FERNANDO AUGUSTO MIRANDA DA COSTA

Estudo da prevalência de papilomavirus humano (HPV) em urina de homens infectados pelo HIV-1 na cidade de São Paulo, Brasil

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências

**Área de Concentração: Dermatologia
Orientador: Prof. Dr. Jorge Simão do Rosário Casseb**

São Paulo

2008

FERNANDO AUGUSTO MIRANDA DA COSTA

Estudo da prevalência de papilomavirus humano (HPV) em urina de homens infectados pelo HIV-1 na cidade de São Paulo, Brasil

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Jorge Simão do Rosário Casseb

São Paulo

2008

Dedicatória

*Dedico este trabalho a uma grande
mulher que passou em minha vida
e hoje deixa saudades.
Te amo minha avó!*

Agradecimentos

Primeiramente, a Deus, por me proporcionar saúde e força. Só tenho a agradecer e nada mais a pedir por tudo o que Ele já me deu.

Aos meus pais, Fernando e Fátima. Sem eles nada disso seria possível de realizar. Graças ao apoio e ao amor que me deram, mesmo sendo difícil de lidar com a saudade e a distância. Obrigado meus pais... eu os amo demais e me desculpem por qualquer erro cometido.

Cynthia, Fabrício e Lívinha, obrigado por fazerem parte da minha vida. Sei que posso contar sempre com vocês. Vocês são luz e força para que eu continuasse a minha batalha em São Paulo. Obrigado por tudo o que são e representam para mim. Lívia, titio te ama!

À toda minha família, Tia Ivone, Tio Jorge, Tio Dilermando, Tio Paulo (in memorian), meu avô (in memorian), minha avó (in memorian) e meus primos e tias por todas as horas em que estive nos seus pensamentos e orações. Seu Getúlio, Dona Eunice, Cassandra e Danielle, por já serem também a minha família, por todo o carinho que me deram. Eternamente grato serei por cada gesto de amor por parte de cada um de vocês!

À minha companheira, confidente, amiga e eterna namorada, Vanessa. Por estar junto de mim em todos os momentos: alegres ou tristes; de stress ou calmos; por ser a mulher que é e que me ajudou a ser o homem que hoje eu sou. Obrigado por aguentar todas as barras comigo. Te amo para sempre!

Ao meu grande amigo e irmão, Jackson Lima, que aceitou o desafio de morar em São Paulo, consolidando uma grande amizade. Obrigado pela ajuda nesta caminhada.

Ao meu querido “chefe”, Jorge Casseb, pela orientação, pela amizade, pela confiança que depositou em mim durante esses mais de 3 anos de convívio. Só tenho a agradecer pela oportunidade que me destes.

Ao Professor Alberto Duarte, por abrir as portas do LIM-56 para um paraense se aventurar na arte da pesquisa. Obrigado!

Aos grandes amigos que fiz nestes 3 anos no LIM-56. Adriana, Rafael, Ingrid, Lígia, Anna, Viviane, Nelson, Mayce, Márcio, Liã, Daniela, Grazielle, Léia, Vanessa, Juliana, Luciano, Soraya, Patrícia, e os demais colegas de laboratório por fazerem a minha estadia no LIM-56 mais divertida.

Às meninas da secretaria, Olivete, Edna e Adriana. Sem elas, os nossos projetos e nossos orientadores iriam enlouquecer. Aos amigos também da secretaria, Luiz, Ângelo, André e Lúcio pelo apoio no andamento do laboratório.

Ao Doutor Roberto Carvalho pelos conselhos e auxílio para a coleta das amostras dos pacientes do Centro de Referência e Treinamento em DST/AIDS.

Ao Doutor José Eduardo Levi pela disponibilidade das amostras positivas para HPV, utilizadas como controle nos experimentos, que foi de grande importância na padronização de minhas técnicas de biologia molecular.

Aos pacientes do Centro de Referência e Treinamento em DST/AIDS e do Ambulatório de Serviço de Doenças sexualmente Transmissíveis do Departamento de Dermatologia do HC/FMUSP os quais foram indispensáveis para a realização deste trabalho.

À Fapesp pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa e a CAPES pela bolsa de mestrado.

Costa FAM. **Estudo da prevalência de HPV em urina de homens infectados pelo HIV-1 na cidade de São Paulo, Brasil** [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.

Introdução: O Papilomavirus Humano (HPV) é um vírus de DNA que inclui 118 genótipos, sendo o tipo 16 responsável por 80% dos casos de câncer cervical nas mulheres. Os homens são um importante reservatório de HPV e os principais responsáveis pela transmissão às suas parceiras. **Objetivo:** Detectar HPV DNA e determinar a prevalência de HPV-16, 18, 6 e 11 em amostras de urina de homens infectados pelo HIV-1. **Material e Métodos:** Homens adultos infectados pelo HIV proveniente de clínica de Urologia/doenças sexualmente transmissíveis e clínica de HIV foram convidados a participar da pesquisa. O estudo foi conduzido entre março de 2006 e abril de 2008. Cerca de 20 ml de urina foi coletada em uma sala específica. As amostras foram submetidas a um PCR Real Time utilizando-se Sybr Green® com primers degenerados PGMY09/11 para detecção de HPV DNA. As amostras positivas, então, foram submetidas a uma PCR convencional utilizando-se primers específicos para cada tipo de HPV. **Resultados:** Um total de 223 homens infectados pelo HIV-1 foi testado, sendo que 81% deles utilizavam HAART. Sessenta e nove (30.9%) homens apresentaram positividade para HPV DNA na urina pelo método de PCR Real Time. Vinte e dois (31.9%) deles foram positivos para o HPV-16, pelo método da PCR convencional. Dezoito (26.5%) homens apresentaram o DNA do HPV-11; quatro (5.8%) apresentaram o HPV-6 e cinco (7.2%) apresentaram o HPV-18. Vinte (29%) apresentaram DNA de algum tipo de HPV que não aqueles que foram propostos nos objetivos do trabalho. Os homens HIV/HPV mostraram atividade sexual precoce menor que os não infectados por HPV (33.4% vs 40.3%, $p=0.22$), porém alto número de parceiros sexuais no último ano (40.6% vs 36.4%, $p=0.50$) do que os homens HPV negativos. A média de carga viral de HIV foi de 10663 cópias/mL e 14104 cópias/mL ($p=0.0002$), para HPV positivo e HPV negativo, respectivamente. A contagem média de células TCD4+ foi de 441 cels/ml e 517 cels/ml ($p=0.30$), respectivamente. **Conclusões:** Foi detectada alta prevalência (30.9%) de HPV na urina de homens assintomáticos, infectados pelo HIV-1. Um terço deles foi infectado pelo HPV-16. O alto número de parceiros sexuais foi um fator importante para a aquisição de HPV nesta população. Nós descrevemos o primeiro estudo utilizando PCR Real Time para detectar HPV em amostras de urina no Brasil, sugerindo a urina como um espécime confiável para a triagem de HPV em larga escala na população.

Descritore: 1. Infecções por Papilomavirus/urina 2. Prevalência 3. Homens 4. Reação em cadeia da Polimerase 5. HIV-1.

Costa FAM. **Study of prevalence of human papillomavirus HPV in urine samples of male HIV-1 infected individuals in Sao Paulo, Brazil** [dissertation].

Background: Human Papillomaviruses (HPV) is a DNA virus that includes 118 genotypes and the type 16 is the responsible for 80% of the cervical cancer in women. Men are an important reservoir of HPV and major responsible for the transmission for their partners. **Aim:** To detect HPV DNA and to determine the HPV-16, 18, 6 and 11 prevalence in the urine samples of HIV-1-infected men. **Methods:** Adult men HIV-infected subjects in the Urology/Sexually Transmitted Disease (STD) Clinic and HIV Out clinic were invited to participate. The collect was conducted between March 2006 and april 2008. About 20 ml of urine was collected in a specific room, previously cleaned within the last 3 hours. The samples were performed to a real time PCR, using Sybr Green® with PGMY09/11 degenerate primers to detect HPV DNA. The positive samples were also submitted to conventional PCR using type-specific primers for each HPV type. **Results:** A total of 223 HIV-infected men were tested, 81% of whom were on HAART. Sixty-nine (30.9%) men were positive for HPV DNA in their urine samples by Real Time PCR. Twenty-two (31.9%) of them were positive for HPV-16 by conventional PCR. Eighteen (26.1%) men showed the HPV-11 DNA; four (5.8%) showed HPV-6 DNA and five (7.2%) showed HPV-18 DNA. Twenty (29%) presented DNA of some type of HPV than those which have been proposed in the goals of the work. The HIV/HPV co-infected men showed similar early sexual activity (33.4% vs 40.3%, $p=0.22$), but higher number of sexual partners in the last year (40.6% vs 36.4%, $p=0.50$) than HPV negative men. The mean HIV RNA plasma viral load was 10663 copies/mL and 14104 copies/mL ($p=0.0002$), for HPV positive and HPV negative, respectively. The mean T CD4+ cells count was 441 cells/mL and 517 cells/mL ($p=0.30$), respectively. **Conclusions:** High (30.9%) prevalence of HPV in urine of asymptomatic HIV-1-infected men was detected. One third of them were infected by HPV-16 type. Higher numbers of sexual partners was an important factor for HPV acquisition in this population. We described the first study using real time PCR to detect HPV in urine samples in Brazil and suggest that urine as a reliable specimen for HPV screening in large sample size population.

Descriptors: 1. Papillomavirus infections/urine 2. Prevalence 3. Men 4. Polymeras Chain Reaction 5. HIV-1

LISTA DE ABREVIACÕES, SÍMBOLOS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
CD	Classe de diferenciação
CD4	Classe de diferenciação 4
CD8	Classe de diferenciação 8
CDC	<i>Centers for Diseases Control and Prevention</i> – Centro de Controle e Prevenção de Doenças
Cels	Células
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Deoxinucleosídeo trifosfato
EV	epidermodisplasia verruciforme
EUA	Estados Unidos da América
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
g	Gravidade
HAART	<i>Highly Active Anti-retroviral Therapy</i> - Terapia Anti-retroviral Altamente Ativa
HC/FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HIV-1	<i>Human Immunodeficiency Virus Type 1</i> – Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1
HPV	Human Papilomavirus
IST	Infecções Sexualmente Transmissíveis
nm	Nanômetro
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia de polimerase
Pmol	Picomoles
PVs	Papilomavirus
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	Ácido Ribonucléico mensageiro
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UNAIDS	<i>United Nations Programme on HIV/AIDS</i> - Nações Unidas para AIDS
USP	Universidade de São Paulo

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μ	Micro
μg	Microgramas
μL	Microlitro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
rpm	Rotações por minuto

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Seqüência de nucleotídeos utilizada na PCR para detecção de HPV DNA	40
Tabela 2	Seqüência de nucleotídeos utilizada na PCR Tipo específico	42
Tabela 3	Características demográficas e sociais dos indivíduos infectados pelo HIV-1.	50
Tabela 4	Histórico de práticas sexuais dos pacientes envolvidos no estudo	51
Tabela 5	Características Clínicas e Laboratoriais	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Pré-requisitos para caracterização de uma célula cancerosa	2
Figura 2	Principais estágios no desenvolvimento do câncer cervical	3
Figura 3	Mecanismo de carcinogênese do Papilomavirus Humano (HPV).	5
Figura 4	Árvore Filogenética com os grupos de HPV	7
Figura 5	Modelo do capsídeo do Papilomavirus Humano	8
Figura 6	Genoma do HPV DNA, apresentado de forma linear.	9
Figura 7	Esquema do genoma do HPV, circular com 8000 pb	10
Figura 8	Morfologia típica de máculas benignas de EV	13
Figura 9	Progressão de câncer cervical mediado pelo HPV	17
Figura 10	Condiloma acuminata Anal	20
Figura 11	Múltiplas verrugas genitais no prepúcio e na glândula peniana	21
Figura 12	Prevalência de HPV entre mulheres sexualmente ativas, entre 15-59 anos, dividido por grupos de idade, Estados Unidos, 2003 – 2004	22
Figura 13	Estimativa de adultos e crianças vivendo com HIV em 2007	29
Figura 14	Taxa de Incidência de AIDS (por 100.000 habitantes) em jovens de 13 a 24 anos por UF de residência. Brasil, 2005	30
Figura 15	Roteiro das técnicas de detecção do HPV.	45
Figura 16	PCR Real Time. Sessenta e nove pacientes apresentaram HPV DNA.	46
Figura 17	Curva de melting dos pacientes HPV positivos.	46
Figura 18	Gel de agarose 2% com amostras positivas para cada tipo de HPV proposto no estudo.	47
Figura 19	Prevalência dos tipos de HPV e co-infecções.	48

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	PAPILOMAVIRUS HUMANO E CÂNCER	1
1.2	BIOLOGIA DO PAPILOMAVIRUS HUMANO	6
1.3	ESTRUTURA GENÔMICA E PROPRIEDADES	9
1.4	TIPOS DE PAPILOMAVIRUS	12
1.5	REPLICAÇÃO DO HPV	16
1.6	EPIDEMIOLOGIA	18
1.7	CO-FATORES PARA O APARECIMENTO DO CÂNCER	24
1.8	RESPOSTA IMUNE AO HPV	25
1.8.1	ESCAPE VIRAL	26
1.9	VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV)	27
1.10	CO-INFECÇÃO DE HPV E HIV	31
1.11	HPV E URINA	33
1.12	VACINAS PARA HPV	35
2	OBJETIVOS GERAIS	37
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3	MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1	CASUÍSTICA	37
3.2	METODOLOGIA	38
3.3	TÉCNICAS MOLECULARES	38
3.3.1	EXTRAÇÃO DE DNA	38
3.3.2	PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE L1 DO HPV	39
3.3.3	PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE β -actina	41
3.3.4	PCR COM PRIMERS TIPO-ESPECIFICO	41
3.3.5	SEQUENCIAMENTO	42
3.3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
4	RESULTADOS	45
4.1	SEQUENCIAMENTO	48
5	DISCUSSÃO	54
6	CONCLUSÕES	62
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
8	ANEXOS	75

1. INTRODUÇÃO

1.1 PAPILOMAVIRUS HUMANO E CÂNCER

A infecção pelo Papilomavirus Humano (HPV) é uma infecção sexualmente transmissível, de natureza viral, altamente disseminada, com cerca de 50% dos adultos sexualmente ativos com experiência de uma infecção genital por HPV (Casariego *et al.*, 2002; Baay *et al.*, 2004).

Há cerca de três décadas, um largo espectro de pesquisas biológicas, clínicas e epidemiológicas vem estabelecendo o papel etiológico do HPV no carcinoma de células escamosas da cérvix uterina, sendo esta associação, única na epidemiologia do câncer (Scheurer *et al.*, 2005). O câncer cervical é o melhor exemplo de uma malignidade humana de etiologia infecciosa (Stoler, 2003; Cruz *et al.*, 2004; Queiroz *et al.*, 2004; Roden *et al.*, 2004; Taira *et al.*, 2004) e mais de 99% do câncer cervical e suas lesões precursoras contêm DNA do HPV (Roden *et al.*, 2004).

O crescimento maligno de uma célula requer a inativação de genes supressores de tumor como pRb, p53; ativação de vias estimulatórias de crescimento, como a Ras; evasão do mecanismos de apoptose; mudanças na fosforilação de muitas proteínas celulares como aquelas obtidas pela inativação da fosfatase 2A (PP2A); imortalização celular; angiogênese; invasão e metástase, sendo que o HPV promove muitos desses eventos (Figura 1) (Carbone *et al.*, 2004). O papilomavirus induz lesões epiteliais hiperplásicas, papilomatosas e verrugosas

na pele e em vários sítios mucosos, incluindo o trato anogenital, uretra, laringe, mucosa traqueobraquial, nasal e cavidade oral (Correnti *et al.*, 2004).

Figura 1: Pré-requisitos para caracterização de uma célula cancerosa. Retirado de Carbone *et al.*, 2004.

O câncer cervical é o segundo tipo de câncer mais comum em mulheres (Queiroz *et al.*, 2004; Arora *et al.*, 2005). Dados de 2002 mostraram que cerca de 500.000 novos casos de câncer cervical surgiram e 275.000 mulheres morreram (Schiffman *et al.*, 2007). O câncer cervical representa 15% de todos os processos malignos em mulheres, sendo o segundo maior em incidência, atrás apenas do câncer de mama (Sapy *et al.*, 2007). Cerca de 80% dos casos são observados em países em desenvolvimento devido à falta de acesso tanto nos programas de triagem de câncer cervical quanto de tratamento (Cox, 2006).

Enquanto a maioria das infecções por HPV resolve espontaneamente, uma pequena fração persiste e induz câncer através de um estágio pré-invasivo chamado de Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) (Wood *et al.*, 2007). O câncer cervical compreende quatro estágios: transmissão de HPV, persistência viral, progressão de um clone de uma célula infectada para o pré-câncer e a invasão (Figura 2). Alguns estágios são reversíveis, ocorrendo o clearance viral e com menos freqüência a regressão do estágio pré-câncer para a normalidade (Schiffman *et al.*, 2007).

Figura 2: Principais estágios no desenvolvimento do câncer cervical. Retirado de Schiffman et al., 2007.

A indução e o desenvolvimento de NIC requerem um específico contexto biológico. Os Papilomavírus (PVs) se replicam dentro de queratinócitos e os HPVs de alto risco geralmente têm como alvo células epiteliais basais da junção escamo-colunar cervical. Estas células não são facilmente reproduzidas em sistemas de cultura de tecidos. Além de que outros fatores também influenciam na persistência

viral e no potencial oncogênico, como o estado hormonal, o estado imunológico, co-infecções e co-fatores ambientais. Logo, estes complexos fatores dificultam o estudo em modelos experimentais do processo de neoplasia cervical (Wood *et al.*, 2007).

