

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

DIAGNÓSTICO DO *Papilomavírus humano* EM LESÕES CLÍNICAS E

SUBCLÍNICAS DE PÊNIS: AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA

DIAGNÓSTICA DOS MÉTODOS COLETA DE MATERIAL COM

ESCOVA E PCR, PENISCOPIA E HISTOLOGIA

RENATO LUÍS ROMBALDI

Caxias do Sul

2004

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
UCS - BICE - Processamento Técnico

R762t Rombaldi, Renato Luís
Transmissão transplacentária do *Papilomavírus humano* /
Renato Luís Rombaldi. - 2008.
xii, 147 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia, 2008.
Apresenta bibliografia e anexos.
“Orientação: Prof. Dr. Fabio Pasqualotto; co-orientação: Prof.
Dr. Eduardo Pretto Serafini, Prof^ª. Dr^ª. Jovana Mandelli.”

1. Papilomavírus. 2. Doenças virais – Transmissão
transplacentária. I. Título.

CDU: 616.98:578.827HPV

Índice para o catálogo sistemático:

- | | |
|--|------------------|
| 1. Papilomavírus | 616.98:578.82HPV |
| 2. Doenças virais – Transmissão transplacentária | 618.3-022 |

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária
Márcia Carvalho Rodrigues – CRB 10/1411

RENATO LUÍS ROMBALDI

TRANSMISSÃO TRANSPLACENTÁRIA DO *Papilomavírus humano*

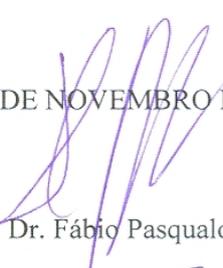
**Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul,
visando à obtenção de grau de Doutor em
Biotecnologia.**

Orientador: Prof. Dr. Fabio Pasqualotto

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Pretto Serafini

Profª. Dra. Jovana Mandelli

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 24 DE NOVEMBRO DE DOIS MIL E OITO.



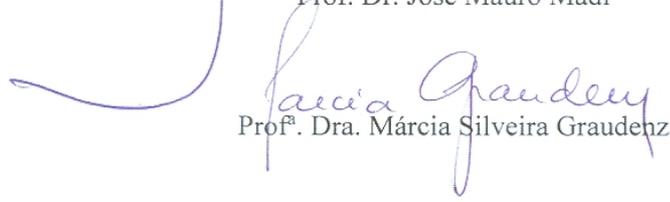
Prof. Dr. Fábio Pasqualotto



Profª. Dra. Luisa Lina Villa



Prof. Dr. José Mauro Madi



Profª. Dra. Márcia Silveira Graudenz

RENATO LUÍS ROMBALDI

**DIAGNÓSTICO DO *Papilomavírus humano* EM LESÕES CLÍNICAS E
SUBCLÍNICAS DE PÊNIS: AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DIAGNÓSTICA DOS
MÉTODOS COLETA DE MATERIAL COM ESCOVA E PCR, PENISCOPIA E
HISTOLOGIA**

**Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em
Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul,
visando à obtenção de grau de Mestre em
Biotecnologia.**

Orientador: Prof^ª. Dra. Suelen Osmarina Paesi

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Pretto Serafini

Caxias do Sul

2004

à querida esposa Ana Paula e aos amados filhos,
Marcelo e Marina, de quem muitas vezes presente
estive distante.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é resultado do esforço, dedicação e colaboração de muitas pessoas. A todas elas meu sincero agradecimento. Mencionarei algumas, mas registro meu pedido de perdão para as omitidas.

- À Dra. Suelen Osmarina Paesi, orientadora, por me haver acolhido em seu serviço, pelo apoio incalculável em todas as fases de trabalho, pela demonstração de espírito científico elevado, somados à amizade irrestrita, a minha eterna gratidão.

- Ao Dr. Eduardo Pretto Serafini pela co-orientação, dedicação, apoio e amizade dispensados durante todo o tempo.

- Às empresas PRIMAGEM e AVENTIS PHARMA pelo apoio financeiro à pesquisa.

- Ao Dr. Sergio Echeverrigaray pelo conhecimento, capacidade e caráter.

- Aos professores do Instituto de Biotecnologia pelo espírito científico, por me haverem acolhido em seus serviços e por oportunizarem a realização deste trabalho.

- Aos colegas do Curso de Mestrado, pelo valioso auxílio, apoio e amizade.

- Às acadêmicas de Biologia, Andréa Cristina Vanni, Luciane Maria Aver, Roberta Viceli, Fernanda Baréa, Rafaele Frassini e Marlene Xavier. Sem elas o trabalho seria mais difícil.

- Ao colega Mauro Fardo pelo encaminhamento dos pacientes.

- Aos professores Petrônio F. Oliveira Filho e Mario Bernardes Wagner pela orientação em bioestatística.

- À Claudia Marques pelo carinho, apoio e amizade.

- Aos funcionários do Instituto de Biotecnologia pelo apoio e disponibilidade.

- Finalmente, minha gratidão aos pacientes que possibilitaram a realização deste estudo. Eles motivaram a investigação aqui apresentada e são o objetivo para os resultados que busco alcançar.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Biologia do HPV	5
2.2. Proteínas virais.....	6
2.3. Integração do genoma viral ao genoma humano	8
2.4. Classificação do HPV	10
2.5. Co-fatores na infecção pelo HPV.....	11
2.6. História natural da infecção pelo HPV.....	12
2.7. Formas de contaminação pelo HPV.....	13
2.8. Prevalência da infecção pelo HPV em homens.....	14
2.9. Formas de apresentação da infecção pelo HPV.....	15
2.10. Métodos diagnósticos da infecção pelo HPV.....	17
2.10.1. Peniscopia	17
2.10.2. Citologia e histologia	18
2.10.3. Microscopia eletrônica	19
2.10.4. Imuno-citoquímica e imuno-histoquímico	19
2.10.5. Captura híbrida	20
2.10.6. Hibridização <i>in situ</i>	21
2.10.7. Reação da polimerase em cadeia – PCR	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. Pacientes	24

3.2. Padrão ouro	24
3.3. Classificação das lesões conforme a presença de HPV/DNA e a forma de apresentação da infecção viral.....	25
3.4. Avaliação epidemiológica	25
3.5. Métodos de amostragens utilizadas	27
3.5.1. Coleta da amostra obtida com escova	27
3.5.2. Coleta da amostra obtida por biopsia	28
3.6. Análise e classificação histológica	28
3.7. Extração do DNA total das amostras obtidas com escova e por biopsia	29
3.8. Amplificação do DNA com β -globina	31
3.9. Amplificação do DNA viral com oligonucleotídeos MY9 e MY11	32
3.10. Tipificação viral	33
3.11. Análise estatística	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5. CONCLUSÕES.....	69
6. PERSPECTIVAS.....	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
8. ANEXOS	78
7.1. Anexo 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para coleta de material de lesão de pênis	78

7.2. Anexo 2 – Ficha Epidemiológica	79
7.3. Anexo 3 - <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> (RFLP). Padrões para HPV de mucosa. Os padrões foram obtidos empregando os primers MY09/MY11 que amplificam uma seqüência de ~ 450 pb L1. Bernard <i>et al.</i> (1994)	80
7.4. Anexo 4 - Incluiu umas três bases eliminadas comparadas ao CP4173; porém, a digestão global da <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> (RFLP). Padrões para HPV de mucosa. Os padrões foram obtidos empregando os primers MY09/MY11 que amplificam uma seqüência de ~ 450 pb L1. Bernard <i>et al.</i> (1994)	81

LISTA DE TABELAS

Tabela	Título	Página
1	Reação de digestão enzimática para cada amostra de HPV amplificado.....	33
2	Amplificação para β -globina e HPV nas amostras obtidas com escova e por biopsia	38
3	Medidas de desempenho dos métodos diagnósticos para HPV	44
4	Correlação entre HPV/DNA positivo e a localização das infecções clínicas e subclínicas na genitália masculina.....	47
5	Correlação entre HPV/DNA e o tipo de lesão identificada na peniscopia.....	48
6	Correlação entre HPV/DNA e o achado histológico	50
7	Dados epidemiológicos – I	53
8	Dados epidemiológicos – II	57
9	Dados epidemiológicos – III	60
10	Dados epidemiológicos – IV	63
11	Correlação entre HPV/DNA no homem e companheira sexual com HPV	65

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Mapa do HPV 16, mostrando o genoma circular com 7.905 pares de bases, os genes precoces (E1, E2, E4, E5, E6 a E7), os genes tardios (L1 e L2) e a <i>long control region</i> (LCR).....	6
2	Características e definições do teste diagnóstico	36
3	Amplificação de 268 pares de base do gene da β -globina humana empregando-se os primers PCO4 e GH20 em gel de agarose. β -glob + = amplificação positiva para β -globina. Controle positivo = amplificação positiva para β -globina - controle com células humanas da linhagem <i>SiHa</i> . Controle negativo = controle sem DNA humano - amplificação negativa para β -globina. DNA $\phi X 174RF$ = marcador de peso molecular.....	39
4	Amplificação para HPV com os primers MY9 e MY11 em gel de agarose. HPV + = amplificação positiva para HPV/DNA. Controle positivo = amplificação positiva para HPV/DNA - células humanas da linhagem <i>SiHa</i> - que contém o HPV 16. Controle negativo = solução sem DNA - amplificação negativa para HPV/DNA. DNA $\phi X 174RF$ = marcador de peso molecular.....	41

5	Perfil de digestão de HPV11 em gel de poliacrilamida. Fragmento de 449 pares de bases amplificadas com MY9 e MY11 e digerido com enzimas de restrição. Controle sem enzimas = solução com DNA e sem enzimas de restrição. DNA $\phi X 174RF$ = marcador de peso molecular.....	66
---	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	- Ácido desoxirribonucléico
DST	- Doença sexualmente transmissível
HPV	- <i>Papilomavírus humano</i>
IRS	- Idade da primeira relação sexual
LCR	- “ <i>Long control region</i> ”
mM	- Milimolar
ng	- Nanograma
NS	- Associação estatisticamente não significante
ORFs	- “ <i>Opening reading frames</i> ”
pb	- Pares de bases
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
pRB	- Proteína do tumor Retinoblastoma
RFLP	- <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	- Ácido ribonucléico
RP-	- Razão de probabilidade negativo (<i>Likelihood ratio negativo</i>)
RP+	- Razão de probabilidade positivo (<i>Likelihood ratio positivo</i>)
rpm	- Rotações por minuto
μL	- Microlitro

**DIAGNÓSTICO DO *Papilomavírus humano* EM LESÕES CLÍNICAS E
SUBCLÍNICAS DE PÊNIS: AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DIAGNÓSTICA DOS
MÉTODOS COLETA DE MATERIAL COM ESCOVA E PCR, PENISCOPIA E
HISTOLOGIA**

RESUMO

A infecção genital pelo *Papilomavírus humano* é uma das doenças sexualmente transmissíveis de maior frequência, sendo que cerca de 40 genótipos foram detectados na região anogenital feminina e masculina.

Este estudo visou avaliar a eficácia diagnóstica dos métodos coleta de material com escova e PCR, peniscopia e histologia, para diagnóstico do *Papilomavírus humano* em infecções clínicas e subclínicas de pênis, bem como estabelecer o perfil epidemiológico da população masculina contaminada. Para tanto, desenvolveu-se um estudo prospectivo em homens que procuraram o serviço de urologia com lesão no pênis, e em homens parceiros sexuais de mulheres portadoras de lesões de baixo ou alto grau do colo uterino. Os pacientes foram submetidos à entrevista epidemiológica, peniscopia e coleta das amostras com escova e por biopsia. Avaliou-se a sensibilidade, a especificidade e a razão de probabilidade positivo e negativo dos métodos coleta com escova e PCR, peniscopia e histologia para diagnóstico da infecção pelo HPV. Dos 80 homens estudados, 38 (47,5%) apresentaram-se negativos para HPV/DNA e 42 (52,5%) apresentaram-se positivos para HPV/DNA, dos quais 29 (36,2%) eram portadores de infecção clínica, 12 (15%) eram portadores de infecção subclínica, e um (1,3%) era portador de infecção latente.

As medidas de desempenho dos métodos diagnósticos da infecção clínica pelo HPV foram consideradas muito boas para os métodos coleta de material com escova e PCR,

histologia e peniscopia + histologia; e a coleta de material com escova e PCR foram os métodos que apresentaram o melhor desempenho, quando empregados isoladamente, para diagnóstico da infecção subclínica pelo HPV.

O estudo epidemiológico evidenciou média de idade do grupo HPV/DNA positivo de $28,1 \pm 9,6$ anos, com clara prevalência dessa infecção abaixo de 29 anos. Houve associação estatística entre as variáveis, média de idade, estado marital solteiro, idade da primeira relação sexual ≤ 16 anos, número de parceiras ≥ 2 no último ano e infecção pelo HPV.

**DIAGNOSIS OF THE *Human Papillomavirus* IN CLINICAL AND SUBCLINICAL
LESIONS OF THE PENIS: EVALUATION OF THE DIAGNOSTIC EFFICIENCY
OF THE METHODS MATERIAL COLLECTION BY BRUSH AND PCR,
PENISCOPY AND HISTOLOGY**

ABSTRACT

Genital infection by the *human Papillomavirus* is one of the most frequent sexually transmitted diseases, and about 40 genotypes were detected in female and male anogenital region.

The aim of this study was to evaluate the diagnostic efficiency of the collection methods by brush and PCR, peniscopy and histology for HPV diagnosis of the *human Papillomavirus* in clinical and subclinical penis infections, as well as to determine epidemiologic contaminated profile male population. A prospective study was carried out in men seeking for treatment at the urology service due to lesion in the penis, as well as in men whose sexual partners are women with either serious or mild lesions in the uterine cervix. The patients have been subjected to epidemiologic interview, peniscopy and to sample collection by brush and biopsy. The collection of methods by brush and PCR, peniscopy and histology, used for the diagnosis of HPV infection, have been assessed in terms of their sensitivity, their specificity and also regarding the ratio between their positive and negative probability. Of the 80 men included in study, 38 (47.5%) were negative for the HPV/DNA, whereas 42 (52.5%) were positive to HPV/DNA, out of whom 29 (36.2%) had clinical infection, 12 (15%) had subclinical infection and one (1.3%) had a latent infection.

The performance standards of the diagnostic methods for clinical HPV infection was considered excellent for brush and PCR, histology and peniscopy + histology; brush + PCR were the methods that showed the best performance when used alone for the diagnosis of subclinical HPV infection.

The epidemiologic analysis showed an mean age $28,1 \pm 9,6$ years for HPV/DNA positive group, with a clear prevalence of this infection in people with less age of 29 old. There were significant difference between HPV infection and the following variables: age, marital status-single, first sexual intercourse before 16 old and number of sexual partners in the last 2 or more years.

1. INTRODUÇÃO

A infecção genital provocada pelos diferentes tipos de *Papilomavírus humano* (HPV) é, na atualidade, uma das doenças sexualmente transmissíveis (DST) de maior frequência e das mais estudadas, mormente pelo seu importante papel na gênese do câncer do colo uterino e pela possibilidade de indução de uma numerosa variedade de lesões epiteliais proliferativas em diferentes partes do corpo humano. Assim posto, merece ênfase a infecção da área genital por alguns genótipos de *Papilomavírus humano*, denominados de alto risco oncogênico, que podem originar lesões com potencial evolutivo para carcinomas do colo uterino, vagina e vulva.

Nos últimos 30 anos, presenciou-se uma extraordinária revolução na compreensão, administração, diagnose e controle acerca do HPV. Todo esse conhecimento proporcionou um impacto positivo significativo, que apesar dos progressos, permanece como uma das principais causas de morbidez. As mudanças mais singulares na diagnose do HPV estiveram relacionadas ao aparecimento e emprego crescente da biologia molecular como método diagnóstico, permitindo melhor compreensão dos mecanismos celulares pelos quais o HPV está envolvido na gênese neoplásica.

Na atualidade, as técnicas diagnósticas utilizadas para identificar a infecção pelos *Papilomavírus* enfatizam a anamnese e o exame físico, bem como o emprego de métodos complementares, tais como o citológico, histológico, imuno-histoquímico, microscopia eletrônica e a biologia molecular. Entretanto, gradativa e definitivamente, a detecção do HPV tem se baseado em seus efeitos morfológicos virais sobre a célula ou pela detecção de seu ácido desoxirribonucléico (DNA).

A forte associação entre o *Papilomavírus humano* e os cânceres da região anogenital pressupõe a utilização de métodos diagnósticos que permitam identificar o

vírus, estabelecer o seu genótipo e classificá-lo de acordo com o seu potencial de baixo ou alto risco oncogênico. Desta maneira, indubitavelmente, o emprego de técnicas de biologia molecular, pela maior especificidade demonstrada, é a conduta mais adequada. Destaca-se a importância do método de reação em cadeia da polimerase (PCR) visto que, dependendo da metodologia de coleta empregada, poderemos ter nas amostras níveis muito baixo de DNA viral para serem identificados, resultantes do pouco material viral existente na célula ou da pequena quantidade de material coletado.

O homem tem uma função importante na disseminação do HPV e muito tem-se discutido sobre o seu papel nas freqüentes recidivas e persistência da infecção na mulher, bem como sobre a importância de seu tratamento para redução das taxas de lesões precursoras do câncer do colo uterino. O diagnóstico da infecção pelo HPV no homem ganha importância, já que freqüentemente é assintomático, o que torna o indivíduo contaminado um reservatório de vírus, com um papel determinante na transmissão e perpetuação dessa doença. O emprego de métodos biológicos de diagnóstico para rastrear o HPV pode proporcionar uma melhora no tratamento, no acompanhamento e na prevenção de seqüelas maiores e do câncer de pênis, mesmo que esse seja raro em nossa região. Tais métodos também auxiliam na prevenção da disseminação do HPV, oportunizando uma de orientação sensata e real do casal, além de permitir amenizar o impacto da infecção na mulher.

Em virtude das repercussões da infecção do HPV na espécie humana, bem como da necessidade de se identificar um método diagnóstico de fácil execução, não-invasivo, de menor custo, de alta sensibilidade na identificação e classificação do HPV, o presente estudo teve como objetivo avaliar a eficácia diagnóstica dos métodos, coleta de material com escova e PCR, peniscopia e histologia, em infecções clínicas e subclínicas de pênis

compatíveis com HPV, bem como estabelecer o perfil epidemiológico da população masculina contaminada.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A infecção pelo *Papilomavírus humano* é extremamente freqüente em todo o mundo (MENZO *et al.*, 2001). Os vários tipos de *Papilomavírus humano* (HPV) induzem a uma variedade de lesões epiteliais proliferativas em diferentes locais do corpo humano. Embora a maior parte das infecções seja de natureza benigna, a infecção da área genital por alguns genótipos de HPV, denominados de alto risco, resulta em lesões que possuem grande potencial para progredir para carcinomas (STUBENRAUCH *et al.*, 2000; SWAN *et al.*, 1999). Tal foi a força das evidências associando o HPV ao câncer do colo uterino, que a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) promoveu uma reunião de consenso e considerou os HPV 16 e 18 carcinogênicos para a espécie humana (*World Health Organization*, 1995).

No Brasil, o Ministério da Saúde e o Instituto Nacional do Câncer, em estudo intitulado “Estimativas sobre a Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil – 2002”, como parte do sistema de vigilância do câncer, realizou estimativa para o mesmo ano, sobre a incidência e mortalidade por câncer. O estudo forneceu um conjunto de informações que permitiram um melhor entendimento do cenário brasileiro uma vez que analisou as neoplasias malignas no sexo feminino e a localização do maior número de incidências. Foi observado que estas, ocorreriam nas seguintes localizações primárias: mama, pele, colo do útero e cólon e reto, em ordem decrescente. No mesmo estudo, a análise da mortalidade estimou que as maiores incidências ocorreriam nas seguintes localizações: mama, pulmão, cólon e reto, colo do útero e estômago. Identificou, também, que na região sul do Brasil, as maiores taxas de incidência de câncer entre mulheres, em ordem decrescente de ocorrência, correlacionar-se-iam à pele (não-melanóticos), à mama, ao colo uterino e cólon e ao reto. Quanto às maiores taxas de mortalidade, em ordem

decrecente de ocorrência, correlacionar-se-iam à mama, ao pulmão, ao cólon e reto e ao colo do útero (KLIGERMAN, 2002).

2.1. Biologia do HPV

O HPV é um DNA-vírus, não cultivável, da família *Papillomaviridae*, gênero *Papillomavirus* (HOWLEY and LOWY, 2001), capaz de induzir no homem uma grande variedade de lesões proliferativas (VERNON *et al.*, 2000). Até o momento, mais de 100 genótipos diferentes de HPV foram identificados, dos quais aproximadamente 40 foram detectados na área anogenital (KLETER *et al.*, 1999). O vírus possui um genoma de DNA, constituído por 7.200 a 8.000 pares de base, de cadeia dupla, contido num capsídeo externo de proteína virótica que mede cerca de 55 nanômetros de diâmetro. Tal capsídeo é formado por 72 subunidades (capsômeros), com arranjo icosaédrico, sendo por este motivo de aparência esférica à microscopia eletrônica (BOUSARGHIN *et al.*, 2002; BOUDA *et al.*, 2000). O HPV é constituído por dois tipos de proteínas estruturais: L1 (proteína maior), que é gênero-específica, sendo sua presença correlacionada à presença de HPV intacto nos tecidos; e L2 (proteína menor), que é altamente tipo-específica (BOUSARGHIN *et al.*, 2002).

