections. There is a need for longitudinal studies to determine whether anal infection
315 with multiple HPV genotypes increases the incidence or progression of AIN in women.

316 In conclusion, we observed a high prevalence of anal HPV infection, suggesting
317 that anal HPV infection is common among healthy women. However, among HIV-
318 positive women, the high risk of HPV infection (most of which are multiple infections)
319 should be considered during the clinical evaluation of HIV-infected patients, given that
320 such patients have inherent immunosuppression. Further studies for HPV persistence in
321 these patients should be performed, to improve the treatment of patients with anal
322 lesions prior to cancer development. Although screening for AIN and the use of HPV
323 vaccination may reduce the risk of anal cancer, these neoplasms continue to be a
324 significant comorbidity in HIV/AIDS patients.

325

326

327

328

329

330

331 **REFERENCES**

332

- 333 1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and
334 Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10. Lyon, France: IARC, 2010.
335 <http://globocan.iarc.fr>. Accessed September 27, 2013.
- 336 2. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativas
337 2012: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2011: 38.
338 <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>. Accessed
339 October 15, 2013.
- 340 3. Palefsky JM, Rubin M. The epidemiology of anal human papillomavirus and
341 related neoplasia. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2009; 36: 187–200.
- 342 4. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2013*. Atlanta: American
343 Cancer Society; 2013.
- 344 5. De Sanjosé S, Palefsky J. Cervical and anal HPV infections in HIV positive
345 women and men. *Virus Res.* 2002; 89(2): 201–11.
- 346 6. Gonçalves MAG, Randi G, Arslan A, et al. HPV type infection in different
347 anogenital sites among HIV-positive Brazilian women. *Infect Agent Cancer.*
348 2008; 3: 5.
- 349 7. Hernandez BY, McDuffie K, Zhu X, et al. Anal human papillomavirus infection
350 in women and its relationship with cervical infection. *Cancer Epidemiol*
351 *Biomarkers Prev.* 2004; 14: 2550–6.
- 352 8. Véo CAR, Saad SS, Nicolau SM, et al. Study on the prevalence of human
353 papillomavirus in the anal canal of women with cervical intraepithelial neoplasia
354 grade III. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2008; 140(1): 103–7.

- 355 9. Sobhani I, Vuagnat A, Walker F, et al. Prevalence of high-grade dysplasia and
356 cancer in the anal canal in human papillomavirus-infected individuals.
357 *Gastroenterology* 2001; 120(4): 857–66.
- 358 10. De Roda Husman AM, Walboomers JMM, van den Brule AJC, et al. The use of
359 general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly
360 conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen
361 Virol.* 1995; 76(4): 1057–62.
- 362 11. Manos MM, Ting Y, Wright DK. Use of Polymerase Chain reaction
363 Amplification for the Detection of Genital Human Papillomaviruses. *Cancer
364 Cells.* 1989; 26(7): 209–14.
- 365 12. Stanley MA, Winder DM, Sterling JC, et al. HPV infection, anal intra-epithelial
366 neoplasia (AIN) and anal cancer: current issues. *BMC Cancer.* 2012; 12(1): 398.
- 367 13. Ramamoorthy S, Liu Y-T, Luo L, et al. Detection of multiple human
368 papillomavirus genotypes in anal carcinoma. *Infect Agent Cancer.* 2010; 5(1):
369 17.
- 370 14. Poggio JL. Premalignant lesions of the anal canal and squamous cell carcinoma
371 of the anal canal. *Clin Colon Rectal Surg.* 2011; 24(3): 177–92.
- 372 15. Palefsky JM, Holly EA, Ralston ML, et al. Prevalence and risk factors for anal
373 human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus (HIV)-
374 positive and high- risk HIV-negative women. *J Infect Dis.* 2001; 183: 383–91.
- 375 16. Hessol NA, Holly EA, Efird JT, et al. Anal intraepithelial neoplasia in a
376 multisite study of HIV-infected and high-risk HIV-uninfected women. *AIDS.*
377 2009; 23(1): 9–70.

- 378 17. Kojic EM, Cu-Uvin S, Conley L, et al. Human papillomavirus infection and
379 cytologic abnormalities of the anus and cervix among HIV-infected women in
380 the study to understand the natural history of HIV/AIDS in the era of effective
381 therapy (the SUN study). *Sex Transm Dis.* 2011; 38(4): 253–9.
- 382 18. Patel P, Hanson DL, Sullivan PS, et al. Incidence of types of cancer among
383 HIV-infected persons compared with the general population in the United States,
384 1992 – 2003. *Ann Intern Med* 2008; 148(10): 728-36.
- 385 19. Holly EA, Ralston ML, Darragh TM, et al. Prevalence and risk factors for anal
386 squamous intraepithelial lesions in women. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2001;
387 93(11): 843–9.
- 388 20. Crum-Cianflone NF, Hullsiek KH, Marconi VC, et al. Anal cancers among HIV-
389 infected persons: HAART is not slowing rising incidence. *AIDS.* 2010; 24(4):
390 535–43.
- 391 21. Valari O, Koliopoulos G, Karakitsos P, et al. Human papillomavirus DNA and
392 mRNA positivity of the anal canal in women with lower genital tract HPV
393 lesions: Predictors and clinical implications. *Gynecol Oncol.* 2011; 122(3): 505–
394 8.
- 395 22. Goodman MT, Shvetsov YB, McDuffie K, et al. Acquisition of anal human
396 papillomavirus (HPV) infection in women: the Hawaii HPV Cohort study. *J*
397 *Infect Dis.* 2008; 197: 957–66.
- 398 23. Winer RL, Lee S-K, Hughes JP, et al. Genital human papillomavirus infection:
399 incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J*
400 *Epidemiol.* 2003; 157(3): 218–26.

- 401 24. Salati SA, Al Kadi A. Anal cancer - A review. *Int J Health Sci* 2009; 6(2): 169–
402 190.
- 403 25. Brewster DH, Bhatti LA. Increasing incidence of squamous cell carcinoma of
404 the anus in Scotland, 1975–2002. *Br J Cancer*. 2006; 95: 87–90.
- 405 26. Baldwin JI, Baldwin JD. Heterosexual anal intercourse: an understudied, high-
406 risk sexual behavior. *Arch Sex Behav*. 2000; 29(4): 357–73.
- 407 27. Bruland O, Fluge O, Immervoll H, et al. Gene expression reveals two distinct
408 groups of anal carcinomas with clinical implications. *Br J Cancer*. 2008; 98:
409 1264–73.
- 410 28. Daling JR, Sherman KJ, Hislop TG, et al. Cigarette smoking and the risk of
411 anogenital cancer. *Am J Epidemiol*. 1992; 135(2): 180–9.
- 412 29. Garbuglia AR, Piselli P, Lapa D, et al. Frequency and multiplicity of human
413 papillomavirus infection in HIV-1 positive women in Italy. *J Clin Virol*. 2012;
414 54(2): 141–6.
- 415 30. Palefsky JM, Holly EA, Gonzales J, et al. Detection of human papillomavirus
416 DNA in anal intraepithelial neoplasia and anal cancer. *Cancer Res*. 1991; 51:
417 1014–9.
- 418
- 419

420 **Figures**

421 **Figure 1.** Relationship between number of lifetime sexual partners and period of sexual
422 activity in years, according to anal human papillomavirus (HPV) identification (a) and anal
423 HPV infection type (b).

424 **Figure 2.** Human papillomavirus (HPV) genotype distribution in 58 anal samples,
425 according to human immunodeficiency virus (HIV) status. Black bars, HIV-positive
426 patients; gray bars, HIV-negative patients. status. Black bars, HIV-positive patients; gray
427 bars, HIV-negative patients.

Figure1a
[Click here to download high resolution image](#)

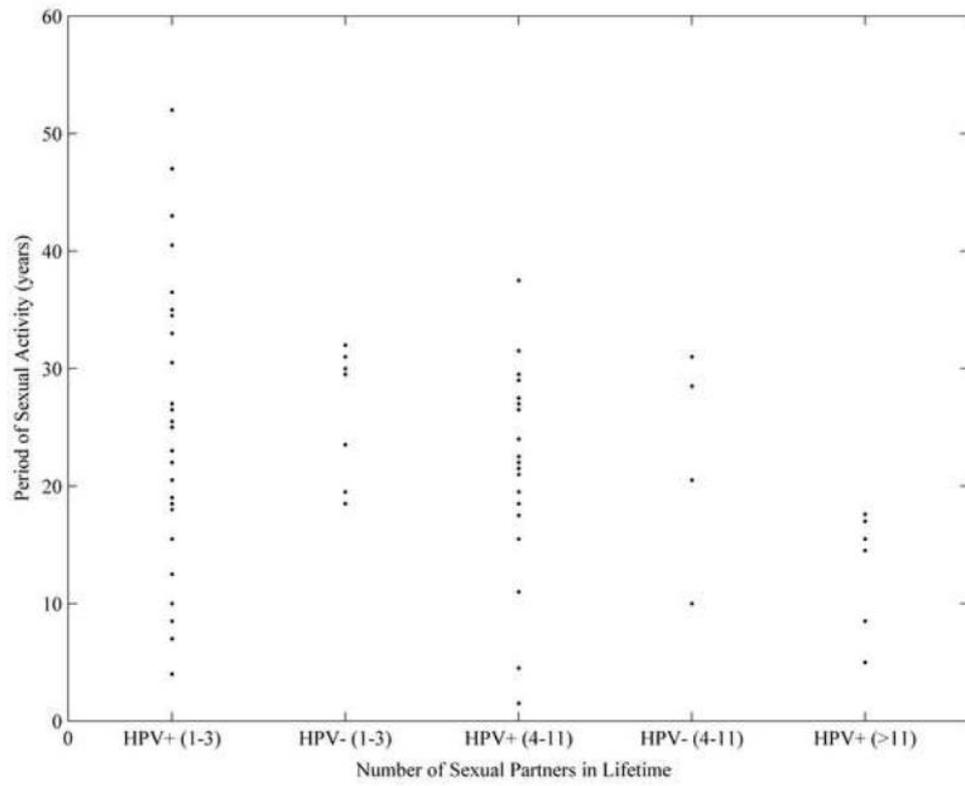


Figure1b

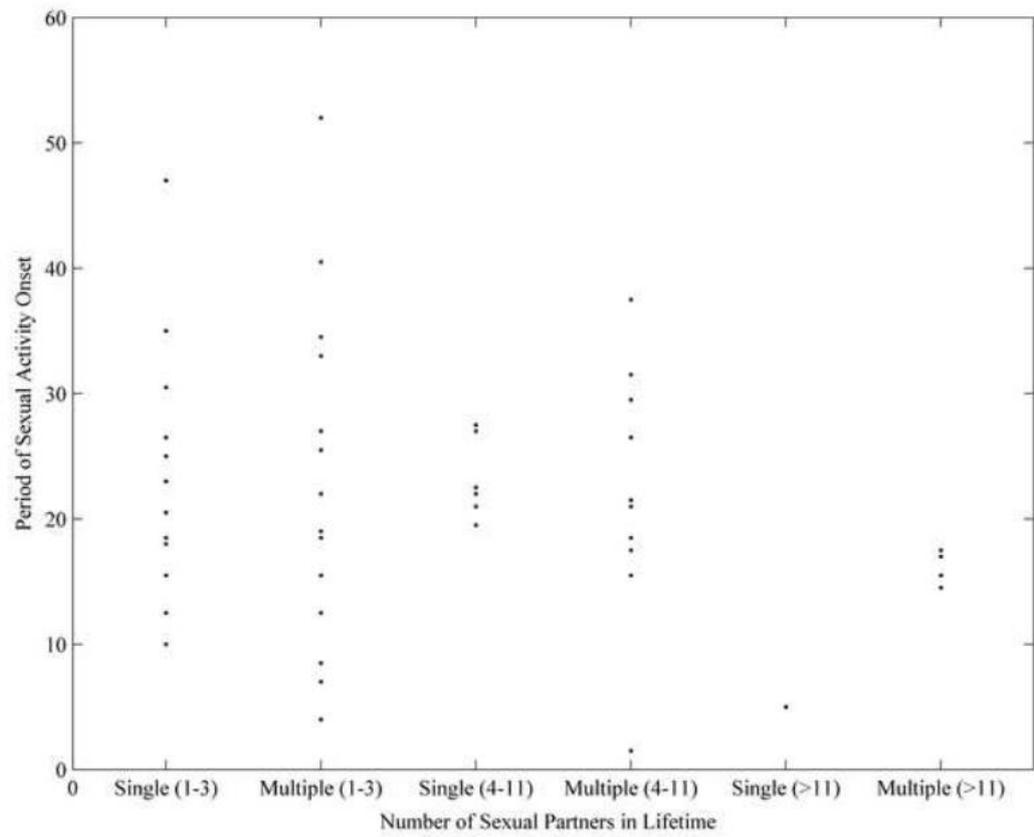
[Click here to download high resolution image](#)