Enquanto a infecção por HPV é largamente subclínica, a progressão do câncer está intimamente relacionada com a persistência do DNA viral. Ocorre a ruptura nas regiões E1 e E2 e a integração no DNA celular. A ruptura de E2 libera os promotores de E6 e E7 e aumenta a expressão de genes transformantes. As proteínas virais de E6 e E7 genes são capazes de degradar seletivamente os produtos de pRb e p53, respectivamente, inativando duas importantes proteínas de regulação negativa celular (Figura 3) (Bosch *et al.*, 2002).

Os genes E6 e E7 do HPV-16 são freqüentemente co-expressos em tumores e são os transcritos virais mais encontrados em biópsias de cânceres cervicais causados por HPV-16, sendo alvos para imunoterapia mediada por células T (Delgado *et al.*, 2008). Estudos mostram que o aparecimento de lesões e a progressão para o câncer estão relacionados ao tipo de resposta imune apresentada pelo paciente (Clerici *et al.*, 1997; Bais *et al.*, 2005; Delgado *et al.*, 2008). A análise do perfil de citocinas de T *helper* tipo 1 (Th1) e 2 (Th2) são utilizadas para caracterizar a resposta imune em muitas doenças humanas, incluindo doenças associadas ao HPV (Delgado *et al.*, 2008). Alguns estudos mostraram que há uma troca de resposta Th1 para Th2 na carcinogênese de epitélio cervical (Clerici *et al.*, 1997; Bais *et al.*, 2005).

Figura 3: Mecanismo de carcinogênese do Papilomavírus Humano (HPV). HSIL, lesão escamosa intraepitelial de alto grau; LSIL, lesão escamosa intraepitelial de baixo grau; RB, gene do Retinoblastoma. Retirado de Bosch et al., 2002.

Entre os anos de 1994 e 2000, o câncer anal afetou 2.04 homens e 2.06 mulheres por 100.000, sendo que o HPV-16 é encontrado em 73% dos casos. A prática do intercuro anal aumenta a probabilidade de câncer, tanto em homens quanto em mulheres. Não existe triagem para este tipo de câncer, porém alguns pesquisadores sugerem a triagem em grupos que praticam a relação anal: homens que fazem sexo com homens (HSH), mulheres com doenças vulvar e cervical de alto grau, indivíduos imunocomprometidos (incluindo HIV positivos e transplantados) e indivíduos com condiloma perianal (Cox, 2006).

1.2 BIOLOGIA DO PAPILOMAVIRUS HUMANO

Os papilomavirus (PV), do Latin “*papilla*” (pústula) e do sufixo grego “-oma” (tumor) são altamente diversificados (Sanclemente e Gill, 2002; De Villiers *et al.*, 2004). Os Papilomavírus isolados são tradicionalmente descritos como “tipos” e são encontrados em mamíferos e pássaros. No único hospedeiro extensivamente estudado, os humanos, alguns dados sugerem a existência de 200 tipos de HPV, porém cerca de 120 papilomavirus humano foram descritos com base no isolamento e seqüenciamento completo do genoma viral (De Villiers *et al.*, 2004; Bernard, 2005).

Em meados dos anos 50, quando se tornou possível a observação dos papilomavirus e dos *polyomavirus* por microscopia eletrônica e análise dos ácidos nucléicos, foram encontrados elementos comuns aos dois vírus: DNA circular dupla-fita e capsídeo icosaédrico. Conseqüentemente, foram considerados muito próximos e alocados na mesma família, *Papovaviridae*. A partir dos anos 80, estudos funcionais e de seqüências mostraram que essas similaridades eram muito superficiais para estabelecer uma relação (Danos *et al.*, 1982; Bernard, 2005).

Uma vez que as classificações taxonômicas devem refletir as relações naturais, concluiu-se que esses vírus formavam duas famílias separadas. Os papilomavirus são membros da família *Papillomaviridae*, reconhecida oficialmente pelo International Council on Taxonomy of Viruses (ICTV) (De Villiers *et al.*, 2004; Bernard, 2005). Atualmente, a filogenia dos papilomavírus é predominantemente inferida com análise comparativa do fragmento de cerca de 290 pb da região L1. A identificação em série é bem estabelecida em entidades monofiléticas com α , β , γ ,

o papilomavirus (Figura 4) (Gottschling, Kohler *et al.*, 2007). Um tipo de HPV é definido quando a sequência do seu gene L1 é, ao menos, 10% dissimilar de qualquer outro tipo de HPV (Bernard, 2005).

Figura 4: Árvore Filogenética com os grupos de HPV. Retirado de Gottshling *et al.*, 2007.

Todos os papilomavirus possuem um capsídeo icosaédrico não-envelopado (Figura 5), com cerca, de 55 nm, constituído por um DNA circular dupla-fita de 8000 pares de base (Modis *et al.*, 2002; Stoler, 2003; Bernard, 2005; Pyeon *et al.*, 2005). Infectam células escamosas epiteliais e é o único grupo de vírus que liga o seu ciclo

de vida ao programa de diferenciação nas células infectadas do hospedeiro (Laimins, 1996).

Figura 5: Modelo do capsídeo do Papilomavirus Humano. Retirado de Modis *et al.*; 2002.

Apesar do tamanho de seu genoma, a biologia molecular destes vírus é muito complexa. Resumindo, três oncogenes, E5, E6 e E7, modulam o processo de transformação; duas proteínas regulatórias, E1 e E2 modulando a transcrição e replicação e duas proteínas estruturais, L1 e L2, compondo o capsídeo viral (Figura 6) (De Villiers *et al.*, 2004; Wilson *et al.*, 2005).

Figura 6: Genoma do HPV DNA, apresentado de forma linear. Retirado de Wilson et al., 2005.

1.3 ESTRUTURA GENÔMICA E PROPRIEDADES

Três regiões do genoma têm sido funcionalmente classificadas. A primeira contém uma porção regulatória não-codificante com cerca de 500 a 1000 pb. A regulação da transcrição dos genes virais é complexa e controlada por fatores de transcrição virais e celulares. A maioria dessas regulações ocorre na região longa de controle (LCR), que varia um pouco em relação à composição de nucleotídeos entre os diferentes tipos de HPV. Esta região apresenta um alto grau de variação no genoma viral do HPV (Chan *et al.*, 1989; Kammer *et al.*, 2000).

A região LCR encontra-se entre L1 e E6 onde não existe uma ORF de tamanho detectável (Chan *et al.*, 1989; Kammer *et al.*, 2000). Essa região contém a origem de replicação de DNA, vários promotores para a síntese de RNAm e seqüências reguladoras da transcrição do DNA (Broker, 1987; Brown e Fife, 1990).

A segunda região refere-se a uma região precoce e consiste nas chamadas ORFs (Open - Reading Frame) E1, E2, E3, E4, E5, E6 e E7, envolvidas na replicação viral e na oncogênese. A terceira região consiste na região tardia, que codifica as proteínas estruturais L1 e L2, do capsídeo viral (Figura 7) (Desaintes e Demeret, 1996; Jung *et al.*, 2004).

Figura 7: Esquema do genoma do HPV, circular com 8000 pb. Retirado de Desaintes & Demeret, 1996.

Os genes E1 e E2 têm papel importante na replicação do HPV. Juntos codificam proteínas que são vitais para a replicação do DNA extracromossomal e o completo ciclo de vida viral. O E2 também codifica duas proteínas: uma que inibe e outra que aumenta a transcrição da região precoce. Uma marca do carcinoma cervical associado ao HPV é a perda da expressão da proteína viral E2. O gene E3 não tem função conhecida (Sanclemente e Gill, 2002; Motoyama *et al.*, 2004).

O gene E4 é expresso primeiramente como um gene tardio na diferenciação do epitélio, quando virions completos são liberados, sendo que não se conhece se têm

propriedades transformantes. O gene E4 também induz o colapso da rede de queratina citoplasmática nos queratinócitos humanos. O gene E5 encontra-se freqüentemente deletado nas células do carcinoma cervical, indicando não ser essencial na manutenção da transformação maligna da célula hospedeira. Quando presente, E5 interage com várias proteínas transmembrana como fatores de crescimento epidermal (Sanclemente e Gill, 2002; Motoyama *et al.*, 2004).

O gene E6 atua no processo de transformação junto com E7 promovendo um ambiente celular para a replicação viral (Sanclemente e Gill, 2002). Estas duas unidades codificam oncoproteínas que permitem a replicação viral, a imortalização e transformação das células hospedeiras infectadas por HPV (Sanclemente e Gill, 2002; Motoyama *et al.*, 2004). A proteína E7 forma complexos com as proteínas de controle do ciclo celular, como pRB, p107, p130 e ciclina A. Esta habilidade parece estar relacionada à sua capacidade de induzir proliferação e imortalização das células (Dyson *et al.*, 1989; Dyson *et al.*, 1992; Tommasino *et al.*, 1993).

Os genes L1 e L2, da região tardia codificam as proteínas principal e secundária do capsídeo, respectivamente; ambos são seqüências altamente conservadas entre todos os papilomavírus (Bernard *et al.*, 1994).

A proteína L1 é a mais abundante do capsídeo viral e constitui cerca de 80% do total das proteínas virais. Ela possui, ainda, epítomos tipo-específicos e é altamente imunogênica. A proteína L2, associada à L1, participa da incorporação do DNA viral dentro do vírion (Zhou, 1996). Em contraste aos genes precoces, os genes

tardios são expressos nas camadas superficiais do epitélio (Howley, 1996; Zur Hausen, 2002).

1.4 TIPOS DE PAPILOMAVIRUS

Os papilomavírus (PVs) constituem um grupo de vírus associado com lesões cutâneas e mucosas de caráter benigno e maligno (De Koning *et al.*, 2006). São específicos ao seu hospedeiro, infectando humanos, macacos, bovinos e pássaros (Gottschling, Stamatakis *et al.*, 2007). Os PVs são bem disseminados na natureza, e a maioria é isolado de humanos. Logo, as doenças relacionadas ao HPV em humanos aumentaram de importância nos anos posteriores, alcançando status de problema de saúde pública (Snoeck, 2006).

Estão agrupados em gênero, espécies, tipos, subtipos e variantes. Diferentes gêneros possuem menos de 60% de similaridade nas seqüências nucleotídicas da proteína L1, enquanto espécie possui de 60 - 70 % de similaridade genética; os tipos têm similaridade entre 71 – 89%; subtipos e variantes, de 90 – 98% e 98 – 99%, respectivamente (Hazard *et al.*, 2007).

Os papilomavirus humanos são encontrados em uma variedade de lesões proliferativas de origem epitelial e podem ser classificados em HPV tipos mucosos e cutâneos, baseado no tropismo por esse tipo de tecido. Os HPV cutâneos são filogeneticamente distantes dos HPVs tipo mucoso (De Andrea *et al.*, 2007).

De acordo com a classificação atualizada dos *Papillomaviridae*, o EV-HPV e os tipos filogeneticamente relacionados estão agrupados dentro do gênero *Betapapillomavirus*, enquanto os tipos mucosos estão entre os *alphapapillomavirus* (De Andrea *et al.*, 2007).

Foram encontradas evidências de HPV em pacientes com câncer de pele não-melanoma, em estudos de pessoas com uma rara doença hereditária, epidermodisplasia verruciforme (EV) [figura 8]. Foi demonstrado que os EV-HPV, antes restrito aos pacientes que sofriam desta doença, ocorrem em alta frequência na população geral saudável, em pacientes com câncer de pele não-melanoma, em pacientes com psoríase e imunodeprimidos (De Villiers *et al.*, 2004; De Andrea *et al.*, 2007).

Figura 8: Morfologia típica de máculas benignas de EV. Retirado de Orth, 2006.

Os papilomavirus são classificados também como sendo de alto e baixo risco oncogênico, sendo que algumas formas estão associadas com câncer *in vivo* ou aumento da incidência de transformação celular *in vitro*, enquanto outros induzem lesões benignas (Correnti *et al.*, 2004).

Os papilomavirus de maior importância clínica pertencem ao alpha-papilomavirus. Possui genótipos de PVs associados com lesões mucosas, genitais e câncer cervical, consistindo em mais da metade dos PVs completamente seqüenciados no Genbank (Gottschling, Kohler *et al.*, 2007).

Em contraste, os beta-papilomavirus compreendem genótipos de HPV originalmente associados com epidermodisplasia verruciformes e são freqüentemente detectados em câncer de pele não-melanoma tanto em indivíduos imunocompetentes e imunossuprimidos. Aparentemente, são mais disseminados, porém com muitos genótipos ainda não descritos formalmente (De Koning *et al.*, 2006; Potocnik *et al.*, 2006).

Pouco é conhecido sobre as propriedades biológicas dos tipos beta-papilomavirus e o seu mecanismo de carcinogênese. Apenas as propriedades dos tipos 20 e 38 vêm sendo estudadas com detalhes em queratinócitos humanos primários. Os estudos mostram a habilidade destes vírus em inativar a proteína do Retinoblastoma (pRB), um gene supressor de tumor, e na perda do controle da transição das fases G1/S da mitose (De Koning *et al.*, 2006).

Atualmente, cerca de 70 tipos de HPV são conhecidos por infectar a região anogenital. Os HPVs de baixo risco, como os tipos 6 e 11, são responsáveis por lesões benignas como verrugas genitais, enquanto os tipos de HPVs de alto risco, como os tipos 16, 18, 31, 33 e 45, por exemplo, estão relacionados com câncer anogenital (D'hauwers *et al.*, 2007). O HPV-16 é o tipo mais prevalente e é visto ao menos em 50% das pacientes com câncer cervical invasivo, seguido pelos tipos 18, 45, 31, 33, 52 e 58 (Gnanamony *et al.*, 2007).

Apesar da ausência de estudos sobre as regiões imunodominantes, existem diversos relatos sobre a diversidade dos tipos de HPV circulantes no Brasil. Estudo realizado em 2004, na cidade de São Paulo, mostrou que homens infectados pelo HIV possuíam tipos de HPV de alto e baixo risco para o câncer (6, 11, 31, 16 e 18) (Manzione *et al.*, 2004). Outro estudo de 2003 mostrou que os tipos de HPV mais prevalentes em mulheres em Brasília foram o HPV-16, HPV-58, HPV-31 e HPV-53 (Camara *et al.*, 2003).

Um trabalho realizado em Recife mostrou que 21.1% das mulheres pesquisadas apresentaram o DNA do HPV-16, sendo que 50% foram positivos para HPV de alto risco para o câncer. O HPV-18 foi detectado em apenas 2% das mulheres pesquisadas (Lorenzato *et al.*, 2000). Em São Paulo, trabalho de 2002, identificou DNA do HPV em 98% das mulheres estudadas, todas infectadas pelo HIV, provenientes do Instituto de Infectologia Emílio Ribas e da Casa da AIDS, sendo que o tipo mais prevalente foi o HPV-6, seguidos pelos tipos 51, 11, 18 e 16 (Levi *et al.*, 2002).

1.5 REPLICAÇÃO DO HPV

O ciclo de vida do HPV é ligado à diferenciação epitelial. As seis proteínas E são responsáveis pela replicação do DNA, transcrição e transformação celular (Kanodia *et al.*, 2007). O epitélio humano normal cresce como camadas estratificadas onde somente as células das camadas basais estão hábeis a se dividir. Após a divisão das células basais, uma das células filhas migra para cima e começa a diferenciação. Durante a infecção, as proteínas virais alteram o início normal do ciclo celular, produzindo uma progene viral (Hebner e Laimins, 2006).

Os vírions de HPV infectam a camada basal e entram na célula através de um co-receptor ainda desconhecido (Pett e Coleman, 2007). Após a migração dos núcleos, a progressão está associada com a conversão do genoma viral de uma forma episomal para uma forma integrada ao longo com deleção ou inativação de E2, regulação negativa do E6, expressão do E7 e ativação do promotor precoce (Roden *et al.*, 2004).

Os oncogenes virais induzem uma re-entrada não programada da fase S do ciclo celular, com ativação da maquinaria celular do hospedeiro necessária para a amplificação dos genes virais. Nas células infectadas, ocorrem baixos níveis de síntese viral, com 50-100 cópias do genoma por célula (Pett e Coleman, 2007). As células infectadas migram para as camadas superiores do epitélio e começam a se diferenciar (Hebner e Laimins, 2006).

Com a diferenciação celular das células infectadas, os promotores tardios são ativados levando à produção dos produtos dos genes tardios. Este evento inicia a fase latente do ciclo de vida do vírus com altos níveis de amplificação do genoma viral. Nas camadas superiores do epitélio, o DNA viral é empacotado em novos capsídeos e os vírions liberados da célula (Figura 9) (Hebner e Laimins, 2006; Woodman *et al.*, 2007).

Figura 9: Progressão de câncer cervical mediado pelo HPV. Retirado de Woodman *et al.*, 2007.

1.6 EPIDEMIOLOGIA

A infecção pelo HPV é relativamente elevada entre as mulheres sexualmente ativas, por este motivo há muitos trabalhos envolvendo somente as mulheres. Entretanto, em relação aos homens existem poucos trabalhos atualmente descritos na literatura que o relacionam com o HPV, principalmente infectados pelo HIV.

Por esta razão, os estudos envolvendo homens têm grande importância na avaliação da prevalência dos indivíduos masculinos portadores do HPV devido ao fato destes indivíduos terem infecção subclínica e assintomática, e conseqüentemente, potenciais transmissores do HPV aos seus parceiros (as) sexuais. A detecção deste vírus por biologia molecular pode permitir avaliar a prevalência em homens assintomáticos e a diversidade molecular do HPV em genes importantes para a resposta imune, os quais serão úteis para indicar a prevalência dos tipos mais freqüentes e a diversidade em relação a eficácia de uma vacina anti-HPV já aprovada há pouco tempo atrás.