Os genes que compõem o genoma viral dos HPV podem ser divididos em dois grupos funcionais: genes tardios (*Late* "L") e genes precoces (*Early* "E"), sendo cada um constituído por uma série de "regiões" ou *opening reading frames* (ORFs) que codificam as proteínas virais. O segmento E, que representa 45% do genoma, é constituído por oito ORFs e codifica proteínas relacionadas com a replicação e controle do genoma viral. O segmento L, que representa 40% do genoma, é responsável por codificar as proteínas estruturais do capsídeo do vírus. Entre os segmentos L e E existe um outro segmento,

denominado de *long control region* (LCR), que representa 15% do genoma e contém elementos regulatórios da expressão genética e da replicação do DNA (SOUSA *et al.*, 1990).

2.2. Proteínas virais

A organização molecular do genoma dos *Papilomavírus humano* pode ser melhor entendida com a Figura 1.

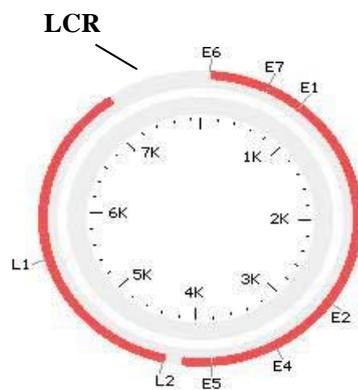


Figura 1. Mapa do HPV 16, mostrando o genoma circular com 7.905 pares de bases, os genes precoces (E1, E2, E4, E5, E6 e E7), os genes tardios (L1 e L2) e a *long control region* (KENNEDY *et al.*, 1991).

2.2.1. Gene E1

A região codificadora do gene E1 leva à produção de uma fosfoproteína de 68 kDa com atividade helicásica e ATPásica intrínseca, que além de possuir alta afinidade pelo DNA é responsável pela manutenção na forma episomal do DNA virótico (LUSKY and BOTCHAN, 1985, 1984). A proteína E1 em conjunto com a proteína E2 formam o complexo E1-E2 sendo esse de extrema importância nos mecanismos de replicação viral (SCHEFFNER *et al.*, 1994).

2.2.2. Gene E2

A proteína codificada pelo gene E2, além de controlar a transcrição de outros genes como E6 e E7, parece possuir atividade estimuladora da função da proteína supressora do crescimento tumoral p53. Desaintes *et al.* (1997) demonstraram que a expressão de E2 pode resultar em apoptose celular.

2.2.3. Gene E4

A expressão da proteína E4 é tardia no ciclo produtivo virótico ocorrendo primariamente no citoplasma (DOORBAR *et al.*, 1986) e sua função ainda está para ser melhor esclarecida, acreditando-se que sua produção esteja ligada à diferenciação terminal dos queratinócitos. Para alguns autores, a proteína E4 seria responsável pela alteração da arquitetura celular conhecida como coilocitose (ROBERTS *et al.*, 1997; DOORBAR *et al.*, 1986) e o rompimento na arquitetura da célula pode facilitar a liberação de partículas viróticas (DOORBAR *et al.*, 1991).

2.2.4. Gene E5

O gene E5 não aparece em todos os tipos de HPV, além de poder estar inativo em alguns outros. À proteína E5 tem-se atribuído papel relacionado à transformação induzida pelos HPV tipo 1, 6 e 16 (CRUSIUS *et al.*, 1997).

Com relação às taxas de proliferação celular, a proteína codificada pelo gene E5 parece ainda operar em conjunto com o fator de crescimento epidermóide no sentido de favorecer a proliferação celular.

2.2.5. Gene E6

A proteína E6 desempenha importante papel nos processos que culminam com transformação celular neoclássica, em especial pelo fato dessa proteína interagir de maneira a acelerar os mecanismos de degradação fisiológica da proteína supressora do crescimento tumoral p53 (SCHEFFNER *et al.*, 1991; WERNESS *et al.*, 1990), fenômeno esse que interfere profundamente nos mecanismos de apoptose e reparo do DNA.

2.2.6. Gene E7

Da mesma forma que E6, a proteína codificada pelo gene E7 também exerce papel importante nos mecanismos de transformação celular, não através de p53, mas por interagir com a proteína supressora de tumores retinoblastomas (pRB) (DYSON *et al.*, 1989) e aumentar sua degradação através da via ubiquitina-proteassomo, a mesma via envolvida na degradação de p53. O E7 de HPV 16 possui uma afinidade com a pRB, 5 a 20 vezes maior que o E7 de HPV 6 e 11 (MUNGER *et al.*, 1989).

2.2.7. Genes L1 e L2

Os dois genes tardios (Late) L1 e L2 codificam as proteínas do capsídeo viral (LI *et al.*, 1987; KOMLY *et al.*, 1986). O L1 é o mais conservado ORF dentro do genoma do HPV, possuindo cerca de 40% de aminoácidos homólogos, presentes em distintos tipos de HPV .

2.3. Integração do genoma viral ao genoma humano

O genoma dos HPV, por razões ainda não esclarecidas, pode integrar-se ao genoma humano, sendo essa etapa fundamental para a transformação neoplásica. Durante o

processo de integração, parece haver preferência por áreas do genoma humano próximas a oncogenes. O genoma viral, quase que invariavelmente, é aberto ao nível das regiões E1/E2 que, entre outras atividades, controlam a transcrição dos genes E6 e E7 (WELLS *et al.*, 2000). Nessa condição, E6 e E7 encontrar-se-ão livres de controle transcrito e, dessa forma, poderão efetivamente interferir nos mecanismos de controle do ciclo celular. Os tipos virais que com mais frequência integram-se ao genoma humano são os tipos 16 e 18 (LOWY *et al.*, 1994). Entretanto, a integração viral também é observada nas infecções virais dos tipos 31, 33 e 35. Esses cinco tipos virais são os mais encontrados nas lesões intra-epiteliais precursoras e no próprio carcinoma escamoso do colo uterino (MUNOZ *et al.*, 2003). É importante ressaltar que as infecções por HPV isoladamente não são capazes, por si só, de induzir progressão para neoplasia invasora, sendo que menos de 2% das lesões induzidas por esse vírus evoluirão para invasão, o que demonstra, indubitavelmente, a necessidade de outros eventos moleculares para o surgimento do fenótipo invasivo (MEIJER *et al.*, 2000).

Nas lesões benignas induzidas pelo HPV, o DNA viral é encontrado na forma epissomal, ou seja, não integrado ao genoma da célula hospedeira e em múltiplas cópias. Já nas lesões malignas induzidas pelo HPV, o DNA viral integra-se ao genoma da célula hospedeira (DURST *et al.*, 1985; SCHWARZ *et al.*, 1985) formando uma ligação estável que interfere na capacidade celular de se replicar de maneira autônoma.

Nas lesões malignas induzidas pelo HPV, o sítio de ligação nos cromossomas é aleatório, porém constante em todas as células de um mesmo tumor, parecendo ter alguma preferência por locais frágeis ou próximos a oncogenes celulares. Conforme Wells *et al.* (2000), o sítio de abertura da molécula circular do DNA do vírus é específico, ou seja, sempre se abre no mesmo local, entre E1 e E2. Observaram, ainda, que o E2 é responsável

por reprimir a transcrição dos genes virais E6 e E7. Uma vez que E2 é inativado pela abertura da molécula virótica, há um aumento considerável da expressão dos genes E6 e E7. O potencial oncogênico do vírus é relacionado aos produtos desses genes, que interagem e inativam proteínas celulares derivadas dos genes supressores de tumores p53 e p105-RB, além de promover a degradação dos referidos genes, bloqueando sua função (WERNESS *et al.*, 1990). A oncogenicidade, portanto, vai depender diretamente do grau de afinidade entre as proteínas derivadas dos genes supressores de tumores e as proteínas virais derivadas de E6 e E7. Assim sendo, os produtos dos genes E6 e E7 dos HPV de alto risco (tipos 16, 18 e 31) apresentam grande afinidade com as proteínas derivadas de p53 e p105-RB (SCHEFFNER *et al.*, 1990; WERNESS *et al.*, 1990), enquanto os produtos derivados dos genes dos vírus de baixo risco (tipos 6 e 11) possuem baixa afinidade. O resultado da integração do vírus é a imortalização das células em que o HPV foi integrado (WOODWORTH *et al.*, 1990; MUNGER *et al.*, 1989). Tais células exibem morfologicamente figuras de mitose anormais, pleomorfismo nuclear, valores de DNA aneuplóides, consistentes com número cromossômial anormal e alteração arquitetural dos cromossomos. Porém, estas células só passam a ser precursoras de tumores quando os genes transformantes E6 e E7 são expostos a oncogenes celulares ativados.

2.4. Classificação do HPV

Através de técnicas moleculares e com a presença de DNA viral em lesões benignas e malignas do colo uterino, os HPV foram classificados em baixo potencial para desenvolvimento de lesões malignas, chamados de baixo risco oncogênico, e alto potencial para desenvolvimento de lesões malignas, chamados de alto risco oncogênico. Neste contexto os HPV 6, 11, 40, 42, 43 e 44 são considerados de baixo risco oncogênico,

enquanto que os HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68 pertencem ao grupo de alto risco oncogênico (BOSCH *et al.*, 1995; LORINCZ *et al.*, 1992; VAN RANST *et al.*, 1992). Munoz *et al.* (2003), em seu estudo, classificou quinze HPV como sendo de alto risco oncogênico (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82), três de provável alto risco oncogênico (26, 53 e 66), o que sugere serem classificados como alto risco oncogênico, e doze de baixo risco oncogênico (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e C16108), existindo uma relação entre a classificação epidemiológica e a classificação filogenética.

2.5. Co-fatores na infecção pelo HPV

Como a maioria das infecções pelos HPV, mesmo pelos de alto risco oncogênico, não necessariamente determinam o desenvolvimento neoplásico, estudam-se fatores ambientais ou do próprio hospedeiro, que podem ser necessários para o desenvolvimento neoplásico. Exemplos destes co-fatores seriam os hormônios, resposta imunológica e herança genética. Como co-fator hormonal cita-se a progesterona, portadora de ação *in vitro* sobre a LCR, estimulando a transcrição de HPV 16. Outros carcinógenos, como os encontrados no fumo, podem também ter participação direta como mutagênicos ou por provocarem imunodeficiência local (VILLA, 1997). Quanto a fatores hereditários, Magnusson *et al.* (2000) demonstraram que pelo menos 27% da variabilidade na susceptibilidade ao desenvolvimento neoplásico no colo uterino pode ser explicada por herança genética.

2.6. História natural da infecção pelo HPV

Informações obtidas de estudos transversais em mulheres sobre a prevalência do HPV por faixas etárias permitiu inferir que o contágio pelo HPV acontece no início da vida sexual, na adolescência, ou por volta dos 20 anos. A infecção será transitória na maioria das vezes e não haverá evidência clínica de doença, que poderá ser suprimida ou até curada. Outras vezes apresentarão lesões de menor importância, que poderão regredir espontaneamente. Uma minoria de mulheres desenvolverá uma infecção persistente pelo HPV, talvez como resultado da presença de co-fatores (HO *et al.*, 1998). Algumas destas infecções persistentes podem estar associadas a tipos virais de alto risco oncogênico, que podem originar lesões com potencial evolutivo para carcinomas. A maior parte dessas lesões precursoras do câncer do colo uterino são diagnosticadas em mulheres com idade entre 25 anos e 29 anos, enquanto os diagnósticos de câncer cervical são mais frequentes entre 35 anos e 39 anos (VILLA, 1997; SCHIFFMAN, 1992).

Estudos prospectivos têm corroborado estas informações demonstrando que, a partir da contaminação, o HPV é capaz de estabelecer uma infecção transitória ou persistente. A infecção transitória é a mais frequente e, após um período variável de tempo, não é mais possível detectar o DNA viral. Já a infecção persistente parece ocorrer mais frequentemente por HPV considerados de alto risco oncogênico (HO *et al.*, 1998), que associados à alta carga viral, seriam os principais fatores determinantes do desenvolvimento de lesões pré-invasivas (VILLA, 1997). Para legitimar as afirmações, cita-se o estudo realizado por Franco *et al.* (1999) que avaliaram 1.425 mulheres brasileiras em relação à aquisição e eliminação do HPV. Esses autores demonstraram uma taxa de 1,3% de novas infecções por HPV por mês, com taxa cumulativa de 38% após 18 meses. Apenas 35% permaneceram infectadas após 12 meses. O tempo médio de infecção para

tipos virais considerados de alto risco oncogênico foi de 13,5 meses e de 8,2 meses para os de baixo risco oncogênico. Mesmo nos casos de infecção persistente, existe a possibilidade de regressão das lesões, e apenas uma minoria de mulheres apresentarão uma lesão precursora de câncer no colo uterino que, não-diagnosticada e tratada, poderá progredir para o câncer.

Ao contrário, do que ocorre na população feminina, não existem dados consistentes sobre a história natural da infecção pelo HPV na população masculina, apesar da sua prevalência ser significativa. Excetuando-se pela baixa frequência de lesões precursores do câncer e do próprio câncer genital masculino, não há motivos para se acreditar que a história natural seja muito diferente.

2.7. Formas de contaminação pelo HPV

Considera-se que o HPV seja de transmissão preferencialmente sexual (ROTOLA *et al.*, 1994; SIEGEL and MELLINGER, 1992), mas dependendo do tipo de HPV e das lesões clínicas associadas a ele, os HPV podem ser transmitidos pelo contato da pele com fômites (instrumental médico), perinatal ou por auto-inoculação (pelo coçar, morder ou roer verrugas).

O conhecimento da infecção pelo HPV nas fases latente e subclínica ainda é limitado, dificultando a informação sobre a transmissão sexual da infecção durante essas fases. O herpes genital, uma doença sexualmente transmissível comum como a infecção pelo HPV, pode ser transmitido primariamente pelo verter de vírus em pacientes sem sinais ou sintomas de doença (MERTZ *et al.*, 1992). Conforme Strand *et al.* (1993), essa situação poderia ser semelhante à da infecção pelo HPV, pelo fato da prevalência de HPV/DNA entre pacientes assintomáticos em clínicas de doenças sexualmente transmissíveis.

Brown *et al.* (1999) sugerem que nem todo contato com o HPV é capaz de estabelecer uma infecção, sendo a infectividade esperada entre parceiros sexuais, em torno de 60%. A infecção inicia-se pela camada basal do epitélio, em locais em que se encontra mais exposta, como na junção dos epitélios escamoso e colunar do colo uterino, ou após microtraumas que possivelmente ocorrem durante o coito (SIEGEL and MELLINGER, 1992; JENSON *et al.*, 1987).

Diversos autores já demonstraram a presença do HPV em líquido amniótico, na pele e orofaringe de recém-nascidos, em proporções de até 73% (TSENG *et al.*, 1998; KAYE *et al.*, 1996; CASON *et al.*, 1995; KAYE *et al.*, 1994; PAKARIAN *et al.*, 1994). Apesar destas altas incidências, não se observa uma grande proporção de crianças com lesões, como seria esperado, caso toda contaminação resultasse em lesão. Ao contrário, os casos são esporádicos e traduzem-se pela presença de condilomas na genitália externa de recém-nascidos e pré-escolares, além da papilomatose juvenil recorrente, na qual estão presentes lesões em orofaringe.

2.8. Prevalência da infecção pelo HPV em homens

O DNA do HPV genital tem sido detectado em 3,6% a 84% dos homens (KOTOULAS *et al.*, 1996), dependendo da população em estudo e das diferenças metodológicas. Alguns autores encontraram uma prevalência de HPV/DNA em homens saudáveis, em torno de 5%, com um pico de 8% a 11% na faixa etária de 16 anos a 35 anos de idade (DILLNER *et al.*, 2000a; MOSCICKI *et al.*, 2000; MOSCICKI, 1996). Coeficientes de prevalência mais altos (63% a 84%) foram relatados entre os homens que freqüentavam clínicas de doenças sexualmente transmissíveis (WIKSTROM *et al.*, 1992; LAW *et al.*, 1991; MANDAL *et al.*, 1991). Apesar da prevalência significativa na

população masculina, e ao contrário do que ocorre entre as mulheres, não há associação expressiva entre infecção pelo HPV e tumores do aparelho geniturinário, sendo o carcinoma de pênis uma neoplasia rara, com incidências mais altas em países em desenvolvimento. Lopes *et al.* (2002) referiram uma freqüência relativa desse tumor no Brasil e Estados Unidos, de 2,1% e 0,5% respectivamente.

2.9. Formas de apresentação da infecção pelo HPV

A infecção pelo HPV, tanto no homem como na mulher, tem sido descrita sob três formas de apresentação: latente, subclínica e clínica.

2.9.1. Forma latente

Na forma latente da infecção, o DNA do HPV é diagnosticado por técnicas moleculares, não existindo evidências clínicas, citológicas, histológicas ou colposcópicas da infecção (LAURO *et al.*, 2000; SIEGEL and MELLINGER, 1992; RICHART and WRIGHT, 1991).

Acredita-se que, nesta forma da infecção, o DNA viral encontra-se na forma episomal, aparentemente não funcional e replicando-se apenas uma vez a cada ciclo celular, o que seria menos do que o número de cópias virais necessário para o diagnóstico molecular pelo método hibridização *in situ*. Como o vírus não se encontra “funcionante” nesta forma de infecção, não existem alterações citológicas decorrentes de sua presença.

Não são conhecidos os mecanismos pelos quais o HPV permanece nessa forma clínica, ao invés de estabelecer uma infecção produtiva, na qual seriam observadas as alterações citológicas ou teciduais. Provavelmente, fatores imunológicos são determinantes

desta condição, influenciados pelo tabagismo, estresse físico e psicológico (Hippeläinen *et al.*, 1994).

Seu significado biológico é desconhecido e não se sabe por quanto tempo o vírus pode permanecer neste estado, nem quantos casos progridem desta forma de infecção para as demais. Segundo Ferenczy *et al.* (1985), a presença do HPV em tecidos normais seria a responsável pela recorrência de lesões apesar dos tratamentos.

2.9.2. Forma subclínica

Nessa forma da infecção, ao invés de o HPV produzir um condiloma clássico evidente, a doença caracteriza-se por áreas difusas de hiperplasia epitelial não-papilífera. Apesar das diferenças macroscópicas entre o condiloma e esta forma da infecção, ambas são caracterizadas por proliferação da camada germinativa basal, dismaturação do epitélio e alterações citológicas características. A maior diferença histológica é que o condiloma é francamente papilar, enquanto a forma subclínica é plana ou micropapilar (REID *et al.*, 1984). Empregando-se o método da peniscopia, as lesões subclínicas traduzem-se por uma área que se torna esbranquiçada após a aplicação do ácido acético a 5%, podendo apresentar-se como epitélio aceto-branco, máculas aceto-brancas e pápulas aceto-brancas (LAURO *et al.*, 2000; BROWN *et al.*, 1999; SIEGEL and MELLINGER, 1992).

2.9.3. Forma clínica

Esta forma da infecção pelo HPV, conhecida como verruga genital ou condiloma, é caracterizada pela presença de lesão exofítica na região anogenital, visível a olho nu, sem técnica de magnificação (LAURO *et al.*, 2000). Os aspectos das lesões são de neofomações sésseis, papilares, múltiplas, com a forma de pequenas cristas, origem do

termo vulgar “crista-de-galo”. Podem ser brancas ou hiperocrômicas. Estão mais presentes em áreas úmidas expostas ao atrito durante o coito, ou seja, pequenos lábios e vestíbulo vulvar na mulher, e prepúcio, glande e sulco bálano-prepucial no homem, além das regiões anal e perianal de ambos os sexos (BUECHNER, 2002). No homem são infreqüentes na uretra e, quando existentes, geralmente estão localizadas na uretra distal e meato uretral. Em locais extragenitais podem assumir o mesmo aspecto de lesões vegetantes, que também devem ser biopsiadas para diagnóstico diferencial com tumor maligno.

2.10. Métodos diagnósticos da infecção pelo HPV

O diagnóstico da maioria das viroses é alcançado tradicionalmente pelas técnicas de cultura viral em células ou órgãos, microscopia eletrônica ou sorologia. Atualmente, nenhum desses métodos é rotineiramente aplicado para detectar HPV, fazendo com que o diagnóstico viral do HPV seja obtido pela detecção dos seus efeitos morfológicos sobre a célula ou, então, pela presença de seu DNA.

