



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA
À SAÚDE

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO TNF- α , β -DEFENSINAS 2 E 3 E
PROTEÍNA p16 NA MUCOSA ANAL DE PACIENTES
INFECTADOS PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO

MARIA JULLIANA GALVÃO NUNES

RECIFE

2017

MARIA JULLIANA GALVÃO NUNES

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO TNF- α , β -DEFENSINAS 2 E 3 E
PROTEÍNA p16 NA MUCOSA ANAL DE PACIENTES
INFECTADOS PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Biologia Aplicada à Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

RECIFE

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à saúde

REITOR(A)

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR(A)

Prof(a). Dra. Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR(A) PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETOR(A) DO CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

Prof(a). Dra. Maria Eduarda Larrazábal

VICE- DIRETOR(A) DO CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

Profa. Dra. Oliane Maria Correia Magalhães

COORDENADOR(A) DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

VICE- COORDENADOR(A) DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

Prof. Dr. João Ricardo Mendes de Oliveira

Catálogo na fonte

Elaine Barroso

CRB 1728

Nunes, Maria Julliana Galvão

Análise da expressão do TNF- α , β -Defensinas 2 e 3 e proteína p16 na mucosa anal de pacientes infectados pelo Papilomavírus humano / Maria Julliana Galvão Nunes- Recife: O Autor, 2017.

104 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Nicodemos Teles de Pontes Filho

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Biologia Aplicada à Saúde, 2017.**

Inclui referências, apêndices e anexo

**1. Papilomavírus 2. Ânus- câncer 3. Fator de necrose de tumor
I. Pontes Filho, Nicodemos Teles de (orientador) II. Título**

616.911

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-274

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: NUNES, Maria Julliana Galvão

Título: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO TNF- α , β -DEFENSINAS 2 E 3 E
PROTEÍNA p16 NA MUCOSA ANAL DE PACIENTES INFECTADOS PELO
PAPILOMAVÍRUS HUMANO.

Tese apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de
Doutor em Biologia Aplicada à Saúde

Aprovada em: 03/03/2017.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho (Orientador)
Departamento de Patologia – Universidade Federal de Pernambuco –UFPE

Profa. Dra. Carina Scanoni Maia
Departamento de Histologia – Universidade Federal de Pernambuco –UFPE

Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo
Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de Pernambuco –UFPE

Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo Júnior
Departamento de Patologia – Universidade Federal de Pernambuco -UFPE

Prof. Dr. Fabrício Oliveira Souto
Núcleo de Ciências da Vida (NCV) – Centro Acadêmico do Agreste – Universidade
Federal de Pernambuco-UFPE

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, minha base para todas as conquistas.

A minha família, meus pais, Edízia e Jaime, por estar sempre presentes nessa longa caminhada, me incentivando e apoiando a cada passo. Minha irmã, Janaina, pela companhia, ajuda e dedicação. Meu namorado, Eduardo Ramalho, pela paciência, ideias compartilhadas e incentivo.

Ao meu orientador, Dr. Nicodemos Pontes-Filho, grande incentivador e um dos responsáveis pelo meu crescimento profissional (10 anos de orientação)

A Dra. Graça Castor, ginecologista do Hospital de Câncer de Pernambuco, pela atenção, amizade, conselhos, enfim, sem ela tudo seria mais difícil.

A Dra Sandra Heráclio, ginecologista do IMIP, pelo compartilhamento de informações, amostras e troca de conhecimentos. Um anjo na minha pesquisa no momento certo.

Ao professor Fabrício Souto, pela orientação quando mais precisei.

A Luciana Castor e Tatiana Félix, pela contribuição no trabalho e pela oportunidade de tê-las orientado.

Aos integrantes do Setor de Patologia do LIKA (em especial Carmelita e Marina), do Serviço de Pélvis do Hospital de Câncer de Pernambuco e do grupo Prospecmol (Sandra).

Aos meus amigos de longa data, por tornar os dias mais leves.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco

E em especial as pacientes que aceitaram participar da pesquisa.

RESUMO

A incidência de carcinoma anal e lesões precursoras relacionadas tem aumentado no mundo, em homens e mulheres e a infecção persistente pelo Papilomavírus humano (HPV) desempenha um papel fundamental na carcinogênese anal. Os fatores de risco para o desenvolvimento de câncer anal incluem intercurso anal, múltiplos parceiros e infecção cervical pelo HPV. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a infecção simultânea pelo HPV na mucosa cervical e anal e elucidar a associação entre a expressão local da proteína p16, β -defensina-2 e 3 e TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) na mucosa anal e o grau de lesões anais associadas ao HPV. O grupo de estudo foi constituído por mulheres sexualmente ativas, com idade entre 18 e 60 anos. A coleta de células foi realizada a partir da mucosa cervical e anal com escova ginecológica, seguida de exame de colposcopia e anoscopia. O DNA foi extraído de amostras de células anais e cervicais e a PCR convencional foi realizada para detectar presença de HPV (tipos: 6, 16, 18, 31 e 33). A PCR em tempo real foi realizada utilizando primers específicos para a β -defensina 2, 3 e TNF- α . Os fragmentos de biopsia foram submetidos a coloração hematoxilina-eosina de rotina para a avaliação histológica e reação imunohistoquímica utilizando anticorpo anti-p16. Neste estudo, a positividade para p16 foi associada ao grupo com neoplasia, estatisticamente significativo ($p = 0,0002$) e padrão contínuo foi predominante. Cerca de 75% dos pacientes com neoplasia foram positivos para HPV e p16. Verificou-se alta taxa de infecção por HPV nas mucosas anal (70,52%), cervical (74,73%) e infecção simultânea cervical e anal (54,73%). A infecção simultânea (mucosa anal e cervical) pelo mesmo tipo de HPV foi observada em 17,30% dos pacientes. Entre os tipos de HPV identificados, o genótipo predominante nas amostras anal e cervical foi HPV6 (26,38%) e (19,71%), respectivamente. Nossos resultados também mostraram uma diminuição da expressão de TNF- α em lesões anais de alto grau em comparação com o normal HPV-positivo ($p < 0,0001$), enquanto que os níveis de expressão de β -defensina 3 aumentaram em pacientes de alto grau ($p = 0,0009$). A aquisição de infecção simultânea anal e cervical pode ocorrer por diferentes meios, mostrando que o canal anal é uma fonte de infecção.

Palavras-chave: Câncer anal. Papilomavirus humano. Defensinas. Fator de necrose tumoral-alfa.

ABSTRACT

The incidence of anal carcinoma and related precursor lesions have been increasing worldwide for both men and women. The human papillomaviruses (HPVs) play a fundamental role in anal carcinogenesis, through persistent infection. Women with cervical cancer and history anal intercourse have an increased risk of anal cancer. The aim of this study was to evaluate simultaneous HPV infection in cervical and anal mucosa and to elucidate the association between p16 protein, β -defensin-2, 3 and TNF- α (tumor necrosis factor alpha) expression local in the anal mucosa and the degree of HPV-associated anal lesions. Study group was composed of sexually active immunocompetent women. Cells collection was performed from cervical and anal mucosa with a brush, followed by anoscopy and colposcopy exam. DNA was extracted from anal and cervical cell samples and PCR was performed to detect HPV presence (types: 6, 16, 18, 31 and 33). Real-time PCR was performed using specific primers to β -defensin 2, 3 and TNF- α . Biopsy fragments were subjected to routine hematoxylin-eosin staining for the histological assessment and immunohistochemistry reaction using anti-p16 antibody. In our study, positivity for p16 was frequently associated with group with neoplasia, statistically significant ($P = 0.0002$) and continuous pattern was predominant. About 75% of patients with neoplasia were positive for HPV and p16. A high rate of HPV infection in anal (70.52%), cervical (74.73%) and simultaneous cervical and anal mucosa (54.73%) was found. Simultaneous infection (anal and cervical mucosa) by the same type HPV was observed in 17.30% of the patients. Among all HPV types identified, the predominant genotype in anal and cervical samples was HPV6 (26.38%) and (19.71%), respectively. Our findings also showed a decreased TNF- α expression in high-grade anal lesion compared to normal HPV-positive ($p < 0.0001$), whereas expression levels of β -defensin 3 were increased in high-grade patients ($p = 0.0009$). The acquisition of simultaneous infection anal and cervical may occur by different means, showing that the anal canal is also a source of infection.

Key-words: Anal cancer. Human papillomavirus. Defensins. Tumoral necrosis factor - alpha

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura anatômica do canal anal.....	14
Figura 2: Representação esquemática do genoma do HPV: genes precoces (E), tardios (L) e região controladora LCR)	22
Figura 3: Mecanismo de atividade antiviral das defensinas	30
Figura 4: Mecanismo de ação do TNF	34

Artigo I

Figura 1: p16 expression in anal mucosa	43
--	-----------

Artigo II

Figura 1: Graphic about HPV types identified in anal and cervical samples.....	64
---	-----------

Artigo III

Figura 1A: Relative expression of TNF in HPV-infected patients with different degrees of anal lesion.....	83
Figura 2A: Relative expression of β -defensin 2 in HPV-infected patients with different degrees of anal lesion	84
Figura 2B: Relative expression of β -defensin 3 in HPV-infected patients with different degrees of anal lesion	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Recomendações de exames para rastreamento de lesão anal	20
--	-----------

Tabela 2: Sequência dos primers específicos para identificação do HPV.....	38
---	-----------

Artigo I

Tabela 1: Patients profile and HPV infection	42
---	-----------

Tabela 2: p16 protein expression in identification of the degree of anal intraepithelial lesion	43
--	-----------

Tabela 3: Comparison between histological diagnosis HPV positive results and p16	44
---	-----------

Artigo II

Tabela 1: Comparison between histopathological diagnosis and HPV types found in anal and cervical mucosa	65
---	-----------

Tabela 2: Association between HPV infection and risk factors for cervical and anal neoplasia	66
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc- adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ASCUS – Atipia de significado indeterminado
FADD – Fas associado ao domínio de morte
hBD - β -defensinas
HIV- *Human Immunodeficiency Virus*
HPV – *Human Papillomavirus*
HSIL – Lesão intraepitelial de alto grau
IFN - Interferon
IgE: Imunoglobulina E
LSIL - Lesão intraepitelial de baixo grau
LT CD4+ - Linfócito T CD4+
LT CD8+ - Linfócito T CD8+
NIA - Neoplasia Intraepitelial Anal
NIC - Neoplasia Intraepitelial Cervical
PAMPs – padrões moleculares associados a patógenos
PDE4- fosfodiesterase tipo 4
PRR- Receptores de reconhecimento padrão
SCC - Carcinoma de Células Escamosas
SIDA - Síndrome da imunodeficiência adquirida
TACE - Enzima conversora do TNF
TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alpha
Th1 - T helper tipo I
Th2 - T helper tipo II
TLR – Toll-like receptor
TNFR1- Receptor tipo I do TNF
TNFR2 - Receptor tipo II do TNF
TRAF - Fatores associados ao receptor de TNF

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo Geral	13
2.2 Objetivos Específicos	13
3 REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1 Estrutura anatômica do canal anal	14
3.2 Câncer anal	15
3.2.1. <i>Classificação</i>	15
3.2.2 <i>Incidência</i>	16
3.2.3 <i>Fatores de risco</i>	17
3.2.4 <i>Diagnóstico e tratamento</i>	19
3.3 Papilomavírus humano (HPV)	21
3.3.1 <i>Classificação viral</i>	22
3.3.2 <i>Mecanismo de infecção</i>	23
3.4 Sistema imune e HPV	26
3.4.1 <i>Defensinas</i>	29
3.4.2 <i>Fator de Necrose Tumoral-alfa</i>	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 População	36
4.2 Obtenção das amostras	36
4.3 Procedimento imunohistoquímico	37
4.4 Extração de DNA	37
4.5 Análise molecular para identificação do HPV	37
4.6 PCR em tempo real	39
4.7 Análise Estatística	39
5 RESULTADOS	40
5.1 Artigo 1	40
5.2 Artigo 2	48
5.3 Artigo 3	67
6 CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS	86
APÊNDICES	96
Apêndice A	96
Apêndice B	99
ANEXOS	101
Anexo I	102

1 INTRODUÇÃO

A incidência mundial de câncer anal associada ao Papilomavirus humano (HPV) está aumentando, em homens e mulheres, embora ainda seja uma rara malignidade que representa cerca de 2% da malignidade colorretal. Os tumores malignos surgem em diferentes tipos de tecidos, sendo o carcinoma epidermóide responsável por 85% dos casos (INCA, 2016; CHESSON *et al.*, 2011).

O HPV apresenta tropismo pela pele e membranas mucosas, onde o vírus pode mostrar um foco de atividade. O canal anal, assim como todo o trato genital, pode fazer parte do circuito viral do HPV ou até mesmo ser um reservatório para o vírus, devido à presença de epitélio escamoso (DALING *et al.*, 2004; PALEFSKY, 2010).

A infecção pelo HPV é um dos fatores de risco para o desenvolvimento de Neoplasia Intraepitelial Anal (NIA). Outros fatores incluem história de intercurso anal, histórico de lesão provocada por HPV em outros sítios (vulvar, vaginal ou cervical), imunodeficiência (infecção por HIV) e tabagismo (PALEFSKY, 2010; DALING *et al.*, 2004; MC CLOSKEY; METCALF, 2007). Mulheres com infecções por HPV cervical têm um risco três vezes maior de infecção anal simultânea (EDGREN, SPAREN, 2007).

Embora o HPV seja o agente etiológico de alguns tipos de câncer, a maioria das mulheres infectadas não desenvolve a doença. Em alguns casos a infecção desaparece sem nenhum tratamento e o vírus é eliminado devido à ação do sistema imune, em um período de 12 a 24 meses após o início da infecção (HO *et al.*, 1998).

O sistema imune do hospedeiro desempenha um importante papel no controle da infecção pelo HPV. Em hospedeiros imunocompetentes, a infecção viral leva a uma resposta imunológica com consequente produção e liberação de várias citocinas que apresentam ação sobre a expressão gênica e crescimento de linhagens celulares infectadas por HPV.

Os fatores associados à persistência da infecção e progressão da doença não são completamente compreendidos, no entanto há evidências de que a resposta imune do hospedeiro afete a susceptibilidade às lesões e sua progressão. Tais fatos tornam interessante o estudo de fatores do sistema imune com o intuito de esclarecer os mecanismos imunológicos e avaliar a susceptibilidade ao HPV. No presente estudo foram analisados tipos de HPV em amostras cervicais e anais de mulheres imunocompetentes.

Foi avaliada a expressão de β -defensinas- 2 e -3 e Fator de necrose tumoral (TNF- α) nas amostras anais de mulheres com diferentes graus de lesões provocadas pelo HPV.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a presença do HPV e a expressão do TNF- α , β -defensinas 2 e 3 e da proteína p16 em amostras anais de mulheres submetidas a anuscopia.

2.2 Objetivos Específicos:

- Identificar a presença do HPV 6, 16, 18, 31 e 33 na mucosa anal e cervical;
- Classificar as lesões anais e cervicais histopatológicas;
- Correlacionar perfil das pacientes com a positividade para HPV;
- Correlacionar o tipo de HPV e o grau de lesão anal e cervical;
- Analisar os níveis de expressão gênica do TNF- α , β -defensinas 2 e 3 e correlacionar com o grau de lesão anal.
- Analisar a expressão da proteína p16 e correlacionar com o grau de lesão anal.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Estrutura anatômica do canal anal

Anatomicamente, o canal anal inclui 3 tipos de epitélio, glandular, de transição e escamoso. O canal anal tem aproximadamente 4 cm de comprimento a partir da margem anal até a zona de transição e é composto por células escamosas. A zona de transição é a junção entre o epitélio colunar retal e o epitélio escamoso anal, semelhante à zona de transição do colo do útero. A linha pectínea (também chamado de linha dentada) está localizada na extremidade proximal do ânus. A zona de transição por vezes é considerada sinônimo da linha dentada, devido à sua proximidade, é considerada parte do ânus, e contém células de transição (Figura 1) (NETTER, 2003; RYAN, 2008).

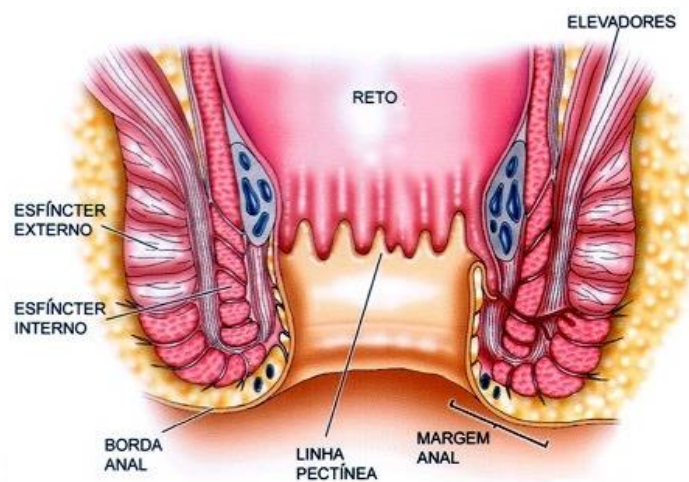


Figura 1: Estrutura anatômica do canal anal

Fonte: endoclin.med.br

O canal anal possui 5 camadas que podem ser descritas usando ultrassonografia endoanal: a mucosa, submucosa, interior do esfíncter anal, plano interesfincteriano, e esfíncter anal externo. O revestimento muscular do canal anal é mais fino que no reto e forma na extremidade superior o esfíncter anal interno, constituído de músculo liso. Na

extremidade inferior existe o esfíncter anal externo, composto de músculo esquelético. O revestimento mucoso divide-se em duas partes: parte superior – epitélio cilíndrico simples e parte inferior - epitélio pavimentoso estratificado (WANG *et al.*, 2015, WISE, 2008).

3.2 Câncer Anal

3.2.1 Classificação

Os tumores que surgem a partir da mucosa de transição ou escamosa do ânus são denominadas carcinoma de células escamosas (SCC). Estes termos, câncer anal e SCC, são utilizados indistintamente na maioria dos estudos. Outros cancers também são categorizados como câncer anal devido sua localização; estes incluem carcinomas cloacogênico (subconjunto de SCC), desenvolvido na zona de transição; adenocarcinomas, principalmente no reto; carcinomas basocelulares, derivado a partir da pele na área perianal; e melanoma maligno, pele ou mucosa anal (RYAN, 2008).

Os tumores anais podem ocorrer na borda anal ou no canal anal, até a transição com o reto. Os tumores que surgem na borda anal são lesões dermatológicas e, como tal, podem ser tratados apenas com excisão local. Por outro lado, os tumores que surgem no canal anal ou na zona de transição entre este e o reto podem ter tratamentos mais agressivos (RYAN; COMPTON; MAYER, 2000).

Alterações displásicas em diagnóstico histológico são classificadas como neoplasia intraepitelial anal (NIA). De acordo com a gravidade da NIA, esta é classificada como NIA-I (NIA de baixo grau), NIA-II e NIA-III (NIA de alto grau-NIA) (DARRAGH *et al.*, 2012) e isto pode estar associado aos subtipos de HPV infectante.

NIA I é uma forma de displasia de baixo grau com anormalidades nucleares que estão confinadas ao terço inferior do epitélio e classificada como lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL). NIA II e NIA III representam alto grau de displasia envolvendo os dois terços inferiores e espessura total do epitélio, respectivamente, e também é referido como lesão intraepitelial de alto grau (HSIL) ou "carcinoma in situ" (DARRAGH *et al.*, 2012; SCHOLEFIELD *et al.*, 2011; STEELE *et al.*, 2012).

O sistema de estadiamento utilizado é o preconizado pela União Internacional Contra o Câncer (UICC), denominado Sistema **TNM** de Classificação dos Tumores. Este sistema baseia-se na extensão anatômica da doença, levando em conta as características

do tumor primário (**T**), características dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza (**N**) e a presença ou ausência de metástase (**M**).

No câncer anal o sistema TNM é empregado, com estadiamento local por ressonância magnética da pelve, e tomografia computadorizada do tórax e abdome para avaliar metástases à distância (GLYNNE-JONES *et al.*, 2010). O tamanho do tumor é o fator de prognóstico mais importante. Lesões celulares menores que 2 cm de diâmetro podem ser curadas em cerca de 80% dos casos, já os tumores ≥ 5 cm, a cura ocorre em menos de 50% dos casos. A probabilidade de envolvimento ganglionar também está diretamente relacionada com o tamanho do tumor (RYAN *et al.*, 2000).

A drenagem linfática no câncer anal também depende da localização do tumor. Quando localizado abaixo da linha dentada, a drenagem é através dos gânglios inguinais e femorais. Esses gânglios são raramente envolvidos na drenagem de carcinomas retais, e pacientes com adenopatia inguinal sem causa aparente devem ser submetidos a um exame cuidadoso do canal anal (BEAHRIS *et al.*, 1976; GREENALL *et al.*, 1985).

3.2.2 Incidência

O câncer anal é uma rara malignidade responsável por cerca de 2% de malignidade colorretal. A incidência do câncer anal está aumentando na população em geral, porém é mais elevada em alguns grupos de risco. Infecção por HIV e intercurso anal receptivo estão associados a maior incidência. Sendo então, homossexuais masculinos com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), apresentam maior frequência de casos de carcinoma de células escamosas anal (VAN DER ZEE *et al.*, 2013). Porém, as lesões intraepiteliais também têm sido encontradas nos pacientes masculinos homossexuais HIV-negativo (MC CLOSKEY; METCALF, 2007) assim como em mulheres HIV-negativo (CHANG *et al.*, 2002).

Um enigma tem sido a alta prevalência de NIA de alto grau em homossexuais masculino HIV positivo, mas a incidência relativamente baixa de câncer anal. Se 30% de todos NIA de alto grau iria evoluir para carcinoma de células escamosas anal (proporção de progressão de um NIC-III para câncer cervical segundo McCredie *et al.*, 2008), então seria de esperar uma incidência mais elevada de câncer anal do que

realmente é observado. Provavelmente, a taxa de progressão da NIA de alto grau para anal SCC é inferior do que do NIC-III ao câncer cervical, mas bons dados ainda são escassos. Machalek *et al.*, (2012) calculou uma taxa de progressão anual teórica de NIA de alto grau para câncer anal de 1/377.

Um aumento na incidência SCC anal pode ser associado a presença de veias dilatadas e doença inflamatória na região anal (LEE *et al.*, 2013), isto tem sido observado em pacientes com lesão inflamatória anal (NORDENVALL, 2006). A constipação crônica pode contribuir para tal associação, e é importante na patogênese do quadro inflamatório anal (LOHSIRIWAT, 2012).

3.2.3 Fatores de risco

Alguns fatores de risco para o desenvolvimento de NIA incluem história de intercurso anal, histórico de infecção pelo HPV em outros sítios (vulvar, vaginal ou cervical), infecção por HIV e tabagismo (COFFEY *et al.*, 2015; PALEFSKY, 2010; DALING *et al.*, 2004; MC CLOSKEY; METCALF, 2007).

Contudo, a infecção pelo HPV é o fator de risco mais comum para o desenvolvimento de NIA (GARRETT *et al.*, 2010). A NIA-III é considerada como precursora para o carcinoma de células escamosas (SCC), o tipo histológico mais comum do câncer anal, surge em áreas de NIA de alto grau, como consequência de infecção crônica pelo HPV e parece ter relação com alta carga do vírus na infecção (FOX, 2006).

Intercurso anal é um fator de risco para a infecção pelo HPV, mulheres com câncer anal comumente reportam intercurso anal (16.9%) comparado com mulheres sem câncer anal (11%) (DALING *et al.*, 2004). O intercurso anal em mulheres jovens (<30 anos), com histórico de doença sexualmente transmissível e múltiplos parceiros também foi associado com um alto risco de câncer anal, no entanto, menos de 10% das mulheres relatam esses fatores de risco (RYAN *et al.*, 2000).

A infecção anal pode ser adquirida pelo contato com outras áreas genitais infectadas, em particular a vulva nas mulheres e o pênis nos homens. Contaminação devido à proximidade da região anal com lesões provocadas pelo HPV em vulva, região perianal e cervical deve ser considerada, bem como a possibilidade de auto-contaminação (GIRALDO *et al.*, 2009; PALEFSKY, 2010). O canal anal, assim como todo o trato genital, pode fazer parte do circuito viral do HPV ou até mesmo ser um reservatório para

o vírus, devido à presença de epitélio escamoso (PALEFSKY, 2010). A região anal, assim como, o colo do útero e amígdalas são exemplos de zonas propensas a carcinogênese pelo HPV (MOSCICKI *et al.*, 2006).