De fato, diversos antígenos virais como o E6 e E7, têm potencial no desenvolvimento de uma vacina eficaz. A expressão destes dois oncogenes do HPV de alto-risco é responsável pela carcinogênese cervical. Existem poucos estudos que avaliam a diversidade da região L1 em amostras procedentes de pacientes brasileiros (Franco e Harper, 2005).

O papilomavirus humano é transmitido por contato sexual e é a infecção sexual mais comum de caráter viral com o surgimento de mais de 6.2 milhões de

novas infecções a cada ano (Giles e Garland, 2006). A incidência de HPV aumenta dramaticamente com o número de parceiros sexuais (Cox, 2006). Porém, inúmeros meios de caráter não-sexual de transmissão através de fômites vêm sendo propostos (Gnanamony *et al.*, 2007).

O intercuro intromissivo não é um pré-requisito para a transmissão do HPV, pois um trabalho mostrou que algumas mulheres que se mantiveram virgens durante os dois anos de estudo estavam infectadas pelo HPV. Preservativos não previnem completamente a transmissão, apesar de mostrar que o uso destes reduz o risco de adquirir o HPV em 70% (Cox, 2006).

Tem crescido evidências que a infecção por HPV é adquirida através de rotas não-sexuais e uma rota em potencial é a transmissão vertical, de mãe para filho. Provavelmente, ocorre durante a passagem do feto através do canal do parto infectado. O vírus também pode ser transmitido por infecção ascendente, após ruptura prematura de membranas (Medeiros *et al.*, 2005).

Cerca de 75% de americanos sexualmente ativos serão infectados pelo HPV em algum momento de sua vida: 74 % das infecções ocorrem em indivíduos entre 15 a 24 anos e a alta incidência é encontrada em mulheres jovens, com menos de 25 anos (Cox, 2006). A infecção por HPV, em particular está associada com significativa morbidade e altos custos de cuidados médicos, com cerca de três bilhões de dólares gastos em apenas um ano (Giuliano, 2007).

Evidências epidemiológicas têm provado que a infecção pelo HPV é o fator de risco mais importante para o desenvolvimento de neoplasias (Walboomers *et al.*, 1999; Munoz, 2000; Gnanamony *et al.*, 2007), porém é consenso que a infecção por HPV de alto risco por si só não é suficiente como causa de casos de câncer cervical (Trottier e Franco, 2006).

As infecções com HPVs de baixo risco podem causar lesões benignas da área anogenital conhecida como condiloma acuminata (verrugas genitais) [figura 10], assim como larga proporção de lesões intraepiteliais de baixo grau do cérvix uterino (Trottier e Franco, 2006). O condiloma acuminata possui baixo risco de progressão para o câncer invasivo, porém os pacientes queixam-se de prurido, sangramentos ou queimação, além dos distúrbios psicológicos devido à aparência da lesão (Chin-Hong e Palefsky, 2005).

Figura 10: Condiloma acuminata Anal. Retirado de Chin-Hong & Palefsky, 2005.

Todos os casos de verrugas genitais são causados pela infecção por HPV (Steben e Duarte-Franco, 2007). Em homens, o tipo 16 está relacionado ao desenvolvimento de cânceres peniano, anal, de cabeça e pescoço (Giuliano, 2007). O diagnóstico de verrugas genitais é primariamente clínico. Os pacientes podem ter desconforto, dor, sangramento, dificuldade de intercursos sexual; estes sintomas são comuns em pacientes com largas lesões em forma de couve-flor (Figura 11). Quando não tratadas, as verrugas podem sumir espontaneamente, permanecerem as mesmas ou aumentar em tamanho e número (Potocnik *et al.*, 2007).

Figura 11: Múltiplas verrugas genitais no prepúcio e na glândula peniana. Retirado de Potocnik *et al.*, 2007.

Os papilomavirus Humanos genitais estão globalmente disseminados, com taxas cumulativas de infecção de aproximadamente 60% em muitas populações de mulheres jovens (Wood *et al.*, 2007). A infecção pelo HPV é transiente em muitos casos, porém infecções persistem por muitos anos carregando alto risco de câncer cervical. A prevalência diminui com a idade, enquanto que a alta incidência pode ser

detectada entre 20 e 35 anos de idade durante o período sexual mais ativo da vida (Figura 12) (Sapy *et al.*, 2007).

Figura 12: Prevalência de HPV entre mulheres sexualmente ativas, entre 15-59 anos, dividido por grupos de idade, Estados Unidos, 2003 – 2004. Dados da “Centers for Disease Control and Prevention” - www.cdc.org.

Pouco é conhecido sobre a prevalência de HPV em homens. Alguns estudos mostram incidência de 4 - 45%, com baixas taxas refletindo a ausência de testes sensíveis para homens. Altas taxas de HPV são geralmente encontradas em estudos com soldados ou em homens que freqüentam clínicas de infecções sexualmente transmissíveis (IST) (Cox, 2006).

A maioria dos estudos de infecção por HPV em homens tem como amostra, pele da região peniana - especificamente do sulco coronal e da glândula do pênis - e da uretra. Existe um consenso que estas amostras são necessárias para detectar o HPV devido ao contato direto do pênis com a cérvice uterina. Logo, muitos trabalhos

com homens têm o propósito de determinar sítios anatômicos ótimos para a detecção de HPV (Giuliano *et al.*, 2007).

O carcinoma celular escamoso de ânus é raro e conta com apenas 1.5% dos casos dos casos de câncer do trato gastrintestinal nos EUA. Cerca de cinco mil homens e mulheres foram diagnosticados com câncer anal em 2006, porém a incidência é muito maior em homens que praticam intercurso anal e naqueles com HIV. Estudos mostraram HPV em 63% de casos dos homens e 90% nas mulheres com câncer anal (Uronis e Bendell, 2007).

Os estudos com homens mostrando a real prevalência do HPV são trabalhos limitados. Em muitos casos, a infecção pelo HPV em homens é subclínica, o que resulta em um reservatório assintomático, transmitindo o vírus. Porém, entre homens soropositivos, há uma alta incidência de neoplasia anal intraepitelial (Hagensee *et al.*, 2004) e a infecção pelo HPV está intimamente ligada com o câncer anal e peniano (Wilkin *et al.*, 2004; Smits *et al.*, 2005).

Trabalho publicado no ano 2000 mostrou que 71% dos homens com câncer peniano apresentou o DNA de diferentes tipos de HPV, sendo 81% deles para HPV de alto risco para o câncer, principalmente o tipo HPV-18 (Picconi *et al.*, 2000). Outro estudo mostrou que 70% dos parceiros sexuais de mulheres infectadas pelo HPV, também estavam infectados, em diferentes porções do trato genital, como uretra, no prepúcio, entre outros (Nicolau *et al.*, 2005).

A infecção por tipos de HPV de alto risco é freqüente entre mulheres sexualmente ativas, com incidência de 15 a 40% (De Araujo Souza e Villa, 2003). Estudos em mulheres brasileiras mostraram taxas de prevalência variando de 55.4% a 91%, dependendo do tipo de ensaio utilizado, respectivamente, hibridização In situ e PCR, sendo que os tipos de HPV mais prevalentes encontrados nas Américas Central e do Sul foram os tipos 16, 18, 45, 31 e 33 (Rabelo-Santos *et al.*, 2003).

1.7 CO-FATORES PARA O APARECIMENTO DO CÂNCER

A relação da infecção pelo HPV e o aparecimento do câncer cervical está muito bem estabelecido (Chan *et al.*, 2005; Scheurer *et al.*, 2005).

Entretanto, a infecção por tipos oncogênicos do HPV é importante na causa do câncer cervical, porém é necessária a associação com outros fatores coexistindo com o HPV, para modular a transição para o câncer, como o uso prolongado de contraceptivos orais; o fumo; DSTs, como Herpes Simples tipo 2, *Chlamydia trachomatis*, a AIDS; a baixa idade dos relacionamentos sexuais; múltiplos parceiros sexuais; baixa condição sócio-econômica e multiparidade (Queiroz *et al.*, 2004; Arora *et al.*, 2005).

Pessoas que receberam terapia imunossupressora crônica após transplante de órgãos têm alto risco de ter carcinomas em muitos sítios. Outros estudos têm demonstrado o fumo como um fator para o desenvolvimento de câncer anal. Diversos estudos epidemiológicos têm ligado as práticas sexuais com o risco de câncer anal, principalmente à prática de intercurso anal (Uronis e Bendell, 2007).

1.8 RESPOSTA IMUNE AO HPV

As variações que ocorrem nas regiões imunodominantes podem influenciar a resposta imune e possivelmente no potencial oncogênico do HPV, afetando o reconhecimento imunológico pelo hospedeiro e na atividade de immortalização celular (Sathish *et al.*, 2005).

As oncoproteínas E6 e E7 são necessárias para o estabelecimento e manutenção do estado tumorigênico e são alvos potenciais para a imunidade celular. Em estudos que utilizam essas proteínas, a resposta imune celular específica em modelos experimentais leva à supressão dos tumores induzidos pelo HPV (Bernard, 2004).

Um trabalho publicado em 2003 sugere que as proteínas E6 e E7 do HPV induzem uma instabilidade cromossomal, que leva a um acúmulo de mudanças genéticas. Portanto, E6 e E7 representam um bom alvo para o desenvolvimento de imunoterapias antígeno-específicas ou vacinas para o câncer cervical (Palefsky e Holly, 2003). Porém, a maioria dos estudos é focada na proteína E7, por estar abundantemente mais expressa e melhor caracterizada imunologicamente (Mahdavi e Monk, 2005).

A proteína L1 representa mais de 90% das proteínas totais encontradas na superfície do vírus, e forma as VLPs (Vírus-like-particle), muito utilizadas para estudo de resposta de anticorpos induzidas pela infecção do HPV genital. Muitas regiões imunodominantes vêm sendo identificadas dentro da proteína L1, principalmente em

pacientes com lesões cervicais e infecção persistente pelo HPV (Urquiza *et al.*, 2005).

Estas VLPs são morfologicamente similares aos vírions infecciosos, com epítomos conformacionais altamente imunogênicos, porém não apresentam o DNA viral (Stern, 2005). Entretanto, eles podem induzir a produção de anticorpos neutralizantes em níveis comparáveis àqueles produzidos pelos vírions (Reddy *et al.*, 2004).

As VLPs são muito eficientes na indução tanto da resposta imune humoral quanto a celular. Os anticorpos induzidos por VLPs promovem uma proteção imune contra vírus infecciosos quando testados em modelos animais e também levam à ativação de células dendríticas *in vitro* (Stern, 2005).

1.8.1 ESCAPE VIRAL

A integração viral no genoma da célula hospedeira é um evento terminal para ciclo de vida do vírus. A replicação do DNA viral em células indiferenciadas e a subsequente formação de partículas virais nas células epiteliais diferenciadas reduzem a exposição ao sistema imune do hospedeiro. A falha do sistema imune em reconhecer o vírus pode ser explicada pelo fato de ciclo de vida do HPV ser não-lítico e não mostrar nenhum sinal pró-inflamatório que ativa as células dendríticas e induz a migração celular para o local. A natureza não lítica do HPV limita a produção de antígenos que serão apresentados ao sistema imune adaptativo (Kanodia *et al.*, 2007).

Há também a interação da citocinas / quimiocinas liberadas durante as respostas imune humoral e celular que são responsáveis pela regressão, persistência ou progressão das lesões associadas ao HPV (Goncalves e Donadi, 2004). Queratinócitos infectados por HPV podem modificar a resposta imune por vários mecanismos: através da secreção de várias citocinas ou através da produção de citocinas de resposta Th2 (IL-4 e IL-10) em carcinomas configurando um mecanismo de evasão contra a resposta imune mediada por células T (Kim *et al.*, 1995).

Um estudo comparou o perfil de citocinas em secreções cervicais de pacientes HPV DNA (+) e HPV DNA (-) com citologia normal, porém no primeiro grupo foram descritos elevados níveis de IL-10. O aumento da secreção de IL-10 em lesões cervicais pode inibir a resposta imune contra a infecção por HPV, levando à progressão de células cancerosas (Azar *et al.*, 2004).

1.9 VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV)

O primeiro caso de HIV-1 em humanos foi detectado a partir de amostra de sangue coletado de um homem na República Democrática do Congo em 1959. A forma de como ocorreu a contaminação ainda é desconhecida, porém sabe-se que o vírus circula nos Estados Unidos desde os anos 1970 (Questions and Answers. Divisions of HIV/AIDS Prevention. Centers for Disease Control Prevention, 2007).

A AIDS foi reconhecida em 1981, mas o primeiro caso de AIDS diagnosticado retrospectivamente no Brasil ocorreu em 1980, em um homem jovem, bissexual

residente na cidade de São Paulo (Meira, 2002). Foi postulado que um vírus T linfotrópico encontrado em pacientes com AIDS era o causador da AIDS. Análises imunológicas do retrovírus e suas propriedades biológicas sugeriram que ele fosse membro de uma família de retrovírus humanos conhecidos como HTLV e foi chamado de HTLV-III (Arya *et al.*, 1984).

Devido a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), nome recomendado pelo Center for Disease Control (CDC) em setembro de 1982, ser mais comum em homossexuais e usuários de drogas intravenosas, as primeiras teorias focaram nos problemas de estilo de vida. No final do ano de 1982, evidências epidemiológicas indicaram que a aids foi uma doença infecciosa transferida por fluidos corpóreos e pela exposição a sangue ou derivados sanguíneos contaminados (Greene, 2007).

Atualmente, cerca de 35 milhões (Figura 13) de pessoas estão infectadas pelo Vírus da Imunodeficiência Humana do tipo 1 (HIV-1), o qual pode ser caracterizado dentro de três distintos grupos: M, N e O. Enquanto as cepas de HIV do grupo O e N mostraram circulação limitada na África Central, as cepas do grupo M se distribuíram vastamente e inclui a maioria das cepas de HIV responsáveis pela pandemia. Dentro do grupo M, 11 subtipos (A - D, F – H e J – H) foram definidos. Ao menos 34 formas recombinantes (CRFs) foram identificadas (Locateli *et al.*, 2007). A atual epidemia na cidade de São Paulo de HIV/AIDS é causada principalmente pelo subtipo B (Komninakis *et al.*, 2007).

A África Sub-Saariana é o lar de 62% dos casos mundiais de HIV, com cerca de 14 mil pessoas infectadas diariamente e 11 mil mortes por doenças relacionadas ao HIV/AIDS (Mbirimtengerenji, 2007). Um terço de todas as pessoas vivendo com HIV na América Latina, reside no Brasil (UNAIDS, 2007). Estima-se que o Brasil tenha 610 mil pessoas infectadas, segundo o Global AIDS Program (Stefani *et al.*, 2007)

Figura 13: Estimativa de adultos e crianças vivendo com HIV em 2007. Fonte: UNAIDS. AIDS Epidemic Update, 2007.

Desde 1982, 55 mil casos de AIDS foram identificados no Brasil entre jovens de 13 a 24 anos (Figura 14). Possivelmente, o aumento dos casos de HIV se dá pela desinformação a respeito do problema, já que apenas 60% dos jovens têm conhecimento correto das formas de transmissão do HIV. Somente 53% dos jovens usaram preservativo na primeira relação sexual, sendo que 40% relataram ter usado

preservativo em todas as relações sexuais, independente da parceria, eventual ou fixo (Boletim Epidemiológico AIDS/DST, 2007).

Figura 14: Taxa de Incidência de AIDS (por 100.000 habitantes) em jovens de 13 a 24 anos por UF de residência. Brasil, 2005. Retirado do Boletim Epidemiológico AIDS/DST, 2007.

1.10 CO-INFECÇÃO DE HPV E HIV

Um novo complicador para a disseminação do HPV é a co-infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). De fato, algumas questões permanecem a serem respondidas, como por exemplo, se ocorre um efeito adicional na infecção pelo HIV na aquisição, reativação ou persistência da infecção pelo HPV (De Sanjose e Palefsky, 2002).

A transmissão sexual eficiente de ambas infecções permite um elevado número de pessoas co-infectadas em nosso meio (Carvalho et al. 2005). A AIDS é o resultado final da infecção pelo HIV, sendo reconhecida mundialmente como problema de saúde pública, e que pode associar-se com doenças infecto-parasitárias e doença sexualmente transmissível (DST), adquirindo características diferentes, como por exemplo, evolução da infecção HIV para AIDS, ao contrário se estivesse isolada (Rodrigues e Abath, 2000).

A prevalência das lesões pelo HPV é significativa entre pacientes infectados com o HIV, porém a maioria dos estudos tem avaliado as verrugas genitais. Estes estudos são raros e com um número pequeno de pacientes. A maioria dos trabalhos com HPV em pacientes infectados pelo HIV se restringe à área genital. Entretanto, são reportadas altas prevalências do HPV mesmo na ausência de lesões clínicas, multiplicidade dos tipos de HPV na mesma lesão, novos tipos de HPV e muitos tipos oncogênicos levando ao desenvolvimento de displasias e neoplasias (Porro *et al.*, 2003).

A incidência do câncer cervical é elevada em mulheres HIV positivas comparadas com mulheres HIV negativas, além do que outro estudo indica que homens que fazem sexo com outros homens HIV positivos têm duas vezes mais chance de desenvolver câncer anal do que homens homossexuais HIV negativos (Mahdavi e Monk, 2005)

Diversos estudos vêm demonstrando uma interferência na presença de co-infecções com o aumento e a facilitação da transmissão do HIV, porém mais estudos devem ser realizados para esclarecimentos destes dados (Rodrigues e Abath, 2000; Kouri *et al.*, 2002). Nosso grupo identificou que homens infectados pelo HIV apresentam maior diversidade de tipos de HPV comparados àqueles não infectados pelo HIV, assim como tipos de HPV com potencial oncogênico (Carvalho *et al.* 2005). Segundo Arhtag (1989), grande parte das DST ocasiona lesões ulcerativas e/ou e inflamatórias, facilitando a transmissão do vírus (Arhtag, 1989).