A anamnese e o exame físico representam o primeiro passo para o diagnóstico das lesões induzidas pelo HPV. A infecção clínica é facilmente detectada pelo exame físico, através da observação direta das lesões vegetantes (condilomas acuminados) na região genital masculina. Devido ao pleomorfismo peculiar dessas lesões, muitas vezes o diagnóstico será histológico. O exame físico não é capaz de diagnosticar a forma subclínica ou latente.

2.10.1. Peniscopia

A peniscopia é um método diagnóstico para a infecção pelo HPV, que utiliza o colposcópico, instrumento ótico capaz de ampliar a visão do examinador em até 20 vezes. O

exame consiste na avaliação da genitália masculina e região perianal sob magnificação, após a aplicação de ácido acético 2% a 5% por 5 minutos. O ácido acético coagula e precipita as proteínas intracelulares, revelando lesões brancas, ou acentuando lesões com relevos. Essa reação é reversível e superficial, podendo ser reproduzida com facilidade. A coagulação é visível se a quantidade de proteína na célula for maior do que no tecido normal, situação observada quando há replicação viral. As lesões coradas podem ser planas, ou papulosas, ou, ainda, apresentarem-se em pequenas lesões papilíferas, normalmente bem demarcadas, podendo apresentar alças capilares na porção central. Identificadas as áreas anormais, pode-se direcionar biopsias para diagnóstico histológico (LAURO *et al.*, 2000; HIPPELÄINEN *et al.*, 1991). Este método não é capaz de diagnosticar a forma latente da infecção e pode apenas sugerir a presença do HPV na forma subclínica. Apresenta desempenho diagnóstico insatisfatório pois apresenta altas taxas de resultados falso-positivos, obrigando biopsias para o diagnóstico diferencial. Como a frequência de lesão pré-invasiva é muito baixa na genitália masculina, a biopsia pode ser uma medida demasiada invasiva se tiver o único objetivo de esclarecer o diagnóstico.

2.10.2. Citologia e histologia

Os métodos citológico e histológico baseiam-se no efeito do vírus sobre as células e tecidos infectados, sem identificar propriamente o vírus. A primeira, a citologia, depende da esfoliação das células patológicas que representam a lesão subjacente, sendo útil na investigação da infecção pelo HPV em determinadas áreas (junção dos epitélios escamoso e colunar do colo uterino), ainda que possa apresentar limitações e desvantagens em outras. A histologia, assim como a citologia, representa um meio de diagnóstico indireto e

interpretativo, com resultados falso-positivo e falso-negativo, que depende da realização de uma biopsia da área infectada. Os achados histopatológicos mostram alterações arquiteturais e citológicas, que se caracterizam pela atipia coilocitótica (vacuolização perinuclear acompanhada de hipercromasia e aumento do volume nuclear), considerada como patognomônica para infecção pelo HPV (MAYMON *et al.*, 1994; KOSS, 1990; BOON and KOK, 1985; MEISELS and FORTIN, 1976). A histologia confirma a existência de doença nas lesões subclínicas e informa a existência desde processos inflamatórios até tumorais.

Os métodos diagnósticos peniscopia, citologia e histologia apresentam baixa especificidade, tornando difícil o diagnóstico preciso de HPV. São métodos que não identificam infecções latentes, tampouco predizem o tipo de HPV associado às lesões.

2.10.3. Microscopia eletrônica

A microscopia eletrônica demonstra a presença de partículas viróticas de aspecto esférico medindo cerca de 55nm de diâmetro, com arranjo cristalino ou dispersas pelo núcleo, ou ainda no citoplasma, quando há ruptura da membrana nuclear (HILLS and LAVERTY, 1979). As partículas virais visualizáveis ao microscópio eletrônico apresentam-se idênticas nas suas dimensões e na organização do genoma, não identificando o tipo viral, já que os HPV diferem entre si na seqüência de nucleotídeos do DNA. É um método empregado para localizar a partícula viral dentro da célula hospedeira.

2.10.4. Imuno-citoquímico e imuno-histoquímico

O HPV pode ainda ser demonstrado por técnicas de imuno-citoquímica/imuno-histoquímica. É um tipo de pesquisa que, por ser qualitativa, utiliza anticorpos como

reagentes específicos para a identificação dos antígenos do HPV. Esse método detecta o revestimento protéico das partículas virais do HPV, sendo utilizados anticorpos policlonais contra antígenos específicos aos vários tipos de HPV (SYRJANEN and PYRHONEN, 1983; WOODRUFF *et al.*, 1980). Apresenta alta especificidade, porém detecta somente os vírus na forma episomal, isto é, não integrado ao genoma do hospedeiro, predominante nas lesões de baixo grau. A sensibilidade é menor quando há integração do genoma viral ao da célula hospedeira, como nos casos de lesões precursoras do câncer, carcinomas epidermóides invasores e adenocarcinomas. Devido à sua baixa sensibilidade, a técnica imuno-histoquímica não é o método de escolha para o diagnóstico da infecção pelo HPV.

A forte associação entre o HPV e carcinomas da região anogenital implica a utilização de métodos diagnósticos que permitam identificar o vírus e estabelecer sua tipagem como alto ou baixo risco oncogênico. Desta maneira, o emprego de técnicas de biologia molecular com maior especificidade é mais adequado.

Na prática diária, são basicamente três as técnicas biomoleculares utilizadas na detecção de HPV/DNA. São elas: captura híbrida, hibridização *in situ* e reação em cadeia da polimerase.

2.10.5. Captura híbrida

A captura híbrida é uma técnica molecular extremamente específica e de fácil execução que fornece, a partir das amostras, a tipagem viral por grupos (alto e baixo risco oncogênico) além de permitir estimativa da carga viral (COX *et al.*, 1995). Este método utiliza sondas de ácido ribonucleico (RNA) específicas para 18 dos 30 tipos de HPV que mais frequentemente acometem o trato genital, com formação de "híbridos" DNA:RNA.

Caso existam partículas virais, os híbridos formados entre o DNA viral e as sondas específicas são capturados na parede do tubo de reação recobertos com anticorpos específicos marcados com fosfatase alcalina. As sondas não-reagentes são lavadas e a detecção da reação é feita através de adição de substrato quimioluminescente da fosfatase alcalina. A consequente emissão de luz é lida por luminômetro sendo a intensidade da luz proporcional à quantidade de HPV na amostra, fato que permite avaliar quantitativamente a carga viral. Os tipos virais detectados são divididos em dois grupos: grupo de baixo risco oncogênico: 6/11/42/43/44; grupo de intermediário/alto risco oncogênico: 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68.

2.10.6. Hibridização *in situ*

A hibridização *in situ* (SYRJANEN and SYRJANEN, 1986) permite a localização do DNA viral dentro das células, esteja este nas células ou em preparados citológicos representativos. Da mesma forma que os outros métodos, baseia-se no pareamento complementar de sondas especificamente projetadas para detectar tipo viral específico. As referidas sondas são previamente marcadas com substâncias como biotina ou digoxigenina, podendo utilizar-se também de material radioativo, se necessário. O teste de hibridização *in situ* pode ser feito diretamente, ou após a amplificação do DNA/RNA com PCR. Sem dúvida, a maior das vantagens com relação à técnica de hibridização *in situ* diz respeito à possibilidade de detectar não somente o tipo viral e a sua localização nas áreas infectadas, mas principalmente o estado físico do vírus, se epissomal ou incorporado ao genoma da célula hospedeira. A desvantagem está em ser menos sensível que o método reação em cadeia da polimerase.

2.10.7. Reação em cadeia da polimerase - PCR

O método PCR foi amplamente empregado nestas últimas décadas para a diagnose e monitoração de certas doenças infecciosas que, juntamente com outras tecnologias, determinaram uma transição rápida da tecnologia diagnóstica, devido à sensibilidade extrema, especificidade e diversidade. Destaca-se o PCR no diagnóstico das infecções pelo HPV, por se tratar de um procedimento simples, rápido e extremamente específico. Esse método corresponde a um processo enzimático-dirigido para reproduzir DNA *in vitro*, amplificando quantidades mínimas de seqüências específicas de DNA-alvo (10 a 100 moléculas de DNA) em milhões de cópias, sendo empregado em amostras citológicas ou histológicas com níveis muito baixos de DNA viral, resultantes do pouco material viral na célula ou pela pequena quantidade de material coletado. O PCR é um processo térmico cíclico que inclui três etapas: (1) durante a desnaturação a 95°C, a fita dupla do DNA-alvo é separada em fitas únicas; (2) os iniciadores se anelam ao DNA-alvo a 37°C-55°C. O conjunto de iniciadores (MY09 e MY11) anelam especificamente as suas seqüências complementares de DNA-alvo de fita única. A distância entre os dois iniciadores é, geralmente, de umas poucas centenas de nucleotídeos; (3) a extensão do iniciador é desempenhada por uma DNA polimerase termostável (a 72°C). A DNA polimerase gera fitas “filhas” de DNA que atravessam a região entre os dois iniciadores. Ambas as fitas simples iniciais de DNA, por conseguinte, são convertidas em quatro fitas simples, as quais servem de modelo para um novo ciclo subsequente de PCR, fazendo com que a concentração de DNA-alvo cresça exponencialmente. O PCR está concluído após 35 a 40 ciclos. Subseqüentemente, a amplificação de PCR é detectada após a eletroforese em gel, por meio da visualização do fragmento de DNA específico ampliado, corado pelo brometo de etídio (BERNARD *et al.*, 1994).

A utilização deste método é justificada (1) pela possibilidade de trabalho com quantidades mínimas de DNA viral nas amostras; (2) por apresentar os mais altos níveis de sensibilidade na detecção do HPV; (3) por permitir uma avaliação aprofundada dos dados epidemiológicos; e (4) por ser uma técnica relativamente simples.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Pacientes

O estudo desenvolveu-se de modo prospectivo, entre fevereiro de 2003 e fevereiro de 2004, em homens com lesão de pênis que procuraram o serviço de Urologia, na Universidade de Caxias do Sul e no Centro Especializado de Serviços do Sistema Único de Saúde de Caxias do Sul, e em homens parceiros sexuais de mulheres portadoras de lesões de baixo ou alto grau do colo uterino, atendidas no Ambulatório de Patologia do Trato Genital Feminino da Universidade de Caxias do Sul.

Este estudo foi realizado com a apreciação e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Caxias do Sul.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1) e o instrumento de avaliação epidemiológica (Anexo 2) foram obtidos, em entrevista individual durante a peniscopia, de todos os pacientes que participaram do estudo.

O estudo não apresentou Conflito de Interesses.

3.2. Padrão ouro

Para avaliar o desempenho dos métodos diagnósticos PCR em amostra obtida com escova, peniscopia e histologia, em infecções no pênis pelo HPV, nas formas clínica e subclínica, considerou-se como “padrão ouro” as amostras obtidas por biopsia, que apresentaram resultados positivos para a β -globina e resultados positivos para HPV/DNA no método PCR.

3.3. Classificação das lesões conforme a presença de HPV/DNA e a forma de apresentação da infecção viral

O grupo de indivíduos estudado foi classificado da seguinte forma:

- HPV/DNA negativo, quando apresentaram HPV/DNA negativo nas amostras obtidas com escova (de mucosa e epitélio escamoso) e por biopsia;

- infecção clínica, quando apresentaram HPV/DNA positivo na amostra obtida com escova e/ou biopsia, e lesão exofítica (verruga genital), branca ou hipercrômica na genitália externa, visível a olho nu, sem técnica de magnificação;

- infecção subclínica, quando apresentaram HPV/DNA positivo na amostra obtida com escova e/ou biopsia, e presença de lesões esbranquiçadas à peniscopia tais como epitélio aceto-branco, ou máculas aceto-brancas, ou pápulas aceto-brancas, observadas após a aplicação do ácido acético a 5%;

- infecção latente, quando apresentaram HPV/DNA positivo na amostra obtida com escova, e peniscopia negativa após a aplicação do ácido acético a 5%.

3.4. Avaliação epidemiológica

A prevalência do HPV é significativa no homem, mas ao contrário do que ocorre entre as mulheres, não há associação expressiva entre a infecção viral e tumores do aparelho genital masculino. Esse comportamento diferente da infecção pelo HPV no homem é devido à falta de um melhor entendimento sobre os fatores de risco para aquisição da infecção viral em questão, elaborou-se o estudo epidemiológico que considerou as seguintes variáveis:

- idade (≤ 19 anos, ≥ 20 anos e ≤ 29 anos, ≥ 30 anos e ≤ 39 anos, ≥ 40 anos e ≤ 49 anos, ≥ 50 anos e ≤ 59 anos, ≥ 60 anos e média da idade em anos);

- raça (branca e não-branca);
- nível de instrução (analfabeto, fundamental, médio e superior; completo ou incompleto);
- renda familiar (média em reais, calculada em janeiro de 2004);
- estado marital (casado, solteiro e amigado);
- idade da primeira relação sexual - IRS (≤ 16 anos, ≥ 17 anos e ≤ 20 anos, ≥ 21 anos e ≤ 30 anos e média da idade em anos da IRS);
- número de parceiras sexuais ao longo da vida (≥ 1 e ≤ 10 parceiras, ≥ 11 e ≤ 50 parceiras, ≥ 51 parceiras e número médio de parceiras sexuais);
- número de parceiras sexuais no último ano (uma parceira sexual, ≥ 2 parceiras sexuais e número médio de parceiras sexuais);
- tabagismo (não-fumante, < 10 cigarros/dia e ≥ 10 cigarros/dia);
- história de postectomia (sim e não);
- relações sexuais com prostitutas (sim e não);
- frequência do uso de método anticonceptivo de barreira (condom) nas relações sexuais com prostitutas (nunca, eventual, freqüente e sempre);
- frequência do uso de condom nas relações sexuais com a companheira (nunca, eventual, freqüente e sempre);
- estabilidade conjugal em anos (≥ 1 e ≤ 2 anos, ≥ 3 anos e ≤ 5 anos, ≥ 6 anos e a média de anos da estabilidade conjugal);
- homossexualismo (sim e não, passivo ou ativo);
- frequência do uso de condom nas relações homossexuais (nunca, eventual, freqüente e sempre);

- história prévia de doença sexualmente transmissível (não, condiloma, gonorréia, imunodeficiência humana adquirida, herpes genital, hepatite e cancro mole);
- história de imunodepressão (sim e não);
- indicação da peniscopia (condiloma no pênis, parceira infectada pelo HPV e controle após tratamento para HPV).

Os pacientes estudados foram submetidos (1º) ao exame físico especial, onde foram buscadas, a olho nu, lesões verrucosas na genitália externa, pênis, região pubiana, pele escrotal e região perianal; (2º) à peniscopia, realizada com auxílio de colposcópio DF Vasconcelos, modelo CP-M2500 (cinco aumentos, 3x, 4x, 7x, 13x e 17x), após aplicação na genitália externa de ácido acético a 5% por um período de 5 minutos; (3º) coleta da amostra com escova, orientada pela peniscopia; (4º) coleta da amostra por biopsia, orientada pela peniscopia.

As imagens identificadas à peniscopia foram classificadas em lesão condilomatosa (verruga acuminada, verruga pigmentada e não-pigmentada), em lesão suspeita de HPV (lesão macular, áreas aceto-brancas, pápulas peroladas, papiloma e lesão eritematosa), em lesão não-suspeita de HPV (úlcera, aumento da vascularização) e normal.

3.5. Métodos de amostragens utilizadas

Foram empregados os seguintes métodos de amostragens:

3.5.1 Coleta da amostra com escova (de mucosa e epitélio escamoso)

A amostra com escova foi obtida utilizando-se a escova especial *Urotest*, com a qual raspou-se a genitália na seguinte ordem: meato uretral, imagens clínicas e/ou subclínicas, região pré-balânica dorsal e ventral, mucosa prepucial e haste peniana. A

escova foi acondicionada em tubo *Eppendorf* com 500µL de solução TE (Tris HCl, pH 7,5 – 10mM; EDTA, 1mM), mantendo-se refrigerada entre 2°C e 4°C, até ser submetida à extração de DNA.

3.5.2 Coleta da amostra por biopsia

A amostra foi obtida por biopsia dirigida (orientada pela peniscopia) das imagens compatíveis ou não para HPV.

A biopsia foi realizada após infiltração de xylocaína a 1% sob as imagens clínicas ou suspeitas (subclínicas) de infecção pelo HPV, e seguindo-se a coleta do fragmento de tecido com o auxílio da pinça “dente-de-rato” e da tesoura de “íris curva”. O material colhido foi sistematicamente dividido em duas partes: uma parte foi acondicionada em tubo *Eppendorf* com 500µL de formol a 10%, sendo posteriormente emblocada em parafina e submetida à avaliação histológica; a outra parte foi acondicionada em tubo *Eppendorf* com 500µL de solução TE, mantendo-se refrigerada entre 2°C e 4°C, até ser submetida à extração de DNA.

As amostras foram devidamente identificadas por números, assim como os dados epidemiológicos.

3.6. Análise e classificação histológica

A avaliação histológica de parte da amostra obtida por biopsia foi considerada:

- positiva para HPV, quando foram observados sinais citoarquiteturais sugestivos de atipias coilocitóticas;

- negativa para HPV, quando a avaliação histológica identificou normalidade ou processos inflamatórios crônicos inespecíficos;

- sugestiva para HPV, quando a avaliação histológica sugeriu qualquer uma das alterações: papilomatose, hiperplasia, queratinização ou hiperkeratose.

As amostras obtidas por biopsia foram submetidas a uma segunda avaliação histológica pelo mesmo patologista.

3.7. Extração do DNA total das amostras obtidas com escova e por biopsia

Para extração do DNA total utilizou-se o Kit comercial *Genra Systems* da *Puregene™ From Buccal Cells*.

Inicialmente foi descartado o sobrenadante (solução de TE) da amostra obtida por biopsia, e adicionaram-se 100µL de solução de TEP's (Tris 1M, pH 8; EDTA, 0,5M; SDS 10%; Proteinase K, 20mg/ml - 200µL), colocando a amostra em banho a uma temperatura de 56°C, por um período de 12 horas a 18 horas, no aparelho Banho Maria Dubnoff da marca Marconi, modelo MA093, série 973846.

Após esse tratamento, as amostras obtidas por biopsia e com escova foram agitadas em vórtex, marca Biomatic, série 291, durante 60 segundos. As escovas foram retiradas dos tubos originais e colocadas em outros tubos *Eppendorf* devidamente identificados e armazenados a uma temperatura de 2°C a 4°C. Acrescentaram-se às amostras 300µL de solução de lise, do kit de extração de DNA, e novamente submetidas a banho a 65°C durante 45 minutos. Passado este tempo, adicionou-se às amostras 1,5µL de RNase (4mg/ml) que continham agora células lisadas, e distribuiu-se a RNase nessa solução, empregando-se movimentos repetidos de inversão manual das mesmas (cerca de 25 vezes). Em seguida, foram levadas ao banho a 37°C durante 30 minutos. Passado esse tempo, às amostras foram esfriadas à temperatura ambiente, e adicionaram-se 100µL de solução de precipitação de proteínas do kit de extração de DNA. A seguir, as amostras foram agitadas

rigorosamente no vórtex durante 20 segundos, com objetivo de misturar as soluções, acentuando a lise. Posteriormente, foram resfriadas em um recipiente contendo gelo e água, durante 5 minutos. Após, as amostras foram centrifugadas por um período de 5 minutos a 13.000 rotações por minuto (rpm), no aparelho Costar Mini Centrifuge, modelo 10, série 06621.

Para a precipitação de DNA, coletaram-se 300µL do sobrenadante das amostras centrifugadas, colocando-as em novo tubo *Eppendorf* devidamente identificado, descartando-se o restante. Adicionaram-se 300µL de isopropanol a 100% (2-propanol) e misturou-se a solução empregando-se movimentos repetidos de inversão manual (cerca de 50 vezes). Mantiveram-se as amostras em repouso, em temperatura ambiente, por um período de 5 minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas durante 7 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante da solução foi descartado e se deixou as amostras secarem de forma espontânea sobre papel absorvente. Uma vez secas, adicionaram-se 300µL de etanol a 70% e misturou-se a solução, empregando-se novamente movimentos suaves e repetidos de inversão manual (cerca de 5 vezes). As amostras foram centrifugadas, durante 1 minuto, a 13.000 rpm. O etanol a 70% foi retirado dos tubos *Eppendorf*, virando-os cuidadosamente. A secagem espontânea das amostras foi alcançada aguardando-se um período aproximado de 15 minutos.

Para a hidratação do DNA adicionaram-se às amostras 20µL de solução de hidratação de DNA, do kit de extração de DNA, e em seguida essas amostras foram colocadas em banho a 65°C durante 60 minutos. Posteriormente, foram estocadas a uma temperatura entre 2 e 4°C, até serem submetidas à amplificação para β-globina e HPV.