A imunossupressão crônica é um fator de risco para vários tipos de carcinomas de células escamosas, incluindo aqueles do canal anal. Uma questão interessante é se a prevalência de infecções por HPV de alto risco em pacientes HIV-positivo é maior devido a imunodeficiência relacionada ou causada pelo comportamento sexual de risco, levando a uma maior aquisição de doenças sexualmente transmissíveis, como HPV (VAN DER LOEFF *et al.*, 2014). A imunossupressão induzida pela infecção por HIV permite a replicação, infecção pelo HPV, com maior probabilidade de subsequente desenvolvimento de câncer anal, que em indivíduos imunocompetentes possivelmente apresentaria como lesão de baixo grau (PIKETTY *et al.*, 2003).

Um fator de risco adicional na susceptibilidade a infecção é o tabagismo, que possui efeitos deletérios sobre imunidade sistêmica e local, uma vez que suprime respostas imunes mediada por células e humoral, podendo levar ao aumento da susceptibilidade à infecção pelo HPV e desenvolvimento de verrugas anogenitais (SOPORE 2002). Subprodutos carcinogênicos do tabaco foram encontrados no muco cervical de fumantes, entre eles a nicotina e a cotidina. Estas substâncias podem danificar diretamente o DNA das células cervicais ou comprometer a resposta imunológica local, facilitando a persistência do HPV (CASTELLSAGUE, MUNOZ, 2003).

Alterações encontradas no sistema imune periférico de pacientes fumantes incluem o aumento do número de linfócitos T citotóxico/supressores, a diminuição do número de linfócitos T helper, significativo decréscimo de células natural killer e baixo nível sanguíneo de imunoglobulinas, exceto IgE, a qual é elevada (JOHNSON *et al.*, 1990).

O tabagismo aumenta o risco de câncer anal de 2 a 5 vezes, de forma independente das práticas sexuais. Esta relação é suportada pelo fato do câncer de pulmão ser duas vezes mais frequente em pacientes com história de câncer anal na população em geral (DALING *et al.*, 1992).

3.2.4 Diagnóstico e tratamento

O câncer anal apresenta como sintomatologia: dor anal, irritação, sangramento e sensação de massa retal, porém cerca de 20% dos pacientes não apresentam sintomas até o momento do diagnóstico (ELIASHVILI; LANDRY; MATTHEWS, 2002).

O rastreamento para SCC é proposto apenas para grupos de risco e não para população em geral. Os grupos de risco em potencial são: receptores de transplantes de órgãos sólidos, homossexuais masculino, mulheres com histórico de tumor ginecológico induzido por HPV e homens e mulheres infectados pelo HIV (VAN DEER LOEF *et al.*, 2014). Castor *et al.*, (2010), afirmam a importância de programa de rastreamento de lesões anais em pacientes com lesões genitais de alto grau associadas ao HPV.

O rastreamento apropriado do câncer anal deveria sempre incluir a inspeção visual da linha de base da genitália externa, palpação e exame de toque retal para identificar anormalidades como verrugas, lesões que apresentam sangramento, de origem incerta, com placas hipo ou hiperpigmentadas e lesões internas palpáveis. O toque retal, exame com lubrificação, deve ser realizado após o teste de Papanicolau anal pois a lubrificação pode interferir na identificação das células (The Northwest Pennsylvania Rural AIDS Alliance, 2008).

A citologia anal pode selecionar pacientes para colposcopia anal e biópsias, evitando a evolução para o carcinoma anal. Anormalidades citológicas anais, visualizadas em testes de Papanicolau, parecem ser altamente preditivas de displasia anal em diagnóstico histológico (KREUTER; WIELAND, 2009).

Um estudo sobre a prevalência de citologia anal anormal em mulheres com neoplasia intraepitelial do trato genital inferior e câncer observou citologia anal positiva em 9% dos pacientes, porém houve uma alta taxa de positividade para HPV anal por análise do DNA viral (PARK *et al.*, 2009). Apenas a presença viral não é indicativa de lesão, podendo esta ser confirmada por anoscopia.

A anoscopia de alta resolução consiste na avaliação do canal anal e área perianal, utilizando lentes de aumento e ácido acético à 4%. É realizada a observação da “zona de transformação” do epitélio colunar do reto inferior para o epitélio escamoso do canal anal. (COUTINHO *et al.*, 2006). O exame não é de uso comum na rotina do especialista, o que pode levar a doença a ser subestimada como diagnóstico etiológico diferencial de prurido anal (AMARAL *et al.*, 2009). A anoscopia é essencial para definir a localização da lesão dentro do canal anal e guiar a realização da biópsia para confirmar o diagnóstico.

Exames como citologia anal e teste molecular para identificação do DNA viral são utilizados como rastreamento inicial. De acordo com os resultados destes testes são propostas recomendações, como mostra a tabela abaixo (tabela 1):

Citologia anal (Teste de Papanicolaou)	Teste HPV	Recomendações
Negativo	Negativo	Rastreamento anual
Negativo	Positivo	Rastreamento a cada 6 meses
ASCUS	Negativo	Rastreamento a cada 6 meses
ASCUS	Positivo	Encaminhar para anuscopia de alta resolução
LSIL ou HSIL	Negativo ou positivo	Encaminhar para anuscopia de alta resolução

Tabela 1: Recomendações de exames para rastreamento de lesão anal. (Adaptada de Ortoski; Kell, 2011).

O tratamento do câncer anal foi revolucionado em 1970 por Nigro e col que demonstrou que a terapia por quimiorradiação não só conseguia sobrevivência e taxas de recorrência similares as terapias cirúrgicas, como também preservava a função do esfíncter. Desde então, modificações tem sido feita, a partir deste tratamento, numa modalidade combinada para o tratamento ideal (BUROKER *et al.*, 1977; NIGRO *et al.*, 1981). E até o momento radiação combinada com 5-fluorouracilo (5-FU) e mitomicina ainda é considerada o padrão.

Lesões intraepiteliais anais de baixo grau (LSIL anal) têm resolução espontânea em grande parte dos casos. As lesões intraepiteliais anais de alto grau (HSIL anal) são mais propensas a progressão para tumor invasivo, com clara associação com os subtipos de HPV de alto risco (HOOTS *et al.*, 2009).

O tratamento de lesões intraepiteliais, como LSIL, por ter um baixo potencial maligno pode ser a “espera vigilante” (com anuscopia de alta resolução em intervalos de 6 a 12 meses). Se necessário, lesões internas podem ser tratadas com ácido tricloroacético (ATA), muitas vezes requer várias aplicações (PALEFSKY, RUBIN, 2009). Um dos tratamentos para lesões externas é a podofilotoxina, um extrato purificado da planta *Podophyllum* que se liga aos microtúbulos celulares provocando inibição da mitose. Apresenta baixas taxas de recorrência (LACEY *et al.*, 2003).

A terapia tópica pode ser eficaz para HSIL. O 5-fluorouracilo (5-FU) creme tem sido usado com boa resposta. No entanto, a recorrência pode ocorrer quando apresentam áreas mal definidas de envolvimento, envolvimento folicular, baixa resposta imune e infecção recorrente ou persistente pelo HPV (GRAHAM *et al.*, 2005).

Há controvérsias sobre se o tratamento de NIA de alto grau é um benefício pela opção de excisão cirúrgica onde cerca de 15% dos pacientes desenvolvem estenose anal secundária ou incontinência fecal e 63 % apresentam recorrência da doença dentro de 1 ano (SIMPSON *et al.*, 2011). Outras opções de tratamento de acordo com o grau da lesão incluem uma variedade de tópicos, imiquimod, ácido tricloroacético (ATA) ou 5-fluorouracil, ou ablativo (coagulação infravermelha (GOLDSTONE *et al.*, 2011)), terapias a laser ou eletrocauterização (MARKS *et al.*, 2012).

O imiquimod é uma terapia que atua como um imunomodulador. Acredita-se que atua através da ligação ao receptor toll like (TLR) 7, ativando células dendríticas, macrófagos, e queratinócitos para liberar interferons do tipo I (IFN) e outras citocinas pró-inflamatórias para aprimorar a atividade citolítica contra o HPV (STEFANAKI *et al.*, 2008; SCHÖFER, 2007).

3.3 Papilomavírus humano (HPV)

O Papilomavírus humano (HPV) é um vírus não envelopado com DNA de fita dupla circular que contém cerca de 8.000 pares de bases, pertence à família *Papillomaviridae*, um grupo heterogêneo de vírus capaz de causar uma variedade de lesões epiteliais (SCULLY, 2002). O genoma do HPV divide-se em três regiões: região tardia (L), região precoce (E) e região reguladora (LCR). A região tardia possui genes estruturais (L1 e L2) envolvidos na estrutura do capsídeo. A região precoce possui genes relacionados ao processo de replicação viral (E1-E7), onde são distribuídos nas seguintes funções: replicação viral (E1, E2), regulação da expressão (E2), montagem e liberação do vírus (E4) e imortalização e transformação celular (E5, E6 e E7) (TROTIER; FRANCO, 2006; MONK; TEWARI, 2007). A região não-codificante reguladora (LCR) contém a sequência de origem de replicação (ORI) e a maioria dos promotores de transcrição (TERHUNE *et al.*, 2001) (Figura 2).

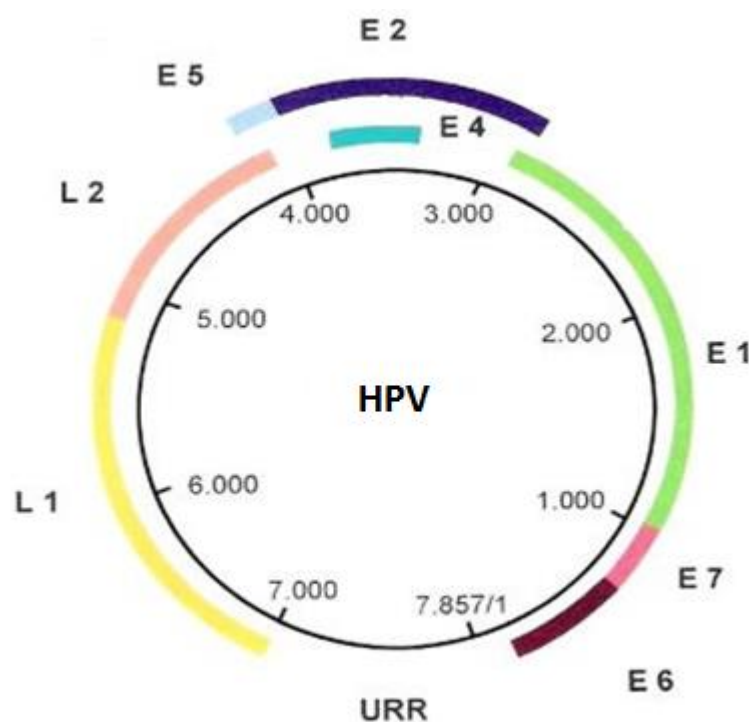


Figura 2. Representação esquemática do genoma do HPV: genes precoces (E), tardios (L) e região controladora (LCR). Fonte: Munoz *et al.*, 2006.

Os genes E6 e E7 dão origem as oncoproteínas de mesmo nome responsáveis pelo processo de transformação celular. A oncoproteína E6 apresenta localização nuclear e possui aproximadamente 18kDa (MOODY *et al.*, 2010), sendo capaz de interagir com várias proteínas relacionadas ao ciclo celular. A oncoproteína E7 contribui para a imortalização celular devido à sua capacidade de interagir com a proteína supressora tumoral do retinoblastoma (pRB), assim como membros de sua família, a p107 e p130 (DYSON *et al.* 1998).

3.3.1 Classificação viral

São conhecidos cerca de 130 genótipos do HPV dos quais aproximadamente 40 podem infectar o trato anogenital. O HPV pode causar câncer de pênis, vagina, vulva, ânus, região perianal, cabeça e pescoço. Na região anogenital pode causar verrugas

genitais e/ou lesões com possibilidades de progressão para o câncer (ESQUENAZI *et al.*, 2010; ZUR HAUSEN, 2009).

Os HPVs podem ser classificados em baixo-risco e alto-risco (oncogênico) de acordo com o grau de malignidade que provocam na região infectada. Dentre os genótipos de baixo risco podemos destacar o HPV 6, 11, 40, 42, 43 e 44, que podem causar lesões benignas genitais e verrugas na pele, os de alto risco (HPV 16, 18, 31, 33, 53, 56 entre outros) podemos citar o HPV 16 e 18, como mais prevalentes que estão associados ao desenvolvimento de câncer, principalmente na região cervical (DALSTEIN *et al.*, 2009). A persistência viral em 10 a 30% dos casos é mais comum com os tipos oncogênicos e está associada ao desenvolvimento de lesão escamosa intraepitelial (KOUTSKY *et al.*, 1997).

O genoma do HPV pode mudar por mutações pontuais, deleções e inserções, estas podem tornar-se permanentes numa população, se selecionadas positivamente ou, se forem funcionalmente neutros, pela expansão seletiva da população hospedeira infectada. Quando mutações nos oncogenes E6, E7 e L1 ocorrem com uma taxa de distância maior que 10% em comparação com outros tipos de HPV conhecidos, se tem um novo tipo viral (DE VILLIERS, 2004). Enquanto isso, variantes de um mesmo tipo viral diferem em 2% em regiões codificante e em 5% em regiões não codificantes em suas sequências de nucleotídeos em comparação com a sequência de referência (BERNARD *et al.*, 2010)

3.3.2 Mecanismo de infecção

Os HPVs são epiteliotrópicos e infectam as células indiferenciadas proliferativas da camada basal do epitélio escamoso através de receptores de HPV identificados como duas moléculas da família das integrinas $\alpha 6\beta 1$ e $\alpha 6\beta 4$, expressas na superfície das células basais (EVANDER *et al.*, 1997). O vírus penetra nestas células após perda da solução de continuidade do tecido, quando então estabelece-se uma relação entre o ciclo viral e a diferenciação da célula infectada (BETIOL; VILLA; SICHERO, 2013).

Nas células da camada basal o vírus pode permanecer em estado latente, ou replicar, podendo infectar outras células e interromper o processo de apoptose, ascender o epitélio e provocar lesões subclínicas e clínicas. As células infectadas tornam-se geneticamente instáveis devido à interferência das oncoproteínas virais em diversos mecanismos celulares, como o reparo do DNA, o controle do ciclo celular, o fuso mitótico, a apoptose ou a estabilização dos telômeros (ITO, 2010).

O DNA viral dentro da célula do hospedeiro pode assumir duas formas: a epissomal e a integrada. Na forma epissomal, o DNA viral permanece circular na célula do hospedeiro, não estando integrado ao DNA da mesma. Essa forma é encontrada nas verrugas genitais e lesões de menor gravidade. O DNA na forma epissomal é responsável apenas pela replicação viral. No ciclo normal de infecção por HPV, há um baixo número de cópias do DNA viral na forma epissomal e baixo nível de expressão de E6, E7, E1 e E2, suficientes apenas para a manutenção do genoma viral. (FERRAZ *et al.*, 2012).

Para as partículas virais serem produzidas, ocorre a amplificação do genoma do HPV e montagem das partículas nas camadas médias e superiores do epitélio. Os genes L1 e L2 codificam proteínas do capsídeo viral e são expressos nos grupos de células com maior expressão de E4, responsável por alterar o citoesqueleto, maturação e replicação viral. A montagem dos vírus e o empacotamento ocorrem na camada superficial do epitélio e a formação e liberação de partículas virais completas ocorrem na superfície do epitélio sem que haja lise celular (FERRAZ *et al.*, 2012).

Para a integração do genoma circular ao DNA da célula hospedeira, esse deve ser linearizado, pela quebra do DNA viral entre a região E1 e L1, resultando na ruptura ou perda do gene E2, sendo encontrado nas lesões de maior gravidade, como o carcinoma “*in situ*” e invasivo (ALBRING; BRENTANO; VARGAS, 2006).

A transformação maligna nas células infectadas depende da integração dos genes E6 e E7 do HPV oncogênico ao genoma do hospedeiro, à persistência da infecção, à baixa de imunidade celular e consequente expressão das proteínas E6 e E7, produtos de oncogenes virais, que interagem com proteínas reguladoras do ciclo celular, como p53 e pRb (proteína do retinoblastoma) (SOUTO; FALHARI; CRUZ, 2005; STEENBERGEN *et al.*, 2005).

A inativação de p53 e proteínas pRb através do mecanismo de carcinogênese do HPV leva a uma desregulação do ciclo celular e expressão anormal de vários marcadores de proliferação celular. Em decorrência dessa interação a célula é conduzida à transformação, imortalização celular e, posteriormente, ao câncer (SOUTO; FALHARI; CRUZ, 2005).

A indução para fase S do ciclo celular de maneira não-programada e descontrolada normalmente leva a apoptose devido ativação da p53, entretanto a oncoproteína viral E6 liga-se a essa proteína supressora tumoral e a degrada por ubiquitinação proteossômica (HUIBREGTSE *et al.*, 1991), levando à resistência à apoptose. Ela também pode ligar-

se a proteína BAK (proteína pró-apoptose), fortalecendo o processo de resistência a apoptose e ao aumento da instabilidade cromossômica (ZUR HAUSEN, 2002).

O gene P16INK4a codifica a proteína p16 a qual regula negativamente a progressão do ciclo celular, atuando como inibidor de CDK 4/6 e, desta forma, bloqueando a fosforilação da proteína do retinoblastoma (pRB). A pRB, por sua vez, exerce efeitos antiproliferativos por meio do controle da transição entre as fases G1 e S do ciclo celular. Em sua forma ativa, hipofosforilada, pRb está ligada ao fator de transcrição E2F, bloqueando sua ação e mantendo a célula na fase G1. Quando fosforilada, a pRB torna-se inativa e libera o fator E2F, o qual induz a progressão do ciclo celular para a fase S (FERRAZ *et al.*, 2012; OGUEJIOFOR *et al.*, 2013; PANNONE *et al.*, 2012).

A ligação da E7 de alto risco a pRB interrompe o complexo RB-E2F, liberando o fator E2F, desencadeando o processo de replicação do DNA e aumentando a proliferação das células do epitélio infectado. O gene P16INK4a, por sua vez, tem sua expressão controlada por *feedback* negativo exercido pela pRB. Assim, a inativação de pRB por E7 resulta no acúmulo de p16 nas células infectadas (FERRAZ *et al.*, 2012; OGUEJIOFOR *et al.*, 2013; PANNONE *et al.*, 2012).

A proteína p16INK4a é codificada no gene 9p21 e a alta frequência das deleções de p16 em linhagens tumorais sugere um papel importante do p16 na carcinogênese (NIELSEN *et al.*, 1999). A carcinogênese causada pelo HPV é caracterizada por níveis aumentados de imunoexpressão da proteína p16. Por conseguinte, p16 pode atuar como um marcador de integração de HPV com o genoma do hospedeiro, servindo como um marcador da oncogênese de HPV (KLAES *et al.*, 2002; MÜNGER, HOWLEY, 2002)

As principais aplicações diagnósticas do teste de imunohistoquímica para p16 estão no campo da patologia ginecológica. A expressão da p16INK4a foi investigada mais extensamente na patologia cervical, embora estejam surgindo novas aplicações deste marcador em várias localizações do trato genital feminino. Além disto, o papel da p16 na NIA tem sido avaliado em homens, e os dados sobre as mulheres acerca da expressão anal ainda são escassos (PANDHI *et al.*, 2016).

3.4 Sistema imune e HPV

Após infecção pelo HPV, conforme variáveis pertinentes ao vírus e ao indivíduo, Em alguns casos o vírus pode ser eliminado, sem tratamento, devido à ação do sistema imunológico, em um período de 12 a 24 meses após o diagnóstico inicial (HO *et al.*, 1998).

A história natural da infecção por HPV inclui a transmissão do vírus, desenvolvimento de infecção persistente e a interação com o sistema imunológico, que tem papel crucial na progressão de uma lesão para o câncer. Deve ser levado em conta, que a associação entre a infecção por HPV e o aparecimento de tumores acontece em um contexto mais amplo do que a simples presença do vírus (AHDIED *et al.*, 2001). A resposta imune desempenha um papel importante na persistência das infecções, algumas não são eliminadas e persistem durante vários anos, tornando-se um fator de risco adicional para o desenvolvimento do câncer (ZUR HAUSEN, 1996).

A primeira linha de defesa contra qualquer patógeno é a resistência inespecífica (imunidade inata) fornecida pela pele e superfície mucosa (FRAZER, 2004). Durante as fases iniciais de uma infecção por HPV, a resposta imune inata do hospedeiro torna-se a primeira linha de defesa contra a infecção. Células dendríticas (DC), Células de Langerhans (LC), natural killer (NK), células T natural killer (NKT), entre outros, são células importantes envolvidas na promoção de uma boa resposta imune contra a infecção pelo HPV (RENOUX *et al.*, 2011; AMADOR-MOLINA *et al.*, 2013).

Esses tipos celulares possuem receptores denominados receptores de reconhecimento padrão (PRRs), que são capazes de reconhecer diferentes microrganismos. O reconhecimento dos microrganismos pelos PRRs é possível porque os mesmos se ligam em moléculas na superfície desses patógenos que possuem padrões moleculares comuns (PAMPs – padrões moleculares associados a patógenos) e que não são apresentados pelas células do hospedeiro (MICHELIN *et al.*, 2008). Um exemplo de PRRs são os Toll-like receptor (TLR).

A maior parte dos tipos celulares citados pode promover um processo pró-inflamatório mediado por citocinas, que liga a resposta inata com a adaptativa. Os linfócitos T são as principais células no sistema imune adaptativo e classificam-se em linfócitos T CD4⁺ (LT CD4⁺) e linfócitos T CD8⁺ (LT CD8⁺). A ativação do LT CD4⁺ resulta na secreção de uma variedade de citocinas. O padrão de expressão destas citocinas define dois subtipos de LT CD4⁺, conhecidos como Th1 e Th2. As células Th1 secretam

citocinas responsáveis pela ativação de células citotóxicas efetoras (macrófagos, células Natural Killer e LT CD8+) gerando a resposta imune mediada por células a patógenos intracelulares. As células Th2 secretam citocinas que estimulam a diferenciação de linfócitos B a plasmócitos, promovendo a imunidade humoral (LISINGEN, 2008).

Teoricamente, o vírus deveria ser detectado pela célula apresentadora de antígenos (APC) do epitélio escamoso, a célula de Langerhans (LC). A LC ativada deveria migrar para um linfonodo, processando os antígenos e apresentando-os à célula T imatura. A célula T diferenciada em T efetora, migraria para o sítio da infecção e destruiria o queratinócito infectado (LISINGEN, 2008).

Durante os primeiros estágios da infecção pelo HPV, o sistema imune inato cria um microambiente pró-inflamatório, recrutando células da imunidade inata para eliminar as células infectadas, iniciando uma resposta imune adquirida efetiva. No entanto, o HPV exhibe uma grande variedade de estratégias de evasão à vigilância imunitária, por proporcionar um microambiente anti-inflamatório (AMADOR-MOLINA *et al.*, 2013).

O HPV apresenta alguns mecanismos que dificultam uma resposta eficiente do sistema imunológico. O ciclo de infecção do HPV apresenta alguns mecanismos de evasão do sistema imune inibindo a detecção do vírus pelo hospedeiro. A liberação do vírus ocorre com a morte programada dos queratinócitos (processo de descamação), não havendo citólise como consequência da replicação, empacotamento e liberação das partículas virais. (FRAZER, 2004; STANLEY, 2006). A infecção e a replicação viral são absolutamente dependentes das etapas de diferenciação dos queratinócitos, onde o ciclo de infecção do vírus acompanha a diferenciação da célula hospedeira.

Os queratinócitos (células que são infectadas pelo HPV) são parte do sistema de defesa imunitária inata e são considerados como sentinelas imunes (NESTLE *et al.*, 2009). Eles podem funcionar como células apresentadora de antígeno não especializada, e são capazes de induzir a expressão de citocinas Th1 e Th2 e respostas de tipo citotóxica em células TCD4+ e TCD8+ de memória, respectivamente (BLACK *et al.*, 2007).