Recentes estudos têm mostrado um aumento na prevalência e na persistência da infecção pelo HPV 16 e 18 no trato genital de mulheres soropositivas para o HIV, promovendo a progressão para a neoplasia epitelial cervical, o que se apresenta de forma mais pronunciada em mulheres com a contagem de células T CD4+ menor que $200 \times 10^6/L$ (Marais *et al.*, 2000; Fernandes *et al.*, 2005). Porém, ainda não está claro se o HIV-1 influencia diretamente na patogênese da doença associada à infecção pelo HPV, devido às interações moleculares com os genes do HPV e através dos seus efeitos no sistema imune (Marais *et al.*, 2000).

1.11 HPV E URINA

O epitélio da bexiga é susceptível a infecção pelo HPV, como o epitélio cérvico-vaginal. Por esta razão, a urina é uma fonte alternativa em potencial de HPV. Alguns estudos para a detecção do DNA do HPV em urina têm sido realizados, porém, quando a presença do HPV é comparada entre amostras cervicais e amostras de urina, a investigação leva desvantagem pelo uso de diferentes métodos de detecção do HPV e pela falta de comparações tipo-específicas, mas quando comparadas, a concordância tipo-específica é alta (Stanczuk *et al.*, 2003).

Métodos de detecção de DNA na urina de pacientes têm sido utilizados para diagnosticar outras infecções sexualmente transmissíveis que afetam a cérvix uterina, como *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*. O sucesso destes programas de triagem fornece uma maior atenção para monitorar as patologias cervicais pela detecção de HPV DNA (Brinkman *et al.*, 2002).

Recentemente, alguns autores reportaram que o HPV pode ser detectado a partir de espécimes de urina de mulheres com carcinoma intraepitelial e invasivo, com alta concordância entre a detecção de HPV por amostras da cérvix e de urina. Estes resultados sugerem que a detecção pela urina pode ser utilizada para o desenvolvimento de novas estratégias de triagem (Fambrini *et al.*, 2008).

O rendimento do DNA do HPV na urina pode ser aumentado pela coleta de células epiteliais, amostras do primeiro jato de urina e pelo uso de amostras com alto volume para realização da extração e a reação da PCR (Stanczuk *et al.*, 2003).

Em mulheres, o uso da urina para a detecção do HPV é devido ao fato de que a parede epitelial do cérvix uterino e/ou da vagina contém células esfoliadas que são eliminadas juntamente na urina. Logo, o uso da urina para a detecção da infecção genital pelo HPV é um diagnóstico útil e conveniente para a triagem não-invasiva em mulheres assintomáticas, que podem conter algum tipo de HPV de alto risco para a patogênese do câncer (Prusty *et al.*, 2005).

Umas das dificuldades de se estudar a presença do HPV em homens é qual tipo de amostra utilizar e qual o método de diagnóstico, já que alguns sítios de infecção ainda não estão totalmente estabelecidos. Porém, muitos estudos têm mostrado elevada sensibilidade de detecção do DNA do HPV em urina (Strauss *et al.*, 1999; Zambrano *et al.*, 2002; Stanczuk *et al.*, 2003; Golijow *et al.*, 2005; Gupta *et al.*, 2006; Jong *et al.*, 2008)., enquanto outros estudos têm mostrado baixa sensibilidade (Forslund *et al.*, 1993; Fife *et al.*, 2003; Weaver *et al.*, 2004)

Não há métodos de triagem padronizados para detecção de HPV em homens infectados e assintomáticos (D'hauwers *et al.*, 2007). Devido ao aumento da sensibilidade dos métodos utilizados para detectar HPV, amostras contendo baixos níveis de DNA, como a urina, tornou-se viável a sua utilização como fonte de detecção de HPV (Stanczuk *et al.*, 2003). A detecção de HPV DNA na urina pode ser uma possibilidade real devido a alta concordância encontrada quando esta é comparada a outros métodos de detecção (Strauss *et al.*, 1999; Zambrano *et al.*, 2002; Stanczuk *et al.*, 2003; Golijow *et al.*, 2005; Gupta *et al.*, 2006; Jong *et al.*, 2008).

1.12 VACINAS PARA HPV

Dois tipos de vacinas podem ser distinguidos: as vacinas terapêuticas que induzem uma resposta imune celular contra células epiteliais infectadas pelo HPV e as vacinas profiláticas, que induzem a produção de anticorpos neutralizantes dos vírus protegendo contra novas infecções, porém não de infecções já existentes (Tjalma *et al.*, 2004).

Apesar do sucesso do desenvolvimento da vacina anti-HPV, com dois produtos aprovados pelo FDA recentemente (vacina da Merck e da GlaxoSmith-Kline), uma vacina quadrivalente para HPV-6, 11, 16 e 18 e uma bivalente para HPV-16 e 18, respectivamente (Mahdavi e Monk, 2005), ainda é desconhecido o impacto sobre uma população com alto grau de vulnerabilidade pela imunossupressão, como pessoas infectadas pelo HIV (Pinto *et al.*, 2005).

É importante a realização de estudos mostrando a diversidade genética do HPV, visto que há a necessidade de incluir na vacina, antígenos dos tipos de HPV circulantes em nosso meio, já que variações geográficas na prevalência têm sido descritas (Camara *et al.*, 2003).

Uma vacina que previne a infecção persistente pelo HPV-16 pode reduzir drasticamente a incidência do câncer cervical e seus precursores. Uma das vacinas aprovada utiliza VLPs, que são capsídeos virais não-infecciosos. Em modelos experimentais, a vacinação com VLPs de L1 podem induzir altos títulos de

anticorpos neutralizantes que conferem proteção contra altas doses experimentais do HPV (Pinto *et al.*, 2005).

Estudos recentes demonstraram que a administração de VLPs, derivadas de HPV-16, diminui consideravelmente a infecção específica, levando a redução de doenças relacionadas a este tipo de HPV. A administração oral destas VLPs leva a produção de anticorpos específicos do capsídeo em ratos, isto indica que a vacinação oral contra o HPV é uma possibilidade concreta (Biemelt *et al.*, 2003).

Uma vacina quadrivalente com uma mistura de quatro VLPs específicas derivadas das proteínas do capsídeo MAJOR L1 do HPV 6, 11, 16 e 18, sintetizadas em *Saccharomyces cerevisiae* foi desenvolvida para proteger contra as doenças comuns relacionadas ao HPV e é esperada uma redução substancial da morbidade, mortalidade e custos com o tratamento da infecção (Villa, 2007).

Foi demonstrada alta eficácia em mulheres não infectadas por HPV prevenindo cânceres cervical, vulvar, vaginal e lesões genitais externas causadas pelos quatro tipos presentes na vacina. Com base nos resultados positivos, atualmente mais de 60 países, incluindo Estados Unidos e a União Européia aprovaram o uso da vacina quadrivalente para uso clínico (Villa, 2007).

2 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a prevalência de HPV em amostras de urina em homens assintomáticos e infectados pelo HIV-1.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Verificar a prevalência do HPV (HPV-DNA) e os tipos circulantes na urina de homens soropositivos para o HIV-1;
2. Identificar fatores de risco para a co-infecção HPV/HIV em homens;
3. Verificar relação entre imunidade e viremia do HIV durante a co-infecção HPV/HIV.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Foram coletadas 223 amostras de urina de homens soropositivos para o HIV-1, provenientes do Serviço de Doenças sexualmente Transmissíveis do Departamento de Dermatologia do HC/FMUSP e do Centro de Referência e Treinamento em DST/AIDS. Após o participante concordar e assinar o TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido), ele respondeu ao questionário com informações sócio-comportamentais, presença ou passado de DST, carga viral para HIV, contagem de linfócitos CD4 e tempo do primeiro exame sorológico para HIV. Depois, foi a uma sala de coleta e coletou uma amostra de urina.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO: Somente indivíduos adultos com sorologia positiva para HIV-1 com idade superior a 18 anos.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO: Foram excluídos do estudo os pacientes que possuíam infecções oportunistas, uso de imunomoduladores ou supressores, além de dados incompletos.

ASPECTOS ÉTICOS: Este estudo foi realizado com a apreciação e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Referência e Treinamento em DST/AIDS (CRT/AIDS) do Programa Estadual de São Paulo e Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HC/FMUSP. Somente os pacientes adultos com idade superior a 18 anos, que assinaram o consentimento livre e esclarecido, fizeram parte desta pesquisa. Todos os dados individuais são confidenciais e em nenhum momento foram ou serão divulgados.

3.2 METODOLOGIA

Após a coleta, as amostras foram centrifugadas, aliquotadas e armazenadas a -70°C , para posterior análise.

3.3 TÉCNICAS MOLECULARES

3.3.1 EXTRAÇÃO DE DNA

A urina coletada foi utilizada para a realização da extração de DNA. Essa amostra foi centrifugada a $1275 \times g$ por 15 minutos e o sobrenadante retirado, sendo utilizadas as células. Estas amostras foram submetidas a um processo de extração

de DNA por meio do reagente comercialmente disponível (GFX Genomic Blood DNA Purification Kit, Amersham Pharmacia Biotech, Inc, Piscataway, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as células foram agitadas e homogeneizadas e foi adicionado 500 µl de solução de extração (Extraction Solution), deixando por 10 minutos à temperatura ambiente. O conteúdo foi transferido para colunas de sílica e centrifugado a 680 xg por 3 minutos, descartando-se o tubo coletor. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes. Acrescenta-se 500 µl de solução de lavagem (Wash Solution), centrifugando a 1020 xg por 5 minutos. A coluna foi colocada em tubo cônico de 1.5 ml, identificado, e adicionou-se 70 µl de água aquecida previamente a 70 °C, deixando aproximadamente por 15 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação a 680 xg por 3 minutos, o DNA genômico foi guardado em freezer a -20°C.

3.3.2 PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE L1 DO HPV

As amostras de DNA extraído foram amplificadas empregando-se os oligonucleotídeos PGMY9 e PGMY11 (descritos por Manos et al. 1989; Gravitt et al. 2000, tabela 1) que amplificam uma região conservada de 450 pares de bases do gene L1 de vários tipos de HPV, adaptando-se à técnica de PCR Real Time utilizando-se SYBR[®] Green. Os iniciadores PGMY09/PGM11 são degenerados em algumas posições. Assim, o anelamento é possível a mais de um tipo de nucleotídeo durante a reação da PCR e, desta maneira, a amplificação de um grande espectro de HPV genitais. Para 20 µL da reação foram utilizadas as seguintes concentrações finais de cada reagente: Um mistura de 0.01 µmol dos primers PGMY9/PGMY11 e 10 µL de Tampão SYBR[®] GreenER qPCR Supermix Universal (Invitrogen, Carlsbad,

Califórnia, EUA). Foram incluídos controles positivos e negativos na reação. Um passo inicial de 4 minutos a 95 °C para desnaturação seguida de 45 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 95 °C; 1 minuto de anelamento a 58 °C e 1 minuto a 72 °C para a extensão, seguido de um último passo de 7 minutos a 72 °C para a extensão final. O melt curve foi realizado com a finalidade de detectar primers dimers e analisar a especificidade da reação, com temperatura inicial de 60 °C + 0.5 °C/ciclo, 30 segundos.

Designação do Primer	Seqüências do Primer (5'-3')
PGMY11 – A	GCA CAG GGA CAT AAC AAT GG
PGMY11 – B	GCG CAG GGC CAC AAT AAT GG
PGMY11 – C	GCA CAG GGA CAT AAT AAT GG
PGMY11 – D	GCC CAG GGC CAC AAC AAT GG
PGMY11 – E	GCT CAG GGT TTA AAC AAT GG
PGMY09 – F	CGT CCC AAA GGA AAC TGA TC
PGMY09 – G	CGA CCT AAA GGA AAC TGA TC
PGMY09 – H	CGT CCA AAA GGA AAC TGA TC
PGMY09 – I	G CCA AGG GGA AAC TGA TC
PGMY09 – J	CGT CCC AAA GGA TAC TGA TC
PGMY09 – K	CGT CCA AGG GGA TAC TGA TC
PGMY09 – L	CGA CCT AAA GGG AAT TGA TC
PGMY09 – M	CGA CCT AGT GGA AAT TGA TC
PGMY09 – N	CGA CCA AGG GGA TAT TGA TC
PGMY09 – P	G CCC AAC GGA AAC TGA TC
PGMY09 – Q	CGA CCC AAG GGA AAC TGG TC
PGMY09 – R	CGT CCT AAA GGA AAC TGG TC

Tabela 1. Seqüência de nucleotídeos que foram utilizadas para PCR para detecção de HPV DNA. Adaptado de Gravitt et al. 2000.

3.3.3 PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE β -actina

As amostras de DNA com resultado negativo para o PCR Real Time com os primers degenerados PGMY09/11 foram submetidas a uma PCR com oligonucleotídeos para β -actina 5' (5' - AGC GGG AAA TCG TGC GTG - 3') e β -actina 3' (5' - CAG GGT ACA TGG TGG TGC - 3') que amplificam um fragmento de 317 pb do gene humano da β -actina, como descrito previamente (Gall *et al.*, 1993).

A PCR foi realizada em volume de 50 μ L contendo 0.2 mM de dNTPs, 2 mM de $MgCl_2$, 0.01 μ mol de cada primer e 0.5 U de Taq DNA polimerase (Amersham Pharmacia Biotech, New Jersey, EUA) em tampão 1X (10mM Tris-HCl e 50mM KCl). Uma reação contendo todos os componentes acima citados e sem DNA foi incluída em todas as amplificações como controle negativo.

3.3.4 PCR COM PRIMERS TIPO-ESPECIFICO

Para confirmar a presença de HPV-16, 18, 6 e 11 nas amostras que apresentaram positividade para HPV DNA, foi realizada uma PCR convencional utilizando-se primers tipo específicos para cada tipo mencionado (Tabela 2) (Naqvi *et al.*, 2004). A PCR com primers tipo-específicos foi realizada em volume de 25 μ L contendo 0.2 mM de dNTPs, 2 mM de $MgCl_2$, 0.01 μ mol de cada primer e 0.5 U de Taq DNA polimerase (Amersham Pharmacia Biotech, New Jersey, EUA) em tampão 1X (10mM Tris-HCl e 50mM KCl). Uma reação contendo todos os componentes acima citados e sem DNA foi incluída em todas as amplificações como controle negativo, sendo o controle positivo o DNA de amostras sabidamente positivas de

cada tipo doadas pelo Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

HPV-6	5'-TAGTGGGCCTATGGCTCGTC-3'
	(Forward Primer)
	5'-TCCATTAGCCTCCACGGGTG-3'
	(Reverse Primer)
HPV-11	5'-GGAATACATGCGCCATGTGG-3'
	(Forward Primer)
	5'-CGAGCAGACGTCCGTCCTCG-3'
	(Reverse Primer)
HPV-16	5'-AAGGCCAACTAAATGTCAC-3'
	(Forward Primer)
	5'-CTGCTTTTATACTAACCGG-3'
	(Reverse Primer)
HPV-18	5'-ACCTTAATGAAAAACCACGA-3'
	(Forward Primer)
	5'-CGTCGTTGGAGTCGTTCTG-3'
	(Reverse Primer)

Tabela 2. Sequência de nucleotídeos utilizados para PCR Tipo específico (Adaptado de Naqvi et al., 2004).

3.3.5 Seqüenciamento

A região LCR, com cerca de 500 a 1000 Pb contidas nos produtos de PCR das amostras, foram purificadas pelo kit “ChargeSwitch® PCR Clean-Up Kit” (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), a fim de retirar o excesso de iniciadores e dNTPs da reação, seguindo as instruções do fabricante.

A reação de seqüenciamento (“cycle sequencing”) foi realizada na concentração de, aproximadamente, 100 ng de produto de PCR, 0.005 μ mol de cada iniciador, 8 μ l de dideoxiribonucleotídeos fluorescentes (Big dye terminators, Perkin Elmer Cetus, Emerville, CA, EUA) e água para completar o volume final de 10 μ l. Posteriormente, a mistura acima foi submetida a 25 ciclos de amplificação a 96°C por 10 segundos para a abertura das fitas de DNA, 50°C por 5 segundos para o anelamento dos iniciadores e 60 °C por 4 minutos para a atuação da enzima polimerase. Foi realizada purificação do produto da reação de seqüenciamento, por meio de isopropanol – etanol para retirada do excesso de dideoxiribonucleotídeos fluorescentes.

Resumidamente, a todo conteúdo do produto da reação de seqüenciamento foram acrescentados 80 μ l de isopropanol 75%, que foram misturados e deixados à temperatura ambiente por quinze minutos. Foram centrifugados por 20 minutos a 1105 xg, removendo-se, depois, todo o sobrenadante. Foram colocados 200 μ l de etanol 70%, misturados por inversão e centrifugados por 20 minutos a 1105 xg. Todo o sobrenadante foi retirado e repetido o procedimento anterior.

Após descarte do sobrenadante, o material centrifugado no fundo do tubo foi secado por aproximadamente uma hora a temperatura ambiente. Após este procedimento, os “pellets” foram estocados a –20°C. Para realizar a corrida eletroforética foi ressuspendido, o “pellet” em 6 μ l da solução de formamida – dextran na concentração de 5:1.

As amostras foram corridas em um seqüenciador automático de DNA (Applied Biosystem-377, Perkin Elmer, Foster city, CA, EUA) e analisadas por meio do programa "Sequence Navigator" (Perkin Elmer, Foster city, CA, EUA). As sequências obtidas da região LCR foram analisadas, comparando-se com amostras já seqüenciadas do HPV. Foram utilizados controles negativos em todos os experimentos para obtenção de um maior controle de qualidade.