3.8. Amplificação do gene β -globina humana

As amostras de DNA obtidas a partir das metodologias de extração foram amplificadas utilizando-se os oligonucleotídeos PCO4 (seqüência 5' para 3': CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC) e GH20 (seqüência 5' para 3': GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC), que amplificam um fragmento de 268 pares de base (pb) do gene β -globina humana, garantindo a qualificação e quantificação do DNA para análise de HPV (SAIKI *et al.*, 1986).

Empregaram-se 19 μ L de solução (2 μ L de solução tampão 10X; 0,4 μ L de dNTP – 12,5mM de dATP, 12,5mM de dCTP, 12,5mM de dTTP e 12,5mM de dGTP; 0,4 μ L de MgCl₂ – 50mM; 0,2 μ L de PCO₄ – 200ng/ μ L; 0,2 μ L de GH₂O – 200ng/ μ L; 0,15 μ L de Taq polimerase 5u/ μ L, da marca Invitrogen; e 15,65 μ L de água) para cada 2 μ L de amostra de DNA. Uma reação foi realizada com todos os componentes acima citados e sem DNA foi incluída em todas as amplificações, chamada de controle negativo.

As amplificações foram realizadas em termociclador modelo PTC 100 (MJ Research, Watertown, Mass). Os parâmetros de termociclagem para desnaturação, anelamento e extensão das fitas de DNA foram: 95°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C. Ao final dos 40 ciclos foi realizada uma extensão final de 5 minutos a 72°C e posterior manutenção a 4°C, por um período de 5 minutos.

Os produtos de amplificação foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão TBE 1X (50mM de solução de Tris, 50mM de ácido bórico, 2,5mM EDTA pH 8,0), acrescidos de brometo de etídio 0,05%, sob voltagem constante de 3V/cm. Como marcador de peso molecular foi utilizado *DNA ϕ X 174RF Hae III Fragments* (40 μ g – 0,5 μ g/ μ L) e como reações controle, para verificação da presença de DNA humano, células

humanas da linhagem *SiHa*. Em seguida, a visualização dos correspondentes 268 pares de base do gene da β -globina humana foi realizada empregando-se luz ultravioleta.

As amostras negativas para a amplificação do gene da β -globina humana foram submetidas a uma nova extração.

3.9. Amplificação do DNA viral com oligonucleotídeos MY9 e MY11

As amostras de DNA β -globina positivas foram amplificadas empregando-se os oligonucleotídeos MY9 (seqüência 5' para 3': GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG)* e MY11 (seqüência 5' para 3': CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC)*, descritos por Manos *et al.* (1989), que amplificam uma região muito conservada de 450 pares de base do gene L1 dos HPV. Para tanto, empregaram-se 49 μ L de solução (5 μ L de solução tampão 10X; 0,97 μ L de dNTP – 12,5mM de dATP, 12,5mM de dCTP, 12,5mM de dTTP e 12,5mM de dGTP; 0,97 μ L de MgCl₂ – 50mM; 0,5 μ L de MY9 – 200ng/ μ L; 0,5 μ L de MY11 – 200ng/ μ L; 0,35 μ L de Taq polimerase 5u/ μ L, da marca Invitrogen; e 40,71 μ L de água) para cada 2 μ L de amostra de DNA. As amplificações foram realizadas no termociclador modelo PTC 100 (MJ Research, Watertown, Mass), aplicando-se os mesmos parâmetros de termociclagem para desnaturação, anelamento e extensão das fitas de DNA utilizados na amplificação do gene da β -globina humana citados acima.

Os produtos de amplificação foram avaliados por eletroforese em gel de agarose, conforme descrito no item 3.8 para a análise de β -globina humana. Os resultados foram analisados e comparados com os controles positivos e negativos na mesma reação, considerando-se controle positivo a amplificação da linhagem de células humanas

* M, W, Y e RR representam nucleotídeos diferentes em um conjunto de primer definidos como MY9 e MY11.

denominadas *SiHa* (que contém o HPV 16), e controle negativo a reação sem DNA. Em seguida, foi realizada a visualização dos fragmentos de DNA humano empregando-se luz ultravioleta.

3.10. Tipificação viral

Os produtos da amplificação de HPV foram digeridos com enzimas de restrição *Amplified Fragment Length Polymorphism* (RFLP) e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida, da seguinte forma: cada enzima de restrição, juntamente com o seu respectivo tampão, foram colocados em tubos de *Eppendorf* individualizados, conforme Tabela 1. A cada um destes tubos acrescentaram-se 8,5µL de uma mesma amostra positiva para DNA viral, previamente diluída na proporção 1:2. Posteriormente as soluções foram colocadas no banho a 37°C, por um período entre 13 horas a 17 horas. Passado esse tempo, aplicou-se em cada fenda do gel de poliacrilamida a solução composta de 10µL de DNA viral e 2µL de tampão de amostra (250mg/% de azul de bromofenol e 15mg/% de ficol). Após a aplicação das amostras no gel de poliacrilamida, realizou-se a corrida eletroforética com TBE 10X, em cuba de eletroforese vertical, a uma voltagem média de 75V/cm, por um período de 2 horas e 30 minutos. No momento seguinte, o gel de poliacrilamida foi imerso em solução fixadora (15ml de etanol, 1ml de ácido acético e 134ml de água destilada), durante 10 minutos. Posteriormente, adicionou-se 20ml de solução corante (0,3g de nitrato de prata e 20ml de água destilada), e agitou-se de forma manual e suave durante 10 minutos. Em seguida, o gel foi lavado com água destilada (duas vezes) e adicionou-se a este o revelador (4,5g de NaOH, 150ml de água destilada e 0,5ml de formol). O gel de poliacrilamida foi agitado até o momento em que iniciou a visualização das bandas de

digestão do DNA viral. Nesse momento, o revelador foi retirado e adicionaram-se 150ml de fixador, que permaneceu por um período de 15 minutos. Passado esse tempo, retirou-se o fixador e adicionou-se a solução secante (40ml de etanol, 12ml de ácido acético e 48ml de água) por um período de uma hora.

As amostras HPV/DNA positivas foram analisadas individualmente para a tipagem viral e comparadas ao controle negativo (reação sem enzima), na mesma reação. A classificação viral foi realizada após a revelação do gel de poliacrilamida, comparando-se os padrões de bandas obtidos a partir da digestão enzimática do DNA viral com os padrões descritos por Bernard *et al.* (1994), conforme os Anexos 3 e 4.

Tabela 1. Reação de digestão enzimática para cada amostra de HPV amplificado.

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	Tubo 8
Enzima μL	<i>BamHI</i> 0,5	<i>DdeI</i> 0,5	<i>HaeIII</i> 0,5	<i>HinfI</i> 0,5	<i>PstI</i> 0,5	<i>RsaI</i> 0,5	<i>MboI</i> 0,5	-
Tampão μL	<i>React 3</i> 1	<i>React 3</i> 1	<i>React 2</i> 1	<i>React 2</i> 1	<i>React 2</i> 1	<i>React 1</i> 1	<i>React 4</i> 1	-
DNA μL	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5

3.11. Análise estatística

Os dados levantados foram tabulados no programa *Statistical Package for the Social Science* (SPSS) – versão 10.0. Avaliou-se a sensibilidade, a especificidade e a razão de probabilidade (*Likelihood ratio*) positivo (RP+) e negativo (RP-) dos métodos diagnósticos, material coletado com escova e PCR, peniscopia e histologia, para diagnóstico do HPV em pênis. As medidas de desempenho foram obtidas a partir da comparação entre os métodos diagnósticos testados e o “padrão ouro” – item 3.2. Para

análise estatística aplicaram-se os testes descritivo e Pearson, considerando-se como significativo $p < 0,05$.

A sensibilidade é definida como a proporção dos indivíduos com a doença que tem um teste positivo para a doença (JAESCHKE *et al.*, 1994). Um teste sensível raramente deixa de encontrar pessoas com a doença, isto é, um teste sensível é usualmente positivo na presença de doença – Figura 2. Considerou-se resultado falso-negativo o percentual de casos doentes que o teste deixou de diagnosticar (falso-negativo = $100 - \% \text{ de sensibilidade do teste}$).

A especificidade é a proporção dos indivíduos sem a doença que têm um teste negativo para doença (JAESCHKE *et al.*, 1994). Um teste específico raramente classificará erroneamente pessoas sadias em doentes, isto é, um teste específico é útil para confirmar um diagnóstico sugerido por outros dados ou testes – Figura 2. Considerou-se resultado falso-positivo o percentual de casos “não-doentes” que o teste sugeriu doença (falso-positivo = $100 - \% \text{ de especificidade do teste}$).

Testes diagnósticos com sensibilidade e especificidade muito abaixo de 50% são considerados inadequados, mas se ambas forem 99%, o teste será considerado de excelente resultado (JAESCHKE *et al.*, 1994). Sem dúvida, é desejável dispor de um teste que seja altamente sensível e altamente específico. Infelizmente, com frequência isso não é possível. Ao contrário, existe um contrabalanço entre sensibilidade e especificidade de um teste diagnóstico.

As razões de probabilidade representam uma forma alternativa de descrever o desempenho de um teste diagnóstico (JAESCHKE *et al.*, 1994). Elas resumizam o mesmo

tipo de informação que a sensibilidade e a especificidade e podem ser usadas para calcular a probabilidade de doença após um teste positivo ou negativo – Figura 2.

		Doença		
		Presente	Ausente	
Teste	Positivo	a	B	a + b
	Negativo	c	D	c + d
		a + c	b + d	

$$\text{Sensibilidade} = a / (a + c)$$

$$\text{Especificidade} = d / (b + d)$$

$$\text{Razão de probabilidade positivo} = [a / (a + c)] / [b / (b + d)]$$

$$\text{Razão de probabilidade negativo} = [c / (a + c)] / [d / (b + d)]$$

Figura 2. Características e definições do teste diagnóstico (JAESCHKE *et al.*, 1994).

Para fins eminentemente práticos, e considerando-se melhor o entendimento da análise e discussão específica da Tabela 4, Medidas de desempenho dos métodos diagnósticos para HPV, os Grupo 1, Grupo 2 e Grupo 3 foram denominados da seguinte forma:

- Grupo 1: constituído pelo grupo de pacientes HPV/DNA positivo portadores de infecção nas formas clínica ou subclínica;
- Grupo 2: constituído pelo grupo de pacientes HPV/DNA positivo portadores somente de infecção na forma clínica;
- Grupo 3: constituído pelo grupo de pacientes HPV/DNA positivo portadores somente de infecção na forma subclínica.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram examinados 85 homens, dos quais 44 (51,8%) eram oriundos de ambulatórios de doenças sexualmente transmissíveis e 41 (48,2%) convidados a participar do estudo, cujas parceiras sexuais eram infectadas pelo HPV ou eram portadoras de lesões precursoras do câncer do colo uterino (diagnósticos pelos métodos citológico e histológico). Desse total de 85 homens, 38 (47,5%) apresentaram-se negativos para HPV/DNA, 29 (36,2%) eram portadores de infecção pelo HPV na forma clínica, 12 (15,0%) eram portadores de infecção pelo HPV na forma subclínica, e um (1,3%) era portador de infecção pelo HPV na forma latente. Excluíram-se do estudo 5 casos (5,9%) que apresentaram resultados negativos para a β -globina aplicada nas amostras coletadas por biopsia, eliminando-se desta maneira, os resultados falso-negativos para amplificação viral.

4.1 Estimativa da eficácia do método de coleta com escova através da amplificação do gene da β -globina

A visualização da amplificação empregando-se os primers PCO4 e GH20, dos 268 pares de bases correspondentes ao gene β -globina humana, foi realizada em gel de agarose empregando-se a luz ultravioleta, conforme está demonstrado na Figura 3. A amplificação do gene β -globina, garante a qualificação e quantificação do DNA para análise de HPV.

A β -globina aplicada nas amostras coletadas com a escova foi positiva em 85,9% dos 80 casos estudados. No grupo de pacientes HPV/DNA negativo e HPV/DNA positivo, a β -globina aplicada nas amostras coletadas com a escova foi positiva em 86,8% e 83,3%, respectivamente (Tabela 2).

Em estudo que considerou a avaliação de 175 homens cujas companheiras apresentavam anormalidades identificadas pela citologia, colposcopia e histologia, Bleeker *et al.* (2002) referiram um percentual de β -globina positiva de 74%, nas amostras coletadas com *swab*, dos pacientes com HPV/DNA positivo.

Tabela 2. Amplificação para β -globina e HPV nas amostras obtidas com escova e por biopsia.

Forma de obtenção das amostras	Categorias	HPV/DNA negativo		HPV/DNA positivo n=42							
		n= 38		Infecção clínica n=29		Infecção subclínica n=12		Infecção latente n=1		Total HPV/DNA positivo	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Com escova	Amplificação com β -globina										
	Positivo	33	86,8	26	89,7	8	66,7	1	100	35	83,3
	Negativo	5	13,2	3	10,3	4	33,3	-	-	7	16,7
	Amplificação para HPV										
	Positivo	-	-	19	65,5	4	33,3	1	100	24	57,1
	Negativo	33	86,8	10	34,5	8	66,7	-	-	18	42,9
Por biopsia	Amplificação com β -globina										
	Positivo	38	100	29	100	12	100	-	-	41	100
	Negativo	*	-	0	-	0	-	-	-	0	0
	Amplificação para HPV										
	Positivo	-	-	29	100	12	100	-	-	41	100
	Negativo	38	100	0	-	0	-	-	-	0	0

* Representam os 5 casos excluídos da pesquisa por apresentarem resultados negativos para a β -globina aplicada nas amostras coletadas por biopsia, eliminando-se desta maneira, os resultados falso-negativos para amplificação viral.

Provavelmente, a maior parte desses resultados negativos para a β -globina em material obtido com escova possa ser explicado pela limitação da escova na obtenção da

amostra, pela quantidade limitada de células humanas contidas na amostra e pela técnica empregada de amplificação para a β -globina.

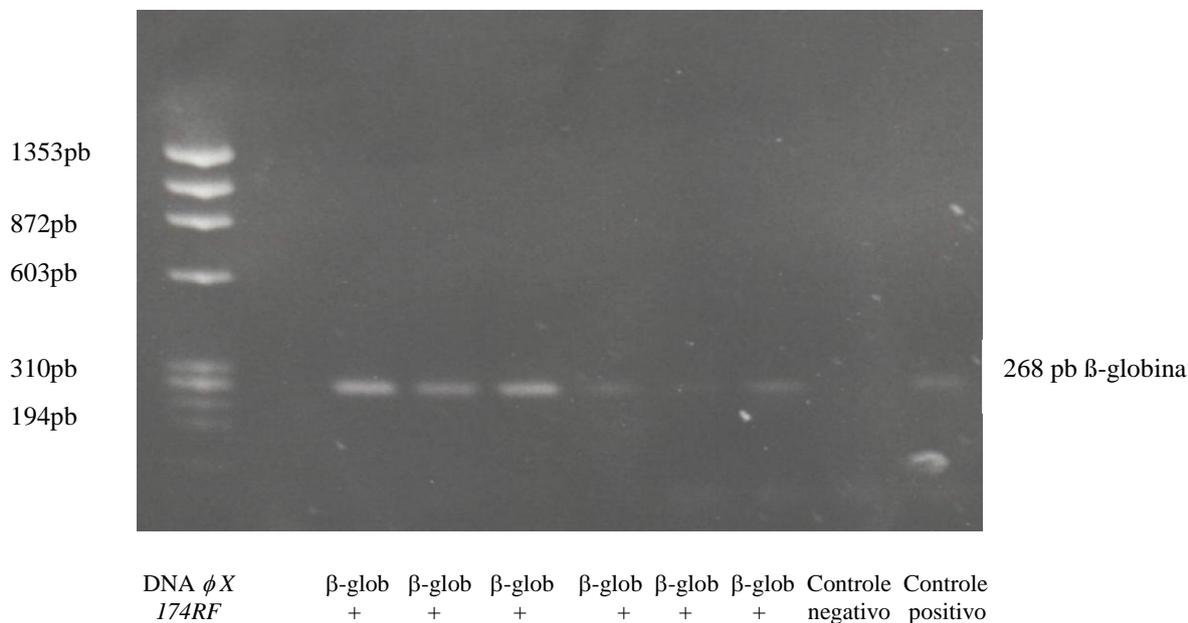


Figura 3. Amplificação de 268 pares de base do gene da β -globina humana empregando-se os primers PCO4 e GH20 em gel de agarose. β -glob + = amplificação positiva para β -globina. Controle positivo = amplificação positiva para β -globina - controle com células humanas da linhagem *SiHa*. Controle negativo = controle sem DNA humano - amplificação negativa para β -globina. DNA ϕX 174RF = marcador de peso molecular.

A β -globina aplicada nas amostras coletadas por biopsia foi positiva em 100% dos pacientes HPV/DNA negativo e 100% dos pacientes com HPV/DNA positivo (Tabela 2). Para fins de comparação entre os métodos de coleta com escova e por biopsia, eliminaram-se cinco amostras negativas para a amplificação do DNA humano em material obtido por biopsia. Essas amostras foram submetidas a nova amplificação com β -globina e foram excluídas do estudo, por apresentarem-se novamente negativas. Tabrizi *et al.* (1992), estudando 215 homens parceiros sexuais de mulheres com citopatológico do colo uterino sugestivo de infecção pelo HPV ou de lesões precursoras do câncer do colo uterino,

constatarem que em 55 amostras coletadas por biópsia de 82 pacientes portadores de lesões clínicas compatíveis com infecção pelo HPV, havia uma taxa de positividade para a β -globina de 85%.

Os resultados negativos no experimento de amplificação para a β -globina das amostras obtidas por biópsia podem ser atribuídos à presença de inibidores ou à técnica utilizada na extração do DNA.

As taxas de positividade da amplificação para β -globina nas amostras obtidas com escova e por biópsia foram consideradas excelentes, comparando-se aos resultados compilados na literatura; entretanto, devem ser realizados estudos que visem a melhoria da eficiência do método de coleta da amostra e de extração de DNA.

4.2 Detecção de HPV por amplificação do loco L1

A visualização da amplificação do DNA viral, empregando-se os primers MY9 e MY11, foi realizada em gel de agarose empregando-se a luz ultravioleta, conforme demonstrado na Figura 4.

A amplificação para HPV nas amostras coletadas com escova foi positiva em 57,1% dos pacientes que apresentaram infecção pelo HPV nas formas clínica, subclínica e latente (Tabela 2). Bleeker *et al.* (2002) empregando os métodos PCR e hibridização *in situ* em amostras coletadas com *swab* obtiveram percentual de 59% de positividade para a amplificação de HPV.

No estudo em questão, avaliou-se a amplificação para HPV nas amostras coletadas com escova nas infecções clínicas e subclínicas, e os percentuais obtidos foram de 65,5% e 33,3%, respectivamente (Tabela 2). Bleeker *et al.* (2002), aplicando os métodos PCR e hibridização *in situ*, encontraram HPV/DNA positivo em 67% dos raspados realizados em

pacientes que apresentavam lesão à peniscopia e 37% de HPV/DNA positivo em raspados obtidos de pacientes que não apresentavam lesão visível.

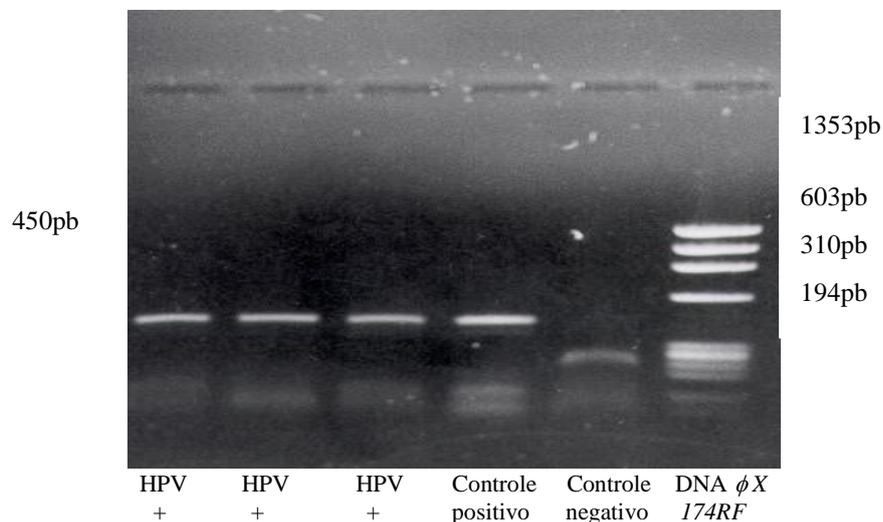


Figura 4. Amplificação para HPV com os primers MY9 e MY11 em gel de agarose. HPV + = amplificação positiva para HPV/DNA. Controle positivo = amplificação positiva para HPV/DNA – células humanas da linhagem *SiHa* – que contém o HPV 16. Controle negativo = solução sem DNA - amplificação negativa para HPV/DNA. DNA ϕX 174RF = marcador de peso molecular.