Figure2
[Click here to download high resolution image](#)

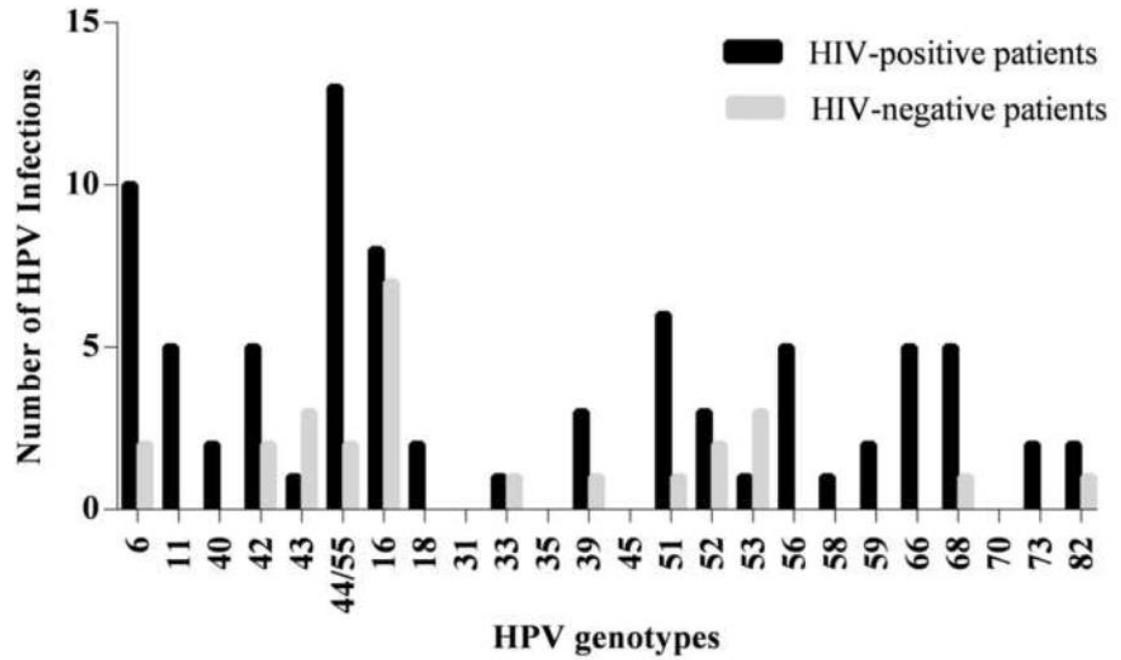
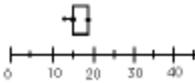
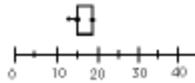


Table 1: Clinical and behavioral data from 73 women according to HPV status in the anal canal. Median data are presented in graphical form.

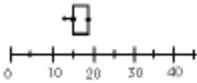
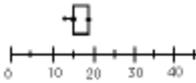
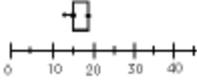
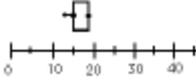
| Characteristic | Anal HPV identification | | |
|---------------------------------------|---|---|-----------------|
| | Negative | Positive | <i>p</i> -value |
| Patients | 12 | 61 | - |
| Age (years) | | | |
| 10–19 | 0 | 2 | - |
| 20–44 | 8 | 43 | 0.7452 |
| 45–60 | 4 | 13 | 0.4564 |
| ≥60 | 0 | 3 | - |
| Median (IQR) |  |  | |
| Age of sexual activity onset | | | |
| Before 16 years | 8 | 43 | 0.7452 |
| After 16 years | 4 | 18 | - |
| Median (IQR) |  |  | |
| Number of sexual partners in lifetime | | | |
| 1–3 | 8 | 35 | 0.7502 |
| 4–11 | 4 | 20 | |
| 11 or more | 0 | 6 | 0.5806 |
| Median (IQR) |  |  | |
| Number of children | | | |

| | | | |
|---------------------------------|----|----|---------|
| 1–3 | 11 | 49 | 0.6801 |
| 4 or more | 1 | 12 | - |
| Sexual partners reported | | | |
| Heterosexual | 11 | 45 | 0.2725 |
| Bisexual | 0 | 3 | - |
| Unknown | 1 | 13 | 0.4403 |
| Anal intercourse | 3 | 37 | 0.0295* |
| HIV infection | 2 | 36 | 0.0104* |
| Smoking | 5 | 24 | - |

*Statistically significant using the Fischer's exact test.

HPV, human papillomavirus; HIV, human immunodeficiency virus; IQR, inter-quartile range.

Table 2: Clinical and behavioral data from 73 women according to the type of HPV infection in the anal canal. Median data are presented in graphical form.

| Characteristic | Anal HPV genotyping | | p-value |
|---------------------------------------|---|---|---------|
| | Single infection | Multiple infection | |
| Patients | 20 | 31 | - |
| Age (years) | | | |
| 10–19 | 1 | 1 | - |
| 20–44 | 15 | 22 | - |
| 45–60 | 3 | 7 | 0.7208 |
| ≥60 | 1 | 1 | - |
| Median (IQR) |  |  | |
| Age of sexual activity onset | | | |
| Before 16 years | 11 | 25 | 0.0645 |
| After 16 years | 9 | 6 | - |
| Median (IQR) |  |  | |
| Number of sexual partners in lifetime | | | |
| 1–3 | 13 | 17 | 0.5659 |
| 4–11 | 6 | 10 | - |
| 11 or more | 1 | 4 | 0.6364 |
| Median (IQR) |  |  | |

| | | | |
|---------------------------|----|----|---------|
| Number of children | | | |
| 1–3 | 16 | 16 | 0.0737 |
| 4 or more | 4 | 15 | - |
| Anal intercourse | 11 | 21 | 0.3892 |
| HIV infection | 10 | 25 | 0.0314* |
| Smoking | 8 | 13 | - |

*Statistically significant using the Fischer's exact test.

HPV, human papillomavirus; HIV, human immunodeficiency virus; IQR, inter-quartile range.

Table 3: HPV genotype distribution in 58 women with multiple infections in anal samples, according to HIV status.

| Multiple HPV genotypes | HIV- positive | HIV- negative |
|---|------------------|------------------|
| <i>2 HPV genotypes</i> | | |
| (11, 44/55) | 4 | - |
| (56, 73) or (51, 66) or (56, 66) or (52, 68) or (06, 44/55) or (06, 42) or (52, 42) or (16, 44/55) or (56, 44/55) or (68, 42) or (59, 06) (16, 68) or (39, 43) | 1 | - |
| | - | 1 |
| <i>3 HPV genotypes</i> | | |
| (16, 56, 43) or (68, 73, 6) or (52, 58, 44/55) | 1 | - |
| (16, 82, 44/55) or (52, 06, 42) or (52, 42, 43) | - | 1 |
| (51, 53, 44/55) | 1 | 1 |
| <i>4 HPV genotypes</i> | | |
| (16, 56, 51, 66) or (51, 39, 82, 44/55) or (16, 68, 06, 42) or (51, 66, 06, 44/55) | 1 | - |
| <i>5 HPV genotypes</i> | | |
| (16, 33, 39, 40, 42) | 1 | - |
| <i>9 HPV genotypes</i> | | |
| (16, 18, 51, 39, 68, 82, 11, 40, 44/55) | 1 | - |

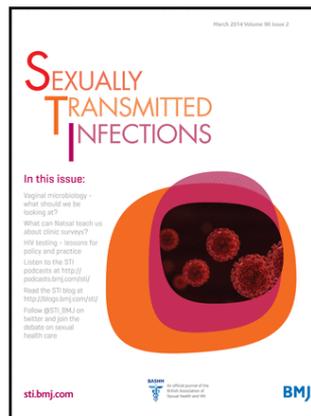
HPV, human papillomavirus; HIV, human immunodeficiency virus.

4 MANUSCRITO II

1. TÍTULO: Human papillomavirus infection among women HIV-positive with normal colposcopy/anoscopy findings.

2. AUTORES: Keilla Maria Paz e Silva, *MSc*; Deyse Soares do Carmo, *Ph.D.*; Mariléa de Lima Guimarães, *MSc*; José Luiz de Lima Filho, *Ph.D.*; Vera Magalhães da Silveira, *Ph.D.*; Romualda Castro do Rêgo Barros, *Ph.D.*; Danyelly Brunaska Gondim Martins, *Ph.D.*

3. REVISTA: *Sexually transmitted infections* (Fator de impacto: 2.611).



**Human papillomavirus infection among women HIV-positive with normal
colposcopy/anoscopy findings**

Keilla Maria Paz e Silva, *MSc*¹ Deyse Soares do Carmo, *Ph.D.*^{2,4} Carlos Henrique Madeiros
Castelletti, *Ph.D.*¹ Mariléa de Lima Guimarães, *MSc*^{2,6} José Luiz de Lima Filho, *Ph.D.*^{1,3} Vera
Magalhães da Silveira, *Ph.D.*^{2,4} Romualda Castro do Rêgo Barros, *Ph.D.*^{2,5} Danyelly
Bruneska Gondim Martins, *Ph.D.*^{1,3§}

¹Molecular Prospection and Bioinformatics Group, Keizo Asami Immunopathology Laboratory (LIKA), Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife - Brazil;

²Clinical Hospital (HC), Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife - Brazil;

³Department of Biochemistry, Biological Science Center, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife - Brazil;

⁴Department of Tropical Medicine, Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife - Brazil;

⁵Department of Maternal and Child Health, Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife - Brazil;

⁶Department of Pathology, Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife - Brazil.

Keilla Maria Paz e Silva

§Corresponding author:

Av. Prof. Moraes Rego

1235 – Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, P.O. Box: 50670-901, Brazil.

Tel: +55 81 21268484

Fax: +55 81 21268485

E-mail address: bruneska@prospecmol.org

Keywords: Anal canal; Genital tract infections; Human papillomavirus; Human immunodeficiency virus.

Word Count: 2040

ABSTRACT

Background: The human papillomavirus (HPV) and human immunodeficiency virus (HIV) are responsible for a fair amount of illnesses. The interactions between these infections represent a challenge for the field of public health. HPV is associated with 99.7% of cases of cervical cancer, is also considered in the pathogenesis of other anogenital malignancies.

Methods: We performed a cross-sectional study of women attending in the Clinical Hospital of the Federal University of Pernambuco (UFPE). Participants completed a questionnaire detailing socio-demographics data and sexual behavior and received cervical and anal HPV testing/typing, colposcopy and anoscopy.

Results: Of 73 women evaluated, 64.38% showed concomitant HPV infection in both sites, especially in the range of 20-44 years. Sexual activity onset before 16 years increases the chance for HPV infection in HIV-positive women showed higher odds ratio for HPV infection in anal canal. Anal intercourse was also found an important risk factor for HPV infection especially in the uterine cervix. Women with normal colposcopy/anoscopy results demonstrates increased chances of being infected with HPV in the uterine cervix/anal canal, respectively. The presence of multiple infections of both sites is detachable, and HPV16 as the most prevalent genotype high risk.

Conclusions: The data obtained can be used as a basis to identify not only the prevalence of HPV infection and its genotypes in cervical and anal canal in the population of seropositive for HIV, but also to identify the most relevant risk factors in this public target.

INTRODUCTION

Human papillomavirus (HPV) is the most common transmitted infection (STI) worldwide [1] with etiological role in the development of cervical precursor lesions and cancer [2]. Cervical cancer accounts for 8.8% of all cancers in women, and is the third most common cancer in women worldwide, with over 530,000 new cases and 275,000 deaths reported each year [3]. For anal cancer, little is known about the epidemiology and no global estimates of anal HPV infection [4].

Otherwise, HPV infection in the anal canal can also lead to serious consequences, such as anal intraepithelial neoplasia (AIN) and anal cancer [5], being present in 90% of these cases [6]. Although anal cancer is a rare disease, AIN is more common, being observed in 5% of American HIV-negative women [7]. In Brazil, the incidence of AIN was high in women with previous genital lesion, reaching to 17.4% frequency [8].