3.3.6 Análise estatística

O tipo de amostra que foi utilizado pelo estudo foi de conveniência. Foi utilizado o programa "Epi-Info" versão 6.04; CDC, Atlanta, GA, para análise estatística. A análise estatística foi realizada com freqüência simples. A análise de significância foi realizada por meio do teste de χ^2 corrigido com testes Yates ou para as variáveis contínuas não paramétricas pelo teste de Kruskal-Wallis. A figura 15 demonstra um roteiro simplificado das técnicas utilizadas no trabalho.

Figura 15: Roteiro das técnicas de detecção do HPV.

4 Resultados

O DNA do HPV foi detectado em 69 (30.9%) pacientes por meio do Real Time PCR utilizando-se Sybr Green[®] (figuras 16 e 17). Dentre eles, vinte e dois homens apresentaram o HPV-16; dezoito homens tinham DNA do HPV-11; quatro apresentaram o HPV-6 e cinco, o HPV-18, por meio de PCR convencional com primers tipo específicos (Figura 18). Vinte homens não tiveram o tipo de HPV determinado, provavelmente por estar infectado por outros tipos de HPV não propostos em nossa pesquisa. Além de cinco pacientes apresentarem co-infecções com vários tipos de HPV (tabela 3, figura 19). Todos os pacientes foram positivos para a PCR da β -actina.

Figura 16: PCR Real Time. Sessenta e nove pacientes apresentaram HPV DNA.

Figura 17: Curva de melting dos pacientes HPV positivos.

Figura 18: Gel de agarose 2% com amostras positivas para cada tipo de HPV proposto no estudo.

Figura 18: Prevalência dos tipos de HPV e co-infecções.

4.1 Seqüenciamento

Amostras positivas para os HPVs 6, 11, 16 e 18 na PCR da região LCR foram submetidas a um seqüenciamento direto desta região, porém não obtivemos resultados satisfatórios para os tipos 6, 11 e 18. Sugerimos que devido à baixa concentração de DNA encontrada em cada amostra e pelo aparecimento de bandas inespecíficas (por análise em gel de eletroforose), o seu seqüenciamento não foi viável para uma análise mais detalhada e conclusiva.

Obtivemos sucesso no seqüenciamento da região LCR de duas amostras positivas para o HPV-16. O objetivo de nossa pesquisa era observar possíveis mutações no tipo circulante em nossos pacientes. Estas duas amostras foram confrontadas com as seqüências completa do genoma (NC_001526) e da região LCR (EU650485) do HPV-16 publicadas no Genbank e não foi encontrada nenhuma mutação ou diferença de nucleotídeos entre as amostras e as seqüências publicadas (dados não mostrados).

Tabela 3. Características Demográficas e sociais dos indivíduos infectados pelo HIV-1.

Características	HPV + (n=69)	HPV - (n=154)	Valor de p
Idade			
18-29	3 (4.3%)	4 (2.6%)	0.61
30-39	13 (18.8%)	36 (23.4%)	
≥ 40	53 (76.9%)	114 (74%)	
Escolaridade			
1º Grau	22 (31.9%)	45 (29.2%)	0.52
2º Grau	28 (40.6%)	55 (35.7%)	
Superior	16 (23.2%)	50 (32.5%)	
Não respondeu	3 (4.3%)	4 (2.6%)	
Sálarios Mínimos			
0 - 4 Salários mínimos	40 (58%)	92 (59.8%)	0.27
≥ 5 Salários Mínimos	22 (31.9%)	55 (35.7%)	
Não sabe ou não respondeu	7 (10.1%)	7 (4.5%)	
Situação Marital			
Casado	15 (21.7%)	47 (30.5%)	0.36
Não casado	50 (72.5%)	101 (65.6%)	
Não Respondeu	4 (5.8%)	6 (3.9%)	
Raça/Cor			
Branco	35 (50.7%)	86 (55.8%)	0.50
Não Branco	29 (42%)	62 (40.3%)	
Não Respondeu	5 (7.3%)	6 (3.9%)	

Tabela 4. Histórico de práticas sexuais dos pacientes envolvidos no estudo.

Características	HPV + (n=69)	HPV - (n=154)	Valor de p
Idade da primeira relação sexual			
≤14 Anos	23 (33.4%)	62 (40.3%)	0.22
≥15 Anos	39 (56.5%)	85 (55.2%)	
Não responde	7 (10.1%)	7 (4.5%)	
Relações sexuais nos últimos 12 meses			
Nenhuma	8 (11.6%)	13 (8.5%)	0.78
Somente com mulheres	19 (27.6%)	38 (24.7%)	
Tanto homens e mulheres	2 (2.9%)	7 (4.5%)	
Somente homens	37 (53.6%)	92 (59.7%)	
Não respondeu	3 (4.3%)	4 (2.6%)	
Uso de preservativo com parceiro fixo			
Não tem parceiro fixo	30 (43.5%)	60 (39%)	0.81
Sempre usa preservativo	28 (40.6%)	66 (42.8%)	
As vezes usa preservativo	4 (5.8%)	14 (9.1%)	
Nunca usa preservativo	1 (1.4%)	4 (2.6%)	
Não respondeu	6 (8.7%)	10 (6.5%)	
Uso de preservativo com parceiro eventual			
Não tem parceiro eventual	23 (33.3%)	46 (29.9%)	0.19
Sempre usa preservativo	39 (56.5%)	92 (59.7%)	
As vezes usa preservativo	1 (1.5%)	9 (5.9%)	
Nunca usa preservativo	0 (0%)	2 (1.3%)	
Não respondeu	6 (8.7%)	5 (3.2%)	
Número de mulheres com quem teve relações sexuais nos últimos 12 meses			
0 - 1	50 (72.5%)	122 (79.2%)	0.66
2 - 4	9 (13%)	15 (9.7%)	
≥ 5	4 (5.8%)	5 (3.3%)	
Não respondeu	6 (8.7%)	12 (7.8%)	

**Número de homens com quem
teve relações sexuais nos
últimos 12 meses**

0 - 1	35 (50.7%)	91 (59.1%)	0.50
2 - 4	12 (17.4%)	22 (14.3%)	
> 5	16 (23.2%)	34 (22.1%)	
Não respondeu	6 (8.7%)	7 (4.5%)	

**Prática de relações anais
como ativo**

Não pratica	26 (37.7%)	43 (27.9%)	0.38
Sempre usa preservativo	37 (53.6%)	88 (57.1%)	
Às vezes usa preservativo	5 (7.3%)	20 (13%)	
Não respondeu	1 (1.4%)	3 (2%)	

**Prática de relações anais
como passivo**

Não pratica	31 (44.9%)	75 (48.7%)	0.91
Sempre usa preservativo	31 (44.9%)	66 (42.9%)	
Às vezes usa preservativo	5 (7.3%)	8 (5.2%)	
Nunca usa preservativo	0 (0%)	1 (0.6%)	
Não respondeu	2 (2.9%)	4 (2.6%)	

**Prática de Relação Oral como
ativo**

Não pratica	30 (43.5%)	59 (38.3%)	0.004
Sempre usa preservativo	6 (8.7%)	21 (13.6%)	
Às vezes usa preservativo	16 (23.2%)	24 (15.6%)	
Nunca usa preservativo	13 (18.8%)	50 (32.5%)	
Não respondeu	4 (5.8%)	0 (0%)	

**Prática de Relação Oral como
Passivo**

Não pratica	25 (36.3%)	55 (35.7%)	0.11
Sempre usa preservativo	17 (24.6%)	28 (18.2%)	
Às vezes usa preservativo	17 (24.6%)	25 (16.2%)	
Nunca usa preservativo	10 (14.5%)	45 (29.2%)	
Não respondeu	0 (0%)	1 (0.7%)	

Rota de Infecção

Homem que faz sexo com mulher (HSM)	10 (14.5%)	25 (16.2%)	0.24
Homem que faz sexo com homem (HSH)	31 (44.9%)	88 (57.1%)	
Usuário de drogas injetáveis	3 (4.4%)	4 (2.6%)	
Transfusão	2 (2.9%)	1 (0.7%)	
Não sabe/ não responde	23 (33.3%)	36 (23.4%)	

Tabela 6. Características Clínicas e Laboratoriais

Características	HPV + (n=69)	HPV - (n=154)	Valor de p
Corrimento			
Sim	25 (36.2%)	49 (31.8%)	0.80
Não	40 (58%)	95 (61.7%)	
Não respondeu	4 (5.8%)	10 (6.5%)	
Verrugas genitais			
Sim	25 (36.2%)	42 (27.3%)	0.14
Não	37 (53.6%)	103 (66.9%)	
Não lembra ou não respondeu	7 (10.2%)	9 (5.8%)	
Lesões			
Sim	9 (13%)	42 (27.3%)	0.06
Não	53 (76.8%)	100 (64.9%)	
Não lembra ou não respondeu	7 (10.2%)	12 (7.8%)	
Uso de Anti-Retroviral			
Sim	60 (87%)	115 (74.7%)	0.03
Não	6 (8.7%)	35 (22.7%)	
Não Responde	3 (4.3%)	4 (2.6%)	

Carga Viral inicial (Primeira Carga viral após o diagnóstico positivo para HIV)			
≥1000 copies/ml	52 (75.4%)	100 (64.9%)	0.30
<1000 copies/ml	12 (17.4%)	38 (24.7%)	
Sem Dados	5 (7.2%)	16 (10.4%)	
Carga Viral Atual (Última carga Viral)			
≥1000 copies/ml	25 (36.2%)	91 (59.1%)	0.0002
<1000 copies/ml	39 (56.5%)	43 (27.9%)	
Sem dados	5 (7.3%)	20 (13%)	
Contagem inicial de Células TCD4+ (Primeira contagem após o diagnóstico positivo para HIV)			
< 200	25 (36.2%)	42 (27.3%)	0.23
≥ 200	37 (53.6%)	101 (65.6%)	
Sem dados	7 (10.2%)	11 (7.1%)	
Contagem de células TCD4+ Atual (Última contagem de TCD4+)			
< 200	13 (18.8%)	19 (12.3%)	0.30
≥ 200	51 (73.9%)	117 (76%)	
Sem dados	5 (7.3%)	18 (11.7%)	

5 Discussão

O HPV é a causa mais comum de doenças sexualmente transmissíveis de etiologia viral em todo o mundo, com ao menos 30 tipos de HPV infectando a região anogenital (Brinkman *et al.*, 2004).

Nosso estudo identificou 30.9% de prevalência de HPV DNA na urina de homens, o que corresponde aos dados que se têm na literatura (Strauss *et al.*, 1999; Sellors *et al.*, 2000; Stanczuk *et al.*, 2003; Golijow *et al.*, 2005; Prusty *et al.*, 2005;

Smits *et al.*, 2005; Daponte *et al.*, 2006; Gupta *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2007; Jong *et al.*, 2008).

Strauss em 1999 encontrou HPV DNA em 78% e 65%, em amostras cervicais e urina, respectivamente, sendo que foi demonstrado 76% de paridade entre os dois tipos de amostras (Strauss *et al.*, 1999). Sells e cols. em 2000 demonstraram a presença de HPV DNA em 45% das pacientes por meio do uso de urina, sendo que o grupo encontrou pelo menos 1 entre 6 tipos de HPV de alto risco oncogênico na urina ou amostras cervicais em 69% das mulheres testadas. A especificidade do teste foi de quase 99% nas amostras de urina (Sells *et al.*, 2000).

O HPV-16 foi o tipo mais prevalente encontrado em nosso estudo entre os pacientes HIV-1 positivos, como descrito em trabalhos anteriores (Sells *et al.*, 2000; Stanczuk *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2007). Em trabalho de Stanczuk, o HPV-16 estava presente em (25/42) 59% e (19/31) 61% das amostras de raspado cervical e de urina, respectivamente (Stanczuk *et al.*, 2003). Golijow em trabalho realizado na Argentina dividiu 2 grupos: o primeiro grupo, homens com parceiras sexuais com diagnóstico positivo para HPV e o segundo grupo, homens com lesões penianas, sendo que foi encontrado 69% e 80% de positividade para HPV-16 na urina, respectivamente (Golijow *et al.*, 2005).

A detecção do HPV é bem maior entre mulheres jovens e parece diminuir com o aumento da idade. Nos homens, a infecção aparenta ser bem comum, porém é menos estudada do que a infecção em mulheres (Queiroz *et al.*, 2004). Em razão da

alta prevalência mundial de HPV em mulheres (2 a 44%) e devido falta de sintomas nos homens, pesquisadores buscam por métodos de diagnósticos mais sensíveis e específicos (Nicolau *et al.*, 2005).

O atual método de triagem para o câncer cervical é um exame pélvico precoce e o exame de Papanicolau, que detecta alterações celulares ou lesões pré-malignas da região cervical. Porém, há diversos problemas quanto a estes métodos. O Papanicolau requer um exame pélvico que é um método invasivo e desconfortável para a paciente, consumindo muito tempo e menos aplicado nos países do terceiro mundo. Apenas 15-50% das pacientes com HPV são identificadas por um simples teste, necessitando de outros testes para uma maior eficácia (Brinkman *et al.*, 2004).

Acredita-se que a natureza assintomática da infecção pelo HPV em homens é responsável pela sustentação da transmissão para as suas parceiras. Os homens são um importante reservatório de infecção pelo HPV e podem desempenhar um papel determinante na transmissão do HPV para as mulheres (Golijow *et al.*, 2005). Desde que esta condição foi sugerida, a triagem de HPV em homens torna-se relevante para a prevenção de câncer cervical nas mulheres (Giovannelli *et al.*, 2007).

A utilização da citologia oncológica do colo cervical, pelo método Papanicolau, tem contribuído para a detecção precoce do HPV e conseqüente redução de três quartos dos casos de câncer cervical durante os últimos 50 anos. Entretanto, este teste mostra altas taxas de falso-negativos, sendo uma limitação crítica (Franco e

Harper, 2005). Porém, muitos cientistas têm focado sua atenção na infecção pelo HPV em homens (Geipert, 2005).

Na ausência de lesões clínicas, a estratégia de diagnóstico mais confiável para homens é o teste para detecção de HPV DNA. As taxas de infecção por HPV em homens variam de 1% a 82.9%, devido a diferentes perfis de pacientes e diferentes ensaios de detecção com diferentes materiais clínicos utilizados (exemplo: superfície peniana, cavidade prepucial, glândula, escroto, uretra, sêmen e urina), devido a falta de acordo em relação aos sítios anatômicos que deveriam ser utilizados (Giovannelli *et al.*, 2007).

Muitos estudos têm demonstrado que mesmo com ausência de lesões clínicas, a uretra masculina é um reservatório de HPV, explicando as recidivas após o tratamento dos parceiros sexuais. A prevalência variou de 17% a 50% (Aynaud *et al.*, 2003). Foram encontradas altas taxas de prevalência de infecção por HPV no sêmen de homens com lesão e sem lesão. Estes dados foram correlacionados com existência de lesões nas suas respectivas parceiras (Aynaud *et al.*, 2002).

Na literatura, muitos estudos têm testado HPV na urina (Strauss *et al.*, 1999; Stanczuk *et al.*, 2003; Brinkman *et al.*, 2004; Daponte *et al.*, 2006). Um estudo conduzido em 1989 mostrou que 88% dos homens testados para a detecção do DNA do HPV-6 e/ou HPV-11 foram positivos, utilizando-se a PCR para diagnóstico em amostras de urina (Melchers *et al.*, 1989). Outro estudo demonstrou que 73% dos pacientes com lesões penianas e com parceiros positivos para o HPV

apresentavam o HPV DNA. Estes dados sugerem que amostras de urina são muito úteis na detecção e genotipagem do HPV DNA em populações de homens de alto risco (Golijow *et al.*, 2005).

Hillman e cols. encontraram 12.5% de prevalência de HPV DNA em amostras de urina de homens que também tinham gonorréia. Neste trabalho os tipos 11, 16 e 18 foram os tipos mais prevalentes, o que corrobora nossos resultados. Os tipos chamados de alto risco foram encontrados em 73% dos pacientes positivos para o HPV DNA submetidos ao teste, utilizando urina. (Hillman *et al.*, 1993).

Weaver comparou diferentes sítios de infecção, entre eles, urina e encontrou 6% de HPV DNA nesta amostra biológica, a qual teve diferença estatística em relação aos outros sítios de infecção como região peniana, glândula e bolsa escrotal (Weaver *et al.*, 2004).

Smits em 2005 encontrou 39.4% e 9.6% de prevalência de HPV DNA, em homens HIV positivos e negativos, respectivamente. No grupo HIV negativo, os tipos de HPV-16 e HPV-74 foram, numericamente, os mais importantes enquanto que no grupo HIV positivo, o HPV-52 foi o tipo mais prevalente. Neste trabalho o uso da urina foi bem satisfatória para a detecção de HPV DNA (Smits *et al.*, 2005), concordando com os nossos achados .

A urina é de simples coleta e pode fornecer um espécime conveniente não-invasivo para triagem de infecção por HPV em larga escala da população masculina

(Geddy *et al.*, 1993). Testes que detectam o HPV DNA tornaram-se úteis para aumentar a sensibilidade da citologia cervical convencional. Uma vez que, a maioria utiliza um swab para coleta, pacientes relatam desconforto e stress emocional em relação ao exame colposcópico. Logo, um método confiável e que não fosse invasivo aumentaria a taxa de participação nos programas de triagem. A utilização de urina proporcionaria uma triagem preliminar para o câncer cervical e contornaria a necessidade do teste de Papanicolau para as mulheres que foram HPV DNA negativas (Song *et al.*, 2007).