A amplificação para HPV foi positiva em 100% das amostras obtidas por biopsia das infecções clínicas e subclínicas (Tabela 2). Tabrizi *et al.* (1992) realizaram biopsia em 55 de 82 pacientes portadores de lesões clínicas compatíveis com infecção pelo HPV. Destas 55 amostras, a técnica convencional de hibridação detectou HPV em 29 amostras (53%) e a técnica de PCR detectou HPV em 47 amostras (85%).

Os percentuais de positividade para a amplificação de HPV/DNA nas amostras obtidas com escova, na forma subclínica de infecção pelo HPV, foram considerados razoáveis, resultado semelhante aos encontrados por Bleeker *et al.* (2002). Esse percentual considerado baixo, foi resultado da não-amplificação para β -globina e para HPV, de 4

casos e 8 casos respectivamente, que pode ser atribuído à presença insuficiente de DNA humano ou viral na amostra coletada com escova.

As taxas de positividade para amplificação do HPV em amostras obtidas com escova nas infecções subclínicas pelo HPV, apesar de semelhantes aos resultados compilados na literatura, foram consideradas razoáveis, indicando que novos estudos devam ser realizados sobre técnicas de coleta, com o objetivo de alcançar quantidades adequadas de DNA humano e viral na amostra.

4.3 Avaliação do desempenho dos métodos diagnósticos - amostra obtida com escova e PCR, histologia e peniscopia, para diagnóstico da infecção pelo HPV

A avaliação da eficácia de um teste diagnóstico baseia-se na sua relação com algum meio de saber se a doença está ou não presente e, para tanto, considerou-se como “padrão ouro” o grupo de indivíduos que apresentaram, em amostras obtidas por biopsia, resultados positivos para a β -globina e resultados positivos e negativos para a amplificação do HPV/DNA no método PCR. Comparou-se ao “padrão ouro” os resultados dos seguintes métodos: amostra obtida com escova e PCR, histologia e peniscopia, avaliando-se as medidas de desempenho dos mesmos, conforme a Tabela 3.

Para fins eminentemente práticos, e considerando-se o melhor entendimento da análise e discussão específica da Tabela 3, denominou-se o grupo portador de infecção pelo HPV na forma clínica e o grupo portador de infecção pelo HPV na forma subclínica de Grupo 1; o grupo portador de infecção pelo HPV na forma clínica de Grupo 2; e o grupo portador de infecção pelo HPV na forma subclínica de Grupo 3.

Na Tabela 3, a análise do Grupo 1 apontou um ótimo desempenho da sensibilidade para os métodos peniscopia (97%) e PCR em amostras obtidas com escova (79%), e um bom desempenho para a histologia (59%), quando aplicados isoladamente.

No que diz respeito ao desempenho da sensibilidade dos métodos diagnósticos aplicados especificamente ao Grupo 2, quando empregados isoladamente, considerou-se ótimo para peniscopia (96%), bem como para o PCR em amostra obtida com escova (90%). Para a histologia (73%), considerou-se muito bom.

Quanto ao desempenho dos métodos diagnósticos aplicados isoladamente no Grupo 3, os mesmos demonstraram ótima sensibilidade para peniscopia (92%), bom desempenho para PCR em amostra obtida com escova (50%) e ruim para a histologia (27%).

Quando se associaram os métodos diagnósticos peniscopia + histologia ou peniscopia + PCR em amostra obtida com escova, o desempenho da sensibilidade foi considerado excelente (100%) para os Grupos 1, 2 e 3.

Avaliando-se a especificidade dos métodos diagnósticos empregados isoladamente nos Grupos 1, 2 e 3, observou-se ótimo desempenho do PCR em amostra obtida com escova (>90%), muito bom para o método histologia ($\geq 70\%$), enquanto que o método diagnóstico peniscopia foi considerado ruim ($\leq 17\%$).

Quando se associaram os métodos diagnósticos peniscopia + PCR em amostra obtida com escova, a especificidade foi considerada boa (67%) nos Grupos 1, 2 e 3, enquanto que a especificidade na associação dos métodos peniscopia + histologia foi considerada boa (67%) no Grupo 2 e ruim (40%) nos Grupos 1 e 3.

Tabela 3. Medidas de desempenho dos métodos diagnósticos para HPV.

	Sensibilidade	Especificidade	Razão de probabilidade positiva	Razão de probabilidade negativa
	%	%		
Grupo 1*				
PCR em amostra obtida com escova	79	93	11,29	0,23
Histologia	59	70	1,97	0,59
Peniscopia	97	13	1,11	0,23
Peniscopia + Histologia	100	40	1,67	0
Peniscopia + PCR em amostra obtida com escova	100	67	3,0	0
Grupo 2**				
PCR em amostra obtida com escova	90	92	11,25	0,11
Histologia	73	86	5,21	0,31
Peniscopia	96	17	1,16	0,24
Peniscopia + Histologia	100	67	3,0	0
Peniscopia + PCR em amostra obtida com escova	100	67	3,0	0
Grupo 3***				
PCR em amostra obtida com escova	50	93	7,14	0,54
Histologia	27	70	0,90	1,04
Peniscopia	92	13	1,06	0,62
Peniscopia + Histologia	100	40	1,67	0
Peniscopia + PCR em amostra obtida com escova	100	67	3,0	0

*Grupo 1: métodos diagnósticos aplicados no grupo de pacientes com infecção clínica e subclínica. **Grupo 2: métodos diagnósticos aplicados no grupo de pacientes com infecção clínica. ***Grupo 3: métodos diagnósticos aplicados no grupo de pacientes com infecção subclínica.

Com o intuito de avaliar a sensibilidade e especificidade dos testes diagnósticos empregaram-se as razões de probabilidades positivo e negativo, que representam uma forma alternativa de descrever o desempenho de um teste diagnóstico.

Avaliando-se a RP- dos métodos diagnósticos, quando empregados isoladamente, PCR em amostra obtida com escova e peniscopia, definiram-se os mesmos como sendo muito bons nos Grupos 1 e 2, e razoável no Grupo 3 (valores quanto mais próximo de zero evidenciam um melhor desempenho do teste), caracterizando o desempenho dos testes como bom (para os Grupos 1 e 2) e razoável (para o Grupo 3) para identificação dos indivíduos não-doentes. No Grupo 3, o método diagnóstico PCR em amostra obtida com escova, quando empregado isoladamente, foi o que apresentou melhores resultados para identificação de homens não-doentes. A RP- dos métodos peniscopia + histologia e peniscopia + PCR em amostra obtida com escova, apresentaram um ótimo desempenho (valor igual a zero) nos Grupos 1, 2 e 3, demonstrando a ótima capacidade desses testes em identificar os pacientes não-doentes.

Estudou-se o desempenho dos métodos diagnósticos no grupo de indivíduos portadores de infecção na forma clínica pelo HPV (Tabela 3) e observou-se que os métodos histologia e PCR em amostra obtida com escova apresentaram baixas taxas de resultados falso-negativos (<27%) e falso-positivos (<10%), na presença e ausência de doença, respectivamente. Esses percentuais são as resultantes dos percentuais máximos esperados de acerto (100%) menos os percentuais de sensibilidade dos testes (73% e 90%) e especificidade (86% e 92%), respectivamente, como foi referido no item 3.11. O método peniscopia apresentou uma alta taxa de resultados falso-positivos (83%) na ausência de doença. Os métodos peniscopia + PCR em amostra obtida com escova e peniscopia + histologia apresentaram taxas iguais para resultados falso-negativos (zero) e falso-positivos (23%) na presença e ausência de doença, respectivamente. A análise dos resultados de desempenho dos métodos diagnósticos para a infecção pelo HPV na forma clínica

demonstrou excelentes resultados para os métodos PCR em amostra obtida com escova, peniscopia + histologia e peniscopia + PCR em amostra obtida com escova.

Na avaliação do desempenho dos métodos diagnósticos no grupo de indivíduos portadores de infecção na forma subclínica pelo HPV, observou-se que o método histológico apresentou uma alta taxa de resultados falso-negativos (73%) na presença de doença, e que o método peniscopia apresentou uma alta taxa de resultados falso-positivos (87%) na ausência de doença (as equações para obtenção das taxas de falso-positivo e falso-negativo, estão referidas no item 3.11). O método PCR em amostra obtida com escova apresentou uma taxa de falso-negativo de 50%. Os métodos peniscopia + PCR em amostra obtida com escova e peniscopia + histologia apresentaram uma taxa igual a zero para resultados falso-negativos na presença de infecção subclínica. O método peniscopia + histologia apresentou uma taxa maior de resultados falso-positivos (60%) que o método peniscopia + PCR em amostra obtida com escova (23%), no estudo do grupo de homens não-doentes. Diante da análise dos resultados, o método peniscopia + PCR em amostra obtida com escova foi o que apresentou os melhores resultados para diagnóstico de infecção pelo HPV no pênis, na forma subclínica.

4.4 Resultados da localização e do tipo de lesão à peniscopia

A análise das áreas mais acometidas pelas infecções clínicas e subclínicas pelo HPV foram a mucosa prepucial (61%), a região frênica (31,1%), a glândula e o sulco bálano-prepucial (17,1%), o corpo do pênis (12,2%), o escroto e a virilha (2,8%), conforme está apresentado na Tabela 4.

Tabela 4. Correlação entre HPV/DNA positivo e a localização das infecções clínicas e subclínicas na genitália masculina.

Local das imagens	HPV/DNA positivo n=42*				Total n=41	
	Infecção clínica** n=29		Infecção subclínica** n=12			
	n	%	n	%	n	%
Meato uretral	1	3,4	-	-	1	2,4
Glande	5	17,2	2	16,7	7	17,1
Sulco bálano-prepucial	3	10,3	4	33,3	7	17,1
Região frênica	9	31,0	5	41,7	14	31,1
Mucosa prepucial	20	68,9	5	41,7	25	61,0
Corpo do pênis	5	17,2	-	-	5	12,2
Escroto	1	3,4	-	-	1	2,4
Virilha	1	3,4	-	-	1	2,4

* 1 paciente era portador de infecção latente. ** Mais do que um tipo de imagem de infecção clínica ou subclínica pode ter sido identificada no mesmo indivíduo.

Hippeläinen *et al.*, em 1991, referiram como as áreas genitais mais acometidas o prepúcio (60,9%), a região frênica (48,4%), o corpo peniano (39%) e o meato uretral (21,8%). Hippeläinen *et al.*, em 1993, referiram o prepúcio/região frênica (30,3%), glande/sulco bálano-prepucial (10,2%) e corpo peniano (5,1%) como os locais mais acometidos. Lauro *et al.*, em 2000, identificou as áreas mais atingidas como o prepúcio (54,7%), o sulco bálano-prepucial (22,6%), a glande (13,2%) e o meato uretral (9%).

Siegel & Mellinger, em 1992, referiram como áreas mais acometidas o sulco bálano-prepucial, o prepúcio e o corpo peniano.

No estudo, as áreas mais acometidas nas formas clínicas e subclínicas de infecção pelo HPV foram a mucosa prepucial e a região frênica, provavelmente por serem as áreas de maior umidade e de maior exposição a microtraumas durante a atividade sexual.

Os percentuais das imagens identificadas na peniscopia (Tabela 5), nos grupos HPV/DNA positivo e negativo, classificadas como lesão condilomatosa, foram de 36,6% na forma de verruga acuminada, de 3,8% na forma de verruga pigmentada e de 1,3% na

forma de verruga não-pigmentada; como lesão sugestiva de HPV, foi de 26,3% na forma de lesão macular, de 20% na forma de pápulas peroladas, de 8,8% na forma de áreas aceto-brancas, de 5,0% na forma de papiloma, de 3,8% na forma de pápula não-pigmentada e de 2,5% na forma de lesão eritematosa; e como lesão não-sugestiva de HPV, foi de 1,3% na forma de úlcera e de 1,3% na forma de lesão herpética.

Tabela 5. Correlação entre HPV/DNA e o tipo de lesão identificada na peniscopia.

Tipo de lesão para HPV	HPV/DNA negativo		HPV/DNA positivo n=42*				Total n=80	
	n=38**		Infecção clínica n=29**		Infecção subclínica n=12**		n	%
	n	%	n	%	n	%		
Lesão condilomatosa								
Verruga acuminada	3	7,9	26	89,7	-	-	29	36,3
Verruga pigmentada	1	2,6	2	6,7	-	-	3	3,8
Verruga não-pigmentada	1	2,6	-	-	-	-	1	1,3
Lesão sugestiva								
Pápulas peroladas	12	31,6	-	-	4	33,3	16	20,0
Lesão macular	12	31,6	5	17,2	4	33,3	21	26,3
Papiloma	-	-	3	10,3	1	8,3	4	5,0
Áreas aceto-brancas	3	7,9	1	3,4	3	25,0	7	8,8
Lesão eritematosa	1	2,6	-	-	1	8,3	2	2,5
Pápula não-pigmentada	3	7,9	-	-	-	-	3	3,8
Lesão não-sugestiva								
Úlcera	1	2,6	-	-	-	-	1	1,3
Lesões herpéticas	1	2,6	-	-	-	-	1	1,3

* 1 paciente era portador de infecção latente. ** Mais do que um tipo de lesão pode ter sido identificado no mesmo indivíduo.

A peniscopia dos pacientes HPV/DNA negativo identificou a presença de lesão condilomatosa, lesão sugestiva e lesão não-sugestiva para infecção pelo HPV, em 13,2%, 81,6% e 5,2% dos casos, respectivamente. No grupo de pacientes com infecção na forma clínica pelo HPV, a peniscopia identificou lesão condilomatosa, lesão sugestiva e lesão

não-sugestiva para infecção pelo HPV em 96,4%, 31% e 0% dos casos, respectivamente. A peniscopia realizada nos pacientes com infecção na forma subclínica identificou preponderantemente lesões sugestivas para infecção pelo HPV, caracterizadas pelas pápulas peroladas (33,3%), lesão macular (33,3%) e área aceto-brancas (25%), como as mais freqüentes.

Tabrizi *et al.* (1992) estudando 215 homens, parceiros sexuais de mulheres com citopatológico do colo uterino sugestivo de infecção pelo HPV ou de lesões precursoras do câncer do colo uterino, consideraram a peniscopia normal em 133 casos (62%). Observaram, também, lesão subclínica em 14 (6%) e lesão clínica evidente em 68 (32%), sendo que 14 desses parceiros sexuais apresentavam lesões subclínicas associadas.

No estudo em questão, quando a peniscopia sugeriu lesão sugestiva, a mesma esteve presente em 81,6% dos pacientes HPV/DNA negativo, em 31% dos pacientes com infecção clínica e na totalidade dos pacientes com infecção subclínica. Nicolau *et al.*, em 1997, na Escola Paulista de Medicina – São Paulo, num estudo prospectivo de 190 parceiros sexuais de mulheres com infecção genital pelo HPV, associadas ou não a lesões precursoras do colo uterino, relacionaram a citologia, a histologia e a peniscopia como métodos complementares entre si.

Bergman & Nalick (1992) indicaram a técnica da peniscopia para homens de alto risco para infecção pelo HPV e para parceiros sexuais de mulheres que apresentem lesões precursoras de câncer genital. Indicaram, também, no pós-tratamento de homens com lesões provocadas pelo vírus.

Diante da performance da peniscopia, no estudo, observou-se a dificuldade da técnica como método isolado de diagnóstico de infecção pelo HPV.

4.5 Resultados da análise histológica

Os resultados obtidos com a análise histológica da amostra obtida por biopsia, no grupo de pacientes HPV/DNA positivo, evidenciaram a coilocitose como achado mais freqüente (59,5%), conforme mostra a Tabela 6. Hippeläinen *et al.*, em 1991, ao estudar um grupo HPV/DNA positivo encontraram taxa de coilocitose de 53,7%, enquanto que Nicolau *et al.*, em 1997, empregando a mesma metodologia, identificaram percentual de 50%.

Tabela 6. Correlação entre HPV/DNA e o achado histológico.

Histologia	HPV/DNA negativo		HPV/DNA positivo n=42*				Total HPV/DNA Positivo n=41	
	n=38**		Infecção clínica n=29**		Infecção subclínica n=12**			
	n	%	n	%	n	%	n	%
Positiva para HPV								
Coilocitose	7	18,4	22	75,9	3	25,0	25	59,5
Sugestiva para HPV								
Hiperplasia	1	2,6	-	-	2	16,7	2	4,8
Queratinização	8	21,1	2	6,9	4	33,3	6	14,3
Papilomatose	8	21,1	13	44,8	4	33,3	17	40,5
Hiperkeratose	1	2,6	1	3,4	-	-	1	2,4
Disqueratose	-	-	1	3,4	-	-	1	2,4
Negativa para HPV								
Inflamação crônica inespecífica	7	18,4	-	-	2	16,7	2	4,8
Normal	6	15,8	1	3,4	3	25,0	4	9,5

* 1 paciente era portador de infecção latente. ** Mais do que um tipo de alteração histológica pode ter sido identificada na mesma amostra.

No grupo de pacientes HPV/DNA positivo, os achados histológicos sugestivos para a infecção pelo HPV, como a papilomatose (40,5%) e a queratinização (14,3%), foram os mais freqüentes.

Na análise da Tabela 6, a histologia foi considerada positiva para HPV em 75,9% e 25% dos pacientes que apresentaram infecção pelo HPV nas formas clínica e subclínica para HPV, respectivamente; sugestiva para HPV em 58,5% e 83,3% dos pacientes que apresentaram lesão clínica e subclínica para HPV, respectivamente; não-sugestiva para HPV em 3,4% e 41,7% para aqueles que apresentaram infecção clínica e subclínica para HPV, respectivamente. Ainda na Tabela 6, a histologia foi positiva para HPV em 59,5% dos pacientes HPV/DNA positivos e em 18,4% dos pacientes HPV/DNA negativos; foi sugestiva para HPV em 64,4% dos pacientes HPV/DNA positivos e em 45,2% dos pacientes HPV/DNA negativos; e foi negativa para HPV em 14,3% dos pacientes HPV/DNA positivos e em 34,2% dos pacientes HPV/DNA negativos. A histologia demonstrou alterações benignas em todas as amostras estudadas, não sendo identificadas lesões precursoras para neoplasia de pênis.

Resultados semelhantes foram observados por Hippeläinen *et al.* (1991) que referiram histologia positiva em 53,7% dos casos de HPV/DNA positivo, histologia suspeita em 58,8% dos casos de HPV/DNA positivo e histologia negativa ou não-específica em 4,6% dos casos de HPV/DNA positivo. A histologia foi positiva ou sugestiva para HPV em 65,8% dos pacientes HPV/DNA negativo. Strand *et al.* (1996), encontraram histologia positiva para coilocitose em 76,9% dos casos de HPV/DNA positivo e histologia negativa em 67,5% dos casos de HPV/DNA negativo.

Teixeira *et al.*, em 1999, empregando os métodos diagnósticos peniscopia e histologia, estudaram 377 homens, parceiros sexuais de mulheres com lesões precursoras de câncer do colo uterino, e encontraram percentual de 68,6% de alterações histológicas sugestivas de infecção pelo HPV em material obtido por biopsias de lesões subclínicas.

A coilocitose e outros sinais morfológicos atribuídos à infecção pelo HPV, tais como a hiperplasia, a papilomatose e a queratinização, estiveram presentes em ambos os grupos HPV/DNA positivo e negativo. Os resultados desse estudo não permitem a inferência da coilocitose como sinal patognomônico de infecção pelo HPV na área urogenital masculina, posto que apresentou tanto resultados falso-positivos quanto falso-negativos. Esse fato poderia ocasionar informações falsas ao paciente.

A grande indicação do estudo histológico é a determinação do diagnóstico das lesões precursoras e invasoras da região urogenital.

4.6 Resultados epidemiológicos

Foram incluídos, no estudo, homens com lesões de pênis provenientes de ambulatórios de DST e homens parceiros sexuais de mulheres ou infectadas pelo HPV ou portadoras de lesões precursoras do câncer do colo uterino (diagnóstico pela citologia e/ou histologia).

As Tabelas 7, 8, 9 e 10 descrevem os correlatos epidemiológicos da população estudada, comparando os grupos HPV/DNA positivo e negativo em relação às variáveis estudadas, a partir de questionário respondido no momento da coleta das amostras (Anexo 2).

O estudo dos 42 homens que apresentaram HPV/DNA positivo revelou uma média de idade de $28,1 \pm 9,6$ anos (com idade mínima de 19 anos e idade máxima de 54 anos). Quando se comparou a média de idade entre os grupos HPV/DNA positivo e negativo, observou-se associação estatística significativa ($p=0,045$) entre a variável estudada e a infecção pelo HPV (Tabela 7).

Tabela 7. Dados epidemiológicos - I.

Variáveis	Categoria	HPV/DNA positivo n=42		HPV/DNA negativo n=38		Valor de p*
		n	%	n	%	
Idade	≤ 19	5	11,9	1	2,6	0,071
	≥20 e ≤29	22	52,4	16	42,1	
	≥30 e ≤39	10	23,8	12	31,6	
	≥40 e ≤49	3	7,1	9	23,7	
	≥50 e ≤59	2	4,8	-	-	
	≥60	-	-	-	-	
	Média em anos	28,1±9,6		31,7±8,3		0,045
Raça	Branca	36	85,7	33	86,8	NS**
	Não-branca	6	14,2	5	13,2	
Nível de ensino	Analfabeto	1	2,4	-	-	NS
	Fundamental (completo ou incompleto)	19	45,2	22	57,9	
	Médio (completo ou incompleto)	19	45,2	12	31,6	
	Superior (completo ou incompleto)	3	7,1	4	10,5	
Renda familiar ***	Média	1.269,00±1.444,90		889,20±519,80		NS
Estado marital	Casado	15	35,7	19	50,0	0,003
	Solteiro	21	50,0	6	15,8	
	Amigado	6	14,3	13	34,2	

* Teste de Pearson. Considerou-se estatisticamente significativa $p < 0,05$ entre HPV/DNA positivo e HPV/DNA negativo. ** NS = associação estatisticamente não significativa. *** Cálculo em reais, em janeiro de 2004.

A literatura compilada, que empregou técnicas biomoleculares, referiu as seguintes média das idades dos pacientes HPV/DNA positivos: Wikstrom *et al.* (2000), 27,1 anos; Strand *et al.* (1996), 25 anos; Rotola *et al.* (1994), 28,1 anos; Bergman & Nalick (1992), 27 anos; e Hippeläinen *et al.* (1991), 28,6 anos. Bleeker *et al.* (2002), em seu estudo realizado entre 1993 e 1999, em 175 homens cujas parceiras sexuais apresentaram neoplasia intra-epitelial cervical, a idade média do grupo analisado foi de 38 anos, a mais alta entre as encontradas na literatura concernente.

A média da idade do grupo de homens infectados pelo HPV se mostra em conformidade com o encontrado na literatura, apesar de o estudo apresentar alguns vieses devido aos critérios de inclusão como, por exemplo, a procedência dos homens estudados.

Considerando-se a análise dos diferentes níveis de faixas etárias, observou-se uma clara prevalência de HPV/DNA positivo abaixo de 29 anos (64,3%), prevalência que cai consideravelmente nas faixas etárias seguintes. Seguindo-se a mesma metodologia, o estudo de Castellsagué *et al.* (1997) demonstrou prevalência, para essa mesma faixa etária, de 14,3% na Espanha (população considerada pelos autores de baixo risco para infecção pelo HPV) e 18,5% na Colômbia (população considerada pelos autores de alto risco para infecção pelo HPV), taxas muito inferiores às detectadas no presente estudo. Franceschi *et al.* (2002), em seu estudo caso-controle realizado em diferentes países, não apontaram associação entre idade e infecção pelo HPV.

O estudo do grupo de homens HPV/DNA positivo não permitiu inferir que o contágio pelo HPV tenha acontecido abaixo dos 19 anos e em iniciantes na atividade sexual; contudo, na análise das faixas etárias, destacou-se o alto percentual de infecção pelo HPV (5/6 casos; 83,3%) para a faixa etária até 19 anos, resultado não observado para as demais faixas etárias, bem como a importante diminuição da prevalência da infecção pelo HPV após os 39 anos. A resposta imunológica poderia esclarecer a alta prevalência do HPV em idade precoce e sua acentuada redução após os 39 anos.

Avaliando-se a raça dos pacientes envolvidos, a presença de DNA/HPV foi maior na raça branca (85,7%) do que na não-branca (14,1%), não havendo diferença dos percentuais encontrados no grupo HPV/DNA negativo (86,8% vs. 12,1%), conforme mostra a Tabela 7. Tal fato pode ser explicado pelas diferenças raciais características da

região sul do país. Castro *et al.* (1994), em estudo realizado na Universidade Federal Fluminense, no Rio de Janeiro, encontraram uma participação de 60% de indivíduos de cor branca e 40% de não-brancos.

No quesito relacionado a avaliação do nível de instrução observou-se que 90,4% dos pacientes com HPV/DNA positivo haviam completado o nível médio de ensino, enquanto que no grupo de pacientes HPV/DNA negativo, o percentual foi de 89,5%, não se evidenciando associação estatisticamente significativa (Tabela 7). Castro *et al.* (1994), em uma amostra de 40 militares do sexo masculino de uma unidade militar sediada no Rio de Janeiro, encontraram um percentual de 45% para nível médio. Hippeläinen *et al.* (1993), em estudo realizado na Finlândia, avaliaram 432 homens HPV/DNA positivo, e encontraram percentual de 40% para o nível educacional teórico e 60% para o nível vocacional. Castellsagué *et al.* (2002), em estudo multicêntrico que considerou homens afetados pelo vírus, circuncidados ou não, e naturais do Brasil, Colômbia, Tailândia, Filipinas e Espanha, encontraram percentual de 39,6% para o nível de ensino fundamental e 19,5% para o nível de instrução médio ou superior.

No que diz respeito ao estudo da variável nível de instrução, a amostra estudada pode não representar a totalidade dos homens contaminados na região de Caxias do Sul, já que imagina-se que aqueles com ensino médio e superior tenham maiores e melhores informações sobre a doença da qual são portadores, bem como possuam maiores possibilidades de tratamento em clínicas particulares. Assim, o grupamento de homens HPV/DNA positivo, na maioria (90,4%) portadores de instrução de nível fundamental e médio, é representativo de uma camada da população menos assistida e instruída, contumazes usuários do Sistema Único de Saúde. Em virtude das informações obtidas, que

sugerem intensa precariedade na educação para a saúde, seria adequada uma avaliação epidemiológica a propósito de informações a respeito da educação sexual recebida nas escolas e no lar.

O estudo da média da renda familiar não evidenciou associação entre os grupos HPV/DNA positivo e negativo (R\$1.269,00±1.444,90 e R\$889,20±519,90, respectivamente), conforme mostra a Tabela 7. Embora esse tema não tenha sido discutido na literatura consultada, mesmo assim merecem ênfase os altos valores percebidos na amostra avaliada. Pode ser representativa do alto poder aquisitivo da região, mesmo para trabalhadores de baixo e médio nível de instrução.

Analisando-se o estado marital, observou-se uma associação estatisticamente significativa entre HPV/DNA positivo ($p=0,03$) e o grupo de solteiros (Tabela 7). Ao se agrupar casados e amigados, indivíduos com suposta estabilidade conjugal, o percentual de HPV/DNA positivo foi de 50%, resultado semelhante ao encontrado por Castro *et al.* (1994), que referiram percentual de 57,5%.

A associação entre o estado marital solteiro e infecção pelo HPV pode ser explicada pela maior média do número de parceiras sexuais no último ano ($4,48\pm 3,0$ parceiras sexuais), quando comparada à média do grupo negativo para HPV/DNA ($2,5\pm 2,4$ parceiras sexuais).

No estudo da idade da primeira relação sexual (IRS) observou-se uma associação altamente significativa entre HPV/DNA positivo e idade da primeira relação sexual ≤ 16 anos ($p=0,036$), conforme Tabela 8. Castellsagué *et al.* (2002), estudando homens

circuncidados e não-circuncidados, encontraram IRS abaixo de 16 anos, num percentual de 4,2% e 22,9%, respectivamente. O mesmo autor, em 1997, estudando 816 homens na Espanha e na Colômbia, relatou uma taxa de 20,1% para a idade da primeira relação sexual inferior a 15 anos. Os dois trabalhos citados empregaram técnicas biomoleculares para diagnóstico da infecção pelo HPV. Franceschi *et al.* (2002) encontraram percentual de 20,4% para a idade da primeira relação sexual ≤ 16 ($p=0,67$).

Tabela 8. Dados epidemiológicos - II.

Variáveis	Categoria	HPV/DNA positivo n=42		HPV/DNA negativo n=38		Valor de p*
		n	%	n	%	
Idade da primeira relação sexual na vida	≤ 16	37	88,1	24	63,2	0,025
	≥ 17 e ≤ 20	4	9,5	13	34,2	
	≥ 21 e ≤ 30	1	2,4	1	2,6	
	Média em anos	17,7 \pm 2,3		16,9 \pm 2,3		0,017
Número de parceiras sexuais durante a vida	≥ 1 e ≤ 10	14	34,1	17	44,7	NS**
	≥ 11 e ≤ 50	23	56,1	20	52,6	
	≥ 51	4	9,8	1	2,6	
	Média	26,5 \pm 29,3		18,4 \pm 17,5		NS
Número de parceiras sexuais no último ano	1	14	33,3	24	63,2	0,008
	≥ 2	28	66,7	14	36,8	
	Média	3,5 \pm 2,9		1,7 \pm 1,3		0,001
Estabilidade conjugal em anos	≥ 1 e ≤ 2	23	59,0	15	39,5	NS
	≥ 3 e ≤ 5	3	7,7	7	18,4	
	≥ 6	13	33,3	14	36,8	
	Média em anos	4,8 \pm 5,9		7,3 \pm 7,7		NS
Tabagismo	Não	26	61,9	21	55,3	NS
	<10	8	19,0	4	10,5	
	≥ 10	8	19,0	13	34,2	

* Teste de Pearson. Considerou-se estatisticamente significativa $p < 0,05$ entre HPV/DNA positivo e HPV/DNA negativo. ** NS = associação estatisticamente não significante.

No estudo, a média da idade da primeira relação sexual no grupo de homens HPV/DNA positivo foi de $17,7 \pm 2,3$ anos, apresentando uma associação estatística significativa entre HPV/DNA positivo e média da idade da IRS ($p=0,017$). Hippeläinen *et al.*, em 1993, em estudo epidemiológico, identificaram média da idade para IRS de $16,2 \pm 1,5$ anos ($p=0,13$). Rotola *et al.* (1994), em estudo desenvolvido na Universidade de Bologna, Itália, encontraram média da idade de 18 anos para IRS.

Na pesquisa em questão, observou-se que os indivíduos HPV/DNA negativo e que tiveram até 10 parceiras sexuais durante a vida, apresentaram percentual de ocorrência de 44,7%, superior ao percentual de 34,1% dos indivíduos HPV/DNA positivo. Na medida em que houve aumento do número de parceiras sexuais (≥ 11 parceiras), aumentou o percentual de indivíduos HPV/DNA positivos (65,9%), ainda que esse quesito não tenha sido estatisticamente significativo (Tabela 8). Castellsagué *et al.* (2002), estudando homens não-circuncidados e com 5 ou menos parceiras sexuais durante a vida, encontraram indivíduos HPV/DNA positivo num percentual de 12,5%; quando o número de parceiras sexuais durante a vida era superior a 5, o percentual aumentou para 44,7%. Franceschi *et al.* (2002) referiram em seus estudos associação entre HPV/DNA positivo e o número de parceiras sexuais durante a vida, ou seja, abaixo de 10 parceiras sexuais, o percentual foi de 21,1%; acima de 10 parceiras, o percentual foi de 43,3% ($p < 0,01$). Assim, maior risco de adquirir infecção pelo HPV parece estar intimamente relacionado ao maior número de parceiras sexuais durante a vida.

Ao se estudar o número de parceiras sexuais no último ano, observou-se uma associação altamente significativa ($p=0,008$) entre o número de parceiras igual ou superior

a 2 e infecção pelo HPV (Tabela 8). Na consulta à literatura específica, constata-se que essa variável não foi avaliada pelos pesquisadores do tema. No entanto, ele corrobora o resultado já citado, em que o aumento do número de parceiras sexuais tende a aumentar o risco de infecção pelo HPV.

Neste estudo, conforme mostra a Tabela 8, o menor tempo de estabilidade conjugal (≥ 1 e ≤ 2 anos) e maior tempo de estabilidade conjugal (≥ 6 anos) apresentaram os maiores percentuais de homens infectados pelo HPV, resultado que não demonstrou associação estatisticamente significativa quando comparado ao grupo HPV/DNA negativo. Hippeläinen *et al.*, em 1993, observaram percentuais de 68,2% e 31,7% de estabilidade conjugal até 2 anos e acima de 2 anos, respectivamente (NS).

Na Tabela 8, observou-se que apenas 38% do grupo HPV/DNA positivo apresentavam o hábito de fumar (NS). Franceschi *et al.* (2002), num estudo caso-controle, em diferentes países, não apontaram associação entre o hábito de fumar e a infecção pelo HPV. Wikstrom *et al.* (2000), ao realizar estudo caso-controle com 147 homens HPV/DNA positivo, referiram um percentual de 28% (NS). Rotola *et al.* (1994), 51,3%; Hippeläinen *et al.* (1993), 60,9% (NS); e Hippeläinen *et al.* (1991) encontraram percentual de 60,4% para tabagistas.

Villa (1997) descreveu a ação carcinogênica do fumo, direta ou indireta, na gênese do câncer do colo uterino.

O presente estudo não encontrou associação estatística entre a infecção pelo HPV em homens e o hábito de fumar, diferentemente do que é observado nas mulheres. Essa observação corrobora a afirmação de que o tabaco, a imunidade local e a estrutura epitelial

diferente na genitália feminina favorecem a infecção pelo HPV e a gênese de lesões precursoras e invasoras do colo uterino.

Tabela 9. Dados epidemiológicos - III.

Variáveis	Categoria	HPV/DNA positivo n=42		HPV/DNA negativo n=38		Valor de p*
		n	%	n	%	
História de postectomia	Sim	5	11,9	4	10,5	NS**
	Não	37	88,1	34	89,5	
Relações sexuais com prostitutas	Sim	20	47,6	23	60,5	NS
	Não	22	52,4	15	39,5	
Uso de condom nas relações sexuais com prostitutas	Sim	18	85,7	11	47,8	0,008
	Não	3	14,3	12	52,2	
Frequência do uso de condom nas relações sexuais com prostitutas	Nunca	3	14,3	8	40,0	NS
	Eventual	7	33,3	5	25,0	
	Frequente	2	9,5	-	-	
	Sempre	9	42,9	7	35,0	
Frequência do uso condom nas relações com a companheira sexual	Nunca	28	66,7	22	57,9	NS
	Eventual	10	23,8	12	31,6	
	Frequente	2	4,8	2	5,3	
	Sempre	2	4,8	2	5,3	

* Teste de Pearson. Considerou-se estatisticamente significativa $p < 0,05$ entre HPV/DNA positivo e HPV/DNA negativo. ** NS = associação estatisticamente não significante.

A postectomia esteve presente em percentuais semelhantes no grupo HPV/DNA positivo (11,9%) e negativo (10,5%), conforme mostra a Tabela 9. Castellsagué *et al.* (2002) estudando homens com (n=292) e sem postectomia (n=847), em diferentes países, encontraram percentuais de infecção pelo HPV de 5,5% e 19,6%, respectivamente, e referiram associação entre a circuncisão e risco reduzido de infecção genital pelo HPV, além de risco reduzido de câncer cervical em mulheres de parceiros sexuais de alto risco para HPV. Assim, concluíram que a circuncisão pode ser considerada um importante co-fator na história natural da infecção pelo HPV, pela influência na aquisição e transmissão

do HPV como doença sexualmente transmissível e gênese do câncer cervical. No mesmo trabalho, estudando a população masculina brasileira, o autor referiu índice de 6,1% de circuncisão.

A Tabela 9 demonstrou que a análise do contato sexual prévio com prostitutas surpreendentemente não esteve associado à infecção pelo HPV. O grupo HPV/DNA positivo mostrou menor percentual de relações sexuais com mulheres trabalhadoras do sexo (47,6%) e em contrapartida os homens HPV/DNA negativo apresentaram maior número de contatos (60,6%). Franceschi *et al.* (2002) referiram percentual de homens com contato sexual com prostitutas de 57,6% (NS), enquanto que Castellsagué *et al.*, em 2002, referiram taxa de 20,4% e Castellsagué *et al.*,(1997), na Espanha, 41,6%, e na Colômbia, 61,4%. A não-associação entre contato prévio com prostitutas e infecção pelo HPV pode ser explicado pelo pequeno tamanho amostral e pela origem dos encaminhamentos dos pacientes estudados.

Observou-se, durante a entrevista epidemiológica, mesmo que esta não tenha contemplado tal fato, que na grande maioria dos 80 homens estudados teve contato prévio com mulheres que exercem a prostituição de forma eventual e no passado. Sabe-se que as mulheres que exercem a prostituição, por apresentarem um maior número de parceiros sexuais, apresentam um maior risco de aquisição e disseminação de doenças sexualmente transmissíveis. Tais aspectos indicam a necessidade de um levantamento epidemiológico mais bem elaborado e aprofundado para a variável em questão, buscando outros aspectos do comportamento sexual.

Conforme Tabela 9, cerca de 85,7% do grupo HPV/DNA positivo utilizaram condom (eventual, freqüente e sempre) durante as relações sexuais com prostitutas. Franceschi *et al.* (2002), em estudo semelhante realizado no Brasil, observaram taxa de 86%. Os mesmos autores referiram que 37% dos homens estudados, em diferentes países, usaram regularmente condom durante as relações sexuais com prostitutas.

Na Tabela 9 observou-se que o percentual de indivíduos HPV/DNA positivo que sempre usaram condom durante a relação sexual com prostitutas foi de 42,9%, os que usaram o método de barreira de forma eventual foi de 33,3%, enquanto que o usaram freqüentemente foi de 9,5%. Franceschi *et al.* (2002) estudando homens com HPV, relataram que 20,6% sempre usaram condom durante atividade sexual com prostitutas, ocasionalmente, 16% e nunca, 16,3%. Castellsagué *et al.* (2002), estudando homens circuncidados e infectados pelo HPV, encontraram “nunca ou ocasionalmente” em 17,1%, “usualmente ou sempre”, em 27%.

O estudo demonstrou que o grupo HPV/DNA positivo usou de forma mais adequada o condom nas relações sexuais com prostitutas. Embora o estudo não tenha confirmado o importante papel de proteção do condom, esse fato, indica a possibilidade de existência de outros fatores de risco (epidemiológicos e comportamentais) na população infectada pelo HPV. São necessários novos estudos epidemiológicos para a variável em questão no sentido de se entender melhor os resultados obtidos.

Quando se estudou o uso de condom com a atual companheira, verificou-se que 66,7% do grupo HPV/DNA positivo nunca empregaram tal método. No grupo HPV/DNA negativo, o percentual dos que nunca usaram condom foi de 57,9%. Hippeläinen *et al.* (1993) apontaram a importância do condom como fator de proteção na infecção pelo HPV.

No grupo de pacientes HPV/DNA positivo todos eram heterossexuais e apenas um apresentava história de imunossupressão adquirida, conforme se constata na Tabela 10. No grupo HPV/DNA negativo, um paciente referiu ser homossexual. Dados da literatura demonstraram que pacientes portadores de imunidade celular deprimida apresentam um risco maior de infecção pelo HPV, desde infecção e lesões pré-invasivas até invasivas da região anogenital (Scott *et al.*, 2001; Dillner *et al.*, 2000b). Imagina-se que, devido ao tamanho amostral, os resultados obtidos tenham ficado prejudicados.

Tabela 10. Dados epidemiológicos - IV.

Variáveis	Categoria	HPV/DNA positivo n=42		HPV/DNA negativo n=38		Valor de p*
		n	%	n	%	
Homossexualismo	Sim	-	-	1	2,6	NS**
	Não	42	100,0	37	97,4	
Frequência do uso do condom nas relações homossexuais	Sempre	-	-	1	100,0	NS
História prévia de Doenças sexualmente transmissíveis **	Não	30	71,4	20	52,6	NS
	Condiloma	4	9,5	6	15,8	
	Sífilis	-	-	1	2,6	
	Gonorréia	7	16,7	10	26,3	
	Hepatite	-	-	1	2,6	
	HIV	1	2,4	-	-	
	Herpes genital	-	-	3	7,9	
	Chato	1	2,4	-	-	
	Cancro mole	1	2,4	-	-	
Clamídia	-	-	1	2,6		
Imunodepressão	Sim	1	2,4	-	-	NS
	Não	41	97,6	38	100	
Indicação da peniscopia***	Prurido peniano	1	2,4	3	7,9	0,002
	Condiloma no pênis	26	61,9	6	15,8	
	Parceira infectada pelo HPV	20	47,6	33	86,8	
	Controle após tratamento para HPV	-	-	2	5,3	
	Condiloma anal	1	2,4	1	2,6	

* Teste de Pearson. Considerou-se estatisticamente significante $p < 0,05$ entre HPV/DNA positivo e HPV/DNA negativo. ** NS = associação estatisticamente não significante. *** Pode haver mais do que uma resposta para o mesmo indivíduo.

A história prévia de doenças sexualmente transmissíveis foi menor no grupo HPV/DNA positivo, observando-se percentual de 28,6% (NS), conforme mostra a Tabela 10. Wikstrom *et al.* (2000), no estudo desenvolvido no Hospital Universitário de Malmö, Suécia, referiram taxa de doença sexualmente transmissível prévia de 23% (NS), enquanto que Hippeläinen *et al.* (1991), referiram percentual de 15,8%.