Contudo mesmo na ausência de citólise e morte celular induzida pelo vírus, os queratinócitos infectados pelo HPV deveriam ativar um efetivo sistema de defesa antiviral: a secreção de interferon tipo 1. Os interferons de tipo 1, interferon- α e interferon- β , têm atividade antiviral, antiproliferativa, antiangiogênica e propriedades imunoestimulatórias que ativam as células dendríticas imaturas (LE BON, *et al.*, 2002; THEOFILOPOULOS *et al.*, 2005). Os HPVs de alto risco (HR-HPVs) são capazes de diminuir a expressão de genes induzíveis pelo interferon- α , e as oncoproteínas E6 e E7

do HPV 16 interagem diretamente com componentes das vias de sinalização do interferon, inibindo-as (RONCO *et al.*, 1998; BARNARD, McMILLAN, 1999).

Mecanismos de evasão imune HPV pode atuar nas fases iniciais de infecção sendo um mecanismo necessário para a infecção viral bem-sucedida. O microambiente em lesões cervicais de baixo grau (LSIL) é predominantemente anti-inflamatório, e é modificado de maneira que favorece a infecção pelo HPV. Em secreções cervicais obtidas de pacientes HPV positivo com LSIL foram observados níveis mais elevados de IL-10 em comparação com pacientes de HPV negativo (AZAR *et al.*, 2004).

Estudos utilizando linhas celulares de cancro do colo do útero tem mostrado que oncogenes do HPV-16 permitem a evasão do fator de necrose tumoral (TNF- α) mediada sinais pró-apoptóticos, para inibir a produção da principal citocina antiviral, interferon- γ (IFN- γ), por células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e células NK, e a transcrição TLR9, resultando na supressão da ativação de vias de sinalização que resultaria em inflamação aguda, estimulação da resposta adaptativa e indução de um estado antiviral (LEE *et al.*, 2001; HASAN *et al.*, 2007).

Na maioria dos casos uma resposta imune eficiente é estabelecida contra o HPV a qual parece ser caracterizada por imunidade mediada por células, associada à regressão da lesão e também pela produção de anticorpo neutralizante. Este anticorpo é dirigido contra epítomos conformacionais da proteína L1, localizada na superfície externa da partícula viral, porém sua produção ocorre em níveis baixos, reflexo do ciclo viral intracelular exclusivo, com ausência de viremia, além da produção das partículas virais se dar em células epiteliais e, portanto, distante de APCs e de macrófagos (VILLA *et al.*, 2005).

Os queratinócitos que contêm cópias episomais de HR-HPV podem exibir um grande número de genes desregulados envolvidos nos mecanismos quimiotáticos e pró-inflamatórios; os genes regulados negativamente estão envolvidos na resposta imune inata e adaptativa, bem como na diferenciação dos queratinócitos (KARIM *et al.*, 2011).

A imunidade inata representa uma resposta rápida e estereotipada a um número grande, mas limitado, de estímulos. É representada por barreiras físicas, químicas e biológicas, células especializadas e moléculas solúveis, presentes em todos os indivíduos, independentemente de contato prévio com imunógenos ou agentes agressores (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000). Fazem parte do sistema imune inato peptídeos antimicrobianos e citocinas, como o Fator de necrose tumoral (TNF) que podem ser estimulados pelo quadro infeccioso.

3.4.1 Defensinas

As defensinas humanas (HDs), peptídeos endógenos produzidos por leucócitos e células epiteliais, são moléculas efetoras que fazem parte da imunidade inata e estão amplamente distribuídas no organismo. Protegem a superfície do corpo humano contra várias infecções e são ativos na pele e no trato gastrointestinal, respiratório e urogenital. São pequenos peptídeos catiônicos que consistem de 30-42 aminoácidos e têm pesos moleculares de 3,5-4,5 kDa (BEVINS; MARTIN-PORTER; GANZ, 1999).

Esses peptídeos mostram atividades antimicrobianas, antiviral, neutralizadores de toxinas e propriedades imunomoduladoras. Em humanos compreendem subfamílias distintas como α e β -defensinas (SELSTED, 2005; GANZ, 1999). As α -defensinas são principalmente encontradas em grânulos azurofílicos de neutrófilos ou secretados pelas células intestinais de Paneth, enquanto que β -defensinas são expressas em várias mucosas e células epiteliais onde podem ser supra-reguladas em resposta a estímulos infecciosos e inflamatórios (BENSCH *et al.*, 1995).

As α -defensinas humanas neutrofílicas são denominadas de peptídeos neutrofílicos humanos (HNP) e são divididas em quatro tipos, HNP-1, HNP-2, HNP-3 e HNP-4. HNP-1 – HNP-3 representam o mais abundante componente bactericida dos grânulos azurofílicos (DROIN *et al.*, 2009) e têm a capacidade de inativar uma variedade de vírus, incluindo HIV-1 (GALLO *et al.*, 2006) e Papilomavírus (BUCK *et al.*, 2006). HNP1-3 foi encontrada em níveis elevados em células tumorais de câncer colorretal (MELLE *et al.*, 2005) e em carcinoma celular renal (MULLER *et al.*, 2002).

Seis β -defensinas humanas (hBD1 a 6) já foram identificadas e caracterizadas (PAZGIER *et al.*, 2006). Já é conhecido que as β -defensinas são induzidas por vários estímulos incluindo numerosas bactérias e fungos e várias citocinas pró-inflamatórias. A expressão de hBD2 e hBD3 é induzida predominantemente em pele inflamada, trato gastrointestinal e tecido pulmonar (SØRENSEN *et al.*, 2005).

A base para o reconhecimento seletivo de diversos vírus pelas defensinas é amplamente desconhecida. As defensinas podem interagir com a bicamada lipídica ou com as glicoproteínas de vírus envelopado; entretanto, as interações proteína-proteína devem ser críticas para a ligação a vírus não envelopados, como o HPV (FURCI *et al.*, 2007).

Para vários tipos de papilomavírus que são sensíveis a HNP1-4 e HD5, o único passo que se sabe ser inibido é a localização nuclear do genoma do HPV-16, o último passo na via de entrada do vírus. O genoma do HPV é exposto em condições de neutralização de HNP1 e HD5 (BUCK *et al.*, 2006). Assim, não está claro se as defensinas bloqueiam a penetração do papilomavírus na membrana do hospedeiro ou a capacidade do genoma de percorrer do citoplasma para o núcleo (Figura 3).

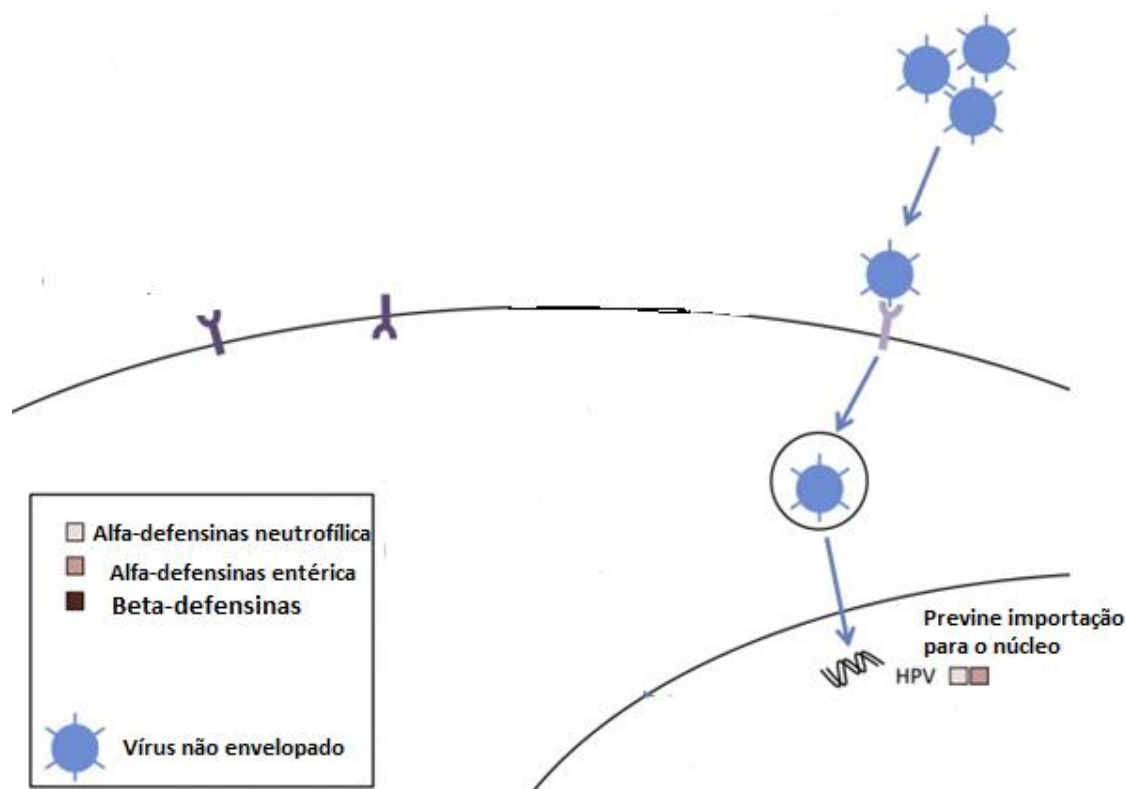


Figura 3: Mecanismo de atividade antiviral das defensinas. A figura mostra a ação de defensinas no possível bloqueio da capacidade do genoma do HPV entrar no núcleo da célula hospedeira. (Adaptada de Wilson et al, 2013)

Meyer-Hoffert *et al.*, (2008) especulou que diferentes tipos de HPV pode levar a uma diferente indução de β -defensinas. Um estudo realizado em lesões anais demonstrou que as defensinas hBD-2 e hBD-3 tem expressão significativamente aumentada em NIA de homossexuais HIV-positivos e condiloma acuminado de ambos, homossexuais portadores ou não do HIV (KREUTER *et al.*, 2008).

A expressão desregulada de algumas defensinas em células tumorais depende de uma série de parâmetros, incluindo o tipo de tumor, tecido circundante e a expressão e secreção de defensinas em células normais correspondentes (DROIN *et al.*, 2009).

As defensinas podem ser encontradas em concentrações capazes de eliminar uma infecção viral no trato genital feminino e já é conhecida a inibição para HIV-1, *Chlamydia trachomatis* e HPV *in vitro*, comprovando seu alto potencial microbicida (PORTER *et al.*, 2005; BUCK *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2002).

3.4.2 Fator de Necrose Tumoral - α

O fator de necrose tumoral- α (TNF- α) foi identificado em meados de 1970 por Lloyd Old e colaboradores como uma endotoxina causadora de necrose de certos tumores em murinos (CARSWELL *et al.*, 1975). No início de 1980, a caquexina, uma molécula aparentemente não relacionada ao TNF foi descrita por Cerami e colaboradores mostrando mediar um papel em doenças crônicas (KAWAKAMI; CERAMI, 1981). Estudos posteriores (BEUTLER *et al.*, 1985; PENNICA *et al.*, 1985) demonstraram que essas moléculas eram idênticas e mostrou a importância dos membros desta família em doenças humanas.

É uma citocina inflamatória pleiotrópica chave envolvida na inflamação e regulação imune. É produzida por muitos tipos de células, particularmente macrófagos, monócitos, células T e B, bem como sinoviócitos. Os queratinócitos, neurônios, células de epitélio pigmentado da retina e células gliais também têm potencial para produzir a citocina (KUCHARZ, 2008; OLSZANECKA-GLINIANOWICZ *et al.*, 2005). O significado biológico do TNF- α reside na sua capacidade para intensificar a síntese de outras citocinas, induzir apoptose de células tumorais e estimular a produção de proteínas de fase aguda e células B (EDER *et al.*, 2011; LUBECKA-MACURA; KOHUT, 2010).

O TNF é sintetizado inicialmente como um polipeptídeo de 26 kDa e 233 aminoácidos com uma pré-sequência de 76 aminoácidos que é clivada por metaloproteinases altamente específicas, algumas horas depois de estar ancorado na membrana celular. A principal enzima responsável pelo processamento do TNF ligado à membrana para a forma solúvel é a enzima conversora de TNF- α (TACE, também conhecido como ADAM-17). TACE é um membro da classe de enzimas ligadas a membrana que contém tanto desintegrinas como metaloproteinases (MOSS *et al.*, 1997).

Assim sendo, o TNF pode apresentar-se nas formas solúvel (sTNF) ou ligada à membrana (tmTNF).

Na forma biologicamente ativa é um homotrímero (sTNF) apresentando formato de cone triangular ou piramidal onde cada lado é formado por uma diferente subunidade monomérica. Os sítios de ligação aos receptores situam-se na metade inferior da estrutura piramidal, o que permite a ligação simultânea com mais de um receptor (NEDWIN *et al.*, 1985; JONES *et al.*, 1989).

As respostas biológicas do TNF- α são mediadas através dois receptores estruturalmente distintos: tipo I (TNFR1, também conhecido como p60, p55, CD120a) e tipo II (TNFR2, também conhecida como p80, p75, CD120b). Ambos os receptores são glicoproteínas transmembranares com múltiplas repetições rica em cisteína nos domínios N-terminais extracelulares. Os seus domínios intracelulares e vias são distintos, e a transdução de sinais de ambos se sobrepõem. A característica primária que distingue os domínios intracelulares de TNFR1 e TNFR2 é a presença de um domínio de morte em TNFR1, que é uma sequência de aproximadamente 70 aminoácidos fundamental para o TNF- α desencadear apoptose celular.

A ligação da citocina ao receptor leva ao recrutamento de proteínas chamadas fatores associados ao receptor de TNF (TRAF) aos domínios citoplasmáticos dos receptores. O domínio intracelular proporciona um local de encaixe para um número de proteína acessória incluindo Fas associado ao domínio de morte contendo proteína (FADD). TNFR1-associado ao domínio de morte contendo proteína (TRADD), e TNFR2-associado ao fator-2 (TRAF-2) fornecem os pontos de ramificação para vias de sinalização pró-apoptótica e inflamatórias que são característicos de TNFR1. Assim, diferentes membros da família de receptores de TNF podem induzir a expressão gênica ou a morte celular, e alguns podem fazer ambos (Figura 4) (PALLADINO *et al.*, 2003).

A ativação dos receptores de TNF-alfa induz uma infinidade de vias de sinalização intracelulares. Estas vias incluem a via de ativação de caspases pró-apoptóticas, via de ativação do NF-kappa β e as vias de MAPK (proteína cinase mitógeno ativada que induz a transcrição de genes que codificam proteínas envolvidas na apoptose, proliferação e inflamação) (PALLADINO *et al.*, 2003).

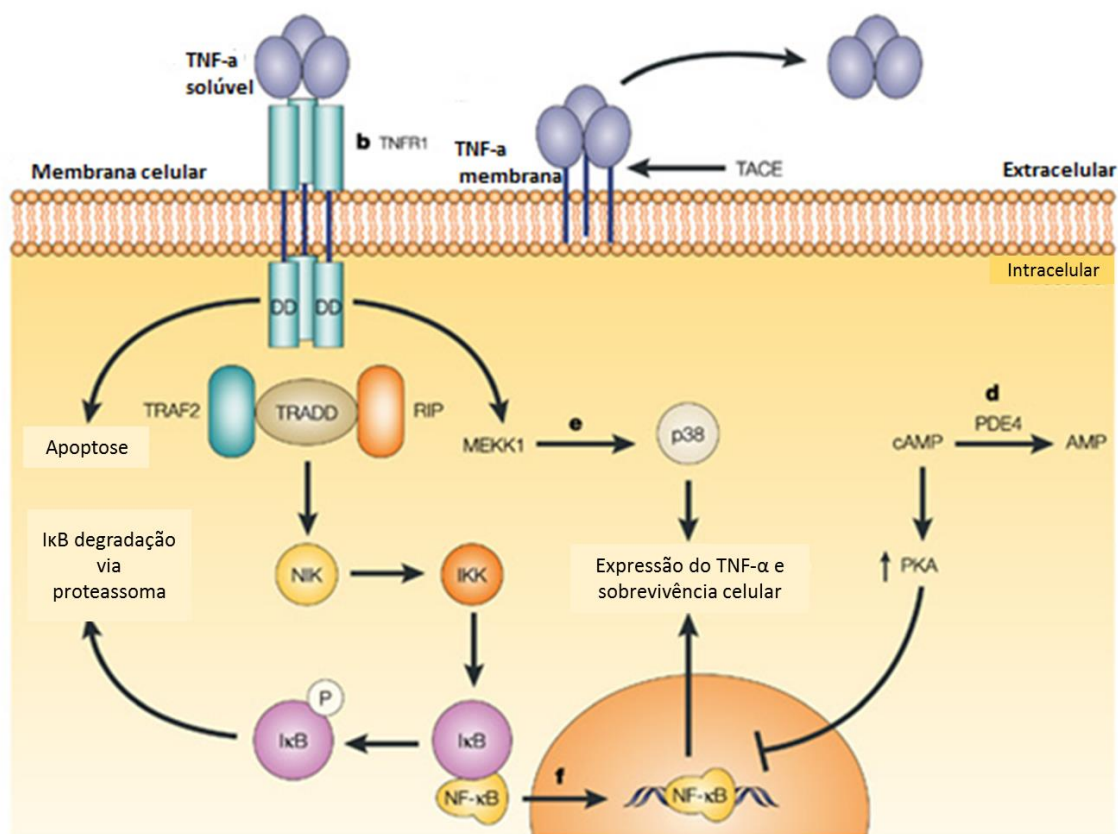
Inicialmente, o TNF-R1 se liga ao homotrímero de TNF no domínio extracelular do receptor, o que induz a trimerização do TNF-R1 e a liberação do silenciador do domínio de morte (SODD) do TNF-R1 intracelular. Após a libertação do SODD, TRADD podem ligar-se ao domínio de morte do TNF-R1 e recrutar proteínas adaptadoras

adicionais, tais como a proteína de interação com receptor (RIP), TRAF -2 e FADD. Quando a caspase-8 é recrutada por FADD para induzir a sinalização do complexo de morte, torna-se ativada, presumivelmente por auto-clivagem, e inicia uma cascata de protease que conduz à morte. Enquanto inibidor de-apoptose TRAF-2 recruta proteína-1 (IAP-1) e IAP-2, que inicia uma via que resulta na fosforilação / ativação de fatores de transcrição através a ativação de MAPK (p38 MAPK). TRAF-2 também ativa RIP, que é crítico para a ativação do NF- κ B (GHOSH *et al.*, 2002). Diferente do TNF-R1, TNF-R2 pode também mediar estas vias acima através da ligação direta com a TRAF2 juntamente com TRAF1 (ROTHER *et al.*, 1994; ROTHER *et al.*, 1995; EMOLAEVA *et al.*, 2008).

Quando o TNF se liga ao seu receptor TNFR1, ambas vias, pró-apoptótica e sobrevivência celular, são ativadas. A via pró-apoptótica prossegue através das proteínas adaptadoras TRADD E FADD, através da ativação de caspases iniciadoras tais como caspase 8, ativação de caspases efetoras (caspase 3), clivagem de substratos celulares e, finalmente, apoptose (FILLIPOVA *et al.*, 2002).

Os genes dependentes da ativação de NF- κ B incluem aqueles que codificam TNF- α , assim um bloqueio de NF- κ B leva a diminuição na produção de TNF. Um dos pontos de bloqueio da síntese de TNF é representado por níveis aumentados de AMPc (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico) intracelular através da inibição de PDE4 (fosfodiesterase 4) (PALLADINO *et al.*, 2003).

A oncoproteína E6 do HPV pode ligar-se ao TNFR1 e inibir a sinalização através de TRADD. A ligação TNFR1/TRADD é reduzida na presença de E6, bloqueando a transmissão dos sinais apoptóticos. A resposta imune direcionada a infecção pelo HPV é fraca ou indetectável e apresenta pouca ou nenhuma resposta inflamatória. A capacidade do E6 proteger as células da ação do TNF pode ser um fator importante na ausência da resposta inflamatória do hospedeiro e contribui tanto para a persistência do vírus quanto para potencial oncogênico (FILLIPOVA *et al.*, 2002).



Nature Reviews | Drug Discovery

Figura 4: Mecanismo de ação TNF- α . Interação do TNF solúvel (sTNF) e TNF ligado à membrana (mTNF) com receptores TNF (TNF-R1 e TNF-R2) e as vias de sinalização ativadas. (Fonte: PALLADINO *et al.*, 2003)

Inibição do TNF- α é usada para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas imunomediadas, incluindo psoríase e doença inflamatória intestinal. No entanto, o bloqueio do TNF- α aumenta o risco de aquisição e/ou reativação de certas infecções bacterianas, fúngicas, virais (WINTHROP, 2006; NATHAN; ANGU; GIBSON, 2006). Há alguns relatos de casos publicados sobre (re) ocorrência de verrugas anogenitais em pacientes após o início da terapia anti-TNF- α (SOMASEKAR; ALCOLADO, 2004; ANTONIOU *et al.*, 2008). Antoniou e col (2008) alerta para a possibilidade de alta susceptibilidade de pacientes em tratamento com anti-TNF- α para infecções virais.

Recentemente, pacientes do sexo feminino com artrite reumatóide foram prospectivamente investigados para detectar a presença de infecção por HPV de alto risco, representado por DNA viral e citopatologia cervical, antes e aos 6 meses de tratamento

anti-TNF- α . A infecção permaneceu inalterada na maioria das pacientes e não houve desenvolvimento de lesão (WAISBERG *et al.*, 2015).

Handisurya e colaboradores observou infecção anogenital pelo HPV em pacientes com psoríase ou doença inflamatória intestinal, e demonstrou que a inibição de TNF- α não aumentou a prevalência da infecção por HPV anogenital após mais de 30 meses de tratamento (HANDISURYA *et al.*, 2015). Apesar de observações divergentes em alguns estudos, é possível que os agentes imunomoduladores, em particular bloqueadores de TNF-alfa, possam contribuir para um aumento da susceptibilidade à infecção anogenital pelo HPV, elevando o risco de infecção persistente e doença associada devido ao atraso ou ineficiência na eliminação viral, ou levar a reativação e/ou exacerbação de infecções latentes, especialmente após a administração a longo prazo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 População

A pesquisa foi realizada com pacientes voluntárias do sexo feminino, na faixa etária entre 18 e 60 anos, atendidas no Serviço de Pélvis do Hospital de Câncer de Pernambuco e no Serviço de ginecologia do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira - IMIP e submetidas aos exames de colposcopia e anoscopia de magnificação. As pacientes envolvidas no estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) além de preencher um questionário padronizado contendo informações sobre os aspectos clínicos e socioeconômicos, hábitos alimentares, tabagismo e alcoolismo. Os fatores excludentes para a pesquisa foram: idade menor que 18 e maior que 60 anos, soropositividade para HIV, ter tomado a vacina contra HPV, quadro de infecção recente, gravidez e puerpério, não apresentar quadro de imunossupressão, doenças autoimunes.

4.2 Obtenção das amostras

O seguinte estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Câncer de Pernambuco, com parecer número 301.040.

Foram coletadas amostras cervicais e anais de pacientes submetidas à colposcopia e anoscopia de magnificação. Para identificação do HPV, foi realizado com raspado com auxílio de escova ginecológica para obter células da região cervical e anal. As escovas ginecológicas foram armazenadas em tubos de 1,5mL contendo soro fisiológico a -20°C até o processamento. Na região anal foi realizada uma nova coleta, no mesmo momento, com a finalidade de se obter mais células. A segunda coleta foi armazenada em RNA later para estudo de expressão de genes relacionados ao sistema imune inato. As amostras foram enviadas ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA/UFPE), onde foram realizados todos os procedimentos.

Após coleta foi realizado o exame de colposcopia e anoscopia que consiste na visualização do colo do útero/canal anal (até a zona de transição com o reto). O exame foi realizado através de colposcópio e ácido acético à 5% foi colocado para visualização de possíveis lesões. Quando na presença de lesões foi realizada biópsia e o material

encaminhado para o setor de patologia do HCP ou IMIP, responsáveis pelo diagnóstico histopatológico.

4.3 Procedimento Imunohistoquímico

Os cortes para realização do procedimento imunohistoquímico foram obtidos no setor de Patologia do HCP, o processamento foi realizado no Setor de Patologia do LIKA, utilizando-se o kit CINTec® Histology para a detecção em tecido da p16INK4a. Os cortes histológicos foram montados em lâminas silanizadas, desparafinizados e incubados em solução de recuperação antigênica (1:10), previamente aquecida em *steamer* com temperatura entre 95 – 99°C, por cerca de 10 minutos. Após resfriamento em temperatura ambiente as lâminas foram lavadas com tampão de lavagem (1:10). Em seguida adicionou-se 50µl do reagente para bloqueio da peroxidase endógena (3% peróxido de hidrogênio e azida sódica- NaN₃) sobre o tecido, e incubou por 5 minutos em temperatura ambiente. Após o período de incubação foi repetida a lavagem.

As lâminas foram retiradas do tampão de lavagem, secas ao redor do corte, e adicionou-se 50µL do anticorpo monoclonal primário (clone E6H4) anti-p16 e incubou-se por 30 minutos em temperatura ambiente e, posteriormente, lavadas com tampão de lavagem. Após lavadas e secas, adicionou-se 50µL do reagente de visualização, e foram incubadas por 30 minutos, em temperatura ambiente. A lavagem foi repetida por duas vezes, e após serem secas foi aplicado 50µL do cromógeno DAB (3, 3' - diaminobenzidina), incubou-se por 10 minutos em temperatura ambiente e repetindo-se a lavagem. Foi realizada a contracoloração com Hematoxilina de Harris e montagem das lâminas com Entellan® e lamínulas. A visualização da marcação foi realizada utilizando-se microscópio de luz convencional.

4.4 Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada com o kit comercial DNeasy blood & Tissue Handbook Qiagen® seguindo instruções do fabricante. O DNA extraído foi conservado a -20°C. O gene da β -globina foi utilizado para controle de qualidade de extração, mostrando que as amostras continham DNA adequado e livre de substâncias inibitórias da PCR (du Breuil *et al*, 1993).

4.5 Análise molecular para identificação do HPV

A identificação da presença do HPV foi realizada através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando primers para a região do gene L1 do HPV, MY09/11 (5'-CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC-3'/ GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG-3') (Manos et al, 1989) e GP5+/GP6+ (5'-TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC - 3'/5'-GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C-3') (Husman et al, 1995) que produzem um amplicon de 450pb e 150 pb, respectivamente.

Foram utilizados primers específicos para os seguintes genótipos do HPV: HPV6, 16, 18, 31 e 33. As sequências dos primers estão listadas na tabela 2. As condições da PCR utilizadas para os primers HPV6, 18, 31 e 33 foram: (i): 94°C -5 minutos, (ii) 35 ciclos de amplificação a 95°C - 30 segundos, 57°C - 30 segundos e 72°C – 1 minuto, (iii) e uma extensão final a 72 ° C - 10 minutos. Para o primer HPV16 a temperatura de anelamento foi 60°C, as demais etapas ocorreram nas mesmas condições.

Tabela 2: Sequência de primers específicos para identificação do HPV

Genótipo	Primer	Sequência	pb
HPV-6*	F	5'-CTGTTTCGAGGCGGCTATC-3'	323
	R	5'-TGGAGGTTGCAGGTCTAAT-3'	
HPV-16**	F	5'-TCA AAA GCC ACT GTG TCC TGA-3'	119
	R	5'-CGT GTT CTT GAT GAT CTG CAA-3'	
HPV-18**	F	5'-CCG AGC ACG ACA GGA ACG ACT-3'	172
	R	5'-TCG TTT TCT TCC TCT GAG TCG CTT-3'	
HPV-31**	F	5'-CTA CAG TAA GCA TTG TGC TAT GC-3'	153
	R	5'-ACG TAA TGG AGA GGT TGC AAT AAC CC-3'	
HPV-33**	F	5'-AAC GCC ATG AGA GGA CAC AAG-3'	211
	R	5'-ACA CAT AAA CGA ACT GTG GTG-3'	

Tabela adaptada de* Wang et al, 2010 e ** Karlsen et al, 1996.

4.6 PCR em tempo real

Para análise da expressão, o RNA total foi extraído utilizando o RNAeasy Mini Kit (Qiagen) seguindo protocolo determinado pelo fabricante. Quantificação e qualidade do RNA foram realizadas utilizando espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). A fita de cDNA foi sintetizada a partir do RNA total através do kit Reverse Transcription (Qiagen) de acordo com a metodologia descrita pelo fabricante. Em seguida foi realizada a qPCR (quantitativa) combinando o cDNA produzido, SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e os primers específicos para cada gene analisado (β -defensina -2 e -3, TNF- α). O equipamento utilizado foi o Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR Systems.

As condições de ciclagem de PCR foram 50°C - 2 min, 95°C- 15 min, e 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. Os níveis relativos de expressão foram calculados por $\Delta\Delta Ct$, $2Ct$ beta-actina - Ct gene específico, onde Ct é o limiar de ciclo.

4.7 Análise Estatística

O teste Qui-quadrado e teste exato de Fisher foram utilizados para comparações entre tipos do HPV e grau histológico de lesão anal e entre a expressão da proteína p16 e o grau histológico de lesão anal. Os níveis de expressão de TNF- α , β -defensina 2 e 3 foram comparados com diagnóstico histológico de lesão de alto grau, lesão de baixo grau e normal, todos HPV positivos. Para essas comparações foi usado ANOVA One-way seguido do teste de Turkey para comparação múltipla. As comparações entre pacientes infectados ou não pelo HPV com diagnóstico histológico normal foram realizadas por teste t não pareado. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism versão 6.0. (Graph-Pad Software, San Diego, CA). Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas se $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Artigo 1

Int J Clin Exp Pathol 2016;9(7):7755-7762
www.ijcep.com /ISSN:1936-2625/IJCEP0023713

Original Article

p16 protein expression in identification anal intraepithelial lesions related to human papillomavirus infection in women

Maria Julliana Galvão Nunes¹, Maria da Graças de Fátima Cavalcanti Castor², Luciana Guerra Castor¹, Adrya Lúcia Peres Bezerra de Medeiros¹, Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo³, Danyelly Brunheska Gondim Martins⁴, Nicodemus Teles de Pontes-Filho⁵

¹Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco, Pernambuco, Brazil;

²Cancer Hospital of Pernambuco (HCP), Pernambuco, Brazil; ³Research Center for Therapeutic Innovation Suely Galdino (NUPIT-SG), Federal University of Pernambuco, Pernambuco, Brazil; ⁴Department of Biochemistry, Molecular Prospection and Bioinformatics Group (ProspecMol)/Federal University of Pernambuco, Pernambuco, Brazil; ⁵Department of Pathology, Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Pernambuco, Brazil

Received January 10, 2016; Accepted May 28, 2016; Epub July 1, 2016; Published July 15, 2016

Abstract: Our objective was to assess p16 protein expression in anal lesions related HPV infection in patients out of main risk group for anal cancer. We studied immunohistochemical expression of p16 in 65 immunocompetent women with different degree of lesions in anal canal. Cell collection and biopsies were performed. HPV DNA was identified by PCR using GP5+/6+ and MY09/11 primers and biopsy fragments were subjected to routine hematoxylin-eosin staining for the histological assessment and immunohistochemistry reaction using anti-p16 antibody. The results histopathological were grouped as: I-Negative: Ia-52.31% (34/65) and Ib-benign changes of a proliferative nature 41.54% (27/65), II-Neoplasia 6.15% (4/65). The mean age of patients was 36.83 years. There was HPV positivity in 78.46% (51/65), more frequently observed in young women, who had between 2-5 sexual partner and reported anal intercourse, but was not statistically significant. Positivity for p16 was frequently associated with group II than groups Ia and Ib, statistically significant ($P = 0.0002$) and continuous pattern was predominant. 75% of II group were positive for HPV and p16. The majority of cases Ia and Ib positive HPV were not p16 staining ($P = 0.0001$). We conclude that p16 have expression associated neoplasia, but the low number of high-grade lesion impede evaluate about specificity of the marker. The HPV infection is not necessarily indicative of several clinical lesion, thus additional tools such as immunohistochemistry and histological diagnosis to assess the degree of lesion combined molecular biology offer a more accurate diagnosis.

Keywords: Anal Intraepithelial Neoplasia (AIN), immunohistochemistry, epithelial markers, viral infection, molecular biology

Introduction

The anal cancer is a rare malignancy that accounts for 2.5% of all gastrointestinal cancers. In 2015 was estimated 7,270 new cases encompassing anus, anal canal and anorectum cancer [1]. The development of Anal Intraepithelial Neoplasia (AIN) have as most common risk factor the human papillomavirus (HPV) infection beside history of anal intercourse and smoking [2-4]. The main risk groups for anal cancer are human immunodeficiency virus (HIV)-positive persons and men who have sex with men (MSM) which shown an increased risk for anal cancer [5]. Squamous cell carcinoma,

the most prevalent histological type of anal cancer, arises in areas of high grade of AIN, as consequence of chronic HPV infection and appears to be related to a high load of virus in infected individuals [6].

More than 150 HPV genotypes are known and approximately 40 are related to anogenital infections [7]. Currently, it is known that HPV can also be found in cancer of the penis, vagina, vulva, anus, perianal region, head and neck. HPV in the anogenital region may give rise to genital warts and lead to the development of lesions with a possible progression to cancer [8, 9]. The natural history of a HPV infection

p16 and anal intraepithelial lesion

includes the following: transmission of the virus; the development of a persistent infection and interaction with the immune system, which plays a crucial role in the progression from a lesion to cancer. HPV infection tends to cause cancer in the area referred to as the "transformation zone". The anal region, as well as the cervix and tonsils are examples of areas prone to carcinogenesis by HPV [10, 11].

The infection for HPV occurs in the basal layer of the squamous epithelium cell through a microtrauma, the viral show tropism by epithelium. Malignant transformation in infected cells depends on the integration of the oncogenic HPV E6 and E7 genes in the host genome [12]. HPV has late structural genes (L1 and L2) that are involved in the structure of capsid and early functional genes (E1-E7) which are associated to viral replication processes [13]. The viral proteins (E6 and E7) inactivate the tumor suppressor proteins p53 and retinoblastoma (pRb), both of which are critical to cell cycle regulation. This promote deregulation of cell cycle and abnormal expression of cellular proliferation markers, for example p16 [14].

A negative feedback process resulting from this interaction activates the expression of p16 inhibitory proteins of the cyclin-dependent kinase complexes [15]. p16 regulates the transition from the G1 to the S phase of the cell cycle [16] and is accumulated in the nuclei and cytoplasm of cells infected by HPV. Biomarkers for HPV infection, such as p16, have been shown to correlate with a histological grade of AIN [17, 18]. However, these researches were realized in mixed groups (men and women), where the majority were men and HIV status was not considered. The aim of the present study was to assess p16 protein expression in anal lesions related HPV infection in patients out of main risk group for anal cancer, characterized by immunocompetent women.

Materials and methods

Characterization and sample collection

The present study was conducted with 65 women voluntary HIV-uninfected, aged between 18 and 60 years, previous HPV-related anogenital disease (cervix, vagina, vulva, or anal) or complaint pain or itch anal. All the patients were submitted to high-resolution anoscopy (HRA) in Service Pelvis of the Cancer Hospital of Pernambuco.

Exclusion criteria: Patients without lesion in anal canal, out of the age range (18-60 years), men and immunodeficiency and who was under treatment were considered as exclusion criteria. Patients with reagent result for HIV also were excluded.

Cells were collected from the anal canal (from the transition zone to the rectum) with gynecological brush before use acetic acid with subsequently biopsy after preview the lesion marked by acetic acid 5%. Immunoassay ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) was performed to detection HIV-1 and HIV-2.

HPV analysis

DNA was extracted from anal cells using DNA IQ™ Casework Pro kit for Maxwell® 16, following manufacturer's instructions. PCR gene β -globin was done in order to show that samples contained adequate DNA and were free of substances inhibitory to PCR. DNA amplification was performed using specific primers (5'-CAACTTCATCCACGTTCACC-3'/5'-GAAGAGC-CAAGGACAGGTAC-3') yielding a 268 bp amplicon. Ultrapure water was used as negative control and DNA extracted from human blood was used as positive control.

The presence of HPV in biological samples was analyzed by PCR using consensus primers for the region of the HPV L1 gene: GP5+/6+ 5'-TTTGTACTGTGGTAGATACTAC-3'/5'-GAAAA-TAAACTGTAAATCATATTC-3') [19] and MY09/11 5'-CGTCCMARRGGAWACTGAT-3'/5'-GCMCAG-GGWCATAAATGG-3') [20] that yield a 150 bp and 450 bp amplicon, respectively. PCR was prepared with GoTaqGreen of Master Mix (Promega®) using 1 μ L DNA (~30 ng DNA). Ultrapure water was used as negative control and pBR322. HPV16 plasmid was used as positive control. Amplification conditions were as follows: (i) 94°C for 3 minutes, (ii) 34 cycles at 95°C for 1 minute, annealing for 1 min, 72°C for 1 minute, (iii) final extension at 72°C for 10 min. MY09/11 primers annealed at 55°C, whereas GP5+/6+ annealed at 45°C. Amplicons were observed on 1% agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide.

Histology and immunohistochemistry

Tissue fragments from the biopsies were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Histological slices were obtained (4 μ m thickness) and stained with hematoxylin-eosin

p16 and anal intraepithelial lesion

Table 1. Patients profile and HPV infection

PARAMETER	n	Percentage	HPV (n)		P (χ^2)
			Positive	Negative	
Age range					0.2322
18-30 years	23	35.38%	20	3	
31-45 years	25	38.46%	20	5	
46-60 years	17	26.16%	11	6	
Total	65	100%	51	14	
Lifetime Sexual Partner					0.6302
1	14	21.54%	10	4	
2-5	35	53.85%	29	6	
More than 5	16	24.61%	12	4	
Total	65	100%			
Anal intercourse					0.1967 0.2207*
Yes	42	64.61%	35	7	
No	23	35.39%	16	7	
Total	65	100%			
Condom in anal intercourse					0.6508 1.0000*
Yes	1	2.38%	1	0	
No	41	97.61%	34	7	
Total	42	100%			

*Fisher's exact test.

(HE) or used in the immunohistochemical test. Two pathologists (N.T.P.F and R.J.V.M) evaluated the immunohistochemical reactions and histological diagnosis without knowledge of the original histologic diagnoses.

Immunohistochemical staining of tissue sections was done using the CINtec® Histology kit to detect tissue of p16^{INK4a} (Biogen). Cervical carcinoma samples were used as positive control. The histological sections were mounted on silanized slides, deparaffinized and incubated in antigen retrieval solution (1:10) previously heated in a steamer at 95°C for 10 minutes. After cooling to room temperature (RT), the slides were washed with wash buffer (1:10), dried and 50 µl of reagent was added in order to block endogenous peroxidase in tissues and then incubated for 5 minutes at RT. After rinsing in wash buffer, tissue sections were incubated for 30 minutes at RT with 50 µL of the primary monoclonal antibody anti-p16 (clone E6H4). Tissue sections were washed twice in wash buffer and incubated for 30 minutes at RT with visualization reagent (polymer reagent conjugated with horseradish peroxidase). After

being washed in wash buffer, peroxidase activity was detected by incubating tissue sections for 10 minutes at RT with DAB Chromogen (3,3'-diaminobenzidine chromogen solution). Tissue sections were counterstained with Harris's hematoxylin.

Histological and immunohistochemical assessment

In our study was proposed a classification to histopathological patterns in accordance diagnoses obtained, thereby the data were grouped and classified as follows: I-Negative: Ia-without significant changes (Normal), benign reactive or inflammatory changes and Ib- benign changes of proliferative nature (including condyloma, polyps and hyperplasia) and II-Neoplasia (Anal Intraepithelial Neoplasia grade I (low-grade), II and III (high-grade).

The p16 positivity was defined by the presence of nuclear and/or cytoplasmatic staining. The classification criteria were based on the thickness of the anal epithelium marked and defined as follows: one third of inferior epithelium (basal layer), between one third and two thirds of the epithelium, or three thirds, corresponding to the entire thickness of the epithelium. The staining pattern was considered as focal or continuous.

Ethical approval

The Brazilian ethical committee for medical and health research in Federal University of Pernambuco accepted this study under identification CEP/CCS/UFPE 280/10.

Statistical study

The statistical analysis was calculated using Chi-square and Fisher's exact test to comparison between patients profile and HPV positivity, histological diagnosis and p16 staining. The comparisons between Histological diagnosis HPV positive and p16 staining were performed with three groups (Ia, Ib and II) through Qui-square. P values < 0.05 were considered statistically significant. The GraphPad Prism 5.01 was used for statistical analysis.

p16 and anal intraepithelial lesion

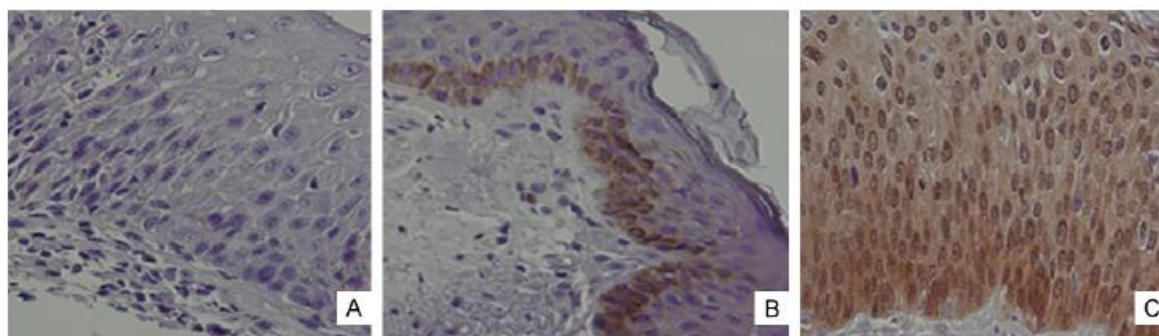


Figure 1. A: Anal epithelium negative (I)(without significant changes) with absence of p16 markings (40×). B: Histologic diagnosis II group AIN I, p16 markings in 1/3 of the thickness of the anal epithelium (40×). C: Histologic diagnosis II group AIN III, p16 markings in all thickness of the anal epithelium (40×).

Table 2. p16 protein expression in identification of the degree of anal intraepithelial lesion

Histological diagnosis (n = 65)	p16 staining								
	Negative	Positive	P	1/3	3/3	P	Focal	Continuous	P
			0.0002			0.4594			0.4594
Ia: Normal, benign reactive or inflammatory changes (n = 34)	28	03		02	01		01	02	
Ib: Proliferative changes (n = 27)	23	01		01	-		-	01	
II: Neoplasia (n = 4)	01	03		01	02		-	03	
Total	52	07		04	03		01	06	

Results

Patients profile

The characteristics of patients are summarized in **Table 1**. The mean age of patients included in this study was 36.83 years (range 20-59 years). Concerning sexual activity, 53.85% (35/65) of the women had between two and five lifetime sexual partners and 64.41% (42/65) reported a history of anal intercourse. A total of 97.61% (41/42) did not use condoms during anal intercourse.

Histology and immunohistochemistry

According to classification previously described, our results to histological diagnosis were: Ia-52.31% (34/65); Ib-41.54% (27/65) and II-6.15% (4/65).

Nuclear and/or cytoplasmatic staining were observed in 75% (3/4) in group II (neoplasia) with staining restricted to the basal layer (AIN I) (**Figure 1B**) or staining the entire thickness of the anal epithelium (AIN III) (**Figure 1C**). In 80% (52/65) of the cases evaluated there was not staining for p16, including 01 case of AIN I, 28 cases classified as Ia and 23 cases as Ib (**Table**

2). p16 staining indeterminate were found in 06 cases.

Positivity for p16 (presence or absent staining) was frequently associated with cases of neoplasia (II) than negative cases (Ia and Ib). The difference was statistically significant ($P = 0.0002$). Concerning thickness of the anal epithelium stained and staining pattern no showed statistical difference ($P = 0.4594$). Continuous pattern was predominantly observed in p16 staining, where all cases group II showed continuous staining. Histological diagnosis Ia (02 cases) and Ib (01 case) showed staining restricted to the basal layer of the epithelium. However, staining pattern in three thirds of the epithelium was observed in one case classified as Ia (inflammation), though focal pattern (**Table 2**).

Molecular analysis

Concerning molecular analysis to identify HPV was observed a frequency of 78.46% (51/65) being considered as positive results when at least one set of primers was amplified. The viral L1 region amplification analyzed by GP5+/6+ set presented a positivity rate of 67.69%

p16 and anal intraepithelial lesion

Table 3. Comparison between histological diagnosis HPV positive results and p16. Positive results for PCR were considered when at least one set of primers was positive

Histological diagnosis HPV positive	p16 staining		P <0.0001
	Positive	Negative	
Ia: Normal, benign reactive or inflammatory changes (n = 24)	02	21	
Ib: Proliferative changes (n = 23)	-	20	
II: Neoplasia (n = 04)	03	01	
Total	05	42	

*Ia: 01 case indeterminate; Ib: 03 cases indeterminate.

(44/65) while for MY09/11 set 43.07% (28/65) was achieved.

Although there was not statistically significant difference between HPV positive and the following profile parameters of the patients as age range ($P = 0.2322$), lifetime sexual partner ($P = 0.6302$), anal intercourse ($P = 0.1967$) and use condom in anal intercourse ($P = 0.6508$). There was a higher frequency, in this study, HPV positivity in young women (18-30 years), who had between 2-5 lifetime sexual partner and reported anal intercourse (**Table 1**).

The comparison between histological results and identification of HPV revealed 100% positivity HPV in lesions with a histological diagnosis of neoplasia, independent of the degree. In patients diagnosed as Ia 70.58% (24/34) and Ib 85.18% (23/27) also exhibited positivity for HPV. This results were not statistically significant ($P = 0.2157$).

Regarding to histological diagnosis HPV positive and 16 staining, 75% cases classified as II group were positively concordant for both. The majority of cases classified as Ia and Ib positive HPV were not p16 staining, only two cases were positive, so that statistical data showed significance between three groups ($P < 0.0001$), despite the low number of cases in group II (**Table 3**).

Discussion

In this study the most patients who reported having anal intercourse did not use condoms, which increases the probability of HPV infection and reveals a lack of knowledge about the risk of infection in the anal region. The anal canal, as well as the entire anogenital tract, can be a part of HPV circuit or may even serve as reservoir for the virus due to the presence of squa-

mous epithelium. The lifetime number of sexual partners is a significant risk factor for HPV even after adjustment for recent sexual behavior [21]. This can be verified in this study, where women who had multiple partners showed higher HPV positivity.

HPV infection is a risk factor for the development of squamous premalignant and malignant lesions in the anal area. The interaction of viral oncoproteins, E6 and E7, with cell cycle regulatory proteins, p53 and pRb, and the relationship between pRb and the transcription factor E2F, can lead to the activation of cyclin-dependent kinases (CDK4 and CDK6) which, in turn, leads to the expression of associated protein kinases, such as p16 [22, 23]. p16 expression is up-regulated in the transformation caused by infection with oncogenic HPV, and showed itself as a sensitive marker for squamous intraepithelial lesions of the female genital tract [24, 25].

So far, the majority of studies focus on marking with p16 in cervical samples [26, 27]. In cases of grade II and III Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN), a greater p16 expression occurs while positivity in cases of CIN I, although uncommon, appears to have a risk of progression to malignancy [28]. According to Lu et al. [29], there is a similarity in marking with p16 in both anal and cervical samples and showed strong and diffuse nuclear staining (with some cytoplasmic staining) in all cases of anorectal squamous cell carcinoma.

Our findings are in agreement with Kreuter et al. [30], when demonstrated that protein expression in normal anal mucosa is only null or positive in a number of isolated cells and restricted to the basal layer, which may suggest that the lesion has a higher potential progression. Thus p16 protein identification through immunohistochemistry is an excellent addition-

p16 and anal intraepithelial lesion

al tool in the diagnosis of high grade anal dysplasia.

Pirog et al. [31], stated that p16 is a highly sensitive and specific marker for high grade AIN, in relation to low-grade lesions, and thus can aid in the classification of neoplasia related to HPV. 100% sensitivity and 100% specificity to diagnose high-grade AIN was observed by Kreuter et al [30]. Our results showed higher positivity for p16 in neoplasia cases but due the low number of neoplasia cases cannot reach a conclusion about the specificity of the marker.

Large cases severe lesions were not prevalent in our results, however this was due to type of population studied, composed of immunocompetent women, that represent a group has lower-risk to development of higher degree lesion. Although anal cancer is a rare disease in the general population, it was demonstrated that the incidence of anal cancer is higher in certain high risk groups, such as MSM (Men who have sex with men) and immune suppressed individuals, including those with HIV [32]. Studies comparing p16 staining with the degree of anal lesions were predominantly composed of HIV-positive patients [30, 33].

Regarding the molecular analysis of HPV in our study, the index of positive samples for the virus was higher (78.46%), considering lower degree lesions and low number cases classified as neoplasia. The type sample contributes to a viral detection more efficient. Fresh anal cells result in higher HPV positivity and broader spectrum of HPV genotypes compared to tissue biopsies, once collected cells represent the whole anal canal [34].

Cimino-Mathews et al [35] showed in your study that all (100%) cases of anal and rectal small cell carcinomas were positive for p16, and 100% of anal and 82% of rectal small cell carcinomas were positive for high-risk HPV, demonstrating that high-risk-type HPV can be detected using in situ hybridization in the majority of anorectal small cell carcinomas.

The prognosis of anal squamous cell carcinoma is substantially affected by the disease stage. The early detection and treatment of precursor lesions entails benefits to the patient [30]. The presence of p16 overexpression detected by

immunohistochemical staining is a simple technique that can be used as a prognostic marker [16]. Bean et al. [17], revealed how routine p16 staining can assist in confirming a histological diagnosis or in detecting intraepithelial lesions that appear as negative using the histological method. This demonstrates the importance of combining the histological method with other methods to assist in the results confirmation.

We observed higher positivity for HPV and p16 in group II, but ingroup Ib HPV positive none showed p16 staining. However, only viral presence in anal regionis not necessarily indicative of clinical lesion with higher severity, is important to analyze the viral type involved in infection. Thereby, benign lesions p16 and HPV positive require a monitoring by lesion progression risk.

Histological exam for AIN diagnosis is sometimes difficult and the utilization of additional tools, such as immunohistochemistry and molecular test, PCR, is important to aid the diagnostic accuracy for AIN. The p16 expression is clearly associated with degree lesion. However, considering the results of the present study need more cases of neoplasia for reach a conclusion about the expression this protein in high AIN. There is a need to disseminate about infections in the anal region, similar to that which occurs related to the cervical region, that due similarity of the epitheliums, the anal epithelium is target of HPV infection, as well as the implementation of periodic screening sessions in healthcare systems.

Acknowledgements

Federal University of Pernambuco, Fundation support for science and technology of Pernambuco (FACEPE), Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

Address correspondence to: Maria Julliana Galvão Nunes, Pathology Sector, Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco (UFPE), Campus Universitário, Recife-PE-Brasil, CEP: 50670-901, Cidade Universitária, Pernambuco, Brazil. Tel: +55 81 2126 8484; Fax: +55 81 2126 8485; E-mail: julliana_gnunes@yahoo.com.br

p16 and anal intraepithelial lesion

References

- [1] Siegel R, Jemal MA, Zou Z, Jemal A. Cancer Statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014; 64: 9-29.
- [2] Garrett K, Kalady MF. Anal Neoplasms. *Surg Clin N Am* 2010; 90: 147-161.
- [3] Daling JR, Madeleine MM, Johnson LG, Schwartz SM, Shera KA, Wurscher MA, Carter JJ, Porter PL, Galloway DA, McDougall JK. Human papillomavirus, smoking, and sexual practices in the etiology of anal cancer. *Cancer* 2004; 01: 270-280.
- [4] McCloskey JC, Metcalf C, French MA, Flexman JP, Burke V, Beilin LJ. The frequency of high-grade intraepithelial neoplasia in anal/perianal warts is higher than previously recognized. *Int J STD AIDS* 2007; 18: 538-542.
- [5] Ryan DP, Compton CC, Mayer RJ. Carcinoma of the anal canal. *N Engl J Med* 2000; 342: 792-800.
- [6] Fox PA. Human papillomavirus and anal intraepithelial neoplasia. *Curr Opin Infect Dis* 2006; 19: 62-6.
- [7] Bravo IG, De Sanjose S, Gottschling M. The clinical importance of understanding the evolution of papillomaviruses. *Trends Microbiol* 2010; 18: 432-8.
- [8] Esquenazi D, Bussoloti-Filho I, Carvalho MGC, Barros FS. The frequency of human papillomavirus findings in normal oral mucosa of healthy people by PCR. *Braz J Otorhinolaryngol* 2010; 76: 78-84.
- [9] Hausen HZ. Papillomaviruses in the causation of human cancers-a brief historical account. *Virology* 2009; 384: 260-265.
- [10] Ahdied L, Klein RS, Burk R, Cu-Uvin S, Schuman P, Duerr A, Safaeian M, Astemborski J, Daniel R, Shah K. Prevalence, incidence, and type-specific persistence of human papillomavirus in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative women. *J Infect Dis* 2001; 184: 682-90.
- [11] Moscicki AB, Schiffman M, Kjaer S, Villa LL. Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine* 2006; 24 Suppl 3: S3/42-51.
- [12] Steenbergen RD, De Wilde J, Wilting SM, Brink AA, Snijders PJ, Meijer CJ. HPV-mediated transformation of the anogenital tract. *J Clin Virol* 2005; 32 Suppl 1: S25-33.
- [13] Monk JB, Tewari KS. The spectrum and clinical sequelae of human papillomavirus infection. *Gynecol Oncol* 2007; 107 Suppl 1: S6-S13.
- [14] Termini L, Villa LL. Biomarcadores na triagem do câncer do colo uterino. *J Bras Doencas Sex Transm* 2008; 20: 125-13.
- [15] Khleif SN, De Gregori J, Yee CL, Otterson GA, Kaye FJ, Nevins JR, Howley PM. Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 4350-4.
- [16] Von Knebel Doeberitz M. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer* 2002; 38: 2229-42.
- [17] Bean SM, Eltoum I, Horton DK, Whitlow L, Chieng DC. Immunohistochemical Expression of p16 and Ki-67 Correlates With Degree of Anal Intraepithelial Neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2007; 31: 555-61.
- [18] Walts AE, Lechago J, Bose S. P16 and Ki67 Immunostaining is a Useful Adjunct in the Assessment of Biopsies for HPV-Associated Anal Intraepithelial Neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2006; 30: 795-801.
- [19] de Roda Husman AM, Walboomers JM, Van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. 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; 76: 1057-62.
- [20] Manos MM, Manos MM, Ting Y, Ting Y, Wright DK, Wright DK, et al. Use of Polymerase Chain reaction Amplification for the Detection of Genital Human Papillomaviruses. *Cancer Cells US Patent Office* 1989; 26: 209-14.
- [21] Brogaard KA, Munk C, Iftner T, Frederiksen K, Kjaer SK. Detection of oncogenic genital human papillomavirus (HPV) among HPV negative older and younger women after 7 years of follow-up. *J Med Virol* 2014; 6: 975-82.
- [22] Gupta S, Takhar PP, Degenkolbe R, Koh CH, Zimmermann H, Yang CM, Guan Sim K, Hsu SI, Bernard HU. The Human papillomavirus type 11 and 16 E6 proteins modulate the cell cycle regulator and transcription cofactor TRIP-Br1. *Virology* 2003; 317: 155-64.
- [23] Branca M, Ciotti M, Santini D, Di Bonito L, Giorgi C, Benedetto A, Paba P, Favalli C, Costa S, Agarossi A, Alderisio M, Syrjänen K. p16ink4a expression is related to grade of CIN in high-risk Human papillomavirus but does not predict virus clearance after conization or disease outcome. *Int J Gynecol Pathol* 2004; 23: 354-65.
- [24] Serrano M. The tumor suppressor protein p16INK4a. *Exp Cell Res* 1997; 237: 7-13.
- [25] Tringler B, Gup CJ, Singh M, Groshong S, Shroyer AL, Heinz DE, Shroyer KR. Evaluation of p16INK4a and pRb expression in cervical squamous and glandular neoplasia. *Hum Pathol* 2004; 35: 689-696.
- [26] Amaro-Filho SM, Golub JE, Nuovo GJ, Cunha CB, Levi JE, Villa LL, Andrade CV, Russomano

p16 and anal intraepithelial lesion

- FB, Tristão A, Pires A, Nicol AF. A Comparative Analysis of Clinical and Molecular Factors with the Stage of Cervical Cancer in a Brazilian Cohort. *PLoS One* 2013; 8: e57810.
- [27] Aslani FS, Safaei A, Pourjabali M, Momtahan M. Evaluation of Ki67, p16 and CK17 Markers in Differentiating Cervical Intraepithelial Neoplasia and Benign Lesions. *Iran J Med Sci* 2013; 38: 15-21.
- [28] Guimarães MC, Gonçalves MA, Soares CP, Bettini JS, Duarte RA, Soares EG. Immunohistochemical expression of p16INK4a and bcl-2 according to HPV type and to the progression of cervical squamous intraepithelial lesions. *J Histochem Cytochem* 2005; 53: 509-516.
- [29] Lu DW, El-Mofty SK, Wang HL. Expression of p16, pRb, and p53 Proteins in Squamous Cell Carcinomas of the Anorectal Region Harboring Human Papillomavirus DNA. *Mod Pathol* 2003; 16: 692-699.
- [30] Kreuter A, Jesse M, Potthoff A, Brockmeyer NH, Gambichler T, Stücker M, Bechara FG, Pfister H, Wieland U. Expression of proliferative biomarkers in anal intraepithelial neoplasia of HIV-positive men. *Am Acad Dermatol* 2009; 10: 490-8.
- [31] Pirog EC, Quint KD, Yantiss RK. P16/CDKN2A and Ki-67 Enhance the Detection of Anal Intraepithelial Neoplasia and Condyloma and Correlate With Human Papillomavirus Detection by Polymerase Chain Reaction. *Am J Surg Pathol* 2010; 34: 1449-1455.
- [32] Palefsky JM. Human papillomavirus-related disease in men: not just a women's issue. *J Adolesc Health* 2010; 46: S12-9.
- [33] Bernard JE, Butler MO, Sandweiss L, Weidner N. Anal Intraepithelial Neoplasia: Correlation of Grade With p16INK4a Immunohistochemistry and HPV In Situ Hybridization. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2008; 16: 215-220.
- [34] Pokomandy A, Rouleau D, Ghattas G, Vézina S, Côté P, Macleod J, Allaire G, Franco EL, Coutlée F; HIPVIRG Study Group. Prevalence, clearance, and incidence of anal human papillomavirus infection in HIV-infected men: the HIPVIRG cohort study. *J Infect Dis* 2009; 199: 965-73.
- [35] Cimino-Mathews A, Sharma R, Illei PB. Detection of Human Papillomavirus in Small Cell Carcinomas of the Anus and Rectum. *Am J Surg Pathol* 2012; 36: 1087-92.

5.2 Artigo 2

GENOTYPING OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS IN CERVICAL AND ANAL MUCOSA OF WOMEN

Nunes, M.J.G^{1*}; Castor, M.G.F.C².; Oliveira, T.F¹.; Souza, P.R.E³.; Pontes-Filho, N.T^{1,4}

1. Laboratory of Immunopathology Keizo Asami / Biological Sciences Center / Federal University of Pernambuco

2. Pelvis Department, Cancer Hospital of Pernambuco, Av. Cruz Cabugá, 1597—Santo Amaro, Recife, Pernambuco P.O. Box 50040-000, Brazil

3. Departamento de Biologia, Área de Genética, da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE – Recife (PE), Brasil.

4. Pathology Department, Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco,

***Corresponding**

Pathology Department,
Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA)
Federal University of Pernambuco (UFPE)
Campus Universitário, Cidade Universitária
Recife - PE - Brazil
CEP: 50670-901
Phone: + 55 81 2126 8484
Fax: + 55 81 2126 8485
Email: julliana_gnunes@yahoo.com.br

ABSTRACT

The incidence of anal carcinoma and related precursor lesions have been increasing worldwide for both men and women, and human papillomaviruses (HPVs) play a fundamental role in anal carcinogenesis. Women with cervical and vulvar cancer, and patients receiving immunosuppressive treatment have been demonstrated to have an increased risk of anal cancer compared with the general population. The aim of this study was to evaluate simultaneous HPV infection and to compare genotypes in cervical and anal mucosa of women with a history of HPV-associated cervical lesion. Study group was composed of 95 sexually active immunocompetent women. Cells collection was performed from cervical and anal mucosa with a brush, followed by anoscopy and colposcopy exam. DNA was extracted from anal and cervical cell samples and PCR was performed to detect HPV presence (types: 6, 16, 18, 31 and 33). In our study, was found a high rate of HPV infection in anal (70.52%), cervical (74.73%) and simultaneous cervical and anal mucosa (54.73%). Simultaneous infection (anal and cervical mucosa) by the same type HPV was observed in 17.30% of the patients. Among all HPV types identified, the predominant genotype in anal and cervical samples was HPV 6 (26.38%) and (19.71%), respectively. In high-grade lesion and cervical cancer, the predominant genotype was HPV 16 and in high-grade lesion and anal cancer, while HPV 6 was more prevalent as single infection. The acquisition of simultaneous infection anal and cervical may occur by different means, showing that the anal canal is also a source of infection. The typically late clinical presentation and treatments for invasive disease and high relapse rates indicates that effective early detection and treatment of pre-invasive disease may be of considerable importance, being included as risk group women with cervical HPV infection.

1. INTRODUCTION

The estimated incidence of Human papillomavirus (HPV) infection is high and most sexually active persons will have detectable HPV at least once in their lifetime [1]. Mucosal high-risk HPV cause cervical, most anal, and a subset of vulvar, vaginal, penile and oropharyngeal carcinomas [2]. HPV infection can be acquired through contact with other infected genital areas, especially the vulva in women and penis in men. Contamination due to the proximity of the anal canal with lesions caused by HPV in vulvar, cervical and perianal region should be considered, as well self-contamination [3,4].

Due to the presence of squamous epithelium, the anal canal has previously been considered as routes or reservoirs to the virus. The key biologic similarity between anal intraepithelial neoplasia - AIN and cervical intraepithelial neoplasia - CIN is the causal relation between the oncogenic human papillomaviruses and the development of squamous carcinoma in both the anus and the cervix [5].

The role of oncogenic HPVs in anal carcinogenesis, particularly within squamocolumnar junction is regarded analogous to the development of cervical cancer. Persistent infection of oncogenic HPV in basal cells of the squamocolumnar junction induces the local development of squamous intraepithelial lesions and typically further carcinogenesis [6].

Anal cancer is a relatively low occurring entity but its incidence has been increasing, especially in risk groups. Women with cervical and vulvar cancer, and patients receiving immunosuppressive treatment have been demonstrated to have an increased risk of anal cancer compared with the general population [7,8]. In this context, our aim was

to evaluate simultaneous HPV infection and to compare genotypes in cervical and anal mucosa of women with a history of HPV-associated cervical lesion.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Characterization and sample collection

The investigation was conducted in two referral hospitals in Pernambuco, Brazil: Pelvis Sector of Cancer Hospital of Pernambuco-Brazil and Lower Genital Tract Pathology Clinic at the Women's Healthcare Center of the Prof. Fernando Figueira Institute of Integrated Medicine. The study was conducted with 95 sexually active women ranging between 18 and 60 years old, selected by spontaneous demand from 2013 until 2016 and HIV-uninfected. The exclusion criteria included women immunodeficiency (HIV-infected, autoimmune disease and use of immunosuppressive drug), pregnancy, out of the age range (18 – 60 years) and taken HPV vaccine.

Cells were collected from the anal canal (from the transformation zone to the rectum) and cervical region, a brush was used to smear the entire ectocervix and endocervix. Following, an exfoliated anal cell specimen was obtained using another brush. Each sample was stored separately in PBS buffer at 4°C until analysis. In total, 190 cervical and anal samples were collected at the same time. After collection, the patients were submitted to colposcopy and high-resolution anoscopy (HRA) to identify cervical and anal lesions. It was used acetic acid (5%) for preview the lesion marked and subsequently biopsy.

2.2 Histopathological Diagnosis

Biopsy and histopathological diagnosis were only possible in patients who were seen changes at the colposcopy and anoscopy exam. Hospital pathology department provided the result of histopathology.

According to the obtained data, histopathological anal results were grouped as I- No lesion (without histologic alterations), II- Proliferative and inflammatory change, III- Low-grade lesion (condyloma, polyp and AIN-I) and IV-high-grade lesion and cancer (AIN-II, AIN-III and cancer). The histopathological cervical results were grouped as I- No lesion (without histologic alterations), II- Low-grade lesion (CIN-I) and III-high-grade lesion and cancer (CIN-II, CIN-III and cancer).

2.3 DNA extraction and β -globin PCR

DNA was extracted from anal cells using DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen Inc, USA) in accordance with the manufacturer's manual. PCR gene β -globin was done in order to show that samples contained adequate DNA and were free of substances inhibitory to PCR. DNA amplification was performed using specific primers yielding a 268bp amplicon. Ultrapure water was used as negative control and DNA extracted from human blood was used as positive control.

2.4 HPV identification and genotyping

The presence of HPV in anal samples was analyzed by PCR using consensus primers for the region of the HPV L1 gene, GP5+/6+ (5'-TTTGT TACTGTGGTAGATACTAC-3'/ 5'-GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3') [9] and MY09/11 (5'-CGTCCMARRGGAWACTGAT-3'/ 5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3') [10] that yield a 150bp and 450bp amplicon, respectively. PCR was prepared with GoTaqGreen of Master Mix (Promega®) using 1µL DNA (~30ng DNA). Ultrapure water was used as negative control and pBR322.HPV16 plasmid was used as positive control. PCR conditions were performed as follows: (i) 94°C for 3 minutes, (ii) 34 cycles at 95°C for 1 minute, annealing for 1 min, 72°C for 1 minute, (iii) final extension at 72°C for 10 min. MY09/11 primers annealed at 55°C, whereas GP5+/6+ annealed at 45°C. Amplicons were observed on 1% agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide.

Type-specific detection of HPV was performed using conventional PCR with primers specific for HPV 6, 16, 18, 31 and 33 [11,12]. The PCR conditions used for primers HPV 6, 18, 31 and 33 were (i): 94°C for 5 min, (ii) 35 amplification cycles at 95°C for 30 seconds, 57°C for 30 seconds and 72°C for 1 minute, and (iii) a final extension at 72°C for 10 minutes. For primer HPV16 the annealing temperature used was 60°C, the remaining steps occurred under the same conditions. Amplicons were observed on 1% agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide.

2.5 Statistic analyzes

Data analysis using the Chi-square and Fisher exact test was performed in this study. All statistical analyses were performed with GraphPad Prism software version 6.0. (Graph-Pad Software, San Diego, CA). All p-values <0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

In this study were included 95 women with the following profile, mean age 40.6 (range, 19–59 years), and first sexual activity age mean 17.5. Sixty-seven (70.52%) of all patients studied (95) practiced anal sex and only six (8.95%) used condom. The most of patients had between 2 - 5 sexual partners (65.26% -62/95). Smoking and alcohol was observed in 26.31% (25/95) and 43.16% (41/95), respectively.

Regarding histological diagnosis, the results obtained from anal lesion were I- No lesion (n=32), II- proliferative and inflammatory change (n=16), III- Low-grade lesion (n=27) and IV-high-grade lesion and cancer (n=20). Moreover, for cervical lesions I- No lesion (n=45), II- Low-grade lesion (n=14) and III- high-grade lesion and cancer (n=36). Sixty-three patients (66.31%) showed some change anal and fifty (52.63%) cervical lesion in the histopathological exam in accordance with colposcopy and anoscopy exam.

HPV detection showed positivity rate in anal samples of 70.52% (67/95) and cervical 74.73% (71/95), considering positive results when both or at least one set of primers (GP5+/6+ and/or MY09/11) was positive. In the positive samples, it was possible to identify specific HPV types evaluated in 44.77% (30/67) and 36.62% (26/71) of the anal and cervical samples, respectively.

Among HPV types identified, the predominant type in the anal and cervical mucosa are presented in Figure 1. Comparison between histopathological diagnosis and

HPV types found in anal and cervical mucosa are shown in Table 1, where is possible to observe the prevalence of HPV16 in high-grade lesions and cervical cancer and the prevalence of HPV6 in high-grade lesions and anal cancer.

Simultaneous anal and cervical HPV infections were detected in 54.73% (52/95) and concordance between evaluated genotypes was observed in 17.30% (9/52), being 66.7% (6/9) observed with HPV06. The prevalence of anal HPV was higher in women with cervical high-grade lesions (CIN2, 3 or cancer) (86.11% - 31/36).

Association between HPV infection and profile of patients exhibiting risk factors for the development of anal and cervical neoplasia are listed in Table 2. Our findings suggest that regarding to the risk factors, receptive anal intercourse could be observed as prevalent risk to anal HPV infection ($p < 0.05$). Women under 30 years old were more susceptible to cervical and anal HPV infection (83.33% - 10/12 and 91.67% - 11/12, respectively), not statistically significant. Moreover, women who reported more than 5 partners showed increased prevalence of anal infection with high-risk HPV evaluated in this study (HPV16, 18, 31 and 33) in 69.23% of cases (9/13), which was considered statistically significant ($p < 0.05$).

DISCUSSION

This study evaluated concurrent cervical and anal HPV infection and revealed a high rate of concurrent infection, but not by the same viral types. Different degrees of CIN and AIN have been studied and it can be seen that patients with high grade CIN (2 and 3) are more likely to anal HPV infection. Anal cancer presents some similarities to cervical cancer in its etiology, like cervical intraepithelial neoplasia, human

papillomavirus infections may cause anal intraepithelial neoplasia, which sometimes progresses from low to high grade and is found in areas adjacent to squamous-cell carcinoma [13].

Anogenital HPV infection is consistently multicentric and cervical HPV infections may be a source of viral dissemination in the anal epithelium [14]. In our study, we found a high percent HPV infection in anal (70.52%), cervical (74.73%) and simultaneous cervical and anal mucosa (54.73%), but the concordance of the HPV genotypes was observed in only 17.30% (9/52), very low rate compared with Guler et al (2013) [15] that observed concordance in 58.3%. Sehnal (2014) [16] also evaluating HIV-uninfected women detected cervical, anal, and concurrent cervical and anal HPV infections in 82.6%, 48.3% and 42.4%, respectively, evaluating only patients with lesion.

The anal canal and perianal region are colonized with a larger variety of HPV genotypes than the female cervix, and HPV 6 and HPV 11 are more common in and around the male anus than the penis or the female cervix and vulva [17,18]. Our data corroborate with these authors, where in high-grade lesion and cervical cancer, the predominant genotype was HPV 16 and in high-grade lesion and anal cancer, HPV 6 was more prevalent as single infection. Cornall et al (2013) [19] studied the potential for association of low-risk genotypes with anal SSC and with high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) and revealed that HPV 6 and 11 can occasionally be associated with high-grade lesion and anal cancer. The detection of HPV 6 in HSIL and invasive carcinomas, in the absence of high-risk HPV genotypes, suggests a possible pathogenic role for HPV 6 in anal and perianal neoplasia.

Some authors emphasize the prevalence of high-risk genotypes associated with HSIL and anal cancer. According to Serup-Hansen et al (2014) [20] and Slama et al, (2015) [21] HPV 16 is the most prevalent subtype, found in 81% of anal carcinomas.

Sehna et al, (2014) [16] found HPV 16 predominant evaluating anal and cervical samples. Our data showed HPV06 was the predominant genotype in anal and cervical samples. Considering high-grade lesion and cervical cancer, the predominant genotype was HPV16, data concordant with Sehna (2014) [16]. Our data was discordant with Slama due to the prevalence of genotype HPV 6 in high-grade lesion and anal cancer, indicating that the genotype considered low-risk may be related to development of high-grade lesion.

The risk factors predisposing to anal cancer include female gender, HPV infection of the lower genital tract, lifetime number of sexual partners, genital warts, cigarette smoking and receptive anal intercourse [22]. Concurrent cervical and anal HPV infections were detected in 54.73% of patients. In similar study the rate of infection concurrent was observed in 42.4% by Slama in 2015 [21], which reported as significant risk factor: >5 lifetime sexual partner, smoking > 60 cigarettes per week, and a history of anal intercourse or any type of sexual contact with the anus including non-penetrative anal sex. In our study factors such as more than 2 lifetime sexual partners, under age 30 and receptive anal intercourse were risk factors for anal infection. Prevalence of HPV infection decreases by increasing age, having a peak between ages 18 and 30 indicating a high possibility of regression [23].

Our data are in agreement with Hessol et al, (2009) [24] which revealed that women with a history of receptive anal intercourse has 3.8 times more likely to have AIN than women with no history of such relations, independent of their immune condition. Whereas our study, the prevalence of different genotypes in cervix and anus, we may emphasize that high rate of patients who related anal intercourse contributed to such infection.

Smoking also has been identified as a risk factor for (persistent) cervical and anal HPV infection and anogenital intraepithelial neoplasia, in HIV-negative and HIV-positive individuals [25,26,27]. Our data showed no relationship between smoking and HPV anal infection. Other important risk factor is history of CIN. A study reported a 16-fold higher risk for anal cancer for women with a history of CIN and a six fold higher risk for women with a history of cervical cancer [28], indicating that high-grade AIN in HIV-uninfected women is related with lesions caused by HPV infection in other sites, as CIN.

Although screening for cervical cancer has long been considered the standard of care, little is known about anal cancer screening despite the growing number of new cases per year, the majority of these among women [19, 28, 30, 31]. Wentzensen et al. (2014) [32] emphasized that a combination of anal cytology and HPV genotyping provided the highest accuracy for detecting anal precancer. Anal HPV testing screening should be done in all women with severe cervical lesions caused by HPV16 and a history of any sexual contact with the anus, heavy smoking and/or more than 5 lifetime sexual partners [21].

The typically late clinical presentation, morbidity of treatments for invasive disease and high relapse rates indicates that effective early detection and treatment of pre-invasive disease may be of considerable importance.

This study evaluated simultaneous anal and cervical HPV infections and showed that the prevalence of anal HPV was higher in women with cervical high-grade lesions (CIN2, 3 or cancer). Our data support that HIV-uninfected women has high rate of simultaneous infection HPV, however, concordance of HPV types infecting the cervix and anal canal was relatively low. Thus, we can affirm that the acquisition of simultaneous infection anal and cervical may occur by different means, showing that the anal canal is also a source of infection.

Anal cancer has many parallels with cervical cancer in that HPV infection is the causative factor in nearly all cases, and there is a spectrum of anal precancerous changes. Genotypes considered low risk may present different activity depending on the site of infection, as the prevalence low-risk genotype in the cases of AIN 2, 3 and anal cancer in this study.

Grat et al., (2016) [33] reveals that given the potential simultaneous of cervical and anal HPV infections, screening for high-risk anal HPV infection should be implemented in patients with high-risk cervical HPV infections.

The typically late clinical presentation, morbidity of treatments for invasive disease and high relapse rates indicates that effective early detection and treatment of pre-invasive disease may be of considerable importance, highlighting inclusion in the risk group of HIV-uninfected women with cervical HPV infection, establishing screening programs for anal cancer and precancerous lesions.

REFERENCES

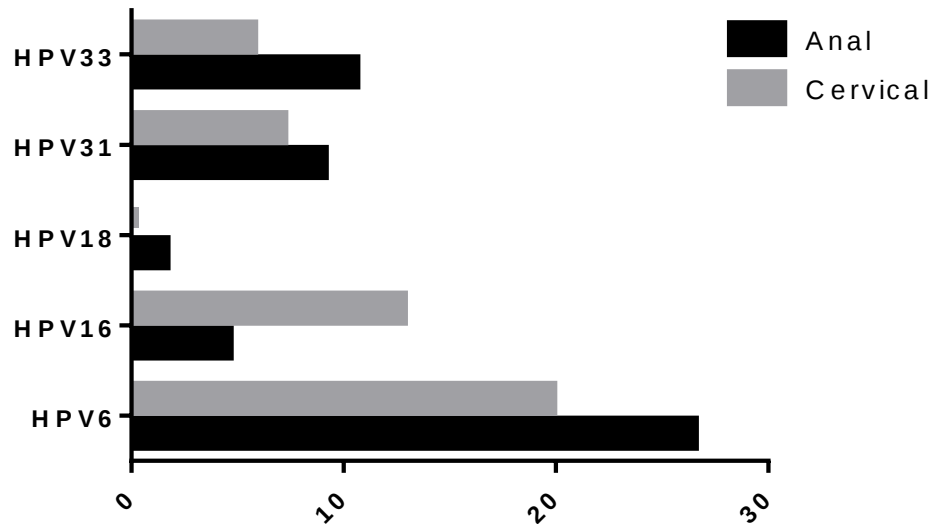
1. Chesson HW, Dunne EF, Hariri S, Markowitz LE (2014) The estimated lifetime probability of acquiring human papillomavirus in the United States. *Sex Transm Dis* 41:660–4.
2. De Martel C, Ferlay J, Franceschi S et al. (2012) Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol* 13: 607–615.
3. Giraldo P, Jacyntho C, Costa C, et al (2009) Prevalence of anal squamous intraepithelial lesion in women presenting genital squamous intraepithelial lesion. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 142(1):73–75.
4. Palefsky JM. (2010) Human papillomavirus-related disease in men: not just a women's issue. *J Adolesc Health*. 46 (4 Suppl): S12–S19.
5. Darragh T, Winkler B (2011) Anal Cancer and Cervical Cancer Screening: Key Differences. *Cancer Cytopathol* 119:5–19
6. Fritsch H, Zehm S, Illig R et al. (2010) New insights into the development and differentiation of the human anorectal epithelia. Are there clinical consequences?, *Int. J. Colorectal Dis.* 25 (10) 1231–1242.
7. Elorza G, Saralegui Y, Enríquez-Navascués JM et al. (2016) Anal intraepithelial neoplasia: A narrative review. *Rev Esp Enferm Dig (Madrid)* 108 (1) 31-39.
8. Palefsky JM, Giuliano AR, Goldstone S et al. (2011) HPV vaccine against anal HPV infection and anal intraepithelial neoplasia, *N. Engl. J. Med.* 365 1576–1585.
9. Husman AMGR, Walboomers JM, Van den Brule AJ et al (1995) 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.* 76: 1057–62.

10. Manos MM, Ting Y, Wright DK, et al. (1989) Use of Polymerase Chain reaction Amplification for the Detection of Genital Human Papillomaviruses. *Cancer Cells*. US Patent Office 7: 209–14.
11. Wang X, Tian X, Liu F et al (2010) Detection of HPV DNA in esophageal cancer specimens from different regions and ethnic groups: a descriptive study. *BMC Cancer* 10 (19) 1-8
12. Karlsen F, Kalantari M, Jenkins A et al (1996) Use of Multiple PCR Primer Sets for Optimal Detection of Human Papillomavirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 34 (9) 2095–2100
13. Fenger C. (1991) Anal neoplasia and its precursors: facts and controversies. *Semin Diagn Pathol* (8):190-201.
14. Hessol NA, Holly EA, Efird JT et al. (2013) Concomitant anal and cervical human papillomavirus infections and intraepithelial neoplasia in HIV-infected and uninfected women. *AIDS* 17 27(11):1743-51.
15. Guler T, Uygur D, Uncu M et al. (2013) Coexisting anal human papilloma virus infection in heterosexual women with cervical HPV infection. *Arch Gynecol Obstet* 288:667–672
16. Sehnal B, Dusek L, Cibula D, et al. (2014) The relationship between cervical and anal HPV infection in women with cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Virol* 59:18-23.
17. Barzon L, Militello V, Pagni S, et al. (2010) Distribution of human papillomavirus types in the anogenital tract of females and males. *J Med Virol* 82:1424–30.
18. Goldstone S, Palefsky JM, Giuliano AR, et al. (2011) Prevalence of and risk factors for human papillomavirus (HPV) infection among HIV seronegative men who have sex with men. *J Infect Dis* 203:66–74.
20. Serup-Hansen E, Linnemann D, Skovrider-Ruminski W, et al. (2014) Human papillomavirus genotyping and p16 expression as prognostic factors for patients with American Joint Committee on Cancer stages I to III carcinoma of the anal canal. *J Clin Oncol* 32 (17): 1812–7.

21. Slama J, Sehnal B, Dusek L, et al. (2015) Impact of risk factor on prevalence of anal HPV infection in women with simultaneous cervical lesion. *Neoplasma* 62 (2): 308-14.
22. Palefsky JM. (1994). Anal human papillomavirus infection and anal cancer in HIV-positive individuals: an emerging problem. *AIDS* 8(3):283-95.
23. Stanley M (2010) Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecol Oncol* 117(2 Suppl):S5–S10
24. Hessol NA, Holly EA, Effird JT, et al. (2009) Anal intraepithelial neoplasia in a multisite study of HIV-infected and high-risk HIV-uninfected women. *AIDS* 23:59-70.
25. Daling JR, Madeleine MM, Johnson LG, et al. (2004) Human papillomavirus, smoking, and sexual practices in the etiology of anal cancer. *Cancer* 101: 270–280.
26. Schwartz LM, Castle PE, Follansbee S, et al. (2013) Risk factors for anal HPV infection and anal precancer in HIV-infected men who have sex with men. *J. Infect. Dis.* 208: 1768–1775.
27. Jensen KE, Schmiedel S, Frederiksen K, et al. (2012) Risk for cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse in relation to smoking among women with persistent human papillomavirus infection. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 21: 1949–1955.
28. Saleem AM, Paulus JK, Shapter AP, et al. (2011) Risk of Anal Cancer in a Cohort With Human Papillomavirus–Related Obstet Gynecol. 117:643-9.
29. Park IU, Ogilvie JW Jr, Anderson KE, et al. (2009) Anal human papillomavirus infection and abnormal anal cytology in women with genital neoplasia. *Gynecol Oncol* 114:399–403.
30. Edgren G, Sparen P. (2007) Risk of anogenital cancer after diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia: a prospective population-based study. *Lancet Oncol* 8 (4): 311–6.
31. National Cancer Institute. Surveillance, epidemiology and end results: anal cancer report. Available at: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/anus.html>. Retrieved May 12, 2015.

32. Wentzensen N, Vinokurova S, Von Knebel Doeberitz M (2004) Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract 64 (11): 3878-84
33. Grat K, Grat M, Wronka K et al . (2016) Cervical human papilloma virus infection in the early postoperative period after liver transplantation: prevalence, risk factors, and concordance with anal infections. Clinical transplantation.

Figure 1: Graphic HPV types identified in anal and cervical samples.



Anal samples: was HPV06 (26.38% - 19/67), HPV16 (4.47% - 3/67), HPV18 (1.49% - 1/67), HPV31 (8.95% - 6/67) and HPV33 (10.44% - 07/67).

Cervical samples: HPV06 (19.71% - 14/71), HPV16 (12.67% - 09/71), HPV18 (0%), HPV31 (7.04% - 05/71) and HPV33 (5.63% - 4/71).

Table 1: Comparison between histopathological diagnosis and HPV types found in anal and cervical mucosa.

<i>Histopathological Diagnosis with HPV identified (n= anal/cervical)</i>	HPV6		HPV16		HPV18		HPV31		HPV33	
	<i>Anal</i>	<i>Cervical</i>	<i>Anal</i>	<i>Cervical</i>	<i>Anal</i>	<i>Cervical</i>	<i>Anal</i>	<i>Cervical</i>	<i>Anal</i>	<i>Cervical</i>
<i>I- No lesion (n=05/06)*</i>	05	05	-	-	-	-	01	-	-	-
<i>II - Proliferative and inflammatory change (n= 1/-)*</i>	01	-	-	-	-	-	01	-	-	-
<i>III- Low-grade lesion (n= 12/06)*</i>	07	05	02	01	01	-	02	01	02	-
<i>IV- high-grade lesion and cancer (n= 12/14)*</i>	06	04	01	08	-	-	02	03	05	04
Total (30/26)	19	14	03	09	01	-	06	04	07	04

*Some patients had multiple infections, so the number of patients in each group is different from the number of HPV types found.

Table 2: Association between HPV infection and risk factors for cervical and anal neoplasia

Risk factors	Positivity HPV			
Age (years)	Cervical n (%)	<i>p</i>	Anal n (%)	<i>p</i>
<i>Younger than 30 (n=12)</i>	10 (83.33)	0.7242	11 (91.67)	0.1027
<i>30 - 60 (n= 83)</i>	61 (73.49)		56 (67.47)	
Partners				
<i>1 (n= 17)</i>	11 (64.70)	0.0590*	9 (52.94)	0.7166*
<i>2-5 (n= 62)</i>	51 (82.26)		45 (72.58)	
<i>>5 (n= 16)</i>	9 (56.25)		13 (81.25)	
Age at 1st coitus				
<i><18 years (n= 74)</i>	53 (71.62)	0.2596	53 (71.62)	0.7869
<i>>18 years (n= 21)</i>	18 (85.71)		14 (66.66)	
Anal intercourse				
<i>Yes (n= 67)</i>	49 (73.13)	0.7961	52 (77.61)	0.0265
<i>No (n= 28)</i>	22 (78.57)		15 (53.57)	
Alcohol consumption				
<i>Yes (n= 41)</i>	30 (73.17)	0.8141	28 (68.29)	0.8206
<i>No (n= 54)</i>	41 (75.92)		39 (72.22)	
Current smoking				
<i>Yes (n= 25)</i>	20 (80)	0.5967	17 (68)	0.8006
<i>No (n= 70)</i>	51 (72.86)		50 (71.43)	

* χ^2 test

5.3 Artigo 3

Differential expression of TNF- α and β -defensin-3 in anal mucosa of patients with Low and High-Grade Anal Intraepithelial Neoplasia

Nunes, M.J.G¹.; Castor, M.G.F.C².; Oliveira, T.F¹.; Souza, P.R.E¹.; Souto, F.O¹.;

Pontes-Filho, N.T^{1,3}

1. Program Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Biological Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235—Cidade Universitária, Recife, Pernambuco P.O. Box: 50670-901, Brazil.

2. Pelvis Department, Cancer Hospital of Pernambuco, Av. Cruz Cabugá, 1597—Santo Amaro, Recife, Pernambuco P.O. Box 50040-000, Brazil

3. Pathology Department, Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235—Cidade Universitária, Recife, Pernambuco P.O. Box: 50670-901, Brazil.

***Corresponding**

Pathology Department,
Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA)
Federal University of Pernambuco (UFPE)
Campus Universitário, Cidade Universitária
Recife - PE - Brazil
CEP: 50670-901
Phone: + 55 81 2126 8484
Fax: + 55 81 2126 8485
Email: julliana_gnunes@yahoo.com.br

ABSTRACT

Anal cancer is a rare malignancy where about 90% of the cases are attributable to persistent infection with human papillomavirus (HPV). This persistent infection depends, largely, on HPV immune system evasion and efficiency of the host immune system. Components of innate immunity in the anus include the physical epithelial barrier, antimicrobial peptides (defensins) and proinflammatory cytokine, however, the complete knowledge about these components in anal cancer and HPV lesion has not yet been fully elucidated. Thus, the aim of this study was to elucidate the association between β -defensin-2, 3 and TNF- α (tumor necrosis factor alpha) expression local in the anal mucosa and the degree of HPV-associated anal lesions. First, cells were collected from anal canal with a brush, followed by anoscopy exam. PCR was performed to detect HPV presence using the primers GP5+/6+ and MY09/11. RNA was extracted from anal cell samples and Real-time PCR was performed using specific primers to β -defensin 2 and 3, TNF- α . Histological results of the current anal lesion were grouped as high-grade lesion (AIN2 and 3) (24.24%), low-grade lesion (polyp, AIN1 and condyloma) (30.30%) and normal (without histological change) (45.45%). Our findings showed a decreased TNF- α expression in high-grade anal lesion compared to normal ($p < 0.0001$), whereas expression levels of β -defensin 3 were increased in high-grade patients ($p = 0.0009$). The β -defensin 2 expression showed no association with different degrees of anal lesion. In conclusion, the significant association between high-grade anal lesion and the low levels of TNF- α expression revealed the role of this cytokine in containing the viral infection and the high levels of expression of β -defensin 3 appear not to be sufficient to eliminate the infection and prevent the progression of the anal lesion.

1. INTRODUCTION

Anal cancer is a rare malignancy where about 90% of the cases are attributable to persistent infection with human papillomavirus (HPV), similar to cervical cancer (Wu et al, 2012). Persistent infection of oncogenic HPV in basal cells of the squamocolumnar junction induces the local development of squamous intraepithelial lesions and typically further carcinogenesis (Herfs et al, 2012). Papillomaviruses persistent elicit a weak or undetectable specific immune response and little or no inflammatory response.

During the early stages of an HPV infection, the host innate immune response becomes the first line of defense against the infection and tissue damage, and can promote a cytokine-mediated pro-inflammatory process, which links the innate with the adaptive immune response (Renoux et al, 2011).

HPV infections elicit the production and release of several inflammatory cytokines from keratinocytes, their main target cell type, from skin fibroblasts and from different components of the innate and adaptive immune response. The tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) is a pleiotropic cytokine with important functions in homeostasis and disease pathogenesis (Kallioliias, 2016).

TNF induces inflammation, activates vascular endothelium, orchestrates the tissue recruitment of immune cells and promotes tissue destruction. The biological significance of TNF- α is in its ability to intensify the synthesis of other cytokines and induce the apoptosis of tumor cells and cells infected by some viruses (Feldman, 2009).

The molecular mechanisms responsible for TNF mediated apoptosis begins with the binding of the trimeric TNF molecule to TNF receptor 1 (TNF R1). However, E6 oncoprotein HPV mediates this apoptosis blockade by interacting with one or more proteins in pathways triggered by TNF signaling (Filippova et al, 2002).

Other antiviral and pro-inflammatory molecules that are part of the innate immune response may affect the growth of HPV-infected cells. Components of innate immunity in the anus also include the physical epithelial barrier and antimicrobial peptides (AMPs) (e.g. β -defensins) (Kreuter, 2009). The defensins are important components of the mucosal innate immunity of the female genital tract, may be involved in the defense against HPV infection (Buck et al. 2006, Klotman & Chang 2006).

The basis for selective recognition of diverse viruses by defensins is largely unknown. Defensins may interact with either the lipid bilayer or envelope glycoproteins of enveloped viruses; however, protein–protein interactions must be critical for binding to non-enveloped viruses (e.g., HPV) (Furci et al, 2007). In a study using a recombinant pseudovirus vector model for HPVs, β -defensins 2 (hBD-2) displayed only little anti-HPV activity (Kreuter 2009).

Immune responses to HPV have predominantly been studied and characterized in the environment of cervical disease, however in the context of anal cancer the immune response to this virus has not yet been fully understood. While the HPV life cycle may be similar across epithelia at different sites, the natural history of Anal Intraepithelial Neoplasia (AIN) may be distinctive from that of (Cervical Intraepithelial Neoplasia) CIN because the anatomy, physiology (e.g. hormonal differences) and immune responses of the anus and cervix are different (Iwasaki, 2010). Thus, the aim of this study was to elucidate the association between β -defensin-2, 3 and TNF- α expression local in the anal mucosa and the degree of HPV-associated anal lesions

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Characterization and sample collection

The investigation was conducted at the Pelvis Cancer Hospital of Pernambuco-Brazil and Lower Genital Tract Pathology Clinic at the Women's Healthcare Center of the Prof. Fernando Figueira Institute of Integrated Medicine, two referral hospitals in Pernambuco, Brazil. The study was conducted with 66 sexually active women ranging between 18 and 60 years old, HIV-uninfected, selected by spontaneous demand from 2013 until 2016. The exclusion criteria included women immunodeficiency (HIV-infected, autoimmune disease and use of immunosuppressive drug), pregnancy, out of the age range (18 – 60 years) and taking HPV vaccine.

Cells were collected from the anal canal (from the transformation zone to the rectum) and two brush was used to smear the anal canal. Each sample was stored separately in PBS buffer at 4°C for HPV detection and stored in RNA later® for expression analysis. After collection, the patients were submitted to high-resolution anoscopy (HRA) to identify anal lesions. It was used acetic acid (5%) for preview the lesion marked and subsequently biopsy. Hospital pathology department provided the histopathology.

2.2 DNA extraction and β -globin PCR

DNA was extracted from anal cells using DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen Inc, USA) in accordance with the manufacturer's manual. PCR gene β -globin was done in order to show that samples contained adequate DNA and were free of substances

inhibitory to PCR. DNA amplification was performed using specific primers yielding a 268bp amplicon. Ultrapure water was used as negative control and DNA extracted from human blood was used as positive control.

2.3 Detection of HPV

The presence of HPV in anal samples was analyzed by PCR using consensus primers for the region of the HPV L1 gene, GP5+/6+ (5'TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3'/5'-AAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3') [9] and MY09/11 (5'-CGTCCMARRGGAWACTGAT-3'/5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3') (Manos et al, 1989) that yield a 150bp and 450bp amplicon, respectively. PCR was prepared with GoTaqGreen of Master Mix (Promega®) using 1µL DNA (~30ng DNA). Ultrapure water was used as negative control and pBR322.HPV16 plasmid was used as positive control. PCR conditions were performed as follows: (i) 94°C for 3 minutes, (ii) 34 cycles at 95°C for 1 minute, annealing for 1 min, 72°C for 1 minute, (iii) final extension at 72°C for 10 min. MY09/11 primers annealed at 55°C, whereas GP5+/6+ annealed at 45°C. Amplicons were observed on 1% agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide.

2.4 Expression analysis

Total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) following the manufacturer's protocol. Quantification and quality of the RNA were performed using NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). cDNA was synthesized by reverse transcription using the Reverse Transcription Kit (Qiagen) according to the

methodology described by the manufacturer. Real-time PCR was performed using a Power SYBR® Green PCR Master Mix, combining the produced cDNA, SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and specific primers for each gene analyzed (β -defensin -2 and -3, TNF- α). The equipment used was the Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR Systems. mRNA expression levels were calculated using the comparative $\Delta\Delta C_t$ method. Relative quantities of all targets in the test samples were normalized to the homogeneously expressed housekeeping gene b-actin. mRNA levels were determined using the median log transformation of the gene expression.

2.5 Statistical analysis

The expression levels of TNF- α , β -defensin 2 and 3 were compared in HPV-infected groups with histological diagnosis of high-grade lesion, low-grade lesion and normal using One-way ANOVA test followed Turkey's test for multiple comparison. Comparisons between patients HPV-infected or uninfected patients with histological diagnosis normal were performed by unpaired t-test. All statistical analysis were performed with GraphPad Prism software version 6.0. (Graph-Pad Software, San Diego, CA). Statistically significant differences were considered if $p < 0.05$.

3. RESULTS

3.1 Histological diagnosis and HPV detection

The histological results of the current anal lesion were grouped as high-grade lesion (AIN2 and 3) (n=16), low-grade lesion (polyp, AIN1 and condyloma) (n=20) and normal (without histological change) (n=30).

HPV detection by PCR technique showed positivity rate of 77.27% (51/66), considering positive results when both or at least one set of primers (GP5+/6+ and/or MY09/11) was positive.

3.2 TNF- α expression

Evaluating of TNF- α expression showed an inversely proportional to the degree of lesion. According our findings, high-grade lesion patients displayed decreasing TNF-alpha expression when compared to HPV-infected patients with normal histological diagnosis ($p < 0.0001$). (Figure 1A). There was no statistically significant in expression when comparing patients with low-grade and high-grade anal lesions. In addition, there is no difference in expression when comparing HPV-infected or uninfected patients with histopathological diagnosis normal.

3.3 β -defensin 2 expression

Evaluating the β -defensin 2 expression, we observed no significant difference between groups of HPV positive patients with different degrees of anal lesion (Figure 2A). Comparing patients with histopathological diagnosis normal HPV positive and negative we observed that HPV positive patients had an increased expression of β -defensin 2 ($p=0.0428$).

3.4 *DEF103b* (β -defensin 3) expression

The expression of β -defensin 3 was increased in lesion-dependent manner ($p=0.0009$). In the analysis of multiple comparisons, we observed increased expression in AIN high-grade comparing with AIN low-grade and normal, comparisons between AIN low-grade and normal was not statistically significant difference (Figure 2B). There is no difference in expression when comparing patients with histopathological diagnosis normal HPV positive and negative.

DISCUSSION

In this study, we evaluated some molecules of the innate immune system (TNF- α , β -defensins 2 e 3) in response to various degrees of anal lesions caused by HPV. Could be observed a decreased expression of the proinflammatory cytokine TNF- α and an increased of β -defensin- 3 in high-grade anal lesions caused by HPV. The innate immunity response to HPV is mediated by several mechanisms and is required to control infection and disease. During the early stages of HPV infection, the innate immune system produces a pro-inflammatory microenvironment, recruiting cells of innate immunity to kill infected cells, initiating an effective acquired immune response. Dissemination and progressive growth of HPV-induced lesions may be related to escape from local cytokine (Crowley-Nowick PA, 2000).

About TNF expression, the patients HPV-infected who did not develop lesions showed higher expression of TNF- α when compared expression levels in patients who developed high-grade and low-grade anal lesions in the presence of viral infection. Is known that TNF- α is involved in signaling apoptosis in infected cells, a mechanism employed in an effort to stop viral replication and spread (Fillipova, 2002). Therefore, our data suggest that a TNF-mediated response against HPV infection in anal mucosa is present in normal patients.

The transduction of TNFR signals is responsible for several TNF activities in the inflammatory process and in immune responses against infectious agents. However, the E6 protein of HPV is known to directly bind to TNFR-1 and abrogate TNF-induced apoptosis of the host cell. (Tracey et al. 2008). The E6 oncoprotein competes with TNF for TNFR1 receptor binding in order to inhibit the mechanism of apoptosis. The low expression and consequence of low production of TNF facilitates interaction E6-TNFR e

abrogate apoptosis mechanism. In our data, the decreased TNF expression is associated with progression of anal lesion.

TNF exerts a potent cytostatic effect on HPV16-immortalized keratinocytes (Vieira et al 1992, Villa et al 1996). Furthermore, it has been observed that increased tumorigenicity of human keratinocytes transformed by HPV16 is associated with resistance to TNF cytostatic effect (Malejczyk et al, 1994).

Guimarães et al (2015) evaluating culture supernatant of anal mucosal mononuclear cells showed that HIV- infected patients with AIN had increased TNF- α production in the anal mucosa. Haga et al (2017) analyzing TNF-alpha in serum showed that HIV-infected men with high-grade anal lesion displayed higher levels of TNF-alpha than HIV-uninfected men with high-grade anal lesion.

The microenvironment in anal lesions may not be well reflected by the serum level of soluble factors (Haga et al 2017). The effects of TNF on HPV cells depends on variables as cell type studied, the virus type present, microenvironment conditions and other associated infections (Termini et al 2008). Our study evaluated HIV-uninfected women, this may explain the discordance with Guimarães et al (2015).

TNF-alpha may have different effects depending on stage of infection or disease induced by HPV. It may protect against development of disease by inducing cellular immunity and contributing to elimination of viruses, but once viral infection is established it may potentiate disease development and may be a tumor promoter (Boccardo et al 2010; Shimizu et al, 2005)

Clinically, chronic, low-level TNF-alpha exposure is reported to be linked with the acquisition of a pro-malignant phenotype such as increased growth, invasion and metastasis (Szlosarek et al 2006). The role of TNF in HPV infection can be cited in cases where cytokine inhibition has been used for the treatment of chronic inflammatory

diseases and there have been case reports on the activation / reactivation of HPV infection demonstrated by the onset of anogenital warts after initiation of the anti-TNF- α therapy (SOMASEKAR; ALCOLADO, 2004; ANTONIOU et al, 2008)

Regarding the expression of the defensins evaluated, β -defensin 3 expression was significantly increased in low-grade and high-grade lesions, whereas β -defensin 2 was not. Meyer-Holf *et al* (2009) showed increased expressions of β -defensin -2 and -3 in common warts and condylomata acuminata of HIV-negative individuals. In another study, β -defensin -2 and -3 expression was shown to be significantly upregulated in HPV-associated anal intraepithelial neoplasia and anal condylomata acuminata of both HIV-positive and -negative men (Kreuter et al 2009).

Our results on hBD-3 are in concordance with these authors when hBD-3 expression showed association with AIN progression. The direct induction of hBDs by HPV seems possible as the E5 protein of the virus activates the epidermal growth factor receptor, a strong activator of hBD-3 (Pim et al, 1992; Kreuter et al, 2009).

Regarding the relationships between the β -defensin 2 expression and viral infections, the β -defensin 2 showed increased expression in HPV positive patients with normal histological diagnosis compared to uninfected patients. This suggests that β -defensin 2 has a possible little activity in viral presence but is not associated with anal lesion progression. Buck *et al* (2005) evaluating genital papillomaviruses, showed that human β -defensins 2 displayed little or no anti-HPV activity.

Other study has shown that human β -defensin 2 mRNA and protein expression is downregulated in high-grade lesion and squamous cell carcinoma of the uterine cervix as compared with normal cervical epithelium (Hubert et al 2007). These data are in agreement with ours when observe the similar levels of expression between patients normal (no lesion) and high-grade anal lesion.

The evasion of the immune response by HPV is critical for a successful infection. Taken together, our results suggest that persistent HPV infection is associated with lower TNF- α expression levels in the anal environment. On the other hand, the high levels of expression of β -defensin 3 in high-grade anal lesions show that there is a stimulus for the expression and consequent production of this peptide, but it does not present an effective anti-HPV activity, considering association with progression of the lesion.

Few studies evaluate the local expression in the anal mucosa of genes related to the immune response. The lack of data in the anal mucosal due to difficulties in sampling and handling mucosal tissue obscures the search for conclusive findings. Further studies with larger numbers of patients are needed to better understand the role of immune defense against HPV in the anal mucosa and apply it as future therapy.

.

REFERENCES

- Boccardo E, A.P. Lepique, L.L. Villa. The role of inflammation in HPV carcinogenesis, *Carcinogenesis* 31 (11) (2010) 1905–1912.
- Buck CB, Day PM, Thompson CD, Lubkowski J, Lu W, Lowy DR, Schiller JT. Human alpha-defensins block papillomavirus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* (2006) 103: 1516–1521.
- Crowley-Nowick PA, Ellenberg JH, Vermund SH, Douglas SD, Holland CA, Moscicki AB. Cytokine profile in genital tract secretions from female adolescents: impact of human immunodeficiency virus, human papillomavirus, and other sexually transmitted pathogens. *J Infect Dis.* (2000) 181:939–945.
- Feldmann, M. Translating molecular insights in autoimmunity into effective therapy. *Annu. Rev. Immunol.* (2009). 27, 1–27
- Filippova M, Song H, Connolly JL, Dermody TS, Duerksen-Hughes PJ: The human papillomavirus 16 E6 protein binds to tumor necrosis factor (TNF) R1 and protects cells from TNF-induced apoptosis. *J Biol Chem* (2002); 277: 21730–21739.
- Furci L, Sironi F, Tolazzi M, Vassena L, Lusso P. alpha Defensins block the early steps of HIV-1 infection: interference with the binding of gp120 to CD4. *Blood* (2007) 109 2928–35.
- Herfs M, Yamamoto Y, Laury A, Wang X, Nucci MR, McLaughling-Drubin ME, Munger K, Feldman S, McKeon FD, Xian W, Crum CP. A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2012) USA 109 10516–10521
- Hubert,P, Herman L, Maillard C, Caberg JH, Nikkels A, Pierard G, Foidart JM, Noel A, Boniver J, Delvenne P. Defensins induce the recruitment of dendritic cells in cervical human papillomavirus-associated (pre)neoplastic lesions formed in vitro and transplanted in vivo. *FASEB J.*, (2007) 21, 2765–2775
- Iwasaki A. Antiviral immune responses in the genital tract: clues for vaccines. *Nat Rev Immunol* (2010) 10: 699–711.
- Kalliolias GD, Ivashkiv LB. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nature Reviews Rheumatology* (2016) 12, 49–62
- Klotman ME, Chang TL. Defensins in innate antiviral immunity. *Nat Rev Immunol* 6: (2006) 447–456.
- Kreuter A, Skrygan M, Gambichler T, Brockmeyer NH, Stücker M, Herzler C, Potthoff A, Altmeyer P, Pfister H, Wieland U. Human papillomavirus-associated induction of human beta-defensins in anal intraepithelial neoplasia. *Br J Dermatol* (2009) 160: 1197–1205.

Korobowicz A. Biology of tumor necrosis factor type alpha (TNF-alpha). *Pol Merkur Lekarski* (2006) 21:358–61.

Kyo, S, Inoue M, Hayasaka N, Inoue T, Yutsudo M, Tanizawa O, Hakura A. Regulation of early gene expression of human papillomavirus type 16 by inflammatory cytokines. *Virology*, (1994) 200, 130–139. 26.

Manos mm, Ting y, Wright dk, *et al.* Use of Polymerase Chain reaction Amplification for the Detection of Genital Human Papillomaviruses. *Cancer Cells*. US Patent Office. 7: 209–14. 1989.

Malejczyk J, Malejczyk M, Majewski S, Breitburd F, Luger TA, Jablonska S, Orth G: Increased tumorigenicity of human keratinocytes harboring human papillomavirus type 16 is associated with resistance to endogenous tumor necrosis factor-alpha-mediated growth limitation. *Int J Cancer* (1994), 56:593-8

Meyer-Hoffert U, Schwarz T, Schroder JM, Glaser R. Expression of human beta-defensin-2 and -3 in verrucae vulgares and condylomata acuminata. *J Eur Acad Dermatol Venereol* (2008); 22:1050–4.

Olszanecka-Glinianowicz M, Zahorska-Markiewicz B, Żurkowski A, Glinianowicz M. The role of tumor necrosis factor (TNF- α) metabolism. *Wiad Lek* 2005;58:11–12.
Schiffman, M., Castle, P.E., Jeronimo, J., Rodriguez, A.C., Wacholder, S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* (2007) 370, 890–907.

Perry AK, Chen G, Zheng D, Tang H, Cheng G. The host type I interferon response to viral and bacterial infections. *Cell Res* (2005) 15: 407-22.

Pim D, Collins M, Banks L. Human papillomavirus type 16 E5 gene stimulates the transforming activity of the epidermal growth factor receptor. *Oncogene* (1992) 7:27–32.

Renoux, V.M.; Bisig, B.; Langers, I.; Dortu, E.; Clemenceau, B.; Thiry, M.; Deroanne, C.; Colige, A.; Boniver, J.; Delvenne, P.; Jacobs, N. Human papillomavirus entry into NK cells requires CD16 expression and triggers cytotoxic activity and cytokine secretion. *Eur. J. Immunol.* (2011), 41, 3240-3252.

Shimizu Y, Miyazaki Y, Ibuki K, Suzuki H, Kaneyasu K, Goto Y, Hayami M, Miura T, Haga T. Induction of immune response in macaque monkeys infected with simian-human immunodeficiency virus having the TNF-alpha gene at an early stage of infection, *Virology* (2005) 343 (2) 151–161.

Szlosarek P, K.A. Charles, F.R. Balkwill, Tumour necrosis factor-alpha as a tumour promoter, *Eur. J. Cancer* 42 (2006) (6) 745–750.

Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. *Pharmacol Ther* (2008) 117(2): 244-279.

Vieira, K.B, Goldstein DJ, Villa LL. Tumor necrosis factor alpha interferes with the cell cycle of normal and papillomavirus-immortalized human keratinocytes. *Cancer Res.*, (1996) 56, 2452–2457.

Vieira KBL, Goldstein DJ, Villa LL: Tumor necrosis factor α interferes with the cell cycle of normal and papillomavirus immortalized human keratinocytes. *Cancer Res* (1996), 56:2452-7.

Villa LL, Vieira KBL, Pei X, Schlegel R: Differential effect of tumor necrosis factor on proliferation of primary human keratinocytes and cell lines containing human papillomavirus types 16 and 18. *Mol Carcinog* (1992), 6:5-9.

Wada NI, Jacobson LP, Margolick JB, Breen EC, Macatangay B, Penugonda S, Martínez-Maza O, Bream JH. The effect of HAART-induced HIV suppression on circulating markers of inflammation and immune activation. *AIDS*. (2015) 29(4):463-471.

Wu X, Watson M, Wilson R, Saraiya M, Cleveland JL, Markowitz L. Human papillomavirus-associated cancers –United States, 2004–2008. *MMWR* (2012); **61**: 258–261.

Figure 1 A: Relative expression of TNF in HPV-infected patients with different degrees of anal lesion

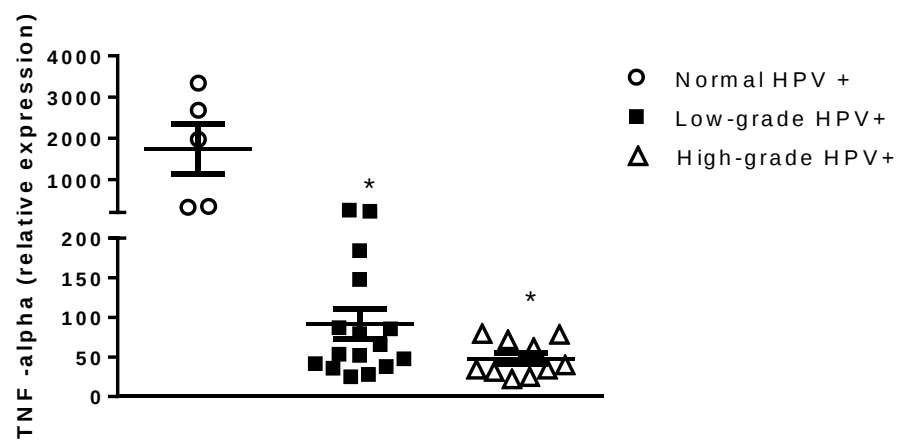


Figure 2A: Relative expression of β -defensin 2 in HPV-infected patients with different degrees of anal lesion

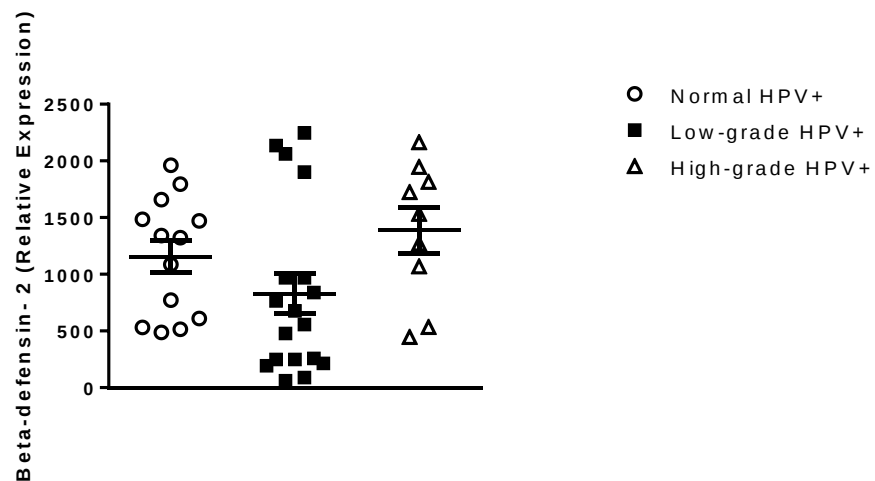
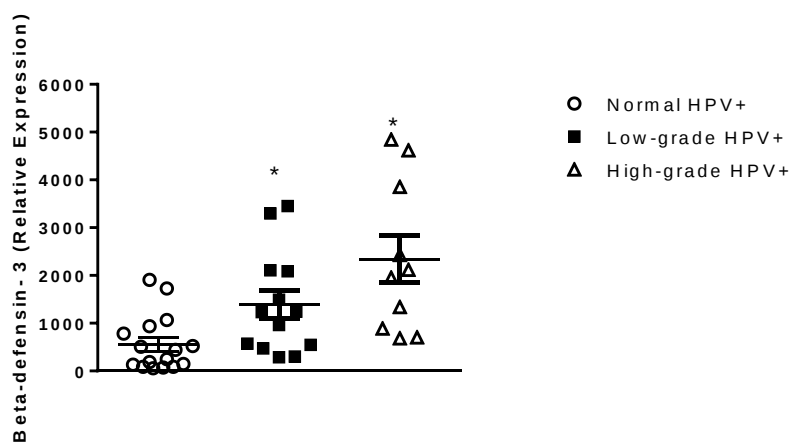


Figure 2B: Relative expression of β -defensin 3 in HPV-infected patients with different degrees of anal lesion



6 CONCLUSÕES

- A imunohistoquímica para p16 se mostra efetiva como técnica auxiliar no diagnóstico de lesões anais devido a positividade nos casos de neoplasia anal, portanto a utilização de técnicas adicionais pode auxiliar na interpretação dos resultados;
- Mulheres com histórico de lesão cervical apresentam alta taxa de infecção anal pelo HPV. A infecção simultânea (cervical e anal), no entanto, não ocorre pelo mesmo tipo viral, na maioria das pacientes. Desta forma, podemos sugerir que a contaminação ocorre por meios distintos e que o canal anal também é uma via de infecção.
- O tipo viral HPV6 mostrou-se prevalente nos casos de NIA II e III. Isto mostra que HPVs considerados de baixo-risco podem causar lesões de alto grau em diferentes sítios, enfatizando que a progressão da lesão depende de vários fatores, não apenas da presença de um tipo viral específico.
- Nossos resultados sugerem que a infecção persistente por HPV está associada a menores níveis de expressão de TNF- α na mucosa anal. Por outro lado, os altos níveis de expressão de β -defensina 3 em lesões anais de alto grau demonstram que há um estímulo para a expressão desta defensina, mas a atividade anti-HPV não se mostra efetiva.

REFERÊNCIAS

- AHDIED, L. et al. Prevalence, incidence, and type-specific persistence of human papillomavirus in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative women. **Journal Infectious Disease**, v. 184, n. 6, p. 682-90, 2001.
- ALBRING L.; BRENTANO, J. E.; VARGAS, V. R. A. O câncer do colo do útero, o papilomavírus humano (HPV) e seus fatores de risco e as mulheres indígenas. **Revista Brasileira Análises Clínicas**, v. 38, n 2, p 87-90, 2006.
- AMADOR-MOLINA, A. et al. Role of Innate Immunity against Human Papillomavirus (HPV) Infections and Effect of Adjuvants in Promoting Specific Immune Response. **Viruses**, v. 5, n.11, p 2624-2642, 2013.
- AMARAL, J. C. et al. Associação de lesões anorretais em portadoras de infecção genital por HPV e neoplasia cérvico-uterina. **Revista brasileira de colo-proctologia**, v. 29, n. 2, p. 203-208, 2009.
- ANTONIOU, C. et al. Genital HPV lesions and molluscum contagiosum occurring in patients receiving anti-TNF-alpha therapy. **Dermatology**, v. 216, n.4, p. 364–365, 2008.
- AZAR, K. K, TANI M. et al. Increased secretion patterns of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha in cervical squamous intraepithelial lesions. **Human. Pathology**, v. 35, n. 11, p. 1376–1384, 2004.
- BAAK, J. P, et al. Dynamic behavioural interpretation of cervical intraepithelial neoplasia with molecular biomarkers. **J Clin Pathol**, v. 59, n. 10, p. 1017-28, 2006.
- BARNARD, P; MCMILLAN, N.A. The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon-alpha. **Virology**, New York, v. 259, n. 2, p. 305-13, 1999.
- BEAHRS, O.H; WILSON, S.M. Carcinoma of the anus. **Annal of Surgery**, v. 184, n. 4, p. 422-8, 1976.
- BENSCH, K.W. et al. hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. **FEBS Letters**, v. 368, n.2, p. 331–5, 1995.
- BERNARD, H.U. et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, v. 401, n. 1, p. 70–79, 2010.
- BETIOL, J.; VILLA, L. L.; SICHERO, L. Impact of HPV infection on the development of head and neck cancer. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 46, n. 3, p. 217–226, 2013.
- BEUTLER, B. et al. Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. **Nature**, v. 316, p. 552–554, 1985.

BEVINS, C. L.; MARTIN-PORTER, E.; GANZ, T. Defensins and innate host defence of the gastrointestinal tract. **Gut**, v. 45, n.6, p. 911–5, 1999.

BLACK, A.P. et al. Human keratinocyte induction of rapid effector function in antigen-specific memory CD4+ and CD8+ T cells. **European. Journal of Immunology**, v. 37, n.6, p. 1485–1493, 2007.

BUCK, C.B. et al. Human alpha-defensins block papillomavirus infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 5, p. 1516-1521, 2006.

BUROKER TR, NIGRO N, BRADLEY G, et al. Combined therapy for cancer of the anal canal: a follow-up report. **Diseases of the Colon & Rectum**, v. 20, n. 8, p. 677–8. 1977.

CARSWELL, E. A. et al. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 72, n. 9, p. 3666–3670, 1975.

CASTELLSAGUE, X.; MUNOZ, N. Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis- role of parity, oral contraceptives and tobacco smoking. **Journal of the National Cancer Institute. Monographs**, Bethesda, v. 31, p. 20-8, 2003.

CASTOR, M. G. F. C. et al. HPV and precancerous lesions of anal canal in women: systematic review. **International Journal Colorectal Disease**, v. 27, n. 3, p.271-6, 2010.

CHANG, G.J.; et al. Surgical treatment of high-grade anal squamous intraepithelial lesions. **Diseases of the Colon & Rectum**, v. 45, n. 4, p. 453-459, 2002

CHESSON, H.W. et al. The cost-effectiveness of male HPV vaccination in the United States. **Vaccine**, v. 29, n. 46, p. 8443–8450, 2011.

COFFEY, K. et al. Lifestyle and reproductive risk factors associated with anal cancer in women aged over 50 years. **British Journal of Cancer**, v. 112, n. 9, p. 1568-1574. 2015.

COUTINHO, J.R.H. Rastreamento de lesões pré-neoplásicas do ânus, citologia anal e anoscopia de alta resolução: novas armas para prevenção. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias**, v. 33, n. 5, p. 311-17, 2006.

DALING, J.R. et al. Cigarette smoking and the risk of anogenital cancer. **American Journal of Epidemiology**, v. 135, n. 2, p 180-9, 1992.

DALING, J.R. et al. Human papillomavirus, smoking, and sexual practices in the etiology of anal cancer. **Cancer**, v. 101, n. 2, p. 270-80, 2004.

DARRAGH, T.M. et al. The lower anogenital squamous terminology standardization project for HPV-associated lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 136, n. 10, p. 1266–97, 2012.

DYSON, N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. **Genes & Development**, v. 12, n. 15, p. 2245–2262, 1998.

EDER, P. et al. Blockers of tumour necrosis factor- α : mechanisms of action. **Gastroenterology Review**, v. 5, p. 290–8, 2011.

EDGREN, G; SPAREN, P. Risk of anogenital cancer after diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia: a prospective population-based study. **The Lancet Oncology**, v. 8, n. 4, p. 311–6, 2007.

ELIASHVILI, N; LANDRY, J; MATTHEWS, R.H. Carcinoma of the anus: strategies in management. **The Oncologist**, v. 7, n. 3, p. 188-199, 2002.

ESQUENAZI, D. et al. The frequency of human papillomavirus findings in normal oral mucosa of healthy people by PCR. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 76, n. 1, p. 78-84, 2010.

ERMOLAEVA, M.A. et al. Function of TRADD in tumor necrosis factor receptor 1 signaling and in TRIF-dependent inflammatory responses. **Nature Immunology**, v. 9, n. 9, p. 1037-1046, 2008.

EVANDER, M. et al. Identification of the $\alpha 6$ integrine as a candidate receptor for papillomavirus. **Journal of Virology**, v. 71, n. 3, p. 5449-59, 1997.

FERRAZ, L. D. C. et al. Ciclo celular, HPV e evolução da neoplasia intraepitelial cervical : seleção de marcadores biológicos. **Journal of the Health Sciences Institute**, v. 30, n. 2, p. 107–111. 2012.

FILIPPOVA, M. et al. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to tumor necrosis factor (TNF) R1 and protects cells from TNF-induced apoptosis. **The Journal Biological Chemistry**, v. 277, n. 24, p. 21730–21739, 2002.

FOX, P. A. Human papillomavirus and anal intraepithelial neoplasia. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 62-6, 2006

FURCI, L. et al. alpha-Defensins block the early steps of HIV-1 infection: interference with the binding of gp120 to CD4. **Blood**, v. 109, n. 7, p. 2928–35, 2007

FURST, D.E. The risk of infections with biologic therapies for rheumatoid arthritis. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 39, n. 5, p. 327–346, 2010.

GALLO, S.A. et al. Theta-defensins prevent HIV-1 Env-mediated fusion by binding gp41 and blocking 6-helix bundle formation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 27, p. 18787–92, 2006.

- GANZ, T. Defensins and host defense. **Science**, v. 286, n. 5439, p. 420–1, 1999.
- GARRETT, K.; KALADY, M. F. Anal Neoplasms. **Surgical Clinics of North America**, v. 90, n. 1, p. 147–161, 2010.
- GHOSH, S; KARIN, M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. **Cell**. v. 109 Suppl;S81-96, 2002.
- GOLDSTONE, R. N. et al. Long-term follow-up of infrared coagulator ablation of anal high-grade dysplasia in men who have sex with men. **Disease of the Colon & Rectum**, v. 54, n. 10, p. 1284–1292, 2011.
- GRAHAM, B. D. et al. Topical 5-fluorouracil in the management of extensive anal Bowen's disease: a preferred approach **Disease of the Colon & Rectum**, v. 48, n. 3, p. 444–50, 2005.
- HANDISURYA, A. et al. Anogenital Human Papillomavirus Prevalence is Unaffected by Therapeutic Tumour Necrosis Factor-alpha Inhibition. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 96, n. 4, p. 494-8, 2015.
- HARDER J, et al. Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 8, p. 5707–13, 2001.
- HASAN, U. A. et al. TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. **The Journal of Immunology**, v. 178, p. 3186–3197. 2007.
- HO, G.Y. et al. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. **The New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 7, p. 423-8. 1998.
- HOOTS, B. E. et al. Human papillomavirus type distribution in anal cancer and anal intraepithelial lesions. **International Journal of Cancer**, v. 124, n. 10, p. 2375–2383, 2009.
- HUIBREGTSE, J.M; SCHEFFNER, M; HOWLEY, P. M. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. **The EMBO Journal**, v. 10, n. 13, p. 4129–4135, 1991.
- HUSMAN, A.M.G.R, 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. **Journal of General Virology**, v. 76, n. 4, p. 1057–62, 1995.
- INCA-Instituto Nacional de Câncer (Brasil). **Estimativas**: Incidência de câncer anal. Disponível em
<<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/anal>> Acesso: junho. 2016.
- ITO, M. M. et al. Dimensão da participação do Papilomavírus humano (HPV) na evolução do câncer cérvico-vaginal. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 42, n. 2, p 127-129, 2010.

JOHNSON, J. D. et al. Effects of the mainstream and environmental tobacco smoke on the immune system in animals and humans: a review. **Critical Reviews in Toxicology**, Boca Raton, v. 20, n. 5, p. 369-390, 1990.

JONES, D.L.; ALANI, R. M.; MÜNGER, K. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. **Genes & Development**, v. 11, n. 6, p. 2101-2111, 1997.

JONES, E.Y.; STUART, D.I.; WALKER, N.P. Structure of tumor necrosis factor. **Nature**, London, v. 338, n. 6212, p. 225-228, 1989.

KALOF, A. N.; COOPER, K. p16INK4a immunoexpression: surrogate marker of high-risk HPV and high-grade cervical intraepithelial neoplasia. **Advances in Anatomic Pathologic**, v. 13, n. 4, p. 190-4, 2006.

KARLSEN, F. et al. Use of Multiple PCR Primer Sets for Optimal Detection of Human Papillomavirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 9, p. 2095-2100, 1996.

KAWAKAMI, M.; CERAMI, A. Studies of endotoxin-induced decrease in lipoprotein lipase activity. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 154, n. 3, p. 631-639, 1981.

KARIM, R. et al. Human papillomavirus deregulates the response of a cellular network comprising of chemotactic and proinflammatory genes. **PLoS One**, v. 6, n. 3, p. 7848, 2011.

KLAES, R. et al. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 26, n. 11, p. 1389-99, 2002.

KOUTSKY, L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. **American Journal of Medicine**, New York, v. 102, n. 5A, p. 3-8, 1997.

KREUTER, A.; WIELAND, U. Human papillomavirus-associated diseases in HIV-infected men who have sex with men [review]. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 22, n. 2, p. 109-114, 2009.

KUCHARZ, E. J. Immunologic mechanisms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: Szechiński J, ed. Enbrel. Clinical application. Wrocław: **Wydawnictwo Medyczne Górnicki**, v. 1, n. 9, 2008.

LACEY, C.J.N. et al. Randomised controlled trial and economic evaluation of podophyllotoxin solution, podophyllotoxin cream, and podophyllin in the treatment of genital warts. **Journal Sexually Transmitted Infections**, v. 79, n. 4, p. 270-275, 2003.

LE BON, A.; TOUGH, D.F. Links between innate and adaptive immunity via type 1 interferon. **Current Opinion in Immunology**, London, v. 14, n. 4, p. 432-6, 2002.

LEE, P.; HU, Y.W.; HUNG, M. H. The Risk of Cancer in Patients with Benign Anal Lesions. **The American Journal of Medicine**, v 126, n 12, 2013.

LEE, S. J. et al. Both E6 and E7 oncoproteins of human papillomavirus 16 inhibit IL-18-induced IFN gamma production in human peripheral blood mononuclear and NK cells. **The Journal of Immunology**; v. 167, n. 1, p. 497–504. 2001.

LEVINSON, P. et al. Levels of innate immune factors in genital fluids: association of alpha defensins and LL-37 with genital infections and increased HIV acquisition. **AIDS**, v. 23, p. 309–17, 2009.

LISINGEN, R.V. **Polimorfismos de genes de citocinas e do gene mica em pacientes com neoplasia intraepitelial cervical**. Tese (Doutorado em Genética). Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2008.

LOHSIRIWAT V. Hemorrhoids: from basic pathophysiology to clinical management. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 17, p. 2009-2017, 2012.

LUBECKA-MACURA. A.; KOHUT, M. TNF superfamily: mechanisms of action, biologic functions and therapeutic possibilities. **Gastroenterology Review**, v. 5, n. 6, p. 303–9, 2010.

MANOS, M. M. et al. Use of Polymerase Chain reaction Amplification for the Detection of Genital Human Papillomaviruses. **Cancer Cells**. US Patent Office. 7, p. 209–14. 1989.

MARKS, D. K.; GOLDSTONE, S. E. Electrocautery ablation of high-grade anal squamous intraepithelial lesions in HIV-negative and HIV-positive men who have sex with men. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 59, n. 3, p. 259–265. 2012.

MACHALEK, D. A. et al. Anal human papillomavirus infection and associated neoplastic lesions in men who have sex with men: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Oncology**, v. 13, n. 5, p. 487–500. 2012.

MCCREDIE, M.R. et al. Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study. **The Lancet Oncology**, v. 9, n. 5, p. 425–34, 2008

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. J. R. Innate immunity. **The New England Journal Medicine**, v. 343, n. 5, p. 338-44, 2000.

MICHELIN, M A.; OLIVEIRA, H. S.; MURTA, E. F. C. Resposta immune nas lesões intra-epiteliais do colo uterino. *Femina*, v. 36, n. 1, p. 9-13, 2008.

MOSS, M. L. et al. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- α . **Nature** v. 385, n. 6618, p. 733–736, 1997.

MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nature reviews Cancer**, v. 10, n. 8, p. 550-560. 2010.

MÜNGER, K.; HOWLEY, P.M. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. **Virus Research**, v. 89, n. 2, p. 213–28, 2002.

NATHAN, D. M.; ANGUS, P.W.; GIBSON, P. R. Hepatitis B and C virus infections and anti-tumor necrosis factor-alpha therapy: guidelines for clinical approach. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 21, n. 9, p. 1366–1371, 2006.

NASU, K.; NARAHARA, H. Pattern recognition via the toll-like receptor system in the human female genital tract. **Mediators of Inflammation**, v. 2010, p. 1-12, 2010.

NEDWIN, G. E. et al. Human lymphotoxin and tumor necrosis genes: structure, homology and chromosomal localization. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.13, n.17, p.6361-6372, 1985.

NESTLE, F.O. et al. Skin immune sentinels in health and disease. **Nature Review Immunology**, v. 9, n. 10, p. 679–691. 2009.

NETTER, F. H. **Atlas of Human Anatomy**. 3rd ed. Teterboro, NJ: Icon Learning Systems; 2003.

NIELSEN, G. P. et al. Immunohistochemical survey of p16INK4A expression in normal human adult and infant tissues. **Laboratory Investigation**, v. 79, n. 9, p. 1137-43, 1999.

NIGRO, N. D. et al. Combined therapy for cancer of the anal canal. **Diseases of the colon and rectum**, v. 24, n. 2, p. 73–5, 1981.

NORDENVALL, C.; NYREN, O.; YE, W. Elevated anal squamous cell carcinoma risk associated with benign inflammatory anal lesions. **Gut**, v. 55, n. 5, p. 703-707, 2006.

Northwest Pennsylvania Rural AIDS Alliance. Anal Pap Smear Rectal Exam Policy. **Northwest Pennsylvania Rural AIDS Alliance**, v. 9, 2008.

OGUEJIOFOR, K. K. et al. The prognostic significance of the biomarker p16 in oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Clinical oncology**, v. 25, n. 11, p. 630–8, 2013.

OLSZANECKA-GLINIANOWICZ, M. et al. The role of tumor necrosis factor (TNF- α) metabolism. **Wiadomosci Lekarskie**, v. 58, n. 11–12, p. 670-4, 2005.

ORTOSKI, KELL Anal Cancer and Screening Guidelines for HPV in Men. **The Journal of the American Osteopathic Association**, v. 111(3 suppl 2):S35-S43, 2011.

PANDHI, D. et al. p16 immunostaining as a predictor of anal and cervical dysplasia in women attending a sexually transmitted infection clinic. **Indian Journal of Sexually Transmitted Diseases**, v. 37, n. 2, p. 151–156, 2016.

PALLADINO, M. A. et al. Anti-TNF- α therapies: the next generation. **Nature review. Drug Discovery**, v. 2, n. 9, p. 736-746. 2003.

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

PANNONE, G. et al. Evaluation of a combined triple method to detect causative HPV in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas: p16 Immunohistochemistry, Consensus PCR HPV-DNA, and In Situ Hybridization. **Infectious agents and cancer**, v. 7, n. 4, p. 1-14, 2012.

PENNICA, D. et al. Cloning and expression in Escherichia coli of the cDNA for murine tumor necrosis factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 82, n. 18, p. 6060–6064, 1985.

PIKETTY, C. et al. High prevalence of anal human papillomavirus infection and anal cancer precursors among HIV-infected persons in the absence of anal intercourse. **Annals of Internal Medicine**, v. 138, n. 6, p. 453–9, 2003.

PIVARCSI, A. et al. Microbial compounds induce the expression of pro-inflammatory cytokines, chemokines and human beta-defensin-2 in vaginal epithelial cells. **Microbes and Infection**, v. 7, n. 9-10, p. 1117–27, 2005.

RENOUX, V. M. et al. Human papillomavirus entry into NK cells requires CD16 expression and triggers cytotoxic activity and cytokine secretion. **European Journal of Immunology**, v. 41, n. 11, p. 3240-3252, 2011.

RONCO, L.V. et al. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. **Genes & Development**, v. 12, n. 13, p. 2061-72, 1998.

ROTHER, M. et al. A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. **Cell**, v. 78, n. 4, p. 681-92, 1994.

ROTHER, M. et al. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. **Cell**, v. 83, n. 7, p. 1243-52, 1995.

RYAN, D. P.; WILLETT, C. G. Classification and epidemiology of anal cancer. **UpToDate**, v. 13, 2008.

RYAN, D. P.; COMPTON, C. C.; MAYER, M. J. Carcinoma of the anal canal. **The New England Journal of Medicine**. v.342, n. 11, p. 792-800, 2000.

SCHÖFER, H. Evaluation of imiquimod for the therapy of external genital and anal warts in comparison with destructive therapies. **The British Journal of Dermatology**, v. 157, n. s2, p. 52-55, 2007.

SCHOLEFIELD, J. H.; HARRIS, D.; RADCLIFFE, A. Guidelines for management of anal intraepithelial neoplasia. **Colorectal Disease**, v. 13, n. s1, p. 3-10, 2011.

SIMPSON, J. A.; SCHOLEFIELD, J. H. Diagnosis and management of anal intraepithelial neoplasia and anal cancer. **BMJ**, v. 343, 2011.

SERRANO, B. et al. Potential impact of a nine-valent vaccine in human papillomavirus related cervical disease. **Infectious Agent and cancer**, v. 7, n. 1, p. 38. 2012.

SOMASEKAR, A.; ALCOLADO, R. Genital condylomata in a patient receiving infliximab for Crohn's disease. **Postgraduated Medical Journal**, v. 80, n. 944, p. 358–359, 2004.

SOPORI, M. Effects of cigarette smoke on the immune system. **Nature Review Immunology**, v. 2, n. 5, p. 372–377, 2002.

STEELE, S. R. et al. Standards Practice Task Force of the American Society of Colon and Rectal Surgeons. Practice parameters for anal squamous neoplasms. **Diseases of Colon and Rectum**, v. 55, n. 7, p. 735-49, 2012.

STEFANAKI, C. et al. Comparison of cryotherapy to imiquimod 5% in the treatment of anogenital warts. **International Journal of STD & AIDS**, v. 19, n. 7, p. 441-444, 2008

TERHUNE, S. S.; HUBERT, W. G. Early polyadenylation signals of human papillomavirus type 31 negatively regulate capsid gene expression. **Journal of Virology**, v. 75, n. 17, p. 8147-57, 2001.

THEOFILOPOULOS, A.N. et al. Type I interferons (a/b) in immunity and autoimmunity. **Annual Review Immunology**, v. 23, p. 307-36, 2005.

THOMPSON, D. A. et al. The HPV E7 oncoprotein inhibits tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis in normal human fibroblasts. **Oncogene**, v. 20, n. 28, p. 3629–3640, 2001.

VALORE, E. V. et al. Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. **The Journal of Clinical Investigation**, v.101, n. 8, p. 1633–42. 1998.

VILLA, L.L. et al. Prophylatic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16 e 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. **The Lancet Oncology**, v. 6, n. 5, p. 271-8, 2005.

VAN DER LOEFF, M. F. S. et al. HPV and Anal Cancer in HIV-Infected Individuals: A Review. **Current HIV/AIDS Reports**, v. 11, n. 3, p. 250-262, 2014.

VAN DER ZEE, R. P. et al. The increasing incidence of anal cancer: can it be explained by trends in risk groups? **The Netherland Journal of Medicine**, v. 71, n.8, p. 401–11, 2013.

WAISBERG, M. G. et al. Human papillomavirus and chlamydia trachomatis infections in rheumatoid arthritis under anti-TNF therapy: an observational study. **Rheumatology International**, v. 35, n. 3, p. 459–463, 2015.

WANG, Z. et al. Evaluation of postoperative anal functions using endoanal ultrasonography and anorectal manometry in children with congenital anorectal malformations. **Journal of Pediatric Surgery**, v.51, n.3, p. 416-20, 2015.

WANG, X. et al. Detection of HPV DNA in esophageal cancer specimens from different regions and ethnic groups: a descriptive study. **BioMed Central Cancer**, v. 10, n. 19, p. 1-8, 2010.

WINTHROP, K. L. Risk and prevention of tuberculosis and other serious opportunistic infections associated with the inhibition of tumor necrosis factor. **Nature Clinical Practice Rheumatology**, v. 2, n. 11, p. 602–610, 2006.

WISE, E. **Principles of Anatomy & Physiology**. McGraw-Hill, 2008.

ZERFASS, K. Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. **Journal of Virology**, v. 69, n. 10, p. 6389–6399, 1995.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nature Review Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342-50, 2002.

ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1288, n. 2, p. F55–F78, 1996.

APÊNDICES

Apêndice A

QUESTIONÁRIO N° _____

DADOS PESSOAIS

Data de coleta: ____/____/____

Nome: _____

Idade: _____ Data de Nascimento: ____/____/____.

Registro HCP: _____

Participação em pesquisa com HPV ()SIM ()NÃO Qual? _____

Positividade para HPV ()SIM ()NÃO Genótipos _____

VIDA SEXUAL

Nº de parceiros _____ Idade da primeira relação _____

Intercurso anal ()SIM ()NÃO Preservativo no intercuro anal ()SIM ()NÃO

Preservativo no intercuro vaginal ()SIM ()NÃO

Frequência ao ginecologista ____x/ ano

DADOS CLÍNICOS

HIV _____ em ____/____/____

Doença auto-imune? ()SIM ()NÃO

Transplante ()SIM ()NÃO

Já fez ou faz uso de imunossupressor? ()SIM ()NÃO Quanto tempo _____

Citologia (última realizada) _____

Infecção por HPV (*anterior*) ()SIM ()NÃO Quando _____

Tipo de lesão _____

Tratamento ()SIM ()NÃO

Medicamentoso

()Imiquimod ()Interferon ()Ácido tricloroacético ()Podofilina ()Podofilotoxina

Cirúrgico

()biópsia ()histerectomia total ()histerectomia parcial ()conização ()_____

Recidiva ()SIM ()NÃO Quantas Vezes? _____

Infecção por HPV (*atual*)

Lesão ()SIM ()NÃO

Tipo de lesão _____

Tratamento ()SIM ()NÃO

Medicamentoso

()Imiquimod ()Interferon ()Ácido tricloroacético ()Podofilina ()Podofilotoxina

Cirúrgico

()biópsia ()histerectomia total ()histerectomia parcial ()conização ()_____

Parceiro com HPV? ()SIM ()NÃO ()nunca observou

Corrimento ()SIM ()NÃO

Outras infecções() Chlamydia trachomatis ()Gardnerella sp ()Candida sp

()Herpes simplex vírus ()Neisseria gonorrhoeae ()cocos e bacilos ()_____

HÁBITOS

Alcoolismo() SIM () NÃO Frequência () Diária () Semanal () Rara

Já parou? () SIM () NÃO há quanto tempo? _____

Tabagismo ()SIM ()NÃO Há quanto tempo?_____ N° cigarros____/dia

Já parou? ()SIM ()NÃO Há quanto tempo?_____

ESTADO NUTRICIONAL

OBS.:

Peso:_____kg; Altura: _____m; IMC:_____

COLPOSCOPIA

➤ Resultado do histopatológico

AP:

ANUSCOPIA DE MAGNIFICAÇÃO

➤ Resultado do histopatológico

AP:

Apêndice B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O presente termo refere-se a um convite a Sra. _____ a participar da pesquisa intitulada: “ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DO SISTEMA IMUNE INATO E DE PROLIFERAÇÃO EPITELIAL NAS MUCOSAS CERVICAL E ANAL DE PACIENTES INFECTADOS PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO)”. A pesquisa será coordenada pela bióloga Maria Julliana Galvão Nunes e pela médica pesquisadora Maria das Graças de Fátima Cavalcante Castor, contatadas através do telefone: (81) 96728083; e-mail julliana_gnunes@yahoo.com.br ou gracafccastor@hotmail.com ou endereço profissional: Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami situado na Avenida. Prof. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, Recife/PE CEP: 50670-901, telefone: (81)2126-8485.

A pesquisa será realizada através do exame de colposcopia anal e cervical. O exame anal tem o objetivo de observar o interior do ânus através da introdução do anuscópio, instrumento rígido em forma de espelho (semelhante a forma de um tubo), lubrificado, que permite a avaliação do ânus através da visualização, tendo a finalidade de verificar a existência de lesões pré-cancerosas ou câncer e na presença de “manchas” será realizado a retirada de um pequeno fragmento sob anestesia, para a análise. Da mesma forma o exame de colposcopia verifica a presença de possíveis lesões no colo do útero utilizando um espelho não lubrificado, permitindo a avaliação. Será realizada biópsia se confirmada a presença de lesões pré-cancerosas ou câncer e/ou “manchas”. Com relação aos riscos, a realização dos exames apenas provoca desconforto, quando da introdução dos instrumentos ou mesmo a picada da agulha da anestesia. Os benefícios pela participação na pesquisa é que os procedimentos realizados são necessários tendo em vista a possibilidade de cura, caso seja detectado alguma lesão pré-cancerosa. No caso da existência de lesão pré-cancerosa ou câncer, a paciente será tratada pelos médicos do Serviço de Pélvis do Hospital de Câncer do Recife. Não haverá nenhum incentivo financeiro pela participação na pesquisa, sendo esta com finalidade exclusiva de colaborar para o sucesso da pesquisa com objetivos estritamente acadêmicos. A participação na pesquisa poderá ser interrompida, se assim desejar, sem sofrer nenhum constrangimento ou qualquer prejuízo para o seu tratamento, seja tratamento clínico ou cirúrgico. As

informações oferecidas pela participante serão submetidas às normas de ética em pesquisa (CONEP) do Conselho Nacional de Saúde, do Ministério da Saúde. Em caso de dúvida poderá contatar ainda o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Pernambuco, situado na Avenida Cruz Cabugá, 1597 - Santo Amaro Recife - PE, 50040-971. A identidade do participante será mantida em sigilo e os resultados da pesquisa poderão ser apresentados em eventos e publicações científicas. A pesquisadora disponibilizará uma cópia assinada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme recomendações da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). Assim se a Sra. aceitar o convite para participar da pesquisa, por favor, preencha os espaços abaixo:

Eu, _____, RG _____,
fui devidamente esclarecida do projeto de Pesquisa acima citado e aceito o convite para participar.

Recife, _____ de _____ 20____.

1 _____

2 _____

Testemunhas

Assinatura da pesquisadora _____

Assinatura do pesquisado _____

ANEXOS

ANEXO I

Parecer do comitê de ética

SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DO SISTEMA IMUNE INATO E DE PROLIFERAÇÃO EPITELIAL NAS MUCOSAS CERVICAL E ANAL DE PACIENTES INFECTADOS PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO

Pesquisador: Maria Julliana Galvão Nunes

Área Temática: Área 1. Genética Humana.

(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.);

Versão: 2

CAAE: 06938812.0.0000.5205

Instituição Proponente:

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Outros

Detalhe: Parecer consubstanciado

Justificativa: No parecer o detalhamento da apresentação do projeto que consta refere-se a outro

Data do Envio: 11/06/2013

Situação da Notificação: Aguardando revisão do parecer do colegiado

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 301.040

Data da Relatoria: 11/06/2013

Apresentação da Notificação:

O Câncer Cervical e o Anal apresentam como um dos fatores de risco mais importante a infecção crônica pelo HPV, esta resulta em uma proliferação aumentada do epitélio escamoso, sendo assim a avaliação de um marcador de proliferação celular Ki 67, é útil no prognóstico de uma variedade de tumores. Serão coletadas amostras cervicais e anais de pacientes submetidos a colposcopia e anuscopia estas amostras coletadas com escovinhas ginecológicas para identificação do DNA e análise da expressão da molécula.

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.040-000

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (813)217--8197

Fax: (813)217--8197

E-mail: cep@hcp.org.br

**SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC**



Continuação do Parecer: 301.040

Objetivo da Notificação:

Criação de uma base de dados local, com informações sobre mulheres com infecção cervical e/ou anal provocada pelo Papilomavirus humano (HPV) atendidas no Hospital de Câncer de Pernambuco.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A execução da pesquisa não implicará em nenhum risco para os pacientes nesta envolvidos. A realização dos exames pode provocar apenas desconforto e/ou dor pela anestesia ou introdução do instrumento (especulo ou anuscopio), pode haver constrangimento durante realização dos mesmos, devido a posição para execução do procedimento. Não existe nenhum incentivo financeiro ao participante, sendo assim o objetivo é colaborar com os dados, exclusivamente, acadêmicos.

Benefícios:

Os benefícios pela participação na pesquisa é que os procedimentos realizados são necessários tendo em vista a possibilidade de cura, caso seja detectado alguma lesão pré-cancerosa. No caso da existência de lesão pré-cancerosa ou câncer, a paciente será tratada pelos médicos do Serviço de Pélvis do Hospital de Câncer do Recife, independente da participação no projeto

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

O objetivo do presente estudo será avaliar a presença de HPV, proliferação epitelial e a expressão de moléculas do sistema imune inato em amostras cervicais e anais de mulheres HIV negativo. Metodologia: Serão coletadas amostras cervicais e anais de pacientes submetidas à colposcopia e anuscopia de magnificação de pacientes atendidas no Hospital de Câncer de Pernambuco. As amostras coletadas no Hospital de Câncer de Pernambuco serão processadas e analisadas no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami/LIKA/UFPE.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos estão de acordo com a resolução 196/96 da CNRM.

Recomendações:

Recomenda-se que seja retirado a frase que não haverá risco, para RISCO MINIMO.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As alterações nos riscos, critérios de exclusão e TCLE foram realizadas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.040-000

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (813)217-8197

Fax: (813)217-8197

E-mail: cep@hcp.org.br

SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC



Continuação do Parecer: 301.040

Considerações Finais a critério do CEP:

RECIFE, 11 de Junho de 2013

Assinador por:
ISABEL CRISTINA LEAL
(Coordenador)

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.040-000

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (813)217--8197

Fax: (813)217--8197

E-mail: cep@hcp.org.br