Foi encontrada alta especificidade de detecção de HPV na urina no trabalho de Song *et al.* (2007), que mostra a presença do HPV DNA em mais de 70% de mulheres com neoplasia intraepitelial cervical. Outro trabalho com mulheres com citologia oncótica positiva detectou 35.1% de HPV utilizando captura híbrida, sendo 2.6% infectados por tipos de baixo risco; 30.8% infectados por tipos de alto risco e co-infecção entre tipos de alto e baixo risco foi de 1.7% (Sapy *et al.*, 2007), o que corrobora os dados obtidos por nosso estudo.

Um trabalho utilizou um teste de ELISA para detectar anticorpos IgG para as VLPs do HPV-16 e 68% das pessoas testadas foram positivas para este anticorpo, em pacientes soropositivos para o HIV-1 (Marais *et al.*, 2000). Em trabalho de 2003 com mulheres indígenas do Zimbábue, todas elas com carcinoma invasivo de células escamosas e a maioria apresentando estágio avançado de câncer cervical, foi utilizado como espécime células coletadas com swab e urina. Nas amostras de swab cervical e urina, 98% e 72% apresentaram o HPV DNA, respectivamente

(Stanczuk *et al.*, 2003). A prevalência foi maior do que a encontrada em nosso estudo, porém em mulheres já com estágio avançado de câncer, enquanto que nossa coorte foi de homens assintomáticos.

Alguns fatores de risco foram identificados em nosso estudo, como a prática de relação oral e uso de preservativo ($p=0.004$). Os homens co-infectados relataram não usar sempre o preservativo na relação oral como ativo, tornando-se este um provável fator para a infecção por HPV.

Em nosso estudo, o número de linfócitos TCD4+ maior que 200 cels/ μ L em pacientes HPV/HIV foi menor do que o encontrado nos pacientes não co-infectados. Um grupo em 2008 publicou que a média e mediana de CD4+ foi menor em pacientes com neoplasia epitelial peniana comparados a toda a coorte (Kreuter *et al.*, 2008). Outro trabalho no Quênia mostrou significante baixa no número de TCD4+ e alta no número de cópias de HIV RNA no sangue de mulheres HIV positivas que estavam infectadas com HPV (Yamada *et al.*, 2008). Dado que não foi encontrado em nosso estudo, uma vez que a maioria dos co-infectados por HPV tinham baixa carga viral de HIV e células TCD4+ igual ou maior que 200 células/ μ L.

Estes dados não usuais, de co-infectados HIV/HPV apresentarem significativa carga viral menor que aqueles somente com HIV pode indicar que esse grupo apresenta maior adesão ao tratamento com antiretrovirais e consequente melhora na qualidade de vida. Isto é confirmado com diferença estatística significativa em relação ao uso de antiretrovirais. Isto poderia proporcionar maior número de

parceiros/parceiras e maior exposição sexual ao HPV. Entretanto, não houveram dados significativos de maior quantidade de parceiros nesses grupo. Deste modo, estudos mais detalhados deveriam ser realizados para explicar esses achado.

Testes para HPV utilizando métodos moleculares podem ser mais sensíveis que a citologia para triagem cervical primária e coleta feita pelo próprio paciente pode aumentar as estratégias preventivas. Este tipo de coleta foi altamente concordante com a coleta realizada por médicos (Daponte *et al.*, 2008). Nosso grupo foi um dos primeiros a utilizar a PCR em tempo real para detecção de HPV DNA em urina e obtivemos bons resultados com alta prevalência detectada entre pacientes assintomáticos e sem histórico de HPV. Um trabalho de 2008 descreveu quatro novos ensaio independentes de PCR Real Time que se mostrou um método confiável para determinar a carga viral de HPV (Broccolo e Cocuzza, 2008).

Em trabalho de Daponte et al. (2008), a aplicação de PCR real time aumentou a performance de ambas as amostras do método de auto-coleta para todas as classes histológicas. Quando foram comparados os métodos de Real time PCR com PCR convencional, o primeiro mostrou alta sensibilidade (Daponte *et al.*, 2008). Em conclusão, o método de Real Time PCR se mostrou uma ferramenta útil e prática para a detecção de HPV na urina.

6 Conclusões

1. Alta prevalência de HPV DNA (30.9%) foi encontrada na urina de homens infectados pelo HIV-1, sem sintomas ou histórico de lesões anteriores por HPV;
2. A urina se mostrou um espécime biológico útil e confiável para detecção de HPV, uma vez que os pacientes não apresentavam lesões;
3. Os tipos de HPV 6, 11, 16 e 18, encontrados na vacina liberada há pouco tempo, mostraram alta prevalência confirmando os dados encontrados na literatura de que estes são os principais tipos circulantes em nosso meio;
4. A PCR em tempo Real foi confirmada como uma ferramenta sensível, confiável, útil e rápida para o diagnóstico de HPV DNA, com potencial para se tornar um teste de triagem.
5. O uso da urina como espécime biológico para detecção de HPV DNA se mostrou útil e confiável, uma vez que é um material de fácil obtenção por meio de técnicas não-invasivas e viável para os métodos de detecção, com possibilidade de aumentar a participação de homens e mulheres em processos de triagem.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahrtag. O que você sabe sobre doenças sexualmente transmissíveis? . Ação Anti-AIDS 1989.

Arora, R., A. Kumar, B. K. Prusty, U. Kailash, S. Batra e B. C. Das. Prevalence of high-risk human papillomavirus (HR-HPV) types 16 and 18 in healthy women with cytologically negative Pap smear. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, v.121, n.1, Jul 1, p.104-9. 2005.

Arya, S. K., R. C. Gallo, B. H. Hahn, G. M. Shaw, M. Popovic, S. Z. Salahuddin e F. Wong-Staal. Homology of genome of AIDS-associated virus with genomes of human T-cell leukemia viruses. Science, v.225, n.4665, Aug 31, p.927-30. 1984.

Aynaud, O., M. Ionesco e R. Barrasso. Cytologic detection of human papillomavirus DNA in normal male urethral samples. Urology, v.61, n.6, Jun, p.1098-101. 2003.

Aynaud, O., J. D. Poveda, B. Huynh, A. Guillemotonia e R. Barrasso. Frequency of herpes simplex virus, cytomegalovirus and human papillomavirus DNA in semen. Int J STD AIDS, v.13, n.8, Aug, p.547-50. 2002.

Azar, K. K., M. Tani, H. Yasuda, A. Sakai, M. Inoue e T. Sasagawa. Increased secretion patterns of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha in cervical squamous intraepithelial lesions. Hum Pathol, v.35, n.11, Nov, p.1376-84. 2004.

Baay, M. F., E. F. Kjetland, P. D. Ndhlovu, V. Deschoolmeester, T. Mduluz, E. Gomo, H. Friis, N. Midzi, L. Gwanzura, P. R. Mason, J. B. Vermorken e S. G. Gundersen. Human papillomavirus in a rural community in Zimbabwe: the impact of HIV co-infection on HPV genotype distribution. J Med Virol, v.73, n.3, Jul, p.481-5. 2004.

Bais, A. G., I. Beckmann, J. Lindemans, P. C. Ewing, C. J. Meijer, P. J. Snijders e T. J. Helmerhorst. A shift to a peripheral Th2-type cytokine pattern during the carcinogenesis of cervical cancer becomes manifest in CIN III lesions. J Clin Pathol, v.58, n.10, Oct, p.1096-100. 2005.

Bernard, H. U. Established and potential strategies against papillomavirus infections. J Antimicrob Chemother, v.53, n.2, Feb, p.137-9. 2004.

Bernard, H. U. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. J Clin Virol, v.32 Suppl 1, Mar, p.S1-6. 2005.

Bernard, H. U., S. Y. Chan, M. M. Manos, C. K. Ong, L. L. Villa, H. Delius, C. L. Peyton, H. M. Bauer e C. M. Wheeler. 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, v.170, n.5, Nov, p.1077-85. 1994.

Biemelt, S., U. Sonnewald, P. Galmbacher, L. Willmitzer e M. Muller. Production of human papillomavirus type 16 virus-like particles in transgenic plants. J Virol, v.77, n.17, Sep, p.9211-20. 2003.

Bosch, F. X., A. Lorincz, N. Munoz, C. J. Meijer e K. V. Shah. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. J Clin Pathol, v.55, n.4, Apr, p.244-65. 2002.

Brinkman, J. A., W. E. Jones, A. M. Gaffga, J. A. Sanders, A. K. Chaturvedi, I. J. Slavinsky, J. L. Clayton, J. Dumestre e M. E. Hagensee. Detection of human papillomavirus DNA in urine specimens from human immunodeficiency virus-positive women. J Clin Microbiol, v.40, n.9, Sep, p.3155-61. 2002.

Brinkman, J. A., M. Z. Rahmani, W. E. Jones, A. K. Chaturvedi e M. E. Hagensee. Optimization of PCR based detection of human papillomavirus DNA from urine specimens. J Clin Virol, v.29, n.4, Apr, p.230-40. 2004.

Broccolo, F. e C. E. Cocuzza. Automated extraction and quantitation of oncogenic HPV genotypes from cervical samples by a real-time PCR-based system. J Virol Methods, v.148, n.1-2, Mar, p.48-57. 2008.

Broker, T. R. Structure and genetic expression of papillomaviruses. Obstet Gynecol Clin North Am, v.14, n.2, Jun, p.329-48. 1987.

Brown, D. R. e K. H. Fife. Human papillomavirus infections of the genital tract. Med Clin North Am, v.74, n.6, Nov, p.1455-85. 1990.

Camara, G. N., D. M. Cerqueira, A. P. Oliveira, E. O. Silva, L. G. Carvalho e C. R. Martins. Prevalence of human papillomavirus types in women with pre-neoplastic and neoplastic cervical lesions in the Federal District of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.98, n.7, Oct, p.879-83. 2003.

Carbone, M., G. Klein, J. Gruber e M. Wong. Modern criteria to establish human cancer etiology. Cancer Res, v.64, n.15, Aug 1, p.5518-24. 2004.

Casariello, Z., S. Micinquevich e M. A. Gomez. HPV in "carcinoma in situ" associated with HIV/AIDS infection: a case report. Med Oral, v.7, n.2, Mar-Apr, p.84-8. 2002.

Chan, P. K., M. M. Yu, T. H. Cheung, K. F. To, K. W. Lo, J. L. Cheung e J. H. Tong. Detection and quantitation of human papillomavirus DNA in primary tumour and lymph nodes of patients with early stage cervical carcinoma. J Clin Virol, v.33, n.3, Jul, p.201-5. 2005.

Chan, W. K., G. Klock e H. U. Bernard. Progesterone and glucocorticoid response elements occur in the long control regions of several human papillomaviruses involved in anogenital neoplasia. J Virol, v.63, n.8, Aug, p.3261-9. 1989.

Chin-Hong, P. V. e J. M. Palefsky. Human papillomavirus anogenital disease in HIV-infected individuals. Dermatol Ther, v.18, n.1, Jan-Feb, p.67-76. 2005.

Clerici, M., M. Merola, E. Ferrario, D. Trabattoni, M. L. Villa, B. Stefanon, D. J. Venzon, G. M. Shearer, G. De Palo e E. Clerici. Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. J Natl Cancer Inst, v.89, n.3, Feb 5, p.245-50. 1997.

Correnti, M., H. Rivera e M. E. Cavazza. Detection of human papillomaviruses of high oncogenic potential in oral squamous cell carcinoma in a Venezuelan population. Oral Dis, v.10, n.3, May, p.163-6. 2004.

Cox, J. T. Epidemiology and natural history of HPV. J Fam Pract, v.Suppl, Nov, p.3-9. 2006.

Cruz, M. R., D. M. Cerqueira, W. B. Cruz, G. N. Camara, M. M. Brigido, E. O. Silva, L. G. Carvalho e C. R. Martins. Prevalence of human papillomavirus type 16 variants in the Federal District, Central Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.99, n.3, May, p.281-2. 2004.

D'hauwers, K., C. Depuydt, J. P. Bogers, M. Stalpaert, A. Vereecken, J. J. Wyndaele e W. Tjalma. Urine versus brushed samples in human papillomavirus screening: study in both genders. Asian J Androl, v.9, n.5, Sep, p.705-10. 2007.

Danos, O., M. Katinka e M. Yaniv. Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. EMBO J, v.1, n.2, p.231-6. 1982.

Daponte, A., S. Pournaras, I. Mademtzis, C. Hadjichristodoulou, E. Kostopoulou, A. N. Maniatis e I. E. Messinis. Evaluation of high-risk human papillomavirus types PCR detection in paired urine and cervical samples of women with abnormal cytology. J Clin Virol, v.36, n.3, Jul, p.189-93. 2006.

Daponte, A., A. Tsezou, P. Oikonomou, C. Hadjichristodoulou, A. N. Maniatis, S. Pournaras e I. E. Messinis. Use of real-time PCR to detect human papillomavirus-16 viral loads in vaginal and urine self-sampled specimens. Clin Microbiol Infect, v.14, n.6, Jun, p.619-21. 2008.

De Andrea, M., M. Mondini, B. Azzimonti, V. Dell'oste, S. Germano, G. Gaudino, T. Musso, S. Landolfo e M. Gariglio. Alpha- and betapapillomavirus E6/E7 genes differentially modulate pro-inflammatory gene expression. Virus Res, v.124, n.1-2, Mar, p.220-5. 2007.

De Araujo Souza, P. S. e L. L. Villa. Genetic susceptibility to infection with human papillomavirus and development of cervical cancer in women in Brazil. Mutat Res, v.544, n.2-3, Nov, p.375-83. 2003.

De Koning, M., W. Quint, L. Struijk, B. Kleter, P. Wanningen, L. J. Van Doorn, S. J. Weissenborn, M. Feltkamp e J. Ter Schegget. Evaluation of a novel highly sensitive, broad-spectrum PCR-reverse hybridization assay for detection and identification of beta-papillomavirus DNA. J Clin Microbiol, v.44, n.5, May, p.1792-800. 2006.

De Sanjose, S. e J. Palefsky. Cervical and anal HPV infections in HIV positive women and men. Virus Res, v.89, n.2, Nov, p.201-11. 2002.

De Villiers, E. M., C. Fauquet, T. R. Broker, H. U. Bernard e H. Zur Hausen. Classification of papillomaviruses. Virology, v.324, n.1, Jun 20, p.17-27. 2004.

Delgado, F. G., E. Martinez, M. A. Cespedes, M. M. Bravo, M. C. Navas e A. L. Combata Rojas. Increase of human papillomavirus-16 E7-specific T helper type 1 response in peripheral blood of cervical cancer patients after radiotherapy. Immunology, Sep 5. 2008.

Desaintes, C. e C. Demeret. Control of papillomavirus DNA replication and transcription. Semin Cancer Biol, v.7, n.6, Dec, p.339-47. 1996.

Dyson, N., P. Guida, K. Munger e E. Harlow. Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. J Virol, v.66, n.12, Dec, p.6893-902. 1992.

Dyson, N., P. M. Howley, K. Munger e E. Harlow. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. Science, v.243, n.4893, Feb 17, p.934-7. 1989.

Fambrini, M., C. Penna, A. Pieralli, C. Bussani, M. G. Fallani, K. L. Andersson, G. Scarselli e M. Marchionni. PCR detection rates of high risk human papillomavirus DNA in paired self-collected urine and cervical scrapes after laser CO2 conization for high-grade cervical intraepithelial neoplasia. Gynecol Oncol, Feb 4. 2008.

Fernandes, A. P., M. A. Goncalves, G. Duarte, F. Q. Cunha, R. T. Simoes e E. A. Donadi. HPV16, HPV18, and HIV infection may influence cervical cytokine intralesional levels. Virology, v.334, n.2, Apr 10, p.294-8. 2005.

Fife, K. H., P. M. Coplan, K. U. Jansen, A. C. Dicello, D. R. Brown, C. Rojas e L. Su. Poor sensitivity of polymerase chain reaction assays of genital skin swabs and urine to detect HPV 6 and 11 DNA in men. Sex Transm Dis, v.30, n.3, Mar, p.246-8. 2003.

Forslund, O., B. G. Hansson, P. Rymark e B. Bjerre. Human papillomavirus DNA in urine samples compared with that in simultaneously collected urethra and cervix samples. J Clin Microbiol, v.31, n.8, Aug, p.1975-9. 1993.

Franco, E. L. e D. M. Harper. Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical cancer control. Vaccine, v.23, n.17-18, Mar 18, p.2388-94. 2005.

Gall, K., D. Pavicic, J. Pavelic, S. Audy-Jurkovic e K. Pavelic. PCR amplification of DNA from stained cytological smears. J Clin Pathol, v.46, n.4, Apr, p.378-9. 1993.

Geddy, P. M., M. Wells e C. J. Lacey. Lack of detection of human papillomavirus DNA in male urine samples. Genitourin Med, v.69, n.4, Aug, p.276-9. 1993.

Geipert, N. Vaccinating men for HPV: new strategy for preventing cervical cancer in women? J Natl Cancer Inst, v.97, n.9, May 4, p.630-1. 2005.

Giles, M. e S. Garland. Human papillomavirus infection: an old disease, a new vaccine. Aust N Z J Obstet Gynaecol, v.46, n.3, Jun, p.180-5. 2006.

Giovannelli, L., M. C. Migliore, G. Capra, M. P. Caleca, C. Bellavia, A. Perino, E. Viviano, D. Matranga e P. Ammatuna. Penile, urethral, and seminal sampling for diagnosis of human papillomavirus infection in men. J Clin Microbiol, v.45, n.1, Jan, p.248-51. 2007.

Giuliano, A. R. Human papillomavirus vaccination in males. Gynecol Oncol, v.107, n.2 Suppl, Nov, p.S24-6. 2007.

Giuliano, A. R., C. M. Nielson, R. Flores, E. F. Dunne, M. Abrahamsen, M. R. Papenfuss, L. E. Markowitz, D. Smith e R. B. Harris. The optimal anatomic sites for sampling heterosexual men for human papillomavirus (HPV) detection: the HPV detection in men study. J Infect Dis, v.196, n.8, Oct 15, p.1146-52. 2007.