As doenças sexualmente transmissíveis mais referidas, em ordem decrescente de citação por ambos os grupos, foram a gonorréia, o condiloma acuminado e o herpes genital. Hippeläinen *et al.* (1991) encontram em seu estudo infecções pela Clamídia e gonorréia.

Os resultados desse estudo não demonstraram uma associação estatística significativa entre história prévia de doença sexualmente transmissível e infecção pelo HPV.

Avaliaram-se as indicações da peniscopia (Tabela 10) no grupo HPV/DNA negativo e observou-se que a indicação de parceira infectada pelo HPV esteve presente em 86,8%, de controle após o tratamento para HPV em 5,3%, de condiloma peniano em 15,8% e de condiloma anal, em 2,6%. No grupo HPV/DNA positivo evidenciaram-se as seguintes indicações: condiloma peniano (61,9%), parceira com infecção pelo HPV (47,6%), e prurido peniano e condiloma anal (2,4%).

Na Tabela 11, observou-se altos percentuais de mulheres infectadas pelo HPV no grupo de homens HPV/DNA negativo (86,8%) e no grupo de homens portadores de lesões subclínicas (83,3%). O estudo do grupo de pacientes portadores de infecção clínica pelo

HPV demonstrou o menor percentual (34,5%) de companheira infectada pelo HPV. O diagnóstico de HPV na companheira foi sugerido pela citologia, colposcopia e histologia.

Tabela 11. Correlação entre HPV/DNA no homem e companheira sexual com HPV.

Companheira infectada pelo HPV* n=54	HPV/DNA negativo		HPV/DNA positivo n=42							
	n=38		Infecção clínica n=29		Infecção subclínica n=12		Infecção latente n=1		Total n=42	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Presente	33	86,8	10	34,5	10	83,3	1	100	21	50,0
Ausente	5	13,2	19	65,5	2	16,7	-	-	21	50,0

*Diagnóstico de infecção pelo HPV pelos métodos citologia e/ou histologia.

Várias são as possibilidades de explicação da relação entre companheira infectada pelo HPV (54/80 casos; 64,5%) e parceiro sexual HPV/DNA negativo (86,8%) ou portador de infecção na forma subclínica (83,3%). A prevalência da infecção pelo HPV pode apresentar ampla variação, intimamente dependente da metodologia diagnóstica empregada. Tem-se aceito, também, como explicação plausível, a baixa concordância de prevalência da infecção pelo vírus observada entre os pares sexuais, por diferentes variações da atividade biológica em homens e mulheres, ou seja, os homens apresentam maiores taxas de regressão espontânea da doença, enquanto as mulheres, maiores taxas de infecções persistentes. Assim, o comportamento das infecções pelo HPV parecem ser diferentes por motivos diversos; sobressaem a imunidade local e as diferenças na organização do epitélio genital em ambos os sexos. Merece pesquisa mais aprofundada o

conhecimento do comportamento biológico e epidemiológico da infecção pelo HPV em homens.

4.7 Tipagem viral

O perfil da digestão enzimática (enzimas de restrição) dos produtos de DNA viral amplificados, foi visualizado em gel de poliacrilamida (Figura 5) e comparado aos padrões de bandas descritos por Bernard *et al.* (1994) - Anexos 3 e 4.

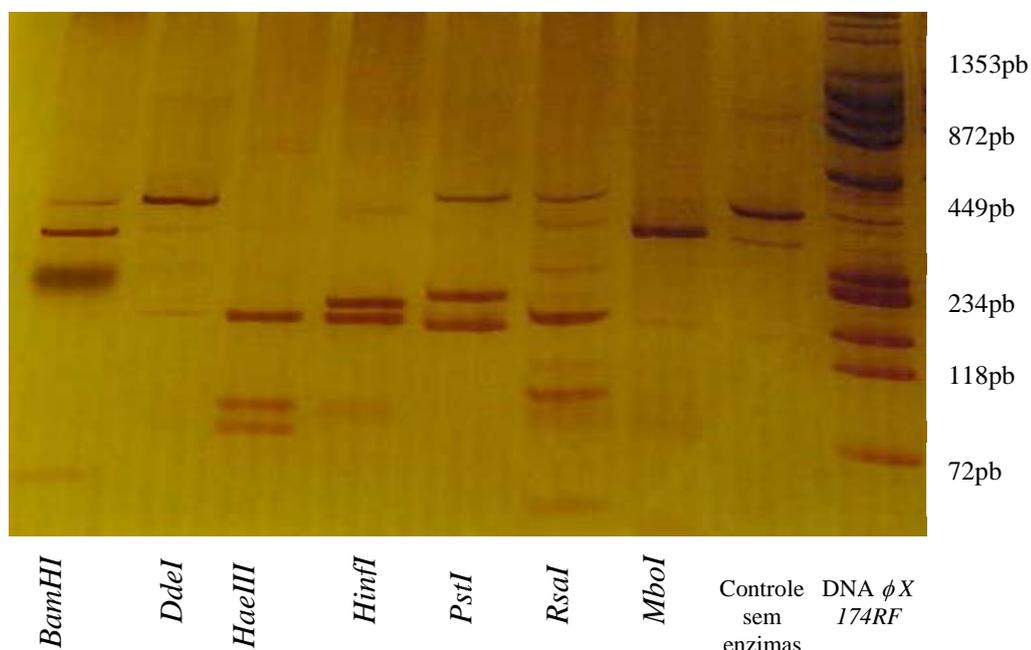


Figura 5. Perfil de digestão de HPV11 em gel de poliacrilamida. Fragmento de 449 pares de bases amplificadas com MY9 e MY11 e digerido com enzimas de restrição. Controle sem enzimas = solução com DNA e sem enzimas de restrição. DNA $\phi X 174RF$ = marcador de peso molecular.

Os percentuais dos tipos de HPV identificados neste estudo foram: HPV 6 – 54,8%, HPV 11 – 40,5%, HPV 61 – 2,4%, HPV 33 – 2,4%, HPV 84 – 2,4%, sendo que um paciente apresentou infecção dupla.

No estudo, o grupo HPV/DNA positivo, composto de parceiros sexuais de mulheres atendidas no Ambulatório de Patologia do Trato Genital Feminino da Universidade de Caxias do Sul e portadoras de lesões de alto e baixo grau do colo uterino, apresentou prevalência dos tipos virais 6 e 11. Paesi *et al.* (2003), na Universidade de Caxias do Sul, em um estudo prospectivo, entre agosto de 2000 a dezembro de 2000, em mulheres portadoras de lesões de baixo ou alto grau do colo uterino, observaram a prevalência dos tipos virais 16 e 18.

Franceschi *et al.* (2002), em estudo caso-controle, de parceiros sexuais de mulheres portadoras de carcinomas *in situ* e carcinomas invasores do colo uterino, encontraram a prevalência dos HPV tipo 16, 18, 31 e 33, de alto risco oncogênico.

Castellsagué *et al.* (1997), estudando casais infectados pelo HPV, encontraram pouca concordância compartilhada nos tipos de HPV identificados (31,8%), resultado possivelmente relacionado à diferença de metodologia diagnóstica empregada para cada grupo.

Tabrizi *et al.* (1992), estudando amostras histológicas benignas de infecção pelo HPV, em parceiros sexuais de mulheres com citopatológico do colo uterino sugestivo de infecção pelo HPV ou de lesões precursoras do câncer do colo uterino, encontraram percentual de 73% para os tipos virais 6 e 11.

Os resultados observados neste estudo, juntamente aos resultados da literatura pesquisada, mostraram uma baixa concordância de prevalência da infecção pelo HPV entre homens de alto risco para infecção pelo viral e mulheres portadoras de lesões de alto e baixo grau do colo uterino, a qual poderia ser explicada por diferentes variações da atividade biológica, pela imunidade local e pela diferenças na organização do epitélio genital em ambos os sexos. Na mesma população masculina e feminina mencionada acima,

observou-se uma baixa concordância entre a prevalência dos tipos virais, resultado que poderia sugerir a possibilidade de transmissão viral múltipla e presença de fatores que predispõem a infecção genital por um ou mais vírus, em ambos os sexos. Esses fatos indicam a necessidade de estudo prospectivo em amostras de epitélios genitais de pares sexuais, empregando-se a mesma metodologia diagnóstica para HPV, visando buscar melhor conhecimento sobre o comportamento biológico da infecção viral.

Os resultados deste estudo corroboram os dados já obtidos na literatura, no que se refere à epidemiologia e à tipagem viral, com exceção das seguintes variáveis: número de parceiras sexuais no último ano e renda familiar.

Este estudo demonstrou, com originalidade, a associação entre o número de parceiras sexuais no último ano ≥ 2 e infecção pelo HPV, fortalecendo o conceito de que, quanto maior número de parceiras sexuais, maiores são as chances de aquisição e transmissão da infecção em questão.

O emprego da escova e PCR para diagnóstico do HPV em pênis foi o método diagnóstico que apresentou melhor desempenho, resultado que aponta para uma mudança da terapêutica médica vigente no que se refere à metodologia diagnóstica empregada para a infecção do HPV.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram concluir que:

1. Os seguintes métodos diagnósticos apresentaram resultados considerados satisfatórios para a identificação da infecção clínica do HPV: coleta de material com escova e PCR, histologia e peniscopia + histologia.

2. A coleta de material com escova e PCR foi o método diagnóstico que apresentou a melhor medida de desempenho, considerado bom, para diagnóstico da infecção subclínica.

3. A média de idade do grupo HPV/DNA positivo foi de $28,1 \pm 9,6$ anos, com clara prevalência dessa infecção em idade abaixo de 29 anos.

4. Houve associação estatística entre as seguintes variáveis e infecção pelo HPV: estado marital solteiro, idade da primeira relação sexual ≤ 16 anos e número de parceiras sexuais no último ano ≥ 2 .

5. Os tipos virais mais frequentes de HPV no pênis foram os tipos 6 e 11, de baixo risco oncogênico.

6. PERSPECTIVAS

- Necessidade de estudos que visem à melhoria da eficiência do método de coleta de amostra e melhoria da técnica de extração do material genético humano e viral.

- Necessidade de estudo, prospectivo, em pares sexuais de risco para HPV (mulheres com lesão de baixo ou alto grau do colo uterino e seus respectivos parceiros sexuais), submetidos à mesma metodologia molecular para diagnóstico da infecção pelo HPV.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bergman, A., and Nalick, R. (1992) Prevalence of human papillomavirus infection in men. Comparison of the partners of infected and uninfected women. *J Reprod Med* **37**: 710-712.
- Bernard, H., Chan, S., Manos, M., Ong, C., Villa, L., Delius, H., Peyton, C., Bauer, H., and Wheeler, C. (1994a) Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis* **170**: 1077-1085.
- Bleeker, M.C., Hogewoning, C.J., Van Den Brule, A.J., Voorhorst, F.J., Van Andel, R.E., Risse, E.K., Starink, T.M., and Meijer, C.J. (2002) Penile lesions and human papillomavirus in male sexual partners of women with cervical intraepithelial neoplasia. *J Am Acad Dermatol* **47**: 351-357.
- Boon, M., and Kok, L. (1985) Koilocytotic lesions of the cervix: the interrelation of morphometric features, the presence of papilloma-virus antigens, and the degree of koilocytosis. *Histopathology* **9**: 751-763.
- Bosch, F., Manos, M., Munoz, N., Sherman, M., Jansen, A., Peto, J., Schiffman, M., Moreno, V., Kurman, R., and Shah, K. (1995) Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *JNCI Cancer Spectrum* **87**: 796-802.
- Bouda, M., Gorgoulis, V.G., Kastrinakis, N.G., Giannoudis, A., Tsoli, E., Danassi-Afentaki, D., Foukas, P., Kyrouti, A., Laskaris, G., Herrington, C.S., and Kittas, C. (2000) "High Risk" HPV Types Are Frequently Detected in Potentially Malignant and Malignant Oral Lesions, But Not in Normal Oral Mucosa. *Mod Pathol* **13**: 644-653.
- Bousarghin, L., Combata-Rojas, A.-L., Touze, A., El Mehdaoui, S., Sizaret, P.-Y., Bravo, M.-M., and Coursaget, P. (2002) Detection of Neutralizing Antibodies against Human Papillomaviruses (HPV) by Inhibition of Gene Transfer Mediated by HPV Pseudovirions. *J Clin Microbiol* **40**: 926-932.
- Brown, T., Yen-Moore, A., and Tying, S. (1999) An overview of sexually transmitted diseases. Part II. *J Am Acad Dermatol* **41**: 661-677; quiz 678-680.
- Buechner, S.A. (2002) Common skin disorders of the penis. *BJU Int* **90**: 498-506.
- Cason, J., Kaye, J., Jewers, R., Kambo, P., Bible, J., Kell, B., Shergill, B., Pakarian, F., Raju, K., and Best, J. (1995) Perinatal infection and persistence of human papillomavirus types 16 and 18 in infants. *J Med Virol* **47**: 209-218.
- Castellsagué, X., Ghaffari, A., Daniel, R.W., Bosch, F.X., Munoz, N., and Shah, K.V. (1997) Prevalence of penile human papillomavirus DNA in husbands of women with and without cervical neoplasia: a study in Spain and Colombia. *J Infect Dis* **176**: 353-361.
- Castellsagué, X., Bosch, F.X., Munoz, N., Meijer, C.J., Shah, K.V., de Sanjose, S., Eluf-Neto, J., Ngelangel, C.A., Chichareon, S., Smith, J.S., Herrero, R., Moreno, V., and Franceschi, S. (2002) Male circumcision, penile human papillomavirus infection, and cervical cancer in female partners. *N Engl J Med* **346**: 1105-1112.
- Castro, C.R.C., de Gouvêa, T.V.D., and Passos, M.R.L. (1994) Infecção pelo Papilomavirus Humano (HPV) em Homens de uma Unidade Militar. *J Bras Doenç Sex Transm* **6**: 46 - 53.

- Cox, J.T., Lorincz, A.T., Schiffman, M.H., Sherman, M.E., Cullen, A., and Kurman, R.J. (1995) Human papillomavirus testing by hybrid capture appears to be useful in triaging women with a cytologic diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance. *Am J Obstet Gynecol* **172**: 946-954.
- Crusius, K., Auvinen, E., and Alonso, A. (1997) Enhancement of EGF- and PMA-mediated MAP kinase activation in cells expressing the human papillomavirus type 16 E5 protein. *Oncogene* **15**: 1437-1444.
- Desaintes, C., Demeret, C., Goyat, S., Yaniv, M., and Thierry, F. (1997) Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis. *EMBO J.* **16**: 504-514.
- Dillner, J., Meijer, C., von Krogh, G., and Horenblas, S. (2000a) Epidemiology of human papillomavirus infection. *Scand J Urol Nephrol Suppl*: 194-200.
- Dillner, J., von Krogh, G., Horenblas, S., and Meijer, C.J. (2000b) Etiology of squamous cell carcinoma of the penis. *Scand J Urol Nephrol Suppl*: 189-193.
- Doorbar, J., Campbell, D., Grand, R.J., and Gallimore, P.H. (1986) Identification of the human papilloma virus-1a E4 gene products. *Embo J* **5**: 355-362.
- Doorbar, J., Ely, S., Sterling, J., McLean, C., and Crawford, L. (1991) Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* **352**: 824-827.
- Durst, M., Kleinheinz, A., Hotz, M., and Gissman, L. (1985) The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours. *J Gen Virol* **66**: 1515-1522.
- Dyson, N., Howley, P., Munger, K., and Harlow, E. (1989) The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*, **243**: 934-937.
- Ferenczy, A., Mitao, M., Nagai, N., Silverstein, S., and Crum, C. (1985) Latent papillomavirus and recurring genital warts. *N Engl J Med* **313**: 784-788.
- Franceschi, S., Castellsague, X., Dal Maso, L., Smith, J.S., Plummer, M., Ngelangel, C., Chichareon, S., Eluf-Neto, J., Shah, K.V., Snijders, P.J., Meijer, C.J., Bosch, F.X., and Munoz, N. (2002) Prevalence and determinants of human papillomavirus genital infection in men. *Br J Cancer* **86**: 705-711.
- Franco, E., Villa, L., Sobrinho, J., Prado, J., Rousseau, M., Desy, M., and Rohan, T. (1999) Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis* **180**: 1415-1423.
- Hills, E., and Laverty, C. (1979) Electron microscopic detection of papilloma virus particles in selected koilocytotic cells in a routine cervical smear. *Acta Cytol* **23**: 53-56.
- Hippelainen, M., Yliskoski, M., Saarikoski, S., Syrjanen, S., and Syrjanen, K. (1991) Genital human papillomavirus lesions of the male sexual partners: the diagnostic accuracy of peniscopy. *Genitourin Med* **67**: 291-296.
- Hippelainen, M., Syrjanen, S., Koskela, H., Pulkkinen, J., Saarikoski, S., and Syrjanen, K. (1993) Prevalence and risk factors of genital human papillomavirus (HPV) infections in healthy males: a study on Finish conscripts. *Sex Transm Dis* **20**: 321-328.
- Hippelainen, M.I., Yliskoski, M., Syrjanen, S., Saastamoinen, J., Hippelainen, M., Saarikoski, S., and Syrjanen, K. (1994) Low concordance of genital human

- papillomavirus (HPV) lesions and viral types in HPV-infected women and their male sexual partners. *Sex Transm Dis* **21**: 76-82.
- Ho, G., Bierman, R., Beardsley, L., Chang, C., and Burk, R. (1998) Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* **338**: 423 - 428.
- Howley, P.M., and Lowy, D.R. (2001) *Papillomaviruses and their replication*. In: *KNIFE, D.M., HOWLEY, P.M. (2001) Fields Virology*. New York: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 4 ed. p. 2197-2229.
- Jaeschke, R., Guyatt, G., and Sackett, D.L. (1994) Users' guides to the medical literature. III. How to use an article about a diagnostic test. A. Are the results of the study valid? Evidence-Based Medicine Working Group. *Jama* **271**: 389-391.
- Jenson, A., Kurman, R., and Lancaster, W. (1987) Tissue effects of and host response to human papillomavirus infection. *Obstet Gynecol Clin North Am* **14**: 397-406.
- Kaye, J., Cason, J., Pakarian, F., Jewers, R., Kell, B., Bible, J., Raju, K., and Best, J. (1994) Viral load as a determinant for transmission of human papillomavirus type 16 from mother to child. *J Med Virol* **44**: 415-421.
- Kaye, J., Starkey, W., Kell, B., Biswas, C., Raju, K., Best, J., and Cason, J. (1996) Human papillomavirus type 16 in infants: use of DNA sequence analyses to determine the source of infection. *J Gen Virol* **77**: 1139-1143.
- Kennedy, I.M., Haddow, J.K., and Clements, J.B. (1991) A negative regulatory element in the human papillomavirus type 16 genome acts at the level of late mRNA stability. *J Virol* **65**: 2093-2097.
- Kleter, B., van Doorn, L.-J., Schrauwen, L., Molijn, A., Sastrowijoto, S., ter Schegget, J., Lindeman, J., ter Harmsel, B., Burger, M., and Quint, W. (1999) Development and Clinical Evaluation of a Highly Sensitive PCR-Reverse Hybridization Line Probe Assay for Detection and Identification of Anogenital Human Papillomavirus. *J Clin Microbiol* **37**: 2508-2517.
- Kligerman, J. (2002) Ministério da Saúde - Instituto Nacional de Câncer. Estimativas sobre a Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil - 2002. *Rev Bras de Cancerologia* **48**: 175-179.
- Komly, C.A., Breitburd, F., Croissant, O., and Streeck, R.E. (1986) The L2 open reading frame of human papillomavirus type 1a encodes a minor structural protein carrying type-specific antigens. *J Virol* **60**: 813-816.
- Koss, L. (1990) Cytologic and histologic manifestations of human papillomavirus infection of the uterine cervix. *Cancer Detect Prev* **14**: 461-464.
- Kotoulas, I.G., Cardamakis, E., Relakis, K., Diamantis, A., Papathanasiou, Z., Korantzis, A., and Mantouvalos, C. (1996) Peoscopic diagnosis of flat condyloma and penile intraepithelial neoplasia. IV. Urethral reservoir. *Gynecol Obstet Invest* **41**: 55-60.
- Lauro, C., Ammaturo, F.P., Quirino, L., Rotondi, M., Soriano, A., and Panariello, S. (2000) [Evaluation of partners of women with HPV infection]. *Minerva Ginecol* **52**: 503-507.
- Law, C., Qassim, M., Thompson, C., Rose, B., Grace, J., Morris, B., and Cossart, Y. (1991) Factors associated with clinical and sub-clinical anal human papillomavirus infection in homosexual men. *Genitourin Med* **67**: 92-98.
- Li, C.C., Shah, K.V., Seth, A., and Gilden, R.V. (1987) Identification of the human papillomavirus type 6b L1 open reading frame protein in condylomas and corresponding antibodies in human sera. *J Virol* **61**: 2684-2690.

- Lopes, A., Bezerra, A.L., Pinto, C.A., Serrano, S.V., de Mell, O.C., and Villa, L.L. (2002) p53 as a new prognostic factor for lymph node metastasis in penile carcinoma: analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy. *J Urol* **168**: 81-86.
- Lorincz, A.T., Reid, R., Jenson, A.B., Greenberg, M.D., Lancaster, W., and Kurman, R.J. (1992) Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* **79**: 328-337.
- Lowy, D., Kirnbauer, R., and Schiller, J. (1994) Genital Human Papillomavirus Infection. *PNAS* **91**: 2436-2440.
- Lusky, M., and Botchan, M.R. (1984) Characterization of the bovine papilloma virus plasmid maintenance sequences. *Cell* **36**: 391-401.
- Lusky, M., and Botchan, M.R. (1985) Genetic analysis of bovine papillomavirus type 1 trans-acting replication factors. *J Virol* **53**: 955-965.
- Magnusson, P., Lichtenstein, P., and Gyllenstein, U. (2000) Heritability of cervical tumours. *Int J Cancer* **88**: 698-701.
- Mandal, D., Haye, K., Ray, T., Goorney, B., Stanbridge, C., and Corbitt, G. (1991) Prevalence of occult human papillomavirus infection, determined by cytology and DNA hybridization, in heterosexual men attending a genitourinary medicine clinic. *Int J STD AIDS* **2**: 351-355.
- Manos, M.M., Ting, Y., Wright, D.K., Lewis, A.J., Broker, T.R., and Wolinsky, S.M. (1989) The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* **7**: 209-214.
- Maymon, R., Shulman, A., Maymon, B., Bekerman, A., Werchow, M., Faktor, J.H., and Altaras, M. (1994) Penile condylomata: a gynecological epidemic disease: a review of the current approach and management aspects. *Obstet Gynecol Surv* **49**: 790-800.
- Meijer, C.J.L.M., Snijders, P.J.F., and Brule, A. (2000) Screening for cervical cancer: Should we test for infection with high-risk HPV? *CMAJ* **163**: 535-538.
- Meisels, A., and Fortin, R. (1976) Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic patterns. *Acta Cytol* **20**: 505-509.
- Menzo, S., Monachetti, A., Trozzi, C., Ciavattini, A., Carloni, G., Varaldo, P.E., and Clementi, M. (2001) Identification of Six Putative Novel Human Papillomaviruses (HPV) and Characterization of Candidate HPV Type 87. *J Virol* **75**: 11913-11919.
- Mertz, G., Benedetti, J., Ashley, R., Selke, S., and Corey, L. (1992) Risk factors for the sexual transmission of genital herpes. *Ann Intern Med* **116**: 197-202.
- Moscicki, A. (1996) Genital HPV infections in children and adolescents. *Obstet Gynecol Clin North Am* **23**: 675-697.
- Moscicki, A.-B., Ellenberg, J.H., Vermund, S.H., Holland, C.A., Darragh, T., Crowley-Nowick, P.A., Levin, L., and Wilson, C.M. (2000) Prevalence of and Risks for Cervical Human Papillomavirus Infection and Squamous Intraepithelial Lesions in Adolescent Girls: Impact of Infection With Human Immunodeficiency Virus. *Arch Pediatr Adolesc Med* **154**: 127-134.
- Munger, K., Phelps, W.C., Bubb, V., Howley, P.M., and Schlegel, R. (1989) The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol* **63**: 4417-4421.
- Munoz, N., Bosch, F.X., de Sanjose, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K.V., Snijders, P.J.F., Meijer, C.J.L.M., and the International Agency for Research on

- Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group (2003) Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *N Engl J Med* **348**: 518-527.
- Nicolau, S.M., Martins, N.V., Ferraz, P.E., Stavale, J.N., Goncalves, W.J., Baracat, E.C., and de Lima, G.R. (1997) Importance of peniscopy, oncologic cytology and histopathology in the diagnosis of penile infection by human papillomavirus. *Rev Paul Med* **115**: 1330-1335.
- Paesi, S.O., Serafini, E.P., and Madi, S.R.C. (2003) Determinação e Tipagem do *Papilomavírus humano* (HPV) em Amostras de População Feminina Atendida no Ambulatório de Patologia Cervical do Ambulatório Central da Universidade de Caxias do Sul. *Rev Cienc Med* **2**: 16-22.
- Pakarian, F., Kaye, J., Cason, J., Kell, B., Jewers, R., Derias, N., Raju, K., and Best, J. (1994) Cancer associated human papillomaviruses: perinatal transmission and persistence. *Br J Obstet Gynaecol* **101**: 514-517.
- Reid, R., Stanhope, C., Herschman, B., Crum, C., and Agronow, S. (1984) Genital warts and cervical cancer. IV. A colposcopic index for differentiating subclinical papillomaviral infection from cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* **149**: 815-823.
- Richart, R., and Wright, T. (1991) Pathology of the cervix. *Curr Opin Obstet Gynecol* **3**: 561-567.
- Roberts, S., Ashmole, I., Rookes, S., and Gallimore, P. (1997) Mutational analysis of the human papillomavirus type 16 E1-E4 protein shows that the C terminus is dispensable for keratin cytoskeleton association but is involved in inducing disruption of the keratin filaments. *J Virol* **71**: 3554-3562.
- Rotola, A., Costa, S., Monini, P., Vendra, C., Guida, G., Terzano, P., Di Luca, D., Martinelli, G., and Cassai, E. (1994) Impact of sexual habits on the clinical evaluation of male HPV infection. *Eur J Epidemiol* **10**: 373-380.
- Saiki, R., Bugawan, T., Horn, G., Mullis, K., and Erlich, H. (1986) Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* **324**: 163-166.
- Scheffner, M., Werness, B., Huibregtse, J., Levine, A., and Howley, P. (1990) The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**: 1129-1136.
- Scheffner, M., Munger, K., Byrne, J.C., and Howley, P.M. (1991) The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 5523-5527.
- Scheffner, M., Romanczuk, H., Munger, K., Huibregtse, J.M., Mietz, J.A., and Howley, P.M. (1994) Functions of human papillomavirus proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* **186**: 83-99.
- Schiffman, M. (1992) Recent progress in defining the epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* **84**: 394 - 398.
- Schwarz, E., Freese, U., Gissmann, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stremlau, A., and zur Hausen, H. (1985) Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* **314**: 111-114.
- Scott, M., Nakagawa, M., and Moscicki, A.-B. (2001) Cell-Mediated Immune Response to Human Papillomavirus Infection. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**: 209-220.

- Sellors, J.W., Karwalajtys, T.L., Kaczorowski, J., Mahony, J.B., Lytwyn, A., Chong, S., Sparrow, J., and Lorincz, A. (2003) Incidence, clearance and predictors of human papillomavirus infection in women. *CMAJ* **168**: 421-425.
- Siegel, J.F., and Mellinger, B.C. (1992) Human papillomavirus in the male patient. *Urol Clin North Am* **19**: 83-91.
- Sousa, R., Dostatni, N., and Yaniv, M. (1990) Control of papillomavirus gene expression. *Biochim Biophys Acta* **1032**: 19-37.
- Strand, A., Rylander, E., Evander, M., and Wadell, G. (1993) Genital human papillomavirus infection among patients attending an STD clinic. *Sex Transm Infect* **69**: 446-449.
- Strand, A., Rylander, E., Wilander, E., Zehbe, I., and Kraaz, W. (1996) Histopathologic examination of penile epithelial lesions is of limited diagnostic value in human papillomavirus infection. *Sex Transm Dis* **23**: 293-298.
- Stubenrauch, F., Hummel, M., Iftner, T., and Laimins, L.A. (2000) The E8^{E2C} Protein, a Negative Regulator of Viral Transcription and Replication, Is Required for Extrachromosomal Maintenance of Human Papillomavirus Type 31 in Keratinocytes. *J Virol* **74**: 1178-1186.
- Swan, D.C., Tucker, R.A., Tortolero-Luna, G., Mitchell, M.F., Wideroff, L., Unger, E.R., Nisenbaum, R.A., Reeves, W.C., and Icenogle, J.P. (1999) Human Papillomavirus (HPV) DNA Copy Number Is Dependent on Grade of Cervical Disease and HPV Type. *J Clin Microbiol* **37**: 1030-1034.
- Syrjanen, K., and Pyrhonen, S. (1983) Demonstration of human papilloma virus (HPV) antigens in a case of urethral condyloma. *Scand J Urol Nephrol* **17**: 267-270.
- Syrjanen, S., and Syrjanen, K. (1986) An improved in situ DNA hybridization protocol for detection of human papillomavirus (HPV) DNA sequences in paraffin-embedded biopsies. *J Virol Methods* **14**: 293-304.
- Tabrizi, S.N., Tan, J., Quinn, M., Borg, A.J., and Garland, S.M. (1992) Detection of genital human papillomavirus (HPV) DNA by PCR and other conventional hybridisation techniques in male partners of women with abnormal Papanicolaou smears. *Genitourin Med* **68**: 370-373.
- Teixeira, J., Santos, C., Derchain, S., and Zeferino, L. (1999) Lesões Induzidas por Papilomavírus Humano em Parceiros de Mulheres com Neoplasia Intra-Epitelial do Trato Genital Inferior. *Rev Bras Ginec Obstet* **21**: 431-437.
- Tseng, C., Liang, C., Soong, Y., and Pao, C. (1998) Perinatal transmission of human papillomavirus in infants: relationship between infection rate and mode of delivery. *Obstet Gynecol* **91**: 92-96.
- Van Ranst, M., Kaplan, J., and Burk, R. (1992) Phylogenetic classification of human papillomaviruses: correlation with clinical manifestations. *J Gen Virol* **73**: 2653-2660.
- Vernon, S.D., Unger, E.R., and Williams, D. (2000) Comparison of Human Papillomavirus Detection and Typing by Cycle Sequencing, Line Blotting, and Hybrid Capture. *J Clin Microbiol* **38**: 651-655.
- Villa, L.L. (1997) Human papillomaviruses and cervical cancer. *Adv Cancer Res* **71**: 321-341.
- Wells, S.I., Francis, D.A., Karpova, A.Y., Dowhanick, J.J., Benson, J.D., and Howley, P.M. (2000) Papillomavirus E2 induces senescence in HPV-positive cells via pRB- and p21^{CIP}-dependent pathways. *EMBO J.* **19**: 5762-5771.

- Werness, B.A., Levine, A.J., and Howley, P.M. (1990) Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* **248**: 76-79.
- WHO (1995) IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human papillomaviruses (HPV). *Summary of data reported and evaluation* **64**.
- Wikstrom, A., Hedblad, M., Johansson, B., Kalantari, M., Syrjanen, S., Lindberg, M., and von Krogh, G. (1992) The acetic acid test in evaluation of subclinical genital papillomavirus infection: a comparative study on penoscopy, histopathology, virology and scanning electron microscopy findings. *Genitourin Med* **68**: 90-99.
- Wikstrom, A., Popescu, C., and Forslund, O. (2000) Asymptomatic penile HPV infection: a prospective study. *Int J STD AIDS* **11**: 80-84.
- Woodruff, J., Braun, L., Cavalieri, R., Gupta, P., Pass, F., and Shah, K. (1980) Immunologic identification of papillomavirus antigen in condyloma tissues from the female genital tract. *Obstet Gynecol* **56**: 727-732.
- Woodworth, C.D., Waggoner, S., Barnes, W., Stoler, M.H., and DiPaolo, J.A. (1990) Human cervical and foreskin epithelial cells immortalized by human papillomavirus DNAs exhibit dysplastic differentiation in vivo. *Cancer Res* **50**: 3709-3715.

8. ANEXOS

Anexo 1.

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA COLETA DE MATERIAL DE LESÃO DE PÊNIS

Sr. _____, o Ambulatório de Urologia do Ambulatório Central da Fundação Universidade de Caxias do Sul, está realizando pesquisa em lesões penianas que podem estar sendo causadas pelo vírus chamado *Papilomavirus humano* ou HPV.

Para identificarmos o vírus é necessário que se faça a coleta com uma pequena escova de plástico diretamente da lesão, a qual posteriormente será analisada em laboratório. Esta coleta poderá causar dor de discreta intensidade.

Após a coleta com a escova, se fará retirada de um fragmento da lesão. Este procedimento é realizado com anestesia local e tem como objetivo comparar a lesão com os achados do material coletado com a escova. Este procedimento causará discreta dor já que é realizado sob anestesia local.

Esta pesquisa tem como objetivo diagnosticar as lesões penianas causadas pelo HPV, bem como, identificar qual dos tipos de HPV ocorrem com mais frequência em nossa região, para que melhor possamos orientar e tratar todos os acometidos por esta doença.

Gostaríamos de esclarecê-lo que o HPV pode estar presente nas genitálias masculinas e femininas, sendo considerado fator de risco para desenvolvimento de doenças que precedem o câncer do pênis, da vulva, da vagina e do colo uterino.

A sua participação nesta pesquisa é sigilosa, só os médicos envolvidos diretamente com a pesquisa é que saberão do resultado, sendo sua privacidade resguardada, não sendo relacionadas com sua pessoa. Caso a presença do HPV seja positiva, você será informado e a equipe médica utilizará tal dado para melhor acompanhamento do meu caso.

Este exame não lhe trará despesas e a qualquer momento poderá retirar tal consentimento para participar da pesquisa; porém, seu acompanhamento será continuado pelos médicos, sem nenhum constrangimento.

O seu contato para qualquer dúvida será o Dr. Renato Luís Rombaldi, que poderá ser encontrado pela parte da manhã, no Ambulatório de Medicina Materno-fetal do Serviço de Obstetrícia do Hospital Geral de Caxias do Sul.

Estou satisfatoriamente esclarecido e autorizo as coletas de material da lesão do meu pênis, com a finalidade de pesquisar a presença do vírus HPV.

Assinatura

Caxias do Sul, _____ de _____ de 2003.

Anexo 2.

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL

FICHA EPIDEMIOLÓGICA

Data: _____ / _____ / _____
Nome: _____ N° _____
Idade: _____ Cor: _____ Estado civil: _____
Nível de instrução: _____
Renda Familiar: _____ Profissão: _____
Fumo: _____ cigarros/dia
Início da atividade sexual: _____ anos
Fimose: Não Sim
N° de parceiras sexuais/vida: _____
N° de parceiras sexuais no último ano: _____
Sexo com prostitutas: Não Sim
N° de relações sexuais: _____
Uso de camisinha: Eventual Freqüente Sempre Nunca
Relações homossexuais: Não Sim Ativo Passivo
Uso de camisinha: Eventual Freqüente Sempre Nunca
Uso de camisinha com a companheira:
Frequência: Eventual Freqüente Sempre Nunca
N° em anos de convívio com a sua atual parceira: _____
DST: _____
Postectomia: _____ Idade em que foi realizada: _____
Imunossupressão: _____
Queixa do paciente (Sintomas): _____
Descrição dos achados clínicos: _____

Anexo 3.

Tipo do HPV	<i>BamHI</i>	<i>DdeI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>	<i>PstI</i>	<i>RsaI</i>	<i>Sau3AI</i>
HPV 6b	449	382 67	217 124 108	234 215	449	161 149 72 67	366 63 20
Uncut: 449 pb							
HPV 11	336 83	447 2	217 124 108	234 215	242 207	216 135 72 26	336 63 20
Uncut: 449 pb							
HPV 13	372 83	326 62 67	204 127 124	240 215	213 242	175 135 73 72	372 63 20
Uncut: 445 pb							
HPV 16	452	452	444 8	452	216 210 26	310 72 70	369 63 20
Uncut: 452 pb							
HPV 18	372 83	432 23	455	455	242 213	135 125 85 72 38	372 63 20
Uncut: 455 pb							
HPV 26	455	455	455	455	102 353	365 72 18	372 63 20
Uncut: 455 pb							
HPV 31	452	283 167 2	328 124	237 215	216 210 26	380 72	369 63 20
Uncut: 452 pb							
HPV 31b	452	285 90 77	328 124	237 215	216 210 26	380 72	369 63 20
Uncut: 452 pb							
HPV 32	366 83	320 21 108	317 124 8	234 215	449	216 161 72	366 63 20
Uncut: 449 pb							
HPV 33	449	320 77 52	449	234 215	242 207	236 102 72 39	267 162 20
Uncut: 449 pb							
HPV 34	458	211 151 88 8	334 124	458	253 179 26	186 161 96 15	438 20
Uncut: 458 pb							
HPV 35	452	294 135 23	261 180 8 3	452	426 26	171 161 72 42	369 63 20
Uncut: 452 pb							
HPV 39	455	324 131	455	355 100	330 125	260 123 72	249 123 63 20
Uncut: 455 pb							
HPV 40	240 132 83	297 158	447 8	455	455	365 90	240 132 63 20
Uncut: 455 pb							
HPV 42	366 83	341 108	449	234 215	449	242 135 72	366 63 20
Uncut: 449 pb							
HPV 44	455	297 112 46	223 124 108	455	455	222 161 72	405 30 20
Uncut: 455 pb							
HPV 45	372 83	324 131	447 8	445	242 213	338 72 45	372 63 20
Uncut: 455 pb							
HPV 51	237 215	362 90	379 73	452	452	380 72	237 132 63 20
Uncut: 452 pb							
HPV 52	449	357 92	258 183 8	449	423 26	449	366 63 20
Uncut: 449 pb							
HPV 53	449	206 158 85	232 217	368 81	449	449	342 87 20
Uncut: 449 pb							
HPV 54	369 83	452	217 127 108	234 218	452	138 125 117 72	369 63 20
Uncut: 452 pb							
HPV 55	455	112 111 101 85 46	215 124 108 8	215 207 33	455	165 161 72 57	405 30 20
Uncut: 455 pb							

Amplified Fragment Length Polymorphism (RFLP). Padrões para HPV de mucosa. Os padrões foram obtidos empregando os primers MY09/MY11 que amplificam uma seqüência de ~ 450 pb L1. Bernard *et al.* (1994).

Anexo 4.

Tipo do HPV	<i>Bam</i>HI	<i>Dde</i>I	<i>Hae</i>III	<i>Hin</i>fI	<i>Pst</i>I	<i>Rsa</i>I	<i>Sau</i>3AI
HPV 56	449	307 142	275 166 8	449	242 207	310 72 49 18	429 20
Uncut: 449 pb							
HPV 57	449	211 142 50 46	449	449	296 153	449	328 38 33 26 24
Uncut: 449 pb							
HPV 58	449	348 101	449	235 214	216 207 26	306 111 32	366 57 20 6
Uncut: 449 pb							
HPV 59	452	452	396 56	452	426 26	452	402 24 20 6
Uncut: 452 pb							
HPV 61	455	455	212 211 24 8	455	455	185 180 72 18	372 63 20
Uncut: 455 pb							
HPV 62	449	449	232 217	449	341 108	359 72 18	399 30 20
Uncut: 449 pb							
HPV 64	375 83	211 151 87 9	334 124	367 91	253 179 26	186 161 72 39	375 63 20
Uncut: 458 pb							
HPV 66 (PAP88)	366 83	291 158	449	449	207 150 66 26	449	366 63 20
Uncut: 449 pb							
HPV 67	449	307 92 50	266 183	234 215	423 26	310 72 67	366 63 20
Uncut: 449 pb							
HPV 68 (ME180)	372 83	455	455	215 140 100	455	260 85 72 38	249 123 63 20
Uncut: 455 pb							
HPV 69	372 83	455	223 183 49	455	455	365 72 18	372 33 30 20
Uncut: 455 pb							
MM4 (W138)	455	288	455	241	455	383	435
Uncut: 455 pb		167		214		72	20
MM7 (PAP291)	369	452	383	452	317	380	369
LVX82	83		69		135	72	63
Uncut: 452 pb							20
MM8 (PAP155)	452	220 142 90	346 106	214 106 95 37	452	310 142	369 63 20
Uncut: 452 pb							
MM9 (PAP238A)	458	243 215	458	458	432 26	201 161 96	408 30 20
Uncut: 458 pb							
LVX100	452	297 155	220 208	452	452	362 72 18	369 63 20
Uncut: 452 pb			24				
I539	455	243	455	241	455	383	435
Uncut: 455 pb		212		214		72	20
CP141	372	455	232				
LVX160	83		117 106	240 215	242 213	231 123 72 29	372 63 20
Uncut: 455 pb							
CP6108	369 83	246 152 54	325 127	452	452	380 72	369 33 24 20 6
Uncut: 452 pb							
CP8304	452	452	127 121 108 96	452	341 111	452	432 20
Uncut: 452 pb							
CP4173	455	300	220	455	455	365	372
LVX100*		155	211			72	63
Uncut: 455 pb			24			18	20
CP8061	452	320 132	217 127	346 106	360 92	380 72	381 51 20
Uncut: 452 pb			108				

*Incluiu umas três bases eliminadas comparadas ao CP4173; porém, a digestão global da *Amplified Fragment Length Polymorphism* (RFLP). Padrões para HPV de mucosa. Os padrões foram obtidos empregando os primers MY09/MY11 que amplificam uma seqüência de ~ 450 pb L1. Bernard *et al.* (1994).