Women with cervical intraepithelial neoplasia (CIN), vulvar intraepithelial neoplasia (VIN) or/and vaginal intraepithelial neoplasia (VAIN) have shown increased prevalence of coexisting AIN development [9, 10]. History of high-grade CIN is associated with increased incidence of almost five times for developing anal cancer [11]. Similarities between anal and cervical tissues, including the epithelium type and HPV genotypes, indicates that this region may also act as reservoir for HPV [12].

HIV-positive women also show increased risk of developing anal cancer, being 7 to 28 times higher than general population [13-15]. It is believed that HIV infection plays a role in the natural history of HPV infection, increasing the likelihood of persistent infection and consequently virulence [16]. HIV-positive women often have infections with multiple HPV genotypes, especially from high-risk group [17], worse prognosis and increased risk of HPV recurrence, being more likely to evolve to cancer [18]. These observations lead to a recommendation for screening in this target population [19,20], mainly with the advent of

HPV vaccination, which knowledge about the distribution of high-risk HPV genotypes became important [21].

The present study aimed to evaluate the frequency of HPV infection in cervical and anal samples and to determine the coexistence and concordance of HPV genotypes in both tissues in a case-control analysis with HIV-women attended at public hospital in Recife, Pernambuco.

METHODS

Study design

It was conducted a case-control study among women aged 17–65 years, attended at Clinical Hospital from Federal University of Pernambuco (UFPE), between November 2010 and February 2013. This study excluded women in the followed conditions: pregnancy, postpartum period (up to 6 months) and autoimmune diseases. At the moment of enrollment, eligible women answered a standardized questionnaire for demographics data, sexual behavior and reproductive health history.

Sample collection

Cervical and anal exfoliated cells were collected from all women using a wooden spatula for PAP smears and a cytobrush for HPV and *Chlamydia trachomatis* DNA detection. Cervical and anal cells from were eluted in 1mL sterile phosphate-buffered saline (PBS) and transported on ice to the processing laboratory. Patients with an abnormal cytology result underwent colposcopy. Women showing abnormal colposcopy results performed a cervical or anal biopsy according to the internal procedures of hospital. All those patients with cervical or anal lesions were treated according to care protocols.

Sample treatment

Cervical samples were processed for DNA extraction using Wizard Extraction Kit (Promega, Madison WI, USA) and anal samples were processed using DNA IQ™ System (Promega, Madison WI, USA) according to the manufacturer's instructions. β -globin gene were used as an internal positive control for the presence of human DNA in PCR reaction, using the forward primer 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3' and the reverse primer 5'-CAACTTCATCCACGTTTACC-3', which amplify a 268 base-pair (bp) region. PCR conditions were as follows: initial denaturation for 10 min at 94 °C followed by 40 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 62 °C for 1 min, and extension at 72 °C for 1 min. The final extension step was performed at 72 °C for 7 min. As negative control, amplification of the reaction mixture was performed with all components except the target DNA.

HPV identification and genotyping

HPV presence was detected by PCR, using GP5+/GP6+ and MY09/MY11 consensus primers, targeting a 155 bp and 450 bp region of L1, respectively, as previously described [22,23]. HPV genotyping was performed using Greiner Bio-One Papillocheck® assay (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany), which enables simultaneous identification of 24 different HPV genotypes in a single reaction (HPV-16,-18,-31,-33,-35,-39,-45,-51,-52,-53,-56,-58,-59,-66,-68,-70,-73,-82,-6,-11,-40,-42,-43, and -44), according to the manufacturer's instructions. A valid result was defined as one that passed all PapilloCheck® internal controls.

***Chlamydia trachomatis* identification**

Chlamydia trachomatis DNA was identified in cervical and anal samples by 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), using Custom TaqMan® Gene Expression Assays (Life Technologies). PCR was performed in a final volume of 25 μ L using 2.5 μ L of DNA sample; 12.5 μ L of TaqMan® Universal PCR Master Mix (2.0x); 8.75 μ L of ultrapure

water; 1.25 μ L of primer/probe mix (20x). Each amplification reaction was carried out as follows: pre-PCR read at 60 °C for 1 min; a holding stage at 95 °C for 10 min; cycling stage with 40 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C and a post-PCR read at 60 °C for 1 min. All analysis were performed in duplicate.

Statistical analysis

Statistical calculations were performed using GraphPad Prism version 6.02. Test comparing the two groups was performed with Fisher's exact test to calculate *odds* ratio (OR) with 95% confidence intervals (CI). *p*-values were two-tailed, with $p < 0.05$ considered statistically significant.

RESULTS

A total of 73 women were enrolled in this study, with median age at 37 years (IQR, 31–45.5 years). Thirty-eight women were positive for HIV infection (**Table 1**) and molecular analysis revealed 51 women with cervical HPV infection and 61 women with anal HPV infection. Forty-seven women (64.38%) showed concomitant HPV infection in both sites, with high rate in women between 20 and 44 years (70.2%), 1 to 3 children (76.6%), first vaginal intercourse before 16 years (72.4%) and use of contraceptive methods (76.6%).

HIV-positive women included in age group of 20-44 years have higher chance of developing cervical (*odds* ratio [OR] = 37.50; 95% confidence interval [CI], 4.353-323.1; $p = < 0.0001$), and anal HPV infection (OR = 9.722; 95% CI, 1.097-86.15; $p = 0.0238$) than HIV-negative women. In the group of 45-60 years, HIV-positive women presented even higher chance for HPV infections in cervix (OR = 84.33; 95% CI, 2.933-242.5; $p = 0.001$). Women that reported 1-3 children also showed high chance for cervical HPV infection (OR = 50.91; 95% CI, 6.071-426.9; $p < 0.0001$).

Sexual activity onset before 16 years increases the chance for HPV infection in HIV-positive women showed higher *odds* for HPV infection in anal canal (OR = 10.13; 95% CI, 1.115-91.93) than uterine cervix (OR = 1.724; 95% CI, 5.233-180.7). Anal intercourse was found an important risk factor for HPV infection in HIV-positive women, but showed higher *odds* for cervical (OR = 62.50; 95% CI, 6.19-630.5) than anal canal (OR = 4.167; 95% CI, 0.3428-506.5). HIV-positive women with multiple sexual partners had increased chances of developing cervical HPV infection (OR = 33.00; 95% CI, 1.482-734.6). Despite high *odds* ratio for anal HPV infection in this group (OR = 9.000; 95% CI, 0.7538-107.4), no statistically significant association was found. The use of contraceptive methods was also a risk factor for the onset of cervical infection (OR = 43.27; 95% CI, 5.119-365.8), together with smoking habits (OR = 56.33; 95% CI, 2.656-119.5). *Chlamydia trachomatis* was observed in only one sample of the anal canal.

Women with normal colposcopy results demonstrates increased chances of being infected with HPV in the uterine cervix (OR = 2.023; 95% CI, 0.6802-6.017), which demonstrates that the diagnostic method may not be useful in this screening. HIV-positive women show 7-times higher risk of developing cervical infection (OR = 186.3; 95% CI, 6.740-515.1). Acetowhite epithelium was the most common abnormality in both groups, being HIV-positive women also more inclined to infection (OR = 34.52; 95% CI, 1.831-651.0) (**Table 2**).

Forty women underwent anoscopy, demonstrating 47.5% normal results despite 83.3% women were HPV-positive (**Table 3**). Women with normal results also showed increased *odds* for HPV infection in anal canal, but they were not aware of this type of infection (OR = 2.118; 95% CI, 0.1754-255.6). In association with HIV, those numbers rise considerably (OR = 13.29; 95% CI, 0.4411-400.1). Acetowhite epithelium was the most frequent finding in both groups, especially HIV-positive (OR = 21.00; 95% CI, 0.5568-792.0).

Seventeen women were infected with single HPV genotype in the cervix, while 23 were infected with multiple HPV genotypes (OR = 2.778; 95% CI, 0.564-13.77). Regarding to anal canal, these numbers increased to 20 and 31 women (OR = 4.167; 95% CI), respectively (**Fig. 1**). Infection with multiple anal HPV types was observed among 69.4% of the women HIV-positive, showing 5 times higher infection rate than HIV-negative group.

The distribution of HPV genotypes according to sites cervical and anal among 73 women is shown in **Fig. 2**. In cervix, the most common HR genotypes were HPV16 (10.5%) but HPV68 was the most common for HIV-positive (90%), while the most common LR genotypes were HPV6 (12.8%) and HPV42 (8.1%). HPV16 was also the most frequent HR genotype in the anal canal (13.8%), present in 60% HIV-negative women. LR-HPV6 (11.1%) and HPV44 (13.8%) were the most common genotype observed. HPV18 was observed in both sites, but in low frequency among these patients.

The concordance in cervical and anal HPV infection was observed in 52% women, mainly caused by HPV6, followed by HPV42. HPV18 was found in only one women in both sites while two patients showed HPV16 in cervical and anal samples.

DISCUSSION

The total prevalence of 83% anal HPV infection in present population is quite high compared to that observed in HIV-positive women and high-risk HIV-negative women (42%-76% prevalence) [24,25] investigated both HPV DNA and mRNA positivity of the anal canal in women with lower genital tract HPV lesions. They observed 45% and 56% HPV DNA positivity in anal and cervical smears, respectively.

The tendency for initiating sexual life before age 16 can lead to early contact with infectious agents, like HPV [26], explaining high frequency in women between 20-44 years, and simultaneous infection in cervical and anal sites. Despite the route of transmission is not

well elucidated [27], there is a possibility of alternative transmission routes, including sexual and nonsexual means [28], which could explain the significant risk of cross-infection between cervix and anus, and vice versa [12].

The lacking of association between behavioral risk factors and anal HPV infection, or even smoking habits in the present population, is in agreement with a previous study on a similar but smaller population [29]. Cervical HPV infection is known as the single most important predictor for anal HPV infection [25], but this correlation could not be observed in this study.

The clinical significance of infection with multiple HPV types is not well understood [24,28], mainly in anal canal. The risk of infection with a new genotype in the anal canal seems to be increased in the presence of another HPV genotype, and certain genotypes, such as HPV16, have a greater effect on the acquisition of new HPV infections [30,31]. In agreement with previous reports, HPV16 was the most prevalent and HPV53, present in four cases, is currently considered likely to be oncogenic [32]. It is known that 90% [29] of cases of anal cancer are currently assigned to HPV16/18, but in our study HPV18 was observed in low frequency.

We observed similar high prevalence of coexisting cervical and anal HPV infection in our study group comparing to [33] using the same genotyping system. Based on the success of the cervical cancer screening program, it has been proposed by some authors, a routine anal screening for high-risk individuals to detect and remove precancerous anal lesions but there is no agreement on the most appropriate modality to perform such screening [14,34].

In conclusion, we identified high rate of multiple HPV infection at anal and cervical sites, as well high rate of coexisting infection, mainly in HIV-positive women. Longitudinal studies should be performed to determine whether the presence of multiple types increases

incidence or progression of AIN. Early screening in anogenital sites could allow the detection of HR-HPV genotypes, with the purpose of reducing the incidence of HPV infection.

Contributors: DBGGM participated in the design and coordination of the study, evaluated results, performed statistical analysis and drafted the manuscript. DSC, RCRB and MLG invited the patients and collected the samples for the study. KPS performed the molecular tests. CHMC participated in the bioinformatics analysis. JLLF and VMS participated in the design of the study and helped to draft the manuscript. All authors approved the final manuscript.

Funding: The work was funded by CNPq No. 475031/2010-5. The funder provided financial support for this project. The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors declare no competing interests.

Patient consent: All enrollees provided a written informed consent prior to their participation in the study.

Ethical approval: This study was approved by the Research Ethics Committee of the Health Sciences Center (CEP/CCS/UFPE No. 281/10) in Recife, Pernambuco.

Provenance and peer review: Not commissioned; externally peer reviewed.

REFERENCES

1. Luchters SM, Vanden Broeck D, Chersich MF, et al. Association of HIV infection with distribution and viral load of HPV types in Kenya: a survey with 820 female sex workers. *BMC Infect Dis* 2010;**10**:18.
2. Abreu ALP, Souza RP, Gimenes F, et al. A review of methods for detect human Papillomavirus infection. *Virol J* 2012;**9**:262.
3. Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;**61**:69-90.
4. Hernandez BY, Ka'opua LS, Scanlan L, et al. Cervical and anal human papillomavirus infection in adult women in American Samoa. *Asia Pac J Public Health* 2013;**25**(1):19-31.
5. Tseng HF, Morgenstern H, Mack TM, et al. Risk factors for anal cancer: results of a population-based case–control study. *Cancer Causes Control* 2003;**14**:837-846.
6. Daling JR, Madeleine MM, Johnson LG, et al. Human papillomavirus, smoking, and sexual practices in the etiology of anal cancer. *Cancer* 2004;**101**:270-280.
7. Hessol NA, Holly EA, Efird JT, et al. Anal intraepithelial neoplasia in a multisite study of HIV-infected and high-risk HIV-uninfected women. *AIDS* 2009;**23**:59-70.
8. Giraldo P, Jacyntho C, Costa C, et al. Prevalence of anal squamous intra-epithelial lesion in women presenting genital squamous intra-epithelial lesion. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009;**142**:73-75.
9. Santoso JT, Long M, Crigger M, et al. Anal intraepithelial neoplasia in women with genital intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol Sci* 2010;**116**(3):578-582.

10. Jacyntho CM, Giraldo PC, Horta AA, et al. Association between genital intraepithelial lesions and anal squamous intraepithelial lesions in HIV-negative women. *Am J Obstet Gynecol* 2011;**205**(2):115.e111–115.e115.
11. Edgren G, Sparen P. Risk of anogenital cancer after diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia: a prospective population-based study. *The Lancet Oncol* 2007;**8**(4):311-316.
12. Goodman MT, Shvetsov YB, McDuffie K, et al. Sequential acquisition of human papillomavirus (HPV) infection of the anus and cervix: the Hawaii HPV Cohort Study. *J Infect Dis* 2010;**201**:1331-1339.
13. Frisch M, Biggar RJ, Goedert JJ. Human papillomavirus-associated cancers in patients with human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. *J Natl Cancer Inst* 2000;**92**:1500-1510.
14. Goldie SJ, Kuntz KM, Weinstein MC, et al. Cost-effectiveness of screening for anal squamous intraepithelial lesions and anal cancer in human immunodeficiency virus-negative homosexual and bisexual men. *Am J Med* 2000;**108**:634-41.
15. Dal Maso L, Franceschi S, Polesel J, et al: Risk of cancer in persons with AIDS in Italy, 1985-1998. *Br J Cancer* 2003;**89**:94-100.
16. De Vuyst H, Clifford GM, Nascimento MC, et al. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: A meta-analysis. *Int J Cancer Suppl* 2008;**124**(7):1626-1636.
17. Strickler HD, Burk RD, Fazzari M, et al. Natural history and possible reactivation of human papillomavirus in human immunodeficiency virus-positive women. *J Natl Cancer Inst* 2005;**97**:577-586.

18. Palefsky JM. Cervical human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia in women positive for human immunodeficiency virus in the era of highly active antiretroviral therapy. *Curr Opin Oncol* 2003;**15(5)**:382-388.
19. Chin-Hong PV, Palefsky JM. Natural history and clinical management of anal human papillomavirus disease in men and women infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 2002;**35(9)**:1127-1134.
20. Hayanga AJ. When to test women for human papillomavirus: take this opportunity to screen for anal cancer too. *BMJ (Clin Res ed)* 2006;**332(7535)**:237.
21. Park EK, Cho H, Lee SH, et al. Human Papillomavirus Prevalence and Genotype Distribution among HIV-Infected Women in Korea. *J Korean Med Sci* 2014;**29**:32-37.
22. De Roda Husman AM, Walboomers JMM, van den Brule AJC, et al. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 1995;**6(4)**:1057-1062.
23. Manos MM, Ting Y, Wright DK. Use of Polymerase Chain reaction Amplification for the Detection of Genital Human Papillomaviruses. *Cancer Cells* 1989;**26(7)**:209-214.
24. Palefsky JM, Holly EA, Ralston ML, et al. Prevalence and risk factors for anal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and high-risk HIV-negative women. *J Infect Dis* 2001;**183(3)**:383-391.
25. Valari O, Koliopoulos G, Karakitsos P, et al. Human papillomavirus DNA and mRNA positivity of the anal canal in women with lower genital tract HPV lesions: predictors and clinical implications. *Gynecol Oncol* 2011;**122**:505-508.
26. Veo CA, Saad SS, Nicolau SM, et al. Study on the prevalence of human papillomavirus in the anal canal of women with cervical intraepithelial neoplasia grade

- III. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 2008;**140**:103-107.
27. Crawford R, Grignon AL, Kitson S, et al. High prevalence of HPV in non-cervical sites of women with abnormal cervical cytology. *BMC cancer* 2011;**11**:473.
28. Hernandez BY, McDuffie K, Zhu X, et al. Anal human papillomavirus infection in women and its relationship with cervical infection. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention* 2005;**14**:2550-2556.
29. Park IU, Ogilvie JW, Jr., Anderson KE, et al. Anal human papillomavirus infection and abnormal anal cytology in women with genital neoplasia. *Gynecol Oncol* 2009; **114**:399-403.
30. Syrjänen KJ, Syrjänen SM. Papillomavirus infections in human pathology. *John Wiley & Sons Ltda* 2000.
31. Goodman MT, Shvetsov YB, McDuffie K, et al. Sequential acquisition of human papillomavirus (HPV) infection of the anus and cervix: the Hawaii HPV Cohort Study. *J Infect Dis* 2010;**201**:1331-1339.
32. Muñoz N, Bosch FX., Sanjosé S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;**348**:518-527.
33. Guler T, Uygur D, Uncu M, et al. Coexisting anal human papilloma virus infection in heterosexual women with cervical HPV infection. *Arch Gynecol Obstet* 2013;**288**:667-672.
34. Scott H, Khoury J, Moore BA, et al. Routine anal cytology screening for anal squamous intraepithelial lesions in an urban HIV clinic. *Sex Trans Dis* 2008;**35**(2):197-2

Table 1. Clinical and behavioral data from 73 women according to HPV status in the uterine cervix and anal canal. *P*-values were calculate for cervical and anal infection considering HIV-positive group as reference.

| | Women N (%) | HIV positive N (%) | Cervical HPV N (%) | <i>p</i>-value | Anal HPV N (%) | <i>p</i>-value |
|---|------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|
| Overall | 73 | 38 (52) | 51 (69.9) | - | 61 (83.6) | - |
| Age (years) | | | | | | |
| 10–19 | 2 (2.7) | 0 (0) | 1 (2) | - | 2 (3.3) | - |
| 20–44 | 51 (69.9) | 26 (35.6) | 35 (68.6) | <0.0001* | 43 (70.5) | 0.0238* |
| 45–60 | 17 (23.3) | 11 (15.1) | 12 (23.5) | <0.0010* | 13 (21.3) | 0.0987 |
| More than 60 | 3 (4.1) | 1 (1.4) | 3 (5.9) | 1.0000 | 3 (4.9) | 1.0000 |
| Number of children | | | | | | |
| 1–3 | 60 (82.2) | 29 (39.7) | 39 (76.5) | <0.0001* | 49 (80.3) | 0.0434* |
| 4 or more | 13 (17.8) | 9 (12.3) | 12 (23.5) | 0.3077 | 12 (19.7) | 0.3077 |
| Age at first vaginal intercourse | | | | | | |
| Less than 16 | 50 (68.5) | 28 (38.3) | 36 (70.6) | <0.0001* | 43 (70.5) | 0.0345* |
| More than 16 | 23 (31.5) | 10 (13.7) | 15 (29.4) | 0.0743 | 18 (29.5) | 0.3394 |
| Anal intercourse related | 40 (54.8) | 26 (35.6) | 29 (56.9) | <0.0001* | 37 (60.6) | 0.2763 |

| Number of sexual partners in lifetime | | | | | | |
|--|-----------|------------|-----------|----------|-----------|--------|
| Less than 3 | 43 (58.9) | 20 (27.4%) | 27 (52.9) | <0.0001* | 35 (57.4) | 0.0504 |
| 4–11 | 24 (32.9) | 16 (21.9%) | 20 (39.2) | 0.0066* | 20 (32.8) | 0.0909 |
| More than 11 | 6 (8.2) | 2 (2.7%) | 4 (7.8) | 0.4667 | 6 (9.8) | 1.0000 |
| Contraceptive use | 57 (78.1) | 29 (39.7%) | 39 (76.5) | <0.0001* | 48 (78.7) | 0.0787 |
| <i>C. trachomatis</i> infection | 1 (1.4) | 0 (0) | 0 (0) | - | 1 (1.6) | - |
| History of condyloma | 24 (32.9) | 13 (17.8%) | 19 (37.2) | 0.1421 | 23 (37.7) | 0.4583 |
| History of cervical lesion | 39 (53.4) | 13 (17.8%) | 27 (52.9) | 0.0030* | 35 (57.4) | 0.2809 |
| Smoking habits | 29 (39.7) | 19 (26%) | 23 (45.1) | 0.0004* | 24 (39.3) | 0.3064 |

*Fischer's exact test.

HPV, human papillomavirus; HIV, human immunodeficiency virus; STI, sexually transmitted infection.

Table 2. Results for colposcopy analysis and HPV infection in 73 women, according to HIV groups, considering each abnormal identification as one case.

| Colposcopy | N | HIV+ | | | HIV- | | |
|-----------------------|----|------|--------|--------|------|--------|--------|
| | | HPV+ | HR-HPV | LR-HPV | HPV+ | HR-HPV | LR-HPV |
| Normal | 28 | 21 | 20 | 14 | 1 | 2 | 0 |
| Abnormal | | | | | | | |
| Acetowhite epithelium | 36 | 14 | 27 | 9 | 10 | 5 | 2 |
| Condyloma | 2 | 2 | 5 | 3 | - | - | - |
| Polyp | 2 | 1 | 1 | - | 1 | - | - |
| Colpите | 5 | - | - | - | 1 | - | - |
| Other | 4 | 2 | 8 | 1 | 2 | 2 | - |

HPV, human papillomavirus; HPV+, HPV-positive; HPV-, HPV-negative; HR-HPV, high-risk HPV; LR-HPV, low-risk HPV; HIV, human immunodeficiency virus; HIV+, HIV-positive; HIV-, HIV-negative.

Table 3. Results for anoscopy analysis and HPV infection in 38 women, according to HIV groups, considering each abnormal identification as one case.

| Anoscopy | N | HIV+ | | | HIV- | | |
|-----------------------|----|------|--------|--------|------|--------|--------|
| | | HPV+ | HR-HPV | LR-HPV | HPV+ | HR-HPV | LR-HPV |
| Normal | 19 | 15 | 17 | 12 | 3 | 4 | 3 |
| Abnormal | | | | | | | |
| Acetowhite epithelium | 12 | 10 | 9 | 11 | 1 | 1 | - |
| Puntaction | 5 | 4 | 4 | 2 | - | - | - |
| Condyloma | 4 | 4 | 3 | 5 | 1 | - | 1 |

HPV, human papillomavirus; HPV+, HPV-positive; HPV-, HPV-negative; HR-HPV, high-risk HPV; LR-HPV, low-risk HPV; HIV, human immunodeficiency virus; HIV+, HIV-positive; HIV-, HIV-negative

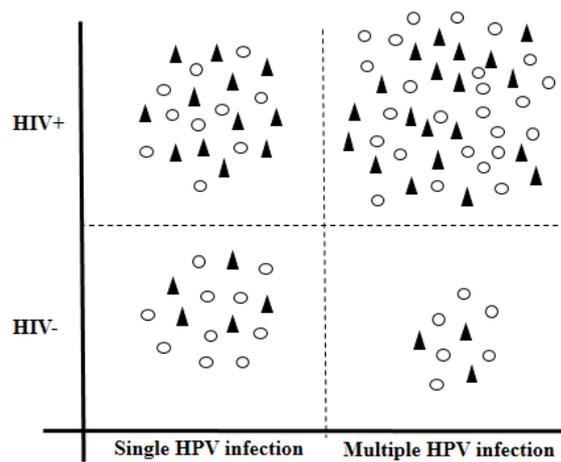


Figure 1. Distribution of the single and multiple infections according HIV status. Triangles are cervical samples and circles are anal samples.

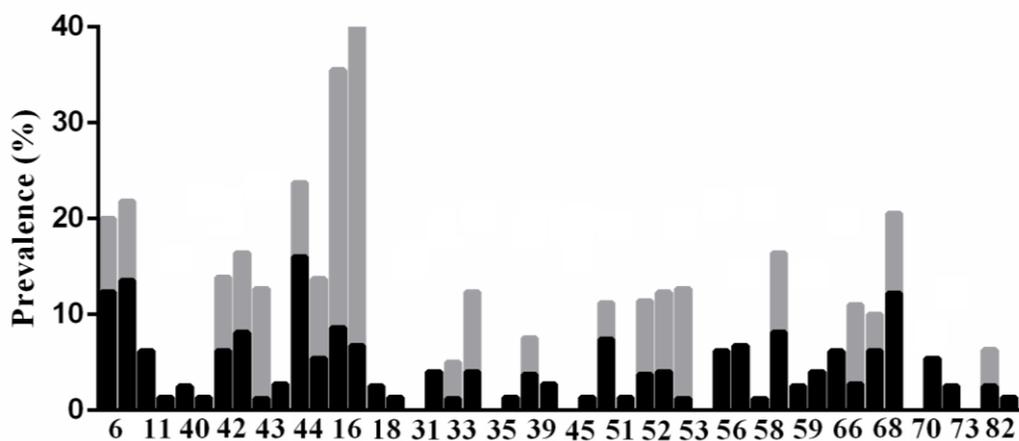


Figure 2. Human papillomavirus (HPV) genotype distribution in cervical and anal samples, according to human immunodeficiency virus (HIV) status. Black bars, HIV-positive patients; gray bars, HIV-negative patients.

5 CONCLUSÕES

Observamos uma elevada prevalência de infecção por HPV anal, principalmente em mulheres saudáveis. No entanto, entre as mulheres HIV-positivas a infecção por genótipos de alto risco e a presença de múltiplas infecções também foi relevante. A alta taxa de concordância entre os genótipos presentes nas amostras cervicais e anais de uma mesma paciente reforça a hipótese de que o canal anal pode exercer um papel de reservatório para o HPV, permitindo reinfecção cervical. Adicionalmente, o aparecimento de lesões no trato anogenital decorrentes da infecção por HPV não está correlacionado à presença de *Chlamydia trachomatis* na população estudada.

Dessa forma, os nossos achados salientam a importância de aprimorar programas de rastreamento mais eficazes e educação em saúde na prevenção do câncer cervical e anal na população, permitindo o acompanhamento da paciente e conseqüentemente a evolução da infecção pelo HPV.

6 PERSPECTIVAS

A partir desta pesquisa surgirão novas perspectivas para a ampliação da investigação do papel do HPV na carcinogênese, o que possibilitará a identificação de grupos de risco que necessitem de um acompanhamento mais frequente, contribuindo para o planejamento e qualificação de programas de controle e prevenção de infecções sexualmente transmissíveis.

Nesse sentido novos projetos de pesquisa devem ser desenvolvidos com a participação de hospitais de referência na região, tendo como objetivo avaliar o papel de moléculas em vias de sinalização relacionadas a infecção pelo HPV e ao desenvolvimento do câncer, visando melhor compreender a biologia da célula tumoral permitindo o desenvolvimento de fármacos para redução das lesões em pacientes infectadas.

7 RESULTADOS ADICIONAIS

Análise de genômica comparativa em diferentes espécies do gênero *Chlamydia* para desenvolvimento de oligonucleotídeos específicos para *Chlamydia trachomatis* na identificação em amostras anogenitais.

Keilla Maria Paz e Silva¹, Carlos Henrique Madeiros Castelletti¹, José Luiz de Lima Filho^{1,2},
Danyelly Brunaska Gondim Martins^{1,2,§}

¹Grupo de Prospecção Molecular e Bioinformática, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brasil;

²Departmento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brasil.

§Autor correspondente:

Av. Prof. Moraes Rego 1235 - Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, CEP: 50670-901, Brasil.

Tel: +55 81 21268484

Fax: +55 81 21268485

E-mail: brunaska@prospecmol.org

RESUMO

As infecções transmitidas via contato sexual podem causar doenças que comprometem o funcionamento adequado do organismo, apresentando grande importância a nível de saúde pública mundial. Em mulheres, o índice de infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) é maior devido à susceptibilidade biológica aumentada e à facilidade de transmissão das infecções. A *Chlamydia trachomatis* é a principal bactéria causadora de IST, sendo normalmente assintomática. A maioria dos kits comerciais para a identificação dessa bactéria são baseados na busca de anticorpos, o que dificulta o diagnóstico precoce. Diante da dificuldade na detecção da *Chlamydia trachomatis*, que pode levar ao aborto e à infertilidade em mulheres com exposição prolongada ao patógeno, o objetivo deste trabalho foi identificar uma sequência de DNA bacteriano a ser utilizada para diagnóstico em amostras anogenitais de pacientes que realizam exames periódicos. Os dados obtidos demonstram que a sequência escolhida é capaz de identificar a bactéria em amostras do trato anogenital.

INTRODUÇÃO

Chlamydias são bactérias gram-negativas de caráter intracelular obrigatório [1] que pertencem a ordem *Chlamydiales*. Há quatro espécies dentro desse gênero: *C. pecorum*, *C. psittaci*, *C. pneumoniae* e *C. trachomatis* [2]. O seu genoma é extremamente pequeno e completo, o qual possui RNA ribossomal (rRNA) de 23S, 16S e 5S e é constituído por um cromossomo circular de 1.042.519 pb (58,7% de A-T) e um plasmídeo com 7.493 pb (Número de acesso no Gen Bank AE001273) [3].

Chlamydia trachomatis é responsável por acometer não só o trato geniturinário [4], mas também o tecido ocular [5], representando um grande problema de saúde pública. No ano de 2012, um total de 1.422,976 casos (456/100.000 habitantes) de infecção por essa bactéria nos EUA foram reportados ao CDC. Com base em estimativas de pesquisas nacionais realizadas entre 1999-2008, a sua prevalência é de 6,8% entre as mulheres sexualmente ativas com faixa etária de 14-19 anos. Estima-se que cerca de 89 milhões de novos casos por ano ocorrendo em todo o mundo, onde indivíduos sexualmente ativos são a maior razão de morbidade [6].

Sabe-se que indivíduos que se infectam antes dos 20 anos de idade, podem vir a ter recorrência da infecção, devido à proteção parcial da imunidade nessa fase da vida [7]. Estudos demonstraram no Brasil, prevalência em torno de 11,4%-16% em mulheres jovens [8,9]. Em Goiânia a prevalência da infecção em adolescentes e mulheres jovens entre 2000 e 2001, foi de 19,6% [10]. Já no estado de São Paulo um estudo com mulheres portadoras de condiloma acuminado no ano de 2007 mostrou uma prevalência de 33,3%, superior a maioria dos estudos realizados [11]. No Estado do Amazonas, a prevalência em mulheres soropositivas ao HIV, com idade mediana de 32 anos, foi de 4,3% (IC 95%=2,1-6,5) [12].

Dados indicam que 10%-40% das mulheres portadoras de infecções por clamídia não tratadas desenvolvem a doença inflamatória pélvica (DIP), como: infertilidade, gravidez ectópica e dor pélvica crônica [13]. Dados de países desenvolvidos indicam que mulheres que tiveram DIP têm probabilidade 6 a 10 vezes maior de desenvolver gravidez ectópica, que contribui em mais de 15% das mortes maternas [14] (WHO, 2004). Abortos espontâneos, natimortos, baixo peso ao nascer, infecção congênita e perinatal também estão associados às ISTs não tratadas em gestantes [15]. Mulheres infectadas por *Chlamydia trachomatis* podem se tornar um reservatório da bactéria, vindo a transmiti-la para os seus parceiros sexuais [5], podendo levar à infertilidade feminina e masculina [16-18].

Contudo, nas populações em que o número de parceiros é mais elevado, com adição a drogas ou histórico de ISTs a prevalência pode ir até 27% [19]. Os estudos tendo como alvo a

população em geral são raros, a prevalência de infecção por *Chlamydia trachomatis* não é conhecida na maioria dos países e rastreios preventivos a populações consideradas de alto risco também não são comuns, o que deixa uma elevada percentagem de infectados assintomáticos por diagnosticar [20], sendo estes últimos um reservatório permanente da bactéria [21]. Tal como acontece com outras ISTs inflamatórias, a infecção por *Chlamydia trachomatis* pode facilitar a transmissão do HIV. Além disso, as mulheres grávidas infectadas podem transmitir esta bactéria para seus bebês durante o parto, resultando em oftalmia neonatal e pneumonia [6].

Existem diversas metodologias que podem ser empregadas para a detecção da *Chlamydia trachomatis*. A escolha do método ideal deve levar em consideração a prevalência da infecção na população que vai ser examinada, para se obter sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade compatíveis. Além disso, é importante que se considere o custo-benefício do teste, as dificuldades para a sua execução, os equipamentos, a infraestrutura laboratorial e o tempo necessário para a liberação dos resultados. Por causa da grande carga de doenças e riscos associados com a infecção, o CDC recomenda que todas as mulheres sexualmente ativas com menos de 26 anos de idade sejam rastreadas anualmente [6].

Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo construir um conjunto de oligonucleotídeos para uma região específica da *Chlamydia trachomatis*, visando implementar um diagnóstico rápido e preciso do patógeno em amostras anogenitais utilizando o PCR em tempo real.

METODOLOGIA

Sequência genômica

Para as análises *in silico* foram coletados os genomas disponíveis de quatro espécies no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>): *Chlamydia pecorum* (NC_015408.1); *Chlamydia pneumoniae* (NC_000922.1); *Chlamydia psittaci* (NC_015470.1) e *Chlamydia trachomatis* (NC_000117.1).

Alinhamento das sequências

As sequências genômicas foram alinhadas utilizando o programa *Multiple Genome Alignment* (MAUVE), que permite a construção de alinhamentos múltiplos de genomas na presença de eventos evolucionários como rearranjos e inversões, que dificultam o alinhamento, não permitindo a identificação correta de regiões específicas (MAUVE, 2010). Foram

realizados vários testes para encontrar os melhores parâmetros de identidade e cobertura para posterior análise dos genes relacionados. Após o alinhamento os clusters foram analisados e exportados os genes ortólogos, genes que codificam proteínas correspondentes em diferentes organismos.

As sequências obtidas foram importadas no *CLC Main Workbench* (CLCBio, Denmark) e analisadas quanto à similaridade com outras espécies. Para isso foi utilizando o *plug-in* do *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) contra todo o banco de dados de sequências de DNA do NCBI. As regiões foram também analisadas através da ferramenta de busca de padrões contra espécies coexistentes e para a espécie humana afim de garantir que a região selecionada não correspondesse a nenhuma outra. Após a etapa de escolha na região gênica foi utilizado o *RepeatMasker*, software que filtra sequências de DNA para repetições intercaladas e de baixa complexidade.

A última etapa no desenvolvimento dos *primers* foi o envio da região selecionada para a *Life Technologies*, onde foi utilizado o serviço “*Custom TaqMan® Genomic Assays*” que projeta e sintetiza conjuntos de oligonucleotídeos e sonda de qualidade controlada com base em informações da sequência fornecida.

Análise molecular

Amostras biológicas contendo *Chlamydia trachomatis* foram obtidas e o DNA total extraído por kit comercial, de acordo com as instruções do fabricante. O DNA foi armazenado a -20 °C até o momento da identificação molecular por sistema de PCR em tempo real. O DNA de *C. trachomatis* foi detectado utilizando dois equipamentos, o Rotor-Gene® Q, modelo 5-Plex, com o software Rotor-Gene Q, versão 2.1.0. (QIAGEN, USA), e o Real Time PCR 7500 (Life Technologies, USA) para *Custom TaqMan® Gene Expression Assays* (Life Technologies). A PCR foi realizada para um volume final de 25 µL utilizando 2,5 µL de amostra de DNA; 12,5µL de TaqMan® PCR Universal Master Mix (2,0x); 8,75 µL de água ultrapura; 1,25 µL da mistura de primers/sonda (20x). Cada reação de amplificação foi realizada com as seguintes condições: pré-PCR a 60 °C durante 1 min, seguindo de uma fase de *holding* a 95 °C por 10 min, uma ciclagem de 40 ciclos, correspondendo a uma etapa de 15 s a 95 °C e de 1 min a 60 °C e uma fase de pós-PCR a 60 °C durante 1 min. Água ultrapura foi utilizada como controle negativo e a análise foi realizada em duplicata. Uma amostra positiva para *Chlamydia trachomatis* identificada em laboratório de diagnóstico da região metropolitana do Recife foi utilizada como controle positivo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise de bioinformática

O MAUVE gerou um alinhamento múltiplo, evidenciando os rearranjos entre as quatro espécies de *Chlamydia* selecionadas, permitindo que genes em posições diferentes no genoma de cada espécie fossem encontrados (**Figura 1**). Os testes para encontrar os melhores parâmetros de cobertura e identidade resultou em 5-100 e 70-100 respectivamente. Esses parâmetros foram utilizados para exportar os genes ortólogos entre as espécies, gerando uma tabela comparativa entre as espécies estudadas. As regiões gênicas exportadas foram analisadas e escolhidas apenas as que pertenciam somente a *C. trachomatis* (187/940, 19.9%). Para cada uma das 187 regiões, foi realizado uma busca de similaridade pelo CLCBio, utilizando-se o algoritmo BLAST contra todo o banco de dados de sequências de DNA do NCBI, com número máximo de *hits* igual a 100.

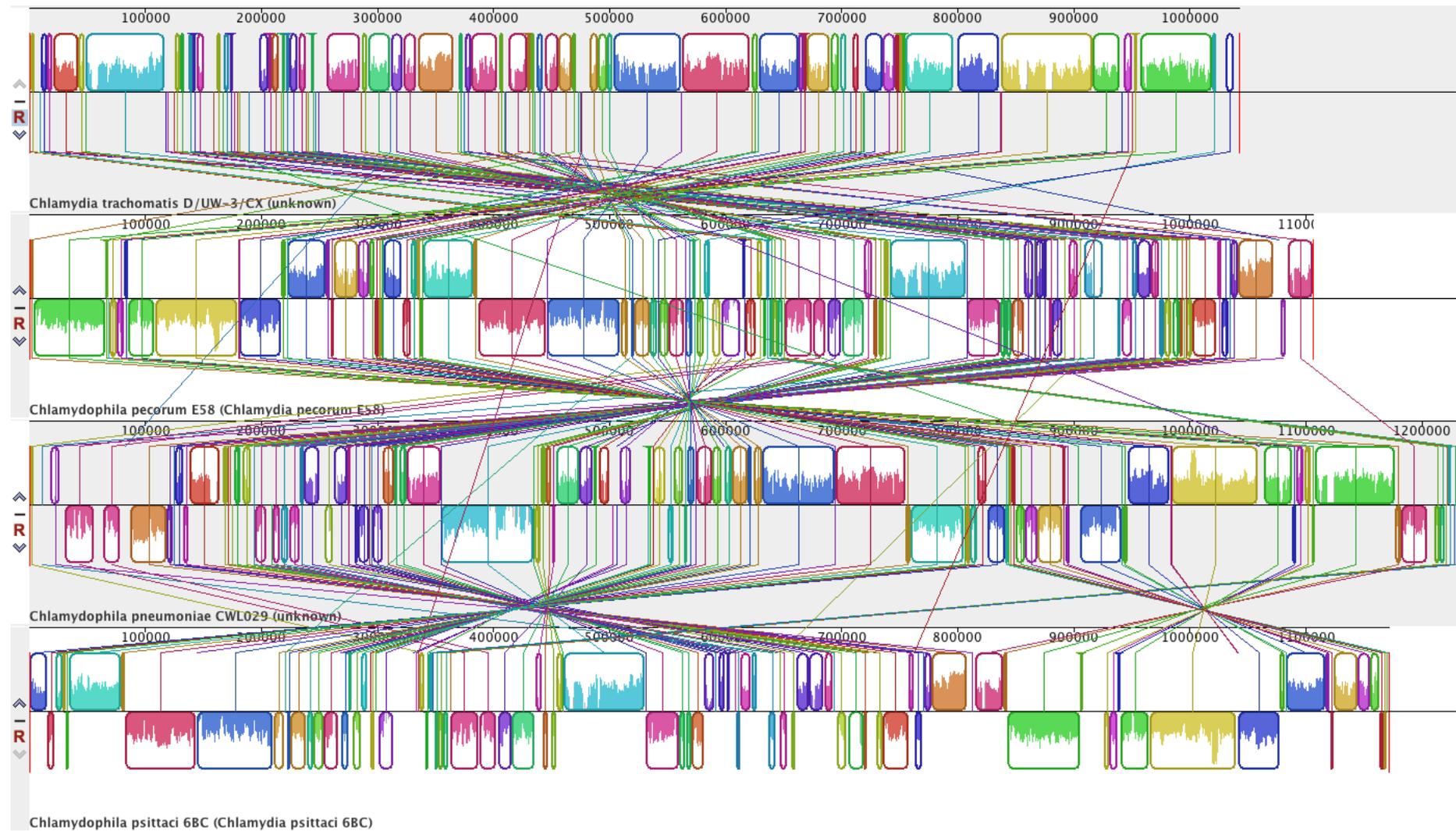


Figura 1. Alinhamento de quatro espécies de clamídia no programa MAUVE.

As regiões mais promissoras, com menor frequência de alinhamento com outros organismos, foram selecionadas para realização de um novo BLAST com *hits* igual a 1.000. Além do alinhamento com o BLAST (**Figura 2**) contra todo o banco do NCBI, foi realizada uma busca por padrões com auxílio do CLCBio para o genoma humano além do genoma de espécies coexistentes como: *Neisseria gonorrhoeae*; *Treponema pallidum*; *Trichomonas vaginalis*; *Gardnerella vaginalis*. Tais análises foram realizadas para garantir que a região selecionada não correspondesse a nenhuma outra.

| Hit | Description | E-value | Score |
|----------|--|-----------|--------|
| FM872307 | Chlamydia trachomatis B/TZ1A828/OT, complete genome | 9.52E-167 | 300.00 |
| CP000051 | Chlamydia trachomatis A/HAR-13, complete genome | 9.52E-167 | 300.00 |
| AE001273 | Chlamydia trachomatis D/UW-3/CX, complete genome | 9.52E-167 | 300.00 |
| HE601806 | Chlamydia trachomatis F/SotonF3 high quality draft genome sequence | 2.32E-164 | 296.00 |
| HE601798 | Chlamydia trachomatis D/SotonD1 high quality draft genome sequence | 2.32E-164 | 296.00 |
| HE601801 | Chlamydia trachomatis E/SW3 complete genome | 2.32E-164 | 296.00 |
| HE601802 | Chlamydia trachomatis E/SotonE4 complete genome | 2.32E-164 | 296.00 |
| HE601803 | Chlamydia trachomatis E/SotonE8 high quality draft genome | 2.32E-164 | 296.00 |
| HE601804 | Chlamydia trachomatis F/SW4 complete genome | 2.32E-164 | 296.00 |
| HE601805 | Chlamydia trachomatis F/SW5 complete genome | 2.32E-164 | 296.00 |
| CP001886 | Chlamydia trachomatis E/150, complete genome | 2.32E-164 | 296.00 |
| FN652779 | Chlamydia trachomatis Sweden2, complete genome | 2.32E-164 | 296.00 |
| HE601960 | Chlamydia trachomatis L2b/CV204 high quality draft genome sequence | 1.38E-159 | 288.00 |
| HE601795 | Chlamydia trachomatis L2b/8200/07 complete genome | 1.38E-159 | 288.00 |
| HE601949 | Chlamydia trachomatis L2b/795 complete genome | 1.38E-159 | 288.00 |
| HE601950 | Chlamydia trachomatis L1/440/LN complete genome | 1.38E-159 | 288.00 |
| HE601951 | Chlamydia trachomatis L1/1322/p2 high quality draft genome | 1.38E-159 | 288.00 |
| HE601965 | Chlamydia trachomatis L2b/Ams5 high quality draft genome sequence | 1.38E-159 | 288.00 |
| HE601964 | Chlamydia trachomatis L2b/Ams4 high quality draft genome sequence | 1.38E-159 | 288.00 |
| HE601963 | Chlamydia trachomatis L2b/Canada1 high quality draft genome sequence | 1.38E-159 | 288.00 |
| HE601962 | Chlamydia trachomatis L2b/Ams3 high quality draft genome sequence | 1.38E-159 | 288.00 |
| HE601961 | Chlamydia trachomatis L2b/Ams2 high quality draft genome sequence | 1.38E-159 | 288.00 |
| HE601959 | Chlamydia trachomatis L2b/Ams1 complete genome | 1.38E-159 | 288.00 |
| HE601958 | Chlamydia trachomatis L2b/LST high quality draft genome sequence | 1.38E-159 | 288.00 |
| HE601957 | Chlamydia trachomatis L2b/Canada2 high quality draft genome sequence | 1.38E-159 | 288.00 |
| HE601956 | Chlamydia trachomatis L2b/UCH-2 complete genome | 1.38E-159 | 288.00 |
| HE601955 | Chlamydia trachomatis L3/404/LN complete genome | 1.38E-159 | 288.00 |
| HE601954 | Chlamydia trachomatis L2/25667R complete genome | 1.38E-159 | 288.00 |
| HE601953 | Chlamydia trachomatis L1/224 complete genome | 1.38E-159 | 288.00 |
| HE601952 | Chlamydia trachomatis L1/115 complete genome | 1.38E-159 | 288.00 |
| AM884177 | Chlamydia trachomatis L2b/UCH-1/proctitis complete genome | 1.38E-159 | 288.00 |
| CP002024 | Chlamydia trachomatis L2c, complete genome | 1.38E-159 | 288.00 |
| AM884176 | Chlamydia trachomatis strain L2/434/Bu complete genome | 1.38E-159 | 288.00 |
| CP003876 | Nocardia brasiliensis ATCC 700358, complete genome | 2.96 | 21.00 |
| HE601629 | Schistosoma mansoni strain Puerto Rico chromosome 6, complete genome | 2.96 | 21.00 |
| FP102640 | Pig DNA sequence from clone CH242-235B10 on chromosome 6, complet... | 2.96 | 21.00 |

Figura 2. BLAST gerado pelo CLC, apresentando os valores de *E-value* e *Score*.

Foram escolhidas cinco regiões exclusivas da *C. trachomatis*, com variação entre 300 a 3000 nucleotídeos, sendo a menor região selecionada para continuidade dos trabalhos. Desta forma, foi utilizado o *RepeatMasker*, gerando como resultado uma anotação detalhada das repetições que estão presentes na sequência em questão, bem como de versão modificada da

sequência de consulta na qual todas as repetições anotadas são mascaradas através da substituição da base por N. A região selecionada para os novos oligonucleotídeos não apresentou sequências repetidas.

Análise molecular

Inicialmente, para o RotorGene Q, os *Cycle Threshold* (CTs) foram obtidos para cada amostra que apresentou fluorescência acima do *background* da reação, permitindo excluir valores de fluorescência atribuídos a ligações inespecíficas e anelamento entre os oligonucleotídeos. Deste modo, os CTs foram determinados em cada amostra como demonstrado na **Figura 3** para análise pelo Rotor Gene®. Para o controle positivo observou-se um CT de 23.60 e para a amostra anogenital um CT de 34.61, demonstrando que o programa utilizado detectou aumento da fluorescência (fase inicial ou *lag*) associada ao aumento exponencial (fase exponencial ou *log*) do produto da PCR [22].

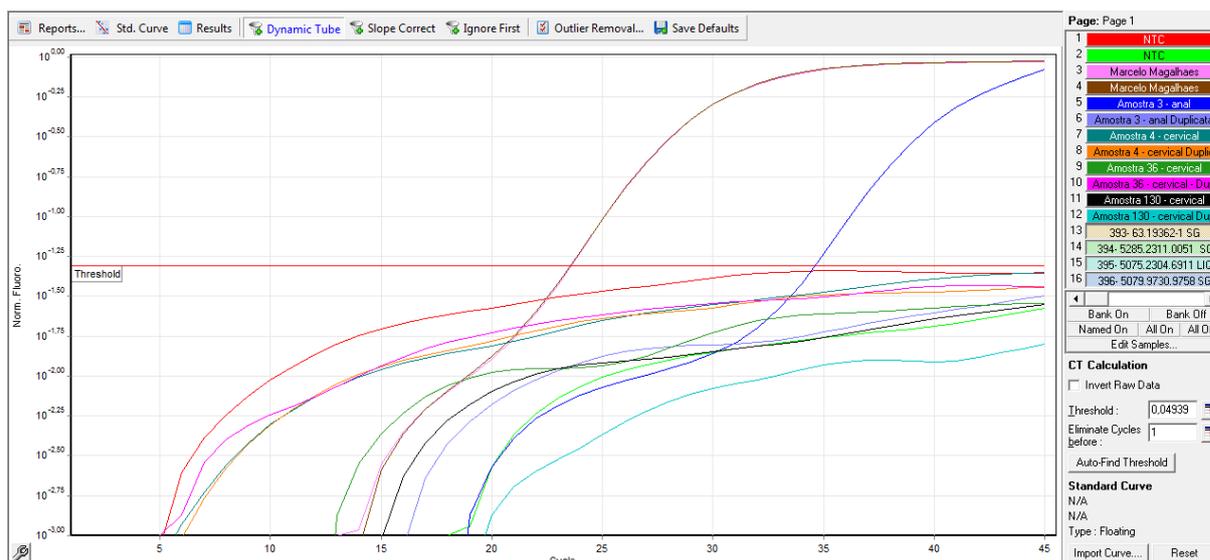


Figura 3. Imagem gráfica do número de ciclos e relação à fluorescência normalizada da reação. A linha horizontal vermelha (*Threshold*) separa o ruído do processo da amplificação real das amostras analisadas através do RotorGene Q para a identificação de *C. trachomatis*.

Utilizando o experimento para presença/ausência do Real Time PCR 7500 (**Figura 4**) para identificação da *C. trachomatis* podemos observar que os CTs obtidos foram semelhantes

aos do experimento descrito acima, correspondente aos CT de 25.45 e 34.35 para o controle positivo e a amostra anogenital, respectivamente.

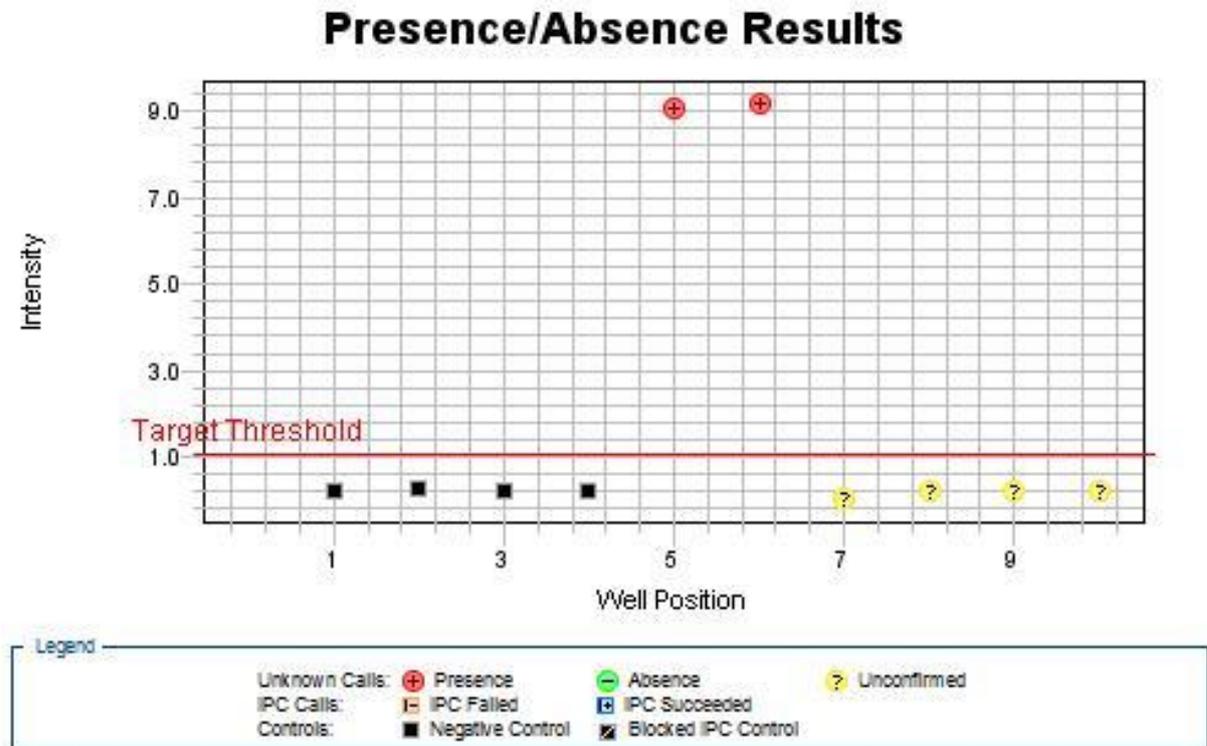


Figura 4. Imagem gráfica do experimento para presença/ausência.

Os dados obtidos até o momento permitem concluir que a sequência utilizada é capaz de detectar a *C. trachomatis* em amostras anogenitais de forma satisfatória, inclusive utilizando equipamentos de fornecedores distintos. No entanto, faz-se necessário testes com amostras de *C. pecorum*, *C. psitacci* e *C. pneumoniae* com o intuito de confirmar a especificidade, demonstrando que não há possibilidade de reação cruzada que levaria a um diagnóstico equivocado. A análise de um maior número de amostras infectadas pela *C. trachomatis* permitirá observar a reprodutibilidade e a sensibilidade dos oligonucleotídeos gerados.

REFERÊNCIAS

1. BRAVERMAN, P. K. Sexually transmitted diseases in adolescents. **Clinical Pediatric Emergency Medicine**, v. 4, n. 1, p. 21-36, 2003.
2. SMITH, J. S. Evidence for *Chlamydia trachomatis* as an HPV cofactor in the etiology of cervical cancer in Brazil and the Philippines. **Journal of Infectious Diseases**, v. 185, p. 324-331, 2002.
3. THOMAS, N. S. et al. Plasmid diversity in *Chlamydia*. **Microbiology**, v. 143, p. 1847-1854, 1997.
4. WHO. **Global strategy for intervention and control of sexually transmitted infections: 2006-2015**. Geneva: World Health Organization; 2007.
5. GOLIJOW, C. D. et al. *Chlamydia trachomatis* and Human papillomavirus infections in cervical disease in Argentine women. **Gynecologic Oncology**, v.96, p. 181-186, 2005.
6. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Incidence, Prevalence, and Cost of Sexually Transmitted Infections in the United States**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/std/stats/STI-Estimates-Fact-Sheet-Feb-2013.pdf>. Acesso em 18 de fevereiro de 2014.
7. SEADI, C. F. et al. Diagnóstico laboratorial da infecção pela *Chlamydia trachomatis*: vantagens e desvantagens das técnicas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, n. 2, p. 125-133, 2002.
8. MIRANDA, A. E. et al. Prevalence and Risk Behaviors for Chlamydial Infection in a Population-Based Study of Female Adolescents in Brazil. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 31, n. 9, p. 542-546, 2004.
9. CODES, J. S. et al. Detecção de doenças sexualmente transmissíveis em clínica de planejamento familiar da rede pública no Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 24, n. 2, p. 101-106, 2002.
10. ARAÚJO, R. S. et al. Prevalence and risk factors for *Chlamydia trachomatis* infection in adolescent females and young women in central Brazil. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 25, p. 397-400, 2006.
11. MARCOLINO, L. D. et al. Coinfecção de *Chlamydia trachomatis* e HPV em mulheres com condiloma acuminado. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 20, n. 2, p. 87-92, 2008.
12. SILVA, C. F. et al. *Chlamydia trachomatis* infection among HIV-infected women attending an AIDS clinic in the city of Manaus, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 16, p. 4, p. 335-338, 2012.
13. NAVARRO, C. et al. Risk factors for genital chlamydial infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 3, p. 195-207, 2002.
14. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Strategy for STI Prevention and Control Meeting**. Geneva, Nov. 2004.
15. GUTMAN, L. Gonococcal diseases in infants and children. In: Holmes et al., eds. **Sexually transmitted diseases**. New York: McGraw-Hill Inc, 1999: 1146, Table 82-1.
16. KARINEN, L. et al. Association between *Chlamydia trachomatis* antibodies and subfertility in the Northern Finland Birth Cohort 1966 (NFBC 1966), at the age of 31 years. **Epidemiology & Infection**, v. 132, n. 5, p. 977-984, 2004.
17. MARDH, P. A. Tubal factor infertility, with special regard to chlamydial salpingitis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 49-52, 2004.

18. ELLEY, A. et al. Can *Chlamydia trachomatis* directly damage your sperm? **The Lancet Infectious Diseases**, v.5, n. 1, p. 53-57, 2005.
19. BERNSTEIN, K. et al. Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae infections among men and women entering california prisons. **American Journal of Public Health**, v. 96, n. 10, p. 1862-1866, 2006.
20. KUČINSKIENĖ, V., ŠUTAITĖ, I., VALIUKEVIČIENĖ, S., MILAŠAUSKIENĖ, Ž. & DOMEIKA, M. Prevalence and risk factors of genital *Chlamydia trachomatis* infection. **Journal Medicina (Kaunas, Lithuania)**, v. 42, n. 10, p. 885-894, 2006.
21. ZHENG, H. Application of an Oligonucleotide array assay for rapid detecting and genotyping of *Chlamydia trachomatis* from urogenital specimens. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 57, p. 1-6, 2006.
22. APPLIED BIOSYSTEMS. **Guide to performing relative quantitation of gene expression using real time quantitative PCR**. Foster City, Califórnia, 2004.

8 INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

8.1 APRESENTAÇÃO DE TRABALHO NA XI REUNIÃO REGIONAL NORDESTE DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR – SBBQ E 4TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM IN BIOCHEMISTRY OF MACROMOLECULES AND BIOTECHNOLOGY (2012);

8.2 APRESENTAÇÃO DE TRABALHO NO IV SINATER – SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE DIAGNÓSTICO E TERAPÊUTICA E VII JORNADA CIENTÍFICA DO LIKA (2013);

8.3 PREMIAÇÃO DE TRABALHO NO IV SINATER – SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE DIAGNÓSTICO E TERAPÊUTICA E VII JORNADA CIENTÍFICA DO LIKA (2013).

ANEXOS**- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO:**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Análise da frequência de Papilomavírus humano e Chlamydia trachomatis em amostras anais de pacientes com lesão cervical.

Pesquisador: Keilla Maria Paz e Silva

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 07451012.3.0000.5208

Instituição Proponente: LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEISO ASAMI

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 140.834

Data da Relatoria: 07/11/2012

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um Projeto de Pesquisa a ser desenvolvido no LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEISO ASAMI(LIKA) tendo como Investigadora Principal a Dra Keilla Maria Paz e Silva. O estudo tem como finalidade promover uma Análise da frequência de Papilomavírus humano e Chlamydia trachomatis em amostras anais de pacientes com lesão cervical. As amostras a serem analisadas serão oriundas de um banco de amostras existente no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami(LIKA/UFPE). Cerca de 200 amostras (canal cervical e anal) de pacientes na faixa etária entre 18 e 60 anos, que foram coletadas no Hospital das Clínicas (HC-UFPE), serão analisadas. Serão excluídas da pesquisa amostras de pacientes HIV positivas, portadoras de doenças auto-imunes, grávidas e em puerpério. Tais amostras serão avaliadas quanto aos tipos de HPV infectantes e a presença de Chlamydia trachomatis, ambos através de técnicas de biologia molecular. Será realizado um teste de PCR para Chlamydia trachomatis. A análise dos dados será correlacionada com os dados laboratoriais e informações clínicas.

Objetivo da Pesquisa:

Análise da frequência de Papilomavírus humano e Chlamydia trachomatis em amostras anais de pacientes com lesão cervical.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os benefícios aos pacientes consistem no recebimento de informações a respeito dos genótipos

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 Fax: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



do HPV encontrados e da identificação de Chlamydia trachomatis. Tais informações serão fornecidas através de laudos a serem anexados aos prontuários, permitindo aos profissionais médicos um direcionamento adequado do tratamento. Como riscos (mínimos) a manipulação de material biológico há de ser considerada.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O Papilomavírus Humano (HPV) é considerado um agente sexualmente transmissível que se destaca por infectar a cérvix e o canal anal, concomitantemente. Este vírus está diretamente ligado ao desenvolvimento do câncer cervical, sendo atualmente discutido o seu papel no câncer de canal anal. A infecção viral dá-se por microlesões de mucosa, no entanto, a presença de determinadas bactérias, tais como Chlamydia trachomatis,

parecem favorecer a infectividade viral e, desta forma, o surgimento da lesão cervical.

O estudo submetido para apreciação desse CEP é importante visto que possibilitará a identificação de 24 diferentes genótipos de HPV, incluindo 6

genótipos de HPV de baixo risco (HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44/55) e 18 genótipos de HPV de alto risco (hpv 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56,

58, 59, 66, 68, 70, 73, 82). As etapas desse teste incluem uma reação de PCR; hibridização; lavagem e secagem; escaneamento e análise.

A presença de lesões cervicais e anais serão analisadas visando a identificação de Chlamydia trachomatis

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de Rosto, Cartas de Apresentação e de Anuência redigidas de forma adequada

Projeto no valor de R\$ 110.000,00 financiado pelo CNPq, constando termo de compromisso deste com a execução do projeto.

Curriculum vitae dos pesquisadores demonstram ampla capacitação técnica.

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão e o pesquisador está autorizado para

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 Fax: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



iniciar a coleta de dados.

Projeto foi avaliado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, por meio de ofício impresso, após a entrega do relatório final ao Comitê de Ética em Pesquisa/UFPE.

RECIFE, 07 de Novembro de 2012

Assinador por:
GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

- QUESTIONÁRIO PADRONIZADO PARA OBTENÇÃO DE INFORMAÇÕES SÓCIO DEMOGRÁFICAS, COMPORTAMENTAIS E REPRODUTIVAS DAS PACIENTES:

| Estudo da Infecção cervical e anal pelo HPV em mulheres HIV- positivas e negativas atendidas no HC-UFPE | | | |
|---|---|--|---|
| I - IDENTIFICAÇÃO | | | |
| 1 - Nome do Hospital <input type="text"/> | | 2 - Nome <input type="text"/> | |
| 3 - Data da Entrevista ____ / ____ / ____ | 4 - Número de Identificação na Pesquisa <input type="text"/> | 5 - Data de Nascimento ____ / ____ / ____ | 6 - Idade ____ |
| II - PROCEDÊNCIA | | | |
| 7 - Endereço <input type="text"/> | | 8 - N° <input type="text"/> | 9 - Apto <input type="text"/> |
| 10 - Bloco <input type="text"/> | | | |
| 11 - Bairro <input type="text"/> | 12 - Cidade <input type="text"/> | 13 - Estado <input type="text"/> | |
| 14 - CEP <input type="text"/> | 15 - Telefone Residencial <input type="text"/> | 16 - Celular <input type="text"/> | 17 - Telefone Vizinho / Orelhão <input type="text"/> |
| III - CONDIÇÕES SÓCIO ECONÔMICAS | | | |
| 18 - Você sabe ler ou escrever? 1 - Sim <input type="checkbox"/> 2 - Não <input type="checkbox"/> | | 19 - Qual foi a última série que você estudou e passou de ano? 1 - 1 a 9 série <input type="checkbox"/> 2 - 10 a 12 série 3 - 13 a 19 série | |
| 20 - Na semana passada, você trabalhou em alguma atividade em que recebeu dinheiro? 1 - Sim <input type="checkbox"/> 2 - Não <input type="checkbox"/> | | | |
| 21 - Qual é a sua ocupação? <input type="text"/> | | 22 - Você possui outro tipo de rendimento? 1 - Sim <input type="checkbox"/> 2 - Não <input type="checkbox"/> 8 - Não sabe informar | |
| | | 23 - Quanto de dinheiro você recebeu no mês passado? R\$ <input type="text"/> | |
| IV - HÁBITOS | | | |
| 24 - Na sua vida inteira, você já tomou pelo menos 8 drinks (Por drink, eu quero dizer meia cerveja, um copo de vinho ou uma dose de destilado (pinga, whisky, etc.) de qualquer tipo de bebida alcoólica)? 1 - Sim <input type="checkbox"/> 2 - Não (vai para questão 31) <input type="checkbox"/> | | 25 - Já houve algum período na sua vida em que em um ano você tomou pelo menos 8 drinks contendo álcool? 1 - Sim <input type="checkbox"/> 2 - Não (vai para questão 31) <input type="checkbox"/> | |
| 26 - Durante os últimos 30 dias, você bebeu pelo menos uma dose de alguma bebida alcoólica? 1 - Sim <input type="checkbox"/> 2 - Não <input type="checkbox"/> | | | |
| 27 - Durante os últimos 3 meses, com que frequência você geralmente ingeriu cerveja, vinho, pinga ou qualquer outro tipo de bebida alcoólica? 1 - Todos os dias 2 - Quase todos os dias 3 - 3 a 4 dias por semana 4 - 1 a 2 dias por semana | | 28 - Nos dias em que você bebeu nos últimos 3 meses quantos drinks você geralmente tomou num único dia? Por drink, eu quero dizer: meia cerveja, um copo de vinho ou uma dose de destilado (pinga, whisky, etc.). 5 - 2 a 3 dias por mês 6 - Uma vez por mês 7 - Menos de uma vez por mês 9 - Não se aplica <input type="checkbox"/> Quantidade de Drinks <input type="text"/> | |
| 29 - Você está atualmente em tratamento para um problema com o álcool? 1 - Sim <input type="checkbox"/> 2 - Não <input type="checkbox"/> | | 30 - Classificação quanto ao uso de bebida alcoólica: 1 - Abstinência 2 - Bebedor leve (o produto da questão 27 pela 28 menor de 14) 3 - Bebedor pesado (o produto da questão 27 pela 28, maior ou igual a 14) 4 - Dependente do álcool (Caso tenha respondido sim, na questão 29) | |
| 31 - Você fuma cigarros atualmente? 1 - Sim <input type="checkbox"/> 2 - Nunca fumei (vai para questão 36) 3 - Fumou, mas parou (vai para questão 33) 4 - Não informado | | 32 - Quantos cigarros você fuma? 1 - 1 a 10 cigarros (até meio maço) por dia <input type="text"/> 2 - 11 a 20 cigarros (meio a um maço) por dia 3 - mais de 20 cigarros (mais de um maço) 4 - de um a dez cigarros por semana 5 - não sei | |
| | | 33 - Com que idade começou a fumar? Anos 8 - não sabe informar <input type="text"/> | |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 34 - Há quanto tempo parou de fumar? Meses <input type="text"/> Anos <input type="text"/> 1 - Nunca parou 8 - Não sabe informar | 35 - Até agora, quantos cigarros você acha que fumou durante a sua vida inteira? 1 - entre 1 e 100 cigarros (até 5 maços) <input type="text"/> 2 - mais de 100 cigarros (mais de 5 maços) 3 - não sei | 36 - Você usa outros derivados do tabaco? 1 - Sim <input type="text"/> 2 - Não (vai a questão 38) 3 - Usou, mas parou (38) | 37 - Qual dos abaixo listados? 1 - cachimbo <input type="text"/> 2 - charuto 3 - fumo de rolo mascado 4 - cigarro de palha 5 - cigarrilha 6 - rapé |
| V - (USO DE DROGAS ILÍCITAS) | | | |
| 38 - Você já experimentou? | | | |
| 38.1 - MACONHA 1 - Nunca usei <input type="text"/> 2 - Fumei alguma vez na vida 3 - Não fumei no último ano 4 - Fumei no último ano | 38.2 - COCAÍNA 1 - Nunca usei <input type="text"/> 2 - Usei alguma vez na vida 3 - Não usei no último ano 4 - Usei no último ano | 38.3 - CRACK 1 - Nunca usei <input type="text"/> 2 - Usei alguma vez na vida 3 - Não usei no último ano 4 - Usei no último ano | 38.4 - COLA 1 - Nunca usei <input type="text"/> 2 - Usei alguma vez na vida 3 - Não usei no último ano 4 - Usei no último ano |
| VI - DADOS DA INFECÇÃO PELO HIV | | | |
| 39 - Há quanto tempo você ficou sabendo que está com HIV/aids? Meses <input type="text"/> Anos <input type="text"/> | 40 - Você toma algum remédio (coquetel) para tratar o HIV/aids? 1 - Sim <input type="text"/> 2 - Não (vai para questão 42) 8 - Não sabe informar (vai para questão 42) | 41 - Há quanto tempo você toma algum remédio (coquetel) para tratar o HIV/AIDS? Meses <input type="text"/> Anos <input type="text"/> | |
| VII - COMPORTAMENTO SEXUAL | | | |
| 42 - Você usa algum método para evitar filhos? 1 - Sim <input type="text"/> 2 - Não | 43 - Se sim, qual método utiliza? 1-Pílula <input type="text"/> 2-Injetável 3-DIU 4-Camisinha 5-Diafragma 6-Laqueadura tubária (Ligação das trompas) | 44 - Você tem quantos filhos? 1 - Um <input type="text"/> 2 - Nenhum 3 - dois 4 - Três 5 - Quatro ou mais | |
| 45 - Que idade você tinha quando teve sua 1ª relação sexual? 1 - < 13 anos <input type="text"/> 2 - 14 a 17 anos 3 - > 18 anos | 46 - Com quantas pessoas diferentes você teve relação sexual nos últimos 12 meses? 1 - < 3 <input type="text"/> 2 - 4 a 11 3 - > 11 | 47 - Desde que iniciou vida sexual, quantos parceiros você teve até hoje? 1 - < 3 <input type="text"/> 2 - 4 a 11 3 - > 11 | |
| 48 - Você já teve relação anal? 1 - Sim <input type="text"/> 2 - Não (vai para questão 55) | 49 - Que idade você tinha quando teve sua 1ª relação anal? 1 - < 13 anos <input type="text"/> 2 - 14 a 17 anos 3 - > 18 anos | 50 - Com quantas pessoas diferentes você teve relação anal nos últimos 12 meses? 1 - < 3 <input type="text"/> 2 - 4 a 11 3 - > 11 | |
| 51 - Com quantas pessoas diferentes você teve relação anal durante toda sua vida? 1 - < 3 <input type="text"/> 2 - 4 a 11 3 - > 11 | 52 - Com quantas pessoas diferentes você teve relação sexual anal nos últimos 12 meses? 1 - Sim <input type="text"/> 2 - Não 3 - Não lembra | 53 - Desde que iniciou vida sexual, quantos parceiros para sexo anal você teve até hoje? 1 - Sempre <input type="text"/> 2 - Maioria das vezes 3 - Raramente 4 - Nunca | |
| 54 - Qual a frequência das relações sexuais anais: 1 - Única vez <input type="text"/> 2 - Raras vezes 3 - Frequentemente 4 - Com a mesma frequência da relação vaginal | 55 - Você considera seu parceiro? 1 - Heterossexual <input type="text"/> 2 - Homossexual 3 - Bissexual 4 - Não deseja responder | 56 - Você conhece as infecções sexualmente transmissíveis? 1 - Sim <input type="text"/> 2 - Não | |
| 60 - Você já ouviu falar em condilomas (verrugas) genitais? 1 - Sim <input type="text"/> 2 - Não | 61 - Você já teve algum condiloma (verruga) na vulva ou próximo ao ânus em alguma época da sua vida? 1 - Sim <input type="text"/> 2 - Não | 62 - Atualmente você está com alguma dessas verrugas? 1 - Sim <input type="text"/> 2 - Não | |

Nome: _____

Nº identificação: _____

Data: _____

| | | | |
|--|--|---|--|
| Citologia cervical: 1. Normal 2. ASCUS 3. AGUS 4. HPV 5. LSIL (NIC I) 6. LIEAG (NIC II) 7. LIEAG (NIC III) 8. CA in situ 9. CA invasor 10. Insatisfatória | Colposcopia: 1. Sem atipias 2. EAB plano 3. EAB denso 4. Pontilhado fino 5. Pontilhado grosseiro 6. Mosaico fino 7. Mosaico grosseiro 8. Vasos atípicos 9. Parcial captação de iodo 10. Iodo negativo 11. Condiloma 12. Outras | Biópsia: 1. Normal 2. Condiloma 3. HPV 4. NIC I 5. NIC II 6. NIC III 7. CA In situ 8. CA invasor | PCR: 1. Negativo 2. Positivo Tipos: |
| Citologia anal: 11. Normal 12. ASCUS 13. HPV 14. LSIL (NIA I) 15. LIEAG (NIA II) 16. LIEAG (NIA III) 17. CA in situ 18. CA invasor 19. Insatisfatória | Anuscopia: 13. Sem atipias 14. EAB plano 15. EAB denso 16. Pontilhado fino 17. Pontilhado grosseiro 18. Mosaico fino 19. Mosaico grosseiro 20. Vasos atípicos 21. Parcial captação de iodo 22. Iodo negativo 23. Retite 24. Condiloma 25. Outras | Biópsia: 9. Normal 10. Condiloma 11. HPV 12. NIA I 13. NIA II 14. NIA III 15. CA In situ 16. CA invasor | PCR: 3. Negativo 4. Positivo Tipos: |
| CD₄⁺: 1. < 200/mm ³ 2. Entre 200 a 350/mm ³ 3. Entre 350 a 500/mm ³ 4. > 500/mm ³ | | Carga viral: 1. ≤ 500 cópias/ml 2. Entre 501 a 3 000 cópias/ml 3. Entre 3 000 a 10 000 cópias/ml 4. Entre 10 000 a 30 000 cópias/ml 5. Maior que 30 000 cópias/ml | |

| Data | / / | / / | / / | / / |
|---------------------|-----|-----|-----|-----|
| CD4 | | | | |
| CD8 | | | | |
| C. Viral | | | | |
| Citologia cervical | | | | |
| Colposcopia | | | | |
| Biópsia cervical | | | | |
| Tipo de HPV no colo | | | | |
| Citologia anal | | | | |
| Anuscopia | | | | |
| Biópsia anal | | | | |
| Tipo HPV no ânus | | | | |