Gnanamony, M., A. Peedicayil e P. Abraham. An overview of human papillomaviruses and current vaccine strategies. Indian J Med Microbiol, v.25, n.1, Jan, p.10-7. 2007.

Golijow, C. D., L. O. Perez, J. S. Smith e M. C. Abba. Human papillomavirus DNA detection and typing in male urine samples from a high-risk population from Argentina. J Virol Methods, v.124, n.1-2, Mar, p.217-20. 2005.

Goncalves, M. A. e E. A. Donadi. Immune cellular response to HPV: current concepts. Braz J Infect Dis, v.8, n.1, Feb, p.1-9. 2004.

Gottschling, M., A. Kohler, E. Stockfleth e I. Nindl. Phylogenetic analysis of beta-papillomaviruses as inferred from nucleotide and amino acid sequence data. Mol Phylogenet Evol, v.42, n.1, Jan, p.213-22. 2007.

Gottschling, M., A. Stamatakis, I. Nindl, E. Stockfleth, A. Alonso e I. G. Bravo. Multiple evolutionary mechanisms drive papillomavirus diversification. Mol Biol Evol, v.24, n.5, May, p.1242-58. 2007.

Greene, W. C. A history of AIDS: looking back to see ahead. Eur J Immunol, v.37 Suppl 1, Nov, p.S94-102. 2007.

Gupta, A., R. Arora, S. Gupta, B. K. Prusty, U. Kailash, S. Batra e B. C. Das. Human papillomavirus DNA in urine samples of women with or without cervical cancer and their male partners compared with simultaneously collected cervical/penile smear or biopsy specimens. J Clin Virol, v.37, n.3, Nov, p.190-4. 2006.

Hagensee, M. E., J. E. Cameron, J. E. Leigh e R. A. Clark. Human papillomavirus infection and disease in HIV-infected individuals. Am J Med Sci, v.328, n.1, Jul, p.57-63. 2004.

Hazard, K., K. Andersson, J. Dillner e O. Forslund. Human papillomavirus subtypes are not uncommon. Virology, v.362, n.1, May 25, p.6-9. 2007.

Hebner, C. M. e L. A. Laimins. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. Rev Med Virol, v.16, n.2, Mar-Apr, p.83-97. 2006.

Hillman, R. J., B. K. Ryaite, M. Botcherby e D. Taylor-Robinson. Human papillomavirus DNA in the urogenital tracts of men with gonorrhoea, penile warts or genital dermatoses. Genitourin Med, v.69, n.3, Jun, p.187-92. 1993.

Howley, P. M. Papillomavirinae and their replication. New York: Fundamental Virology. 1996 (Fields)

Jong, E., J. W. Mulder, E. C. Van Gorp, J. K. Wagenaar, J. Derksen, J. Westerga, A. Tol e P. H. Smits. The prevalence of human papillomavirus (HPV) infection in paired urine and cervical smear samples of HIV-infected women. J Clin Virol, v.41, n.2, Feb, p.111-5. 2008.

Jung, W. W., T. Chun, D. Sul, K. W. Hwang, H. S. Kang, D. J. Lee e I. K. Han. Strategies against human papillomavirus infection and cervical cancer. J Microbiol, v.42, n.4, Dec, p.255-66. 2004.

Kammer, C., U. Warthorst, N. Torrez-Martinez, C. M. Wheeler e H. Pfister. Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity. J Gen Virol, v.81, n.Pt 8, Aug, p.1975-81. 2000.

Kanodia, S., L. M. Fahey e W. M. Kast. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. Curr Cancer Drug Targets, v.7, n.1, Feb, p.79-89. 2007.

Kim, J., R. L. Modlin, R. L. Moy, S. M. Dubinett, T. Mchugh, B. J. Nickoloff e K. Uyemura. IL-10 production in cutaneous basal and squamous cell carcinomas. A mechanism for evading the local T cell immune response. J Immunol, v.155, n.4, Aug 15, p.2240-7. 1995.

Komninakis, S., L. Fukumori, R. Alcalde, M. Cortina, L. Abdala, A. Brito, S. Sanabani, A. J. Duarte e J. Casseb. Techniques used to identify the Brazilian variant of HIV-1 subtype B. Braz J Med Biol Res, v.40, n.3, Mar, p.301-4. 2007.

Kouri, V., J. Cartaya, M. E. Rodriguez, M. Mune, Y. Soto, S. Resik, J. Bravo e A. Llop. Prevalence of Chlamydia trachomatis in human immunodeficiency virus-infected women in Cuba. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.97, n.8, Dec, p.1073-7. 2002.

Kreuter, A., N. H. Brockmeyer, S. J. Weissenborn, T. Gambichler, M. Stucker, P. Altmeyer, H. Pfister e U. Wieland. Penile Intraepithelial Neoplasia Is Frequent in HIV-Positive Men with Anal Dysplasia. J Invest Dermatol, Apr 3. 2008.

Laimins, L. A. Human papillomaviruses target differentiating epithelia for virion production and malignant conversion. seminars in VIROLOGY, v.7, p.305-313. 1996.

Levi, J. E., B. Kleter, W. G. Quint, M. C. Fink, C. L. Canto, R. Matsubara, I. Linhares, A. Segurado, B. Vanderborght, J. E. Neto e L. J. Van Doorn. High prevalence of human papillomavirus (HPV) infections and high frequency of multiple HPV genotypes in human immunodeficiency virus-infected women in Brazil. J Clin Microbiol, v.40, n.9, Sep, p.3341-5. 2002.

Locateli, D., P. H. Stoco, A. T. De Queiroz, L. C. Alcantara, L. G. Ferreira, C. R. Zanetti, R. Rodrigues, E. C. Grisard e A. R. Pinto. Molecular epidemiology of HIV-1 in Santa Catarina State confirms increases of subtype C in Southern Brazil. J Med Virol, v.79, n.10, Oct, p.1455-63. 2007.

Lorenzato, F., L. Ho, G. Terry, A. Singer, L. C. Santos, R. De Lucena Batista e T. Lubambo. The use of human papillomavirus typing in detection of cervical neoplasia in Recife (Brazil). Int J Gynecol Cancer, v.10, n.2, Mar, p.143-150. 2000.

Mahdavi, A. e B. J. Monk. Vaccines against human papillomavirus and cervical cancer: promises and challenges. Oncologist, v.10, n.7, Aug, p.528-38. 2005.

Manziona, C. R., S. R. Nadal e E. E. Calore. [Human papillomavirus oncogenicity and grade of anal intraepithelial neoplasia in HIV positive patients]. Rev Assoc Med Bras, v.50, n.3, Jul-Sep, p.282-5. 2004.

Marais, D. J., E. Vardas, G. Ramjee, B. Allan, P. Kay, R. C. Rose e A. L. Williamson. The impact of human immunodeficiency virus type 1 status on human papillomavirus (HPV) prevalence and HPV antibodies in serum and cervical secretions. J Infect Dis, v.182, n.4, Oct, p.1239-42. 2000.

Mbirimtengerenji, N. D. Is HIV/AIDS epidemic outcome of poverty in sub-saharan Africa? Croat Med J, v.48, n.5, Oct, p.605-17. 2007.

Medeiros, L. R., A. B. Ethur, J. B. Hilgert, R. R. Zanini, O. Berwanger, M. C. Bozzetti e L. C. Mylius. Vertical transmission of the human papillomavirus: a systematic quantitative review. Cad Saude Publica, v.21, n.4, Jul-Aug, p.1006-15. 2005.

Meira, D. A. Acquired immunodeficiency syndrome in Brazil. Croat Med J, v.43, n.4, Aug, p.475-9. 2002.

Melchers, W. J., R. Schiff, E. Stolz, J. Lindeman e W. G. Quint. Human papillomavirus detection in urine samples from male patients by the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol, v.27, n.8, Aug, p.1711-4. 1989.

Modis, Y., B. L. Trus e S. C. Harrison. Atomic model of the papillomavirus capsid. EMBO J, v.21, n.18, Sep 16, p.4754-62. 2002.

Motoyama, S., C. A. Ladines-Llave, S. Luis Villanueva e T. Maruo. The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. Kobe J Med Sci, v.50, n.1-2, Jan, p.9-19. 2004.

Munoz, N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. J Clin Virol, v.19, n.1-2, Oct, p.1-5. 2000.

Naqvi, S. H., S. Wajid e A. B. Mitra. Restriction fragment length polymorphism of L1 amplicon using Rsa 1 detects five different human papillomavirus types and their co-infections among women attending a gynaecological outpatient department. J Virol Methods, v.117, n.1, Apr, p.91-5. 2004.

Nicolau, S. M., C. G. Camargo, J. N. Stavale, A. Castelo, G. B. Does, A. Lorincz e G. R. De Lima. Human papillomavirus DNA detection in male sexual partners of women with genital human papillomavirus infection. Urology, v.65, n.2, Feb, p.251-5. 2005.

Palefsky, J. M. e E. A. Holly. Chapter 6: Immunosuppression and co-infection with HIV. J Natl Cancer Inst Monogr, n.31, p.41-6. 2003.

Pett, M. e N. Coleman. Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? J Pathol, v.212, n.4, Aug, p.356-67. 2007.

Picconi, M. A., A. M. Eijan, A. L. Distefano, S. Pueyo, L. V. Alonio, S. Gorostidi, A. R. Teyssie e A. Casabe. Human papillomavirus (HPV) DNA in penile carcinomas in Argentina: analysis of primary tumors and lymph nodes. J Med Virol, v.61, n.1, May, p.65-9. 2000.

Pinto, L. A., P. E. Castle, R. B. Roden, C. D. Harro, D. R. Lowy, J. T. Schiller, D. Wallace, M. Williams, W. Kopp, I. H. Frazer, J. A. Berzofsky e A. Hildesheim. HPV-16 L1 VLP vaccine elicits a broad-spectrum of cytokine responses in whole blood. Vaccine, v.23, n.27, May 20, p.3555-64. 2005.

Porro, A. M., M. M. Alchorne, G. R. Mota, N. Michalany, A. C. Pignatari e I. E. Souza. Detection and typing of human papillomavirus in cutaneous warts of patients infected with human immunodeficiency virus type 1. Br J Dermatol, v.149, n.6, Dec, p.1192-9. 2003.

Potocnik, M., B. J. Kocjan, K. Seme, B. Luzar, D. Z. Babic e M. Poljak. Beta-papillomaviruses in anogenital hairs plucked from healthy individuals. J Med Virol, v.78, n.12, Dec, p.1673-8. 2006.

Potocnik, M., B. J. Kocjan, K. Seme e M. Poljak. Distribution of human papillomavirus (HPV) genotypes in genital warts from males in Slovenia. Acta Dermatovenereol Alp Panonica Adriat, v.16, n.3, Sep, p.91-6, 98. 2007.

Prusty, B. K., A. Kumar, R. Arora, S. Batra e B. C. Das. Human papillomavirus (HPV) DNA detection in self-collected urine. Int J Gynaecol Obstet, v.90, n.3, Sep, p.223-7. 2005.

Pyeon, D., P. F. Lambert e P. Ahlquist. Production of infectious human papillomavirus independently of viral replication and epithelial cell differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A, v.102, n.26, Jun 28, p.9311-6. 2005.

Queiroz, C., A. G. Travassos, E. Studart, J. B. Araujo Filho, C. K. Sarno e C. C. Pinheiro. Prevalence of human Papilloma Virus in HIV-positive and HIV-negative patients in the State of Bahia: a pilot study. Braz J Infect Dis, v.8, n.5, Oct, p.356-62. 2004.

Rabelo-Santos, S. H., L. Zeferino, L. L. Villa, J. P. Sobrinho, R. G. Amaral e A. V. Magalhaes. Human papillomavirus prevalence among women with cervical intraepithelial neoplasia III and invasive cervical cancer from Goiania, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.98, n.2, Mar, p.181-4. 2003.

Reddy, K. J., B. Banapour, D. E. Anderson, S. H. Lee, J. P. Marquez, M. P. Carlos e J. V. Torres. Induction of immune responses against human papillomaviruses by hypervariable epitope constructs. Immunology, v.112, n.2, Jun, p.321-7. 2004.

Roden, R. B., M. Ling e T. C. Wu. Vaccination to prevent and treat cervical cancer. Hum Pathol, v.35, n.8, Aug, p.971-82. 2004.

Rodrigues, E. H. e F. G. Abath. [Sexually transmitted diseases in patients infected with HIV/AIDS in the State of Pernambuco, Brazil]. Rev Soc Bras Med Trop, v.33, n.1, Jan-Feb, p.47-52. 2000.

Sanclemente, G. e D. K. Gill. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. J Eur Acad Dermatol Venereol, v.16, n.3, May, p.231-40. 2002.

Sapy, T., R. Poka, K. Szarka, J. Konya, S. Huga e Z. Hernadi. Age-specific prevalence of high-risk human papillomavirus infection in a Hungarian female population with positive cytology. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, Aug 20. 2007.

Sathish, N., P. Abraham, A. Peedicayil, G. Sridharan e G. Chandy. HPV 16 E6 sequence variations in Indian patients with cervical neoplasia. Cancer Lett, v.229, n.1, Nov 8, p.93-9. 2005.

Scheurer, M. E., G. Tortolero-Luna e K. Adler-Storthz. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. Int J Gynecol Cancer, v.15, n.5, Sep-Oct, p.727-46. 2005.

Schiffman, M., P. E. Castle, J. Jeronimo, A. C. Rodriguez e S. Wacholder. Human papillomavirus and cervical cancer. Lancet, v.370, n.9590, Sep 8, p.890-907. 2007.

Sellers, J. W., A. T. Lorincz, J. B. Mahony, I. Mielzynska, A. Lytwyn, P. Roth, M. Howard, S. Chong, D. Daya, W. Chapman e M. Chernesky. Comparison of self-collected vaginal, vulvar and urine samples with physician-collected cervical samples for human papillomavirus testing to detect high-grade squamous intraepithelial lesions. CMAJ, v.163, n.5, Sep 5, p.513-8. 2000.

Smits, P. H., R. Bakker, E. Jong, J. W. Mulder, P. L. Meenhorst, B. Kleter, L. J. Van Doorn e W. G. Quint. High prevalence of human papillomavirus infections in urine samples from human immunodeficiency virus-infected men. J Clin Microbiol, v.43, n.12, Dec, p.5936-9. 2005.

Snoeck, R. Papillomavirus and treatment. Antiviral Res, v.71, n.2-3, Sep, p.181-91. 2006.

Song, E. S., H. J. Lee e T. S. Hwang. Clinical efficacy of human papillomavirus DNA detection in urine from patients with various cervical lesions. J Korean Med Sci, v.22, n.1, Feb, p.99-104. 2007.

Stanczuk, G. A., P. Kay, B. Allan, M. Chirara, S. A. Tswana, S. Bergstrom, E. N. Sibanda e A. L. Williamson. Detection of human papillomavirus in urine and cervical swabs from patients with invasive cervical cancer. J Med Virol, v.71, n.1, Sep, p.110-4. 2003.

Steben, M. e E. Duarte-Franco. Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. Gynecol Oncol, v.107, n.2 Suppl, Nov, p.S2-5. 2007.

Stefani, M. M., G. A. Pereira, J. A. Lins, K. C. Alcantara, A. A. Silveira, A. A. Viegas, N. C. Maya e A. H. Mussi. Molecular screening shows extensive HIV-1 genetic diversity in Central West Brazil. J Clin Virol, v.39, n.3, Jul, p.205-9. 2007.

Stern, P. L. Immune control of human papillomavirus (HPV) associated anogenital disease and potential for vaccination. J Clin Virol, v.32 Suppl 1, Mar, p.S72-81. 2005.

Stoler, M. H. Human papillomavirus biology and cervical neoplasia: implications for diagnostic criteria and testing. Arch Pathol Lab Med, v.127, n.8, Aug, p.935-9. 2003.

Strauss, S., J. Z. Jordens, D. McBride, C. Sonnex, S. Edwards, U. Desselberger, P. Watt e J. J. Gray. Detection and typing of human papillomavirus DNA in paired urine and cervical scrapes. Eur J Epidemiol, v.15, n.6, Jul, p.537-43. 1999.

Taira, A. V., C. P. Neukermans e G. D. Sanders. Evaluating human papillomavirus vaccination programs. Emerg Infect Dis, v.10, n.11, Nov, p.1915-23. 2004.

Tjalma, W. A., M. Arbyn, J. Paavonen, T. R. Van Waes e J. J. Bogers. Prophylactic human papillomavirus vaccines: the beginning of the end of cervical cancer. Int J Gynecol Cancer, v.14, n.5, Sep-Oct, p.751-61. 2004.

Tommasino, M., J. P. Adamczewski, F. Carlotti, C. F. Barth, R. Manetti, M. Contorni, F. Cavalieri, T. Hunt e L. Crawford. HPV16 E7 protein associates with the protein kinase p33CDK2 and cyclin A. Oncogene, v.8, n.1, Jan, p.195-202. 1993.

Trottier, H. e E. L. Franco. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. Vaccine, v.24 Suppl 1, Mar 30, p.S1-15. 2006.

Uronis, H. E. e J. C. Bendell. Anal cancer: an overview. Oncologist, v.12, n.5, May, p.524-34. 2007.

Urquiza, M., T. Guevara, F. Espejo, M. M. Bravo, Z. Rivera e M. E. Patarroyo. Two L1-peptides are excellent tools for serological detection of HPV-associated cervical carcinoma lesions. Biochem Biophys Res Commun, v.332, n.1, Jun 24, p.224-32. 2005.

Villa, L. L. Overview of the clinical development and results of a quadrivalent HPV (types 6, 11, 16, 18) vaccine. Int J Infect Dis, v.11 Suppl 2, Nov, p.S17-25. 2007.

Walboomers, J. M., M. V. Jacobs, M. M. Manos, F. X. Bosch, J. A. Kummer, K. V. Shah, P. J. Snijders, J. Peto, C. J. Meijer e N. Munoz. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol, v.189, n.1, Sep, p.12-9. 1999.

Weaver, B. A., Q. Feng, K. K. Holmes, N. Kiviat, S. K. Lee, C. Meyer, M. Stern e L. A. Koutsky. Evaluation of genital sites and sampling techniques for detection of human papillomavirus DNA in men. J Infect Dis, v.189, n.4, Feb 15, p.677-85. 2004.

Wilkin, T. J., S. Palmer, K. F. Brudney, M. A. Chiasson e T. C. Wright. Anal intraepithelial neoplasia in heterosexual and homosexual HIV-positive men with access to antiretroviral therapy. J Infect Dis, v.190, n.9, Nov 1, p.1685-91. 2004.

Wilson, R., F. Fehrmann e L. A. Laimins. Role of the E1--E4 protein in the differentiation-dependent life cycle of human papillomavirus type 31. J Virol, v.79, n.11, Jun, p.6732-40. 2005.

Wood, C. E., Z. Chen, J. M. Cline, B. E. Miller e R. D. Burk. Characterization and experimental transmission of an oncogenic papillomavirus in female macaques. J Virol, v.81, n.12, Jun, p.6339-45. 2007.

Woodman, C. B., S. I. Collins e L. S. Young. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. Nat Rev Cancer, v.7, n.1, Jan, p.11-22. 2007.

Yamada, R., T. Sasagawa, L. W. Kirumbi, A. Kingoro, D. K. Karanja, M. Kiptoo, G. W. Nakitare, H. Ichimura e M. Inoue. Human papillomavirus infection and cervical abnormalities in Nairobi, Kenya, an area with a high prevalence of human immunodeficiency virus infection. J Med Virol, v.80, n.5, May, p.847-55. 2008.

Zambrano, A., M. Kalantari, A. Simoneau, J. L. Jensen e L. P. Villarreal. Detection of human polyomaviruses and papillomaviruses in prostatic tissue reveals the prostate as a habitat for multiple viral infections. Prostate, v.53, n.4, Dec 1, p.263-76. 2002.

Zhou, J., Frazer, I. Papovaviridae: capsid structure and capsid protein function. In: Lacey, C. Papillomavirus reviews: current research on papillomavirus. . London: Leeds University Press, p.93-100. 1996.

Zur Hausen, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. Nat Rev Cancer, v.2, n.5, May, p.342-50. 2002.

8 ANEXOS

ANEXO I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROTOCOLO Nº

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº..... APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (......)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO:..... CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (......).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DA REGIÃO L1 DOS TIPOS 6, 11, 16 E 18 DO VÍRUS PAPILOMAVIRUS HUMANO (HPV) EM HOMENS INFECTADOS PELO HIV-1

PESQUISADOR: FERNANDO AUGUSTO MIRANDA DA COSTA

CARGO/FUNÇÃO: Biomédico

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL

UNIDADE DO ESTUDO: Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de São Paulo.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO X RISCO MÍNIMO ☐ RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

Título Resumido do Estudo: Avaliação do HPV em homens.

INTRODUÇÃO

Você está sendo convidado a participar desta pesquisa porque está infectado com o HIV, o vírus causador da AIDS. A prevalência das lesões pelo HPV é significativa entre pacientes infectados com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). O HPV é um vírus associado com o aparecimento de câncer cervical nas mulheres. A detecção deste vírus pode permitir avaliar a prevalência em homens assintomáticos, potenciais transmissores para as mulheres. Além de poder indicar a prevalência dos tipos mais frequentes e sua diversidade em relação a eficácia de uma vacina anti-HPV, ora em fase final de desenvolvimento em nosso meio. O médico responsável por este estudo neste local é Dr. Jorge Casseb. Antes que você decida se deseja participar, gostaríamos que conhecesse o estudo.

Este é um termo de consentimento livre e esclarecido e contém informações sobre o estudo. A equipe do estudo conversará com você sobre estas informações. Sinta-se à vontade para fazer perguntas a qualquer momento. Caso concorde em participar, será solicitado que assine este termo de consentimento. Você receberá uma cópia assinada deste termo de consentimento.

POR QUE ESTÁ SENDO FEITO O ESTUDO?

O HIV-1 pode influenciar diretamente na patogênese da doença causada pelo HPV. Algumas questões permanecem a serem respondidas, como por exemplo, se ocorre um efeito adicional na infecção pelo HIV na aquisição, reativação ou persistência da infecção pelo HPV. O objetivo principal do nosso estudo é verificar a prevalência do HPV (HPV-DNA) e os tipos circulantes em homens soropositivos para o HIV-1 em amostras de urina.

INFORMAÇÕES NA TRIAGEM

Informações Pessoais

Caso você aceite participar do estudo, serão solicitadas algumas informações de identificação pessoal (nome, sobrenome, data de nascimento, local de nascimento, endereço e outros) e você deverá responder a um questionário sócio-demográfico e comportamental. Estas informações serão mantidas em sigilo e não serão publicadas ou reveladas sem o seu consentimento. Após esta etapa irá coletar 20 mL de urina do primeiro jato para a pesquisa do HPV.

POR QUANTO TEMPO VOU PARTICIPAR DO ESTUDO?

Você deverá participar do estudo por até dois anos, dependendo de quando entrar no mesmo. Se quiser interromper sua participação no estudo no momento que desejar, sem que haja qualquer prejuízo no seu atendimento de rotina no Ambulatório.

QUAIS SÃO OS RISCOS DE PARTICIPAR DO ESTUDO?

Nenhum risco mínimo de coleta de urina.

HÁ BENEFÍCIOS POR PARTICIPAR DESTE ESTUDO?

Possivelmente não receberá nenhum benefício por fazer parte deste estudo. As informações obtidas poderão ajudar a outras pessoas que tenham o HIV e estejam co-infectadas com o HPV.

QUE OUTRAS OPÇÕES EU TENHO ALÉM DESTE ESTUDO?

Ao invés de participar deste estudo, você tem o direito de receber tratamento gratuito na rede pública de saúde. Caso você decida não participar do estudo, isto em nada afetará o seu direito a receber tratamento na rede pública de saúde. A equipe do estudo conversará com você essa e outras opções disponíveis. Você também tem o direito de optar por não receber tratamento. A equipe do estudo conversará com você sobre os possíveis riscos desta opção.

O QUE GARANTE A CONFIDENCIALIDADE?

Nós faremos tudo o que pudermos para proteger a sua privacidade. Além disso, seu nome ou quaisquer outros dados, que possam identificá-lo, não serão colocados em qualquer publicação ou comunicação sobre o estudo.

O seu prontuário médico poderá ser revisto pelo Comitê Ética em Pesquisas da nossa instituição, por profissionais médicos e pelos coordenadores do estudo, respeitando-se a legislação brasileira vigente.

Por outro lado, nada o impede de fornecer informações sobre você mesmo e sobre a sua participação no estudo para outras pessoas, caso você deseje.

Apenas poderão ter acesso aos dados do seu prontuário pessoas que forem indicadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas, pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), pelos coordenadores do estudo, e pela equipe do estudo. Por outro lado, nada o impede de fornecer informações sobre você mesmo e sobre a sua participação no estudo para outras pessoas, caso você deseje.

QUAIS SÃO OS CUSTOS DE PARTICIPAR DO ESTUDO

Você não terá qualquer despesa por participar do estudo. Todos os procedimentos e os testes que são necessários para o estudo serão pagos por nós.

O QUE ACONTECERÁ SE EU SOFRER ALGUM DANO POR PARTICIPAR DO ESTUDO

Os participantes deste estudo que vierem a sofrer danos previstos ou não no termo de consentimento, resultantes dos procedimentos do estudo, têm direito à assistência médica integral. Assim, se você sofrer algum dano diretamente associado à sua participação no estudo, você receberá tratamento médico apropriado oferecido pela equipe do estudo, sem qualquer custo para você.

Você não estará renunciando ou abrindo mão de qualquer direito legal de obter indenização por danos eventuais ao assinar este termo de consentimento.

Caso tenha alguma dúvida ou questão sobre seus direitos como participante deste estudo, você poderá procurar o Comitê de Ética em Pesquisa pelo telefone: 3069 6442.

QUAIS SÃO OS MEUS DIREITOS COMO PARTICIPANTE DO ESTUDO?

Participar do estudo é um ato inteiramente voluntário. Você pode preferir não participar do estudo ou abandoná-lo a qualquer momento. Você será tratado da mesma forma, independentemente de sua decisão.

Nós prestaremos todos os serviços clínicos e profissionais de diagnóstico e de laboratório que fizerem parte do estudo, sem que isso incorra em custo algum para você. Você deve continuar recebendo seus remédios, inclusive os medicamentos anti-HIV e os necessários para prevenir ou tratar infecções relacionadas ao HIV, como normalmente vem fazendo.

Nós lhe comunicaremos sobre novas informações deste ou de outros estudos que possam afetar sua saúde, bem-estar ou vontade de continuar participando deste estudo. Quando o estudo terminar, nós lhe informaremos os resultados.

O QUE EU FAÇO CASO TENHA PERGUNTAS OU PROBLEMAS?

Para perguntas sobre este estudo ou sobre danos relacionados com a pesquisa, favor contatar:

Fernando Costa, Pesquisador Principal, Fone: 3066 - 7194 ou Coordenador do Estudo, Dr. Jorge Casseb, Fone: 3066 - 7194.

Ou a

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de São Paulo, Av. Dr. Ovídio Pires da Campos 255, Prédio da Administração, Quinto andar, São Paulo, SP, CEP 05403-010. Telefone: 3069 6442, fax: 30696492

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Fernando Costa – Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica e Experimental - LIM/56

Av. Enéas de Carvalho Aguiar, 500 / prédio IMT II / 3º andar Tel.: (11) 3066-7499 / 7457; FAX: (11) 3081-7190 Cep 05403-000

Jorge Casseb – Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica e Experimental- LIM/56

Av. Enéas de Carvalho Aguiar, 500 / prédio IMT II / 3º andar Tel.: (11) 30667499 / 7457; FAX: (11) 3081-7190 Cep 05403-000

VII - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:

Título do protocolo: AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DA REGIÃO L1 DOS TIPOS 6, 11, 16 E 18 DO VÍRUS PAPILOMAVIRUS HUMANO (HPV) EM HOMENS INFECTADOS PELO HIV-1.

Título Resumido do Estudo: Avaliação do HPV em homens.

Eu, _____, li (ou ouvi a leitura sobre) as informações contidas neste termo de consentimento. Compreendo os possíveis riscos e benefícios do estudo e os outros tratamentos disponíveis para minha doença. Tive oportunidade de fazer perguntas e recebi respostas satisfatórias para todas as minhas perguntas.

Tenho liberdade de me retirar do estudo a qualquer momento, por qualquer razão, sem que a minha decisão de desistir afete meus direitos a cuidados médicos futuros. Concordo em seguir as instruções do médico responsável pelo estudo, e eu comunicarei imediatamente a ele caso eu sinta qualquer sintoma inesperado ou incomum. Ao assinar este documento, não estou abrindo mão de meus direitos legais. Uma cópia assinada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará em meu poder.

Meu consentimento em participar deste estudo é voluntário.

Nome do (a) voluntário(a) em letra de forma

Assinatura do(a) voluntário(a)

Data : ____/____/____
dia mês ano

Nome da Pessoa que obteve o Consentimento em letra de forma

Assinatura da Pessoa que obteve o Consentimento

Data: ____/____/____
dia mês ano

Anexo II

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica e Experimental - LIM-56
Rua Dr. Enéas de Carvalho, 500, 3º andar, 05403-000
3061-7194 / 7457 Fax: (11) 3081-7190

QUESTIONÁRIO DE PESQUISA: AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE
GENÉTICA DA REGIÃO L1 DOS TIPOS 6, 11, 16 E 18 DO VÍRUS
PAPILOMAVIRUS HUMANO (HPV) EM HOMENS INFECTADOS PELO HIV-
1

A- Dados Pessoais

1-Identificação:

2-Data da entrevista____/____/____

3-Data de Nascimento:____/____/____

4-Escolaridade:

1-nenhuma. 2-de 1ª a 4ª série. 3-de 5ª a 8ª série.
4-2º grau. 5-superior. 6-não respondeu.

5-Renda familiar em salários mínimos:

1-< 2. 2-de 2 a 4. 3-de 5 a 10.
4-maior que 10. 5-não sabe. 6-não respondeu.

6-Situação marital:

1-casado/amigado 2-solteiro 3-separado 4-viúvo 5-não respondeu

7-Raça/cor (auto-referida) que você se considera :

1-branca 2-negra 3-amarela 4-parda 5-indígena 6-não respondeu

B- Dados comportamentais

1-Idade da 1ª relação sexual: ()

2-Relação sexual nos últimos 12 meses:

1-não teve 2-só com mulheres 3-com homens e mulheres
4-só com homens 5-não respondeu.

3-Usa preservativo com parceira (o) eventual:

1-não tem parceira (o) eventual 2-sempre 3-às vezes usa
4-nunca usa 5-não respondeu

4 -Usa preservativo com parceira (o) fixa (o):

1-não tem parceira fixa (o). 2-sempre. 3-às vezes usa.
4-nunca usa. 5-não respondeu.

5-Pratica relações anais como ativo? (Você colocando o seu pênis no ânus do (a) parceiro (a))

1-não pratico 2-sim e sempre uso preservativo
3-sim e, às vezes uso preservativo 4-sim e nunca uso preservativo

6-Pratica relações anais como passivo? (Você recebendo o pênis do seu parceiro no seu ânus)

1-não pratico 2-sim e sempre uso preservativo
3-sim e, às vezes uso preservativo 4-sim e nunca uso preservativo

7-Pratica relação oral como ativo? (Levando o pênis do seu parceiro à sua boca)

1-não pratico 2-sim e sempre uso preservativo
3-sim e, às vezes uso preservativo 4-sim e nunca uso preservativo

8-Pratica relação oral como passivo? [O seu parceiro(a) levando o seu pênis à boca dele (a)]

1-não pratico. 2-sim e sempre uso preservativo.
3-sim e, às vezes uso preservativo. 4-sim e nunca uso preservativo.

9 - Número de parceiros, mulher, com quem teve relações sexuais nos últimos 12 meses:

1-nenhum. 2-só uma. 3- duas a quatro.
4- cinco a dez. 5-mais de dez. 6-não responde.

10- Número de parceiros, homens, com quem teve relações sexuais nos últimos 12 meses:

1-nenhum. 2-só um. 3- dois a quatro.
4- cinco a dez. 5-mais de dez. 6-não responde.

11- Já usou ou usa algumas das drogas abaixo:

1-maconha. 2-cocaína. 3-craque. 4-LSD.
5-ectasy. 6-cola 7-mais de uma anterior. 8-nenhuma.

C-Já teve nos órgãos genitais, alguma vez na vida:

12-Corrimento ? 13-verruga (s) ?
1-sim 2-não 3-não lembro 1-sim 2-não 3-não lembro

14-Ferida (s)? 15-Vesículas?
1-sim 2-não 3-não lembro 1-sim 2-não 3-não lembro

D-Exames laboratoriais

16- DATA DO TESTE HIV:____/____/____

17-Forma de contaminação:

1-prática HSM (homem faz sexo com mulher) 2-prática HSH (Homem que faz sexo com homem) 3-UDI(usuário de drogas injetável) 4-Hemotransfusão
5-não sei 6-não respondo

18-Carga viral do HIV inicial:_____Log:_____

19-Carga viral do HIV atual: _____Log:_____

20-CD4inicial_____21CD8inicial_____22CD4/CD8inicial_____

23-CD4atual_____24-CD8atual_____25-CD4/CD8atual_____

26-Uso de medicação para HIV atualmente?

1-sim 2-não

27- Se sim,quais?_____

28-Tem queimação a urinar?

1-sim 2-não

E-Exame físico

29-Tem corrimento na uretra?

1-sim 2-não

30-Outras lesões?_____

31 – Result. PCR: _____

Anexo III

**SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
CENTRO DE REFERÊNCIA E TREINAMENTO DST/AIDS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

São Paulo, 26 de fevereiro de 2007.

Ofício CRT-DST/AIDS – CEP n.º 043/2007.

PROTOCOLO CEP nº 030/06 – “Detecção do HPV DNA e Determinação dos Tipos 6,11,16 e 18 do Vírus Papilomavirus Humano (HPV) em Amostras de Urina de Homens Infectados pelo HIV-1, na Cidade de São Paulo”.

Prezado Investigador,

Após análise do referido documento pelos membros deste Comitê em reunião ordinária do dia 26/02/2007, foi emitido parecer: APROVADO.

Solicitamos que nos seja enviado, com periodicidade de seis meses a contar desta data, um comunicado sucinto sobre o andamento do Projeto.

Atenciosamente,

Dr. Eduardo Ronner Lagonegro
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
CRT-DST/AIDS

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Jorge Casseb
Investigador Principal

Centro de Referência e Treinamento DST/AIDS
Rua Santa Cruz, 81 – Ambulatório.
V. Mariana CEP: 04121-000 São Paulo – SP
Fone/Fax: 5087-9837
e-mail: cep@crt.saude.sp.gov.br

Anexo IV

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 23.02.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 006/06, intitulado: "Avaliação da diversidade genética da região longa de controle (LCR) e L1 dos tipos 6, 11, 16 e 18 do vírus papilomavirus humano (HPV) em homens infectados pelo HIV-1." apresentado pelo Departamento de DERMATOLOGIA, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: Dr. Jorge Simão do Rosário Casseb

Pesquisador(a) Executante: Sr. Fernando Augusto Miranda da Costa

CAPPesq, 23 de Fevereiro de 2006.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa