EMILY MONTOSA NUNES

**Prevalência e diversidade de beta-papilomavírus em
amostras anogenitais e orais de homens do estudo HIM**

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

Programa de Oncologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Laura Cristina Sichero
Vettorazzo

**São Paulo
2016**

EMILY MONTOSA NUNES

**Prevalência e diversidade de beta-papilomavírus em
amostras anogenitais e orais de homens do estudo HIM**

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

Programa de Oncologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Laura Cristina Sichero
Vettorazzo

**São Paulo
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Nunes, Emily Montosa

Prevalência e diversidade de beta-papilomavírus em amostras anogenitais e orais de homens do estudo HIM / Emily Montosa Nunes. -- São Paulo, 2016.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Oncologia.

Orientadora: Laura Cristina Sichero Vettorazzo.

Descritores: 1.Papillomaviridae 2.Homens 3.Infecção 4.Canal anal
5.Genitália masculina 6.Técnicas de genotipagem

USP/FM/DBD-137/16

Aos que dedicaram e dedicam suas vidas às Ciências.
Aos que forneceram e fornecem seu corpo e mente a compreensão das patologias.
Aos acometidos por HPV e cânceres associados.

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as oportunidades concedidas ao longo de minha vida e que me possibilitaram chegar até aqui.

Aos meus pais que sempre acreditaram nos meus sonhos e lutaram com garra até o momento que puderam para que eu os realizasse.

A minha mãe (Solange Montosa Nunes), irmã (Gabriela Montosa Nunes) e namorado (Felipe Candido) pela compreensão, paciência e distrações necessárias durante os longos dias dedicados a pesquisa e principalmente a elaboração desta dissertação.

A Prof.^a Dr.^a Laura Sichero que desde o início de minha formação acreditou em meu potencial e sempre me estimulou a alcançar novos horizontes na área da pesquisa.

A Prof.^a Dr.^a Luisa Villa por acolher de todas as maneiras nesta grande família que é o Grupo HPV.

Ao João Simão Sobrinho e Neide Ferreira por toda a parceria e colaboração. Com certeza este trabalho não seria possível sem vocês, assim como as horas passadas no laboratório entre piadas, lanches, almoços e desabafos.

A Maria Luiza Baggio (Iza) por sanar com paciência e dedicação todas as minhas curiosidades sobre tudo que compõe o Estudo HIM.

As minhas colegas de laboratório (Jimena Hochmann e Ema Flores) pela ajuda, compreensão e paciência comigo durante os dias dedicados a pesquisa.

Ao Grupo HPV pelas oportunidades de colaborações fornecidas, assim como conselhos e palpites em meu projeto.

Aos colaboradores internacionais, em especial aos do H. Lee Moffitt Cancer Center (Anna Giuliano, Staci Sudenga e Christine Pierce Campbell) por toda

paciência, atenção e estímulo prestado em meu estágio e meu projeto.

Ao Instituto do Câncer do Estado de São Paulo e a Faculdade de Medicina USP, junto aos seus profissionais e colegas, que dispensaram recursos, atenção e esforços em minha educação acadêmica.

As agências de fomento CNPq (nº 573799/2008-3 concedido a Prof.^a Dr.^a Luisa Villa) e Fapesp (auxílio regular nº 2013/01440-4 concedido a Prof.^a Dr.^a Laura Sichero, bolsa de mestrado nº 2013/20470-1 concedido a mim e bolsa estágio de pesquisa no exterior nº 2015/12557-2), por depositarem em mim a confiança em forma de financiamento possibilitando-me realizar e divulgar os resultados deste trabalho, seja no Brasil como no exterior.

E por fim, aos integrantes da banca pela paciência e atenção dispensada na correção deste trabalho.

Muito Obrigada!

“Devotou-se, então, intensivamente, a pesquisa da doença, estudando e distinguindo as diferentes formas clínicas que pode tomar. Determinou os meios profiláticos para combatê-la, estabelecendo, com rigor, os seus diferentes aspectos patológicos e epidemiológicos”.

Trecho do projeto de lei nº 4.043/80, redigido pelo deputado Rosemburgo Romano, sobre a instituição da Medalha de Mérito “Carlos Chagas”.

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de símbolos, siglas e abreviaturas

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1	Papilomavírus humano.....	20
2.2	HPV cutâneos	23
2.2.1	Mecanismo molecular da infecção e patogenia por β -HPV	26
2.3	Câncer de pele não-melanoma (NMSC)	32
2.3.1	Carcinoma basocelular (BCC)	34
2.3.2	Carcinoma de células escamosas (SCC)	36
2.4	Estudo da Infecção por HPV em homens (HIM Study)	38
2.5	Tecnologias para detecção e tipagem do HPV	44
3	OBJETIVOS.....	47
4	MÉTODOS.....	48
4.1	Desenho do estudo e população.....	48
4.2	Coleta dos espécimes	49
4.3	Digestão e extração orgânica do DNA	50
4.4	Detecção e genotipagem de beta-papilomavírus	51
4.4.1	PCR multiplex.....	51
4.4.2	Ensaio de hibridização.....	52
4.5	Análises estatísticas.....	54
5	RESULTADOS	56
6	DISCUSSÃO.....	65
6.1	Prevalência de β -HPV nos diferentes sítios anatômicos.....	67
6.2	Detecção de 43 genótipos distintos de β -HPV	69
6.3	Fatores associados à detecção de β -HPV	70
7	CONCLUSÕES.....	73
8	REFERÊNCIAS	75
9	ANEXOS.....	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Organização básica do genoma de papilomavírus humano (HPV).....	21
Figura 2 - Árvore filogenética dos papilomavírus humanos (HPV).	22
Figura 3 - Tipos de papilomavírus humanos (HPV) avaliados pelo grupo de trabalho da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC).	26
Figura 4 - Esquema de células que compõem a epiderme da pele normal e o desenvolvimento dos cânceres não-melanoma (NMSC).	34
Figura 5 - Componentes da reação de genotipagem de β -HPV via tecnologia Luminex.	46
Figura 6 - Processo de detecção de β -HPV pela tecnologia Luminex.	46
Figura 7 - Desenho do estudo	58
Figura 8 - Prevalência geral de beta-papilomavírus humano (β -HPV) por país e idade nas amostras genitais, de canal anal e cavidade oral, coletados em mesma visita, de 717 homens participantes do Estudo da Infecção por HPV em Homens (HIM)	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sumário de resultados de estudos *in vitro* e *in vivo* da interação entre as oncoproteínas E6 e E7 de HPV cutâneos e proteínas intracelulares. 31

Tabela 2 - Doenças caracterizadas como lesões pré-câncer para o carcinoma de células escamosas (SCC) 38

Tabela 3 - Frequência de tipos de beta-papilomavírus humano (β -HPV) nas regiões genitais, canal anal e cavidade oral, coletados em mesma visita, de 717 homens participantes do Estudo da Infecção por HPV em Homens (HIM). 60

Tabela 4 - Características demográfica e sexual associadas à detecção de ao menos um tipo de DNA de beta-papilomavírus humano (β -HPV) na região genital de 717 homens participantes do Estudo da Infecção por HPV em Homens (HIM). 62

Tabela 5 - Características demográfica e sexual associadas à detecção de ao menos um tipo de DNA de beta-papilomavírus humano (β -HPV) na região do canal anal de 717 homens participantes do Estudo da Infecção por HPV em Homens (HIM). 63

Tabela 6 - Características demográfica e sexual associadas à detecção de ao menos um tipo de DNA de beta-papilomavírus humano (β -HPV) cavidade oral de 717 homens participantes do Estudo da Infecção por HPV em Homens (HIM). .. 64

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<	menor que
=	igual a
>	maior que
≤	menor ou igual que
≥	maior ou igual que
°C	grau Celsius
μL	microlitro
μM	micromolar
95% IC	Intervalo de confiança ao nível de 95%
ATR	Ataxia telangiectasia e proteína relacionada com Rad3
BCC	Carcinoma basocelular
CASI	Auto entrevista assistida por computador
CCL20	Quimiocina (motivo C-C) ligante 20
CUL3	Cullin-3
D.D.Gate	Canal de discriminação de pares
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dr	Doutor
Dr. ^a	Doutora
DST	Doenças sexualmente transmissíveis
E	Região precoce
E1	Proteína precoce 1
E2	Proteína precoce 2
E5	Proteína precoce 5
E6	Proteína precoce 6
E6-AP	Proteína associada a E6
E7	Proteína precoce 7
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EUA	Estados Unidos da América
EV	Epidermodisplasia verruciforme
g	Força g
HIM	Infecção por HPV em homens
HPV	Papilomavírus humano
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
ICESP	Instituto do Câncer do Estado de São Paulo
IFN-I	Interferon do tipo 1
IFN-α	Interferon alfa
IFN-β	Interferon beta
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IRF-7	Fator regulador 7 de interferon
Kb	quilobases
L	Região tardia
L1	Proteína tardia 1
L2	Proteína tardia 2

LCR	Região Longa de Controle
M	Molar
MAML1	Mastermind-like 1
MFI	Intensidade de fluorescência média
mg	miligrama
mL	Mililitro
mM	milimolar
MMP2	Metaloproteinase 2
MSM	Homens que têm sexo com homens
MSW	Homens que têm sexo com mulheres
MSWM	Homens que tem sexo com mulheres e homens
MT1-MMP	Metaloproteinase 1 ligada à membrana
NGS	Sequenciamento de nova geração
nm	nanômetro
NMSC	Câncer de pele não-melanoma
nº	Número
OR	Razão de chances
ORF	Regiões abertas de leitura
p.e.	por exemplo
pb	pares de bases
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PHK	Queratinócitos primários humanos
PK2	Proteína quinase 2
pRb	Proteína do retinoblastoma
Prof.	professor
Prof. ^a	professora
rpm	Rotação por minuto
SCC	Carcinoma de células escamosas
SDS	Dodecilsulfato de sódio
STM	Meio de transporte de espécime
TCLE	Termos de consentimento livre e esclarecido
TMAC	Cloreto de tetrametilamônio
Tris-HCl	Tris(hidroximetil)aminometano hidrocloreto
TS-MPG	Genotipagem tipo específica denominada PCR multiplex baseada em microesferas
UV	luz ultravioleta
UVB	luz ultravioleta B
α	Alfa
β	Beta
γ	gama
Δp73	Isoforma delta da p73
μ	mu
ν	nu

RESUMO

Nunes EM. *Prevalência e diversidade de beta-papilomavírus em amostras anogenitais e orais de homens do estudo HIM* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

O papilomavírus humano (HPV) é transmitido principalmente através do contato sexual e a infecção por estes vírus está fortemente associada ao desenvolvimento de tumores do colo do útero, da vulva e do ânus em mulheres, câncer do pênis e do ânus em homens, assim como tumores da cabeça e pescoço em ambos os sexos. Também há estudos em andamento para estimar a proporção de câncer de pele não-melanoma que podem ser atribuíveis às infecções por tipos virais pertencentes aos ramos cutâneos da filogenia do HPV. Os beta- (β -) HPV vem sendo predominantemente isolados de tecidos cutâneos e sugere-se que façam parte da flora comensal humana. Entretanto, pouco se sabe sobre o papel destes nos sítios de detecção, seja em indivíduos imunosuprimidos como imunocompetentes. A fim de compreender a história natural dos HPV em homens, o Estudo da Infecção por HPV em homens (HIM Study) foi desenhado e conduzido entre 2005 e 2013 no Brasil, México e Estados Unidos (EUA). Em sua primeira triagem de amostras genitais, observou-se que 14,7% eram positivas para HPV, entretanto não correspondia a nenhuma das 37 sondas tipo-específicas para detecção dos principais α -HPV. Após um protocolo de PCR fazendo uso de iniciadores genéricos, seguido por sequenciamento, observou-se um elevado número de tipos virais cutâneos nessas amostras. Perante isso, os objetivos deste trabalho foram (1) Determinar a prevalência de 43 tipos de β -HPV em 729 homens participantes do estudo HIM que forneceram amostras anogenitais e orais em mesma visita de seguimento; (2) Identificar fatores demográficos e sexuais independentemente associados com a detecção de DNA destes tipos de HPV nos diferentes sítios anatômicos analisados. Para atingi-los, utilizou-se a metodologia Luminex atualmente bem estabelecida para genotipagem de β -HPV. Dentre os homens genotipados, 557 (77,7%), 389 (54,3%) e 210 (29,3%) foram positivos para algum tipo de β -HPV no região genital, do canal anal e da cavidade oral, respectivamente. Os tipos de β -HPV mais prevalentes foram HPV-21, -22, -24 e -38 em todos os sítios anatômicos. Homens residentes no EUA (OR = 0,55, 95% intervalo de confiança [IC] de 0,38-0,80) e Brasil (OR = 0,49, 95% CI 0,33-0,73) foram significativamente menos propensos a serem detectados com algum β -HPV no canal anal, comparado aos residentes no México. A idade foi marginalmente associada à maior prevalência de HPV na região do canal anal sendo que de homens mais velhos (31-44 anos, OR = 1,30, 95% CI 0,93-1,82; 45-70 anos, OR = 1,59, 95% CI 0,98-2,58) foram mais propensos a serem positivos para DNA de β -HPV, comparado a homens mais jovens (18-30 anos). A prevalência de algum β -HPV na cavidade oral também foi significativamente associada ao país de residência e idade. Fumantes (OR = 0,50, 95% CI 0,32-0,80) foram significativamente menos propensos a serem positivos para β -HPV na cavidade oral do que os homens que nunca fumaram. A ausência de associação entre a detecção de β -HPV e comportamentos sexuais específicos sugere o contato digital e auto-inoculação como rotas alternativas de transmissão desses vírus.

Descritores: papillomaviridae; homens; infecção; canal anal; genitália masculina; técnicas de genotipagem.

ABSTRACT

Nunes EM. *Prevalence and diversity of beta-papillomavirus in anogenital and oral samples of males from the HIM study* [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2016.

HPV is primarily transmitted by sexual contact and infection by these viruses is strongly associated with the development of tumors in the cervix, vulva and anus in women, cancer of the penis and anus in men, as well as tumors in the head and neck in both genders. There are also ongoing studies ongoing to estimate the proportion of non-melanoma skin cancer that may be attributable to infection by viral types from cutaneous branches of the phylogeny of HPV. Human *beta papillomaviruses* (β -HPV) have been predominantly isolated from cutaneous tissues, and are thought to be part of the commensal flora. However, the role of β -HPV detection in these sites is unknown, whether in immunosuppressed or immunocompetent individuals. In order to understand the natural history of HPV in men, the HPV Infection in Men Study (HIM Study) was designed and conducted between 2005 and 2013 in Brazil, Mexico and the United States (US). In a first screening of genital samples, it was observed that 14.7% were positive for HPV, but did not correspond to neither 37 type-specific probes for detection of major α -HPVs. After a PCR protocol using of generic primers followed by sequencing, we observed a large number of cutaneous HPV types in these samples. For this reason, the objectives of this study were (1) To determine the prevalence of 43 types of β -HPV in 729 male participants of the HIM study provided anogenital and oral samples in the same follow-up visit; (2) To identify demographic and sexual factors independently associated with DNA detection of these types of HPV in different anatomical sites analyzed. To achieve these objectives we used the currently well-established Luminex methodology for β -HPV genotyping. Overall, 557 (77.7%), 389 (54.3%) and 210 (29.3%) men were positive for any β -HPV type at the genital, anal canal and oral cavity, respectively. The most prevalent β -HPV types were HPV-21, -22, -24 and -38 within all anatomic sites. Men from the US (OR= 0.55, 95% Confidence Interval [CI] 0.38-0.80) and Brazil (OR=0.49, 95% CI 0.33-0.73) were significantly less likely to have any β -HPV at the anal canal than men from Mexico. Age was marginally associated with anal HPV prevalence with older men (31-44 years, OR=1.30, 95% CI 0.93-1.82; 45-70 years, OR=1.59, 95% CI 0.98-2.58) being more likely to have any β -HPV at the anal canal compared to younger men (18-30 years). Prevalence of any β -HPV at the oral cavity was also significantly associated with country of origin and age. Current (OR=0.50, 95% CI 0.32-0.80) smokers were significantly less likely to have β -HPV at the oral cavity than men that never smoked. Lack of associations between β -HPV detection and specific sexual behaviors suggests digital contact and autoinoculation as surrogate routes of transmission of these viruses.

Descriptors: papillomaviridae; men; infection; anal canal; genitalia male; genotyping techniques.

1 INTRODUÇÃO

Os papilomavírus humanos (*human papillomavirus*, HPV) pertencem à família *Papillomaviridae* (revisado por Bernard, 2005) e são considerados vírus epiteliotrópicos, pois possuem afinidade por diversos epitélios cutâneos e mucosos. O HPV é transmitido principalmente por contato sexual e a infecção por estes vírus está fortemente associada ao desenvolvimento de tumores no colo uterino, vulva e ânus em mulheres; câncer de pênis e ânus em homens; assim como tumores em cabeça e pescoço em ambos os sexos (Forman *et al.*, 2012). Até o momento mais de 200 tipos de HPV já foram descritos dos quais aproximadamente 40 infectam o trato anogenital (International Human Papillomavirus Reference Center, 2016; revisado por de Villiers *et al.*, 2004).

O câncer do colo do útero é a neoplasia associada à infecção por HPV mais prevalente e estima-se que haja um milhão de mulheres lutando contra este câncer, sendo mais de 80% destes casos em países em desenvolvimento (WHO, 2016). A infecção por HPV também tem sido fortemente correlacionada ao desenvolvimento de câncer de ânus em homens e mulheres, sendo que aproximadamente 85% dos 44.000 casos que ocorrem no mundo por ano são atribuíveis à infecção por estes vírus (revisado por IARC, 2007). Ademais, cerca de 50% dos tumores de vulva, vagina, e pênis podem ser atribuídos à infecção por HPV, assim como 20% dos cânceres da orofaringe (Forman *et al.*, 2012). Diversos estudos foram realizados e outros estão em andamento para estimar a proporção de câncer de pele não-melanoma (*non-melanoma skin cancer*, NMSC) que poderia ser atribuída às infecções por tipos virais pertencentes aos ramos cutâneos da filogenia do HPV (Giuliano *et al.*, 2008b).

Os beta- (β -) e gama- (γ -) papilomavírus humanos são dois dos cinco principais gêneros e incluem tipos virais que foram primeiramente isolados de tecidos cutâneos. Hoje sabe-se que β - e γ -HPV estão largamente distribuídos através do corpo, sendo detectados desde a primeira infância, indicando uma natureza ubíqua e de possível integrante da flora comensal (Antonsson *et al.*, 2000, 2003). Este comportamento contrasta claramente com os alfa- (α -) HPV que são conhecidos por suas propriedades carcinogênicas, sendo principalmente isolados de regiões anogenital e oral (revisado por IARC, 2007).

Os gêneros β - e γ -HPV são altamente diversos com aproximadamente 50 tipos virais completamente sequenciados e caracterizados em cada grupo. Informações adicionais advindas de sequenciamento de nova geração (*next-generation sequencing*, NGS) indicam que exista centenas de novos tipos ainda por serem categorizados (Bzhalava *et al.*, 2004; Chouhy *et al.*, 2013).

Os HPV-5 e -8 (ambos pertencentes à espécie β -1) são reconhecidos como agentes etiológicos do carcinoma de células escamosas (SCC) entre pacientes portadores de epidermodisplasia verruciforme (EV), sendo detectados principalmente em áreas expostas ao sol (Jablonska *et al.*, 1972). Além disso, estudos apontam para o possível papel desses vírus em estágios precoces da carcinogênese cutânea em indivíduos imunocompetentes e imunossuprimidos (Arron *et al.*, 2011; Bouvard *et al.*, 2009; Rollison *et al.*, 2008; Weissenborn *et al.*, 2005).

O grupo de trabalho da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) da Organização Mundial de Saúde reconhece que são necessários mais estudos sobre tipos de HPV cutâneos para melhor compreender a larga distribuição observada. As evidências ainda são inconclusivas no que se refere à

associação entre a presença de β -HPV e desenvolvimento de NMSC em indivíduos imunocompetentes. Apesar de haver um alto número de publicações envolvendo mecanismos moleculares viral, ainda é baixo número de publicações envolvendo estudos de coorte e caso-controle investigando a relação entre β -HPV e câncer (Bouvard *et al.*, 2009).

Diversos grupos têm recentemente descrito a prevalência de β -HPV em sítios anatômicos não cutâneos (Bottalico *et al.*, 2011; Forslund *et al.*, 2013; Sichero *et al.*, 2014, 2015; Torres *et al.*, 2015). Entretanto, são necessários mais estudos para compreender a frequência e distribuição destes vírus, além das vias de transmissão e o papel destes nos sítios analisados.

O Estudo da Infecção por HPV em homens (*HIM Study*) é um estudo de coorte prospectivo multicêntrico (Brasil, México e Estados Unidos) que visa aumentar o conhecimento acerca da infecção por HPV em homens. Para isso, amostras anogenitais e orais foram coletadas de aproximadamente 4 mil homens em visitas a cada seis meses durante quatro anos (Giuliano *et al.*, 2008a).

Na primeira triagem de amostras genitais, observou-se que 14,7% dos espécimes analisados eram positivos para HPV, entretanto não hibridizaram com nenhuma das 37 sondas tipo-específicas para os principais α -HPV testadas (Giuliano *et al.*, 2008a). Após um protocolo de PCR fazendo uso de iniciadores genéricos desenhados para amplificar uma ampla gama de tipos de HPV (PGMY09/11, *nested* GP5+/6+ e FAP59/64), seguido por sequenciamento, revelou-se um elevado número de tipos cutâneos nessas amostras (Sichero *et al.*, 2013, 2014, 2015).

Uma vez que um dos objetivos do estudo HIM é identificar características sócio-demográficas e fatores de comportamento sexual e demográficos,

independentemente associados à aquisição, persistência e eliminação da infecção por HPV, conclui-se que é imprescindível melhor explorar e compreender os tipos de HPV que são detectados na região anogenital e oral masculina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Papilomavírus humano

Os papilomavírus humanos (*human papillomavirus*, HPV) são vírus pertencentes à família *Papillomaviridae* (revisador por Bernard, 2005) possuindo capsídeo não-envelopado de 50 nm de diâmetro que engloba uma molécula de DNA dupla fita circular de aproximadamente 8 kb. Os genes virais da região precoce (*early*, E) exercem funções na transcrição e replicação do DNA (*E1*, *E2*), na transformação celular (*E5*, *E6* e *E7*) e podem ainda estimular a carcinogênese (*E6* e *E7*) por marcarem para degradação as proteínas supressoras tumorais p53 e pRb, respectivamente. Os genes tardios (*late*, L) *L1* e *L2* transcrevem a proteína principal e secundária do capsídeo, respectivamente (revisado por zur Hausen, 1996). A região não codificante entre os genes *L1* e *E6* é denominada Região Longa de Controle (*Long Control Region*, LCR) e compreende aproximadamente 10% do genoma viral (Figura 1). Fatores de transcrição virais e celulares se ligam a sequências específicas da LCR regulando a transcrição dos genes precoces (revisado por Bernard, 2002).

A taxa de variabilidade nucleotídica na LCR e nos diversos genes virais difere entre os vários tipos de HPV. A classificação filogenética destes vírus é baseada na identidade da sequência do gene *L1*, uma das regiões mais conservada do genoma viral, permitindo o agrupamento dos vírus em diferentes níveis taxonômicos: gêneros, com identidade menor que 60% que são denominados por letras gregas; espécies, que são nomeadas com a letra grega do gênero correspondente junto a um número e compreende identidade entre 60 e 70% (revisado por Bernard *et al.*, 2010; International Human Papillomavirus

Reference Center, 2016); e tipos, sendo necessário mais que 10% de divergência no gene *L1* para caracterizar um novo tipo viral e ser dada a nomenclatura “HPV” seguido do número correspondente (de Villiers *et al.*, 2004).

FONTE: Adaptado de Doorbar *et al.*, 2015.

Figura 1 – Organização básica de um genoma de alfa-HPV (α -HPV) de alto risco oncogênico, mu-HPV (μ -HPV) e beta-HPV (β -HPV). Embora todos compartilhem uma organização genética em comum, o tamanho e a posição da maior parte das regiões abertas de leitura (*open reading frame*, ORF) podem variar, como por exemplo os β -HPV que não possuem a ORF E5.

Apesar da alta diversidade de tipos descritos, os HPV são agrupados em cinco gêneros: alfa-papilomavírus (α -HPV), beta-papilomavírus (β -HPV), gama-papilomavírus (γ -HPV), mu-papilomavírus (μ -HPV) e nu-papilomavírus (ν -HPV) (revisado por Bernard *et al.*, 2010) (Figura 2). Os HPV do gênero α -papilomavírus são isolados predominantemente de lesões genitais, enquanto que os β -papilomavírus, junto a ação de radiação ultravioleta B (UVB), podem estar envolvidos no desenvolvimento do câncer de pele não-melanoma (NMSC) em indivíduos portadores de epidermodisplasia verruciforme (EV). Os γ -, μ - e ν -papilomavírus têm sido predominantemente observados em lesões cutâneas.

Até o momento mais de 200 tipos de HPV já foram descritos dos quais aproximadamente 40 infectam o trato anogenital (revisado por de Villiers *et al.*, 2004; International Human Papillomavirus Reference Center, 2016). Alguns tipos virais, como os HPV-6 e -11, estão associados exclusivamente às proliferações

benignas, como verrugas comuns e condilomas, e são denominados de baixo risco oncogênico. Outros tipos, como HPV-16, -18, -31 e -33, entre outros, são classificados como HPV de alto risco oncogênico, pois estão epidemiologicamente associados ao desenvolvimento de lesões intra-epiteliais de alto grau e ao carcinoma do colo do útero (Lörincz *et al.*, 1992) (Figura 2).

FONTE: Adaptada de Doorbar *et al.*, 2012.

Figura 2 – Árvore filogenética dos papilomavírus humanos (HPV) baseada no alinhamento dos genes *E1*, *E2*, *L1* e *L2*. Os tipos de HPV estão classificados em cinco gêneros, sendo que alfa, beta, gama representam os maiores grupos. Os alfa-HPV (α -HPV) são divididos em cutâneo de baixo risco oncogênico (em cinza), mucoso de baixo risco oncogênico (em laranja) e mucosos de alto risco (em rosa). Os tipos de alto risco reconhecidos como "carcinogênicos a humanos" (grupo 1A pela IARC) baseiam-se em dados epidemiológicos e estão identificados na imagem em fonte vermelha. Os demais tipos são considerados "prováveis" ou "possíveis" agentes cancerígenos (grupo 2A e 2B pela IARC).

Estes mesmos tipos virais são encontrados regularmente em homens acometidos com cânceres de pênis (40-50%); em tumores de canal anal (88-

94%), em ambos os gêneros; e em cânceres de cabeça e pescoço (ambos os gêneros) apresentando variações na prevalência de DNA de HPV de acordo com o sítio anatômico e localização geografia (p.e. países desenvolvidos tem prevalência 35-50% em câncer de orofaringe *versus* 5-15% em região distinta da cabeça e pescoço) (Bosch *et al.*, 2013).

As taxas de câncer peniano e anal na população mundial são baixas se comparadas aos demais cânceres. Estima-se que a incidência mundial de câncer de pênis seja de 22 mil casos ao ano, sendo que no Brasil corresponde a 2% de todos os tipos de câncer que atingem o homem (Alemany *et al.*, 2016; INCA, 2016d); enquanto que o câncer anal foi diagnosticado em 27 mil indivíduos em 2008, sendo que no Brasil representa 1-2% de todos os tumores do cólon e de 2 a 4% de todos os tipos de câncer que acometem o intestino grosso (85% dos casos são carcinomas epidermóides) (Alemany *et al.*, 2015; INCA, 2016a). Paralelo a estes, a taxa de incidência do câncer de cabeça e pescoço são extremamente heterogêneas quanto ao sítio anatômico, país e gênero, sendo que no Brasil (Goiânia) a taxa de incidência em 10 mil homens maiores de 14 anos no período de 1983-2002 foi 1,3 na cavidade oral, 4,5 na orofaringe (inclui tonsila; somente entre 1998-2002), 1,5 em outras regiões incluídas em cabeça e pescoço (p.e. lábio, cavidade oral, faringe não especificado, laringe, hipofaringe) (Simard *et al.*, 2014). Ainda mais, esperam-se 11,1 mil casos novos de câncer na cavidade oral de homens em 2016 (INCA, 2016b).

2.2 HPV cutâneos

Os β - e γ -HPV são os dois principais gêneros encontrados em tecidos cutâneos, sendo largamente distribuídos pela superfície corpórea saudável.

Apesar de um pequeno grupo de α -HPV apresentar tropismo por tecido cutâneo, a expressão “HPV cutâneos” em grande parte dos casos tem se referido somente aos gêneros β - e γ -HPV, embora uma vez que os genomas de tipos virais destes gêneros apresentam várias diferenças quanto à disposição e tamanho de genes (revisado por Smola, 2014).

Estudos têm demonstram que DNA de β -HPV pode ser detectado desde a primeira infância, com provável transmissão intrafamiliar, até a vida adulta, sugerindo onipresença e participação na flora comensal humana, uma vez que foi observado estar presente em mais de 80% das amostras de pele saudáveis analisadas (Antonsson *et al.*, 2000, 2003). Estas observações contrastam com o que se sabe sobre α -HPV, uma vez que estes tipos mucosos têm maior preferência pelo trato anogenital e oral e são conhecidos por seu envolvimento em processos carcinogênicos (revisado por IARC, 2007). Portanto, os gêneros de HPV parecem variar bastante entre si, não somente com relação ao genoma, mas também quanto ao sítio anatômico preferencial para infecção e desenvolvimento das patologias associadas. Com o advento da metagenômica e sequenciamento de nova geração, tem se tornado possível registrar uma larga diversidade de tipos cutâneos nunca observada, com mais de 50 tipos virais já descritos para cada um destes gêneros cutâneos, sendo prevista a caracterização de mais centenas de novos isolados num futuro próximo (Bzhalava *et al.*, 2014; Chouhy *et al.*, 2013; revisado por de Villiers, 2013; Johansson *et al.*, 2013).

Os primeiros registros de HPV associados às lesões cutâneas papilomatosas com potencial carcinogênico teve um início histórico lento, uma vez que estas verrugas eram somente consideradas como um problema estético, sem implicações clínicas significativas. Esta ideia começou a mudar gradualmente

após o início da década de 20, quando Lewandowsky e Lutz (1922) descreveram pela primeira vez uma condição hereditária caracterizada por uma extensa ocorrência de verrugas em todo o corpo denominada epidermodisplasia verruciforme (EV) (Tanigaki e Endo, 1984). Posteriormente, Stefania Jablonska observou que pacientes portadores de EV infectados por HPV-5 e -8 (ambos pertencentes à espécie β -1) apresentavam um maior risco de desenvolver carcinoma de células escamosas (SCC) em verrugas expostas ao sol (Jablonska *et al.*, 1972). Outros estudos buscaram avaliar o potencial oncogênico dos HPV cutâneos em outros indivíduos portadores de imunossupressão, como em transplantados, e observaram um aumento da ocorrência de SCC associada a taxas significativamente mais elevadas de β -HPV. Mais recentemente, investiga-se a relação destes vírus cutâneos em estágios iniciais da carcinogênese de NMSC em indivíduos imunocomprometidos em estudos epidemiológicos de caso-controle, entretanto os resultados não são conclusivos (Arron *et al.*, 2011; Chahoud *et al.*, 2015; Reuschenbach *et al.*, 2011; Rollison *et al.*, 2008;. Ulrich *et al.*, 2008; Weissenborn *et al.*, 2005).

Após larga análise dos estudos publicados, o grupo de trabalho da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) considerou os β -HPV 5 e 8, encontrados em 90% das lesões SCC de casos de HPV, como possivelmente cancerígenos (grupo 2B) em indivíduos imunossuprimidos portadores de EV (Bouvard *et al.*, 2009; revisado por IARC, 2007) (Figura 3). Ainda assim, a IARC reconhece a necessidade de novas pesquisas adicionais acerca de sobre HPV cutâneos para melhor compreender a ampla distribuição desses vírus. Até o momento, as evidências epidemiológicas não são conclusivas sobre a associação entre alguns tipos β - e γ -HPV e o desenvolvimento de câncer de pele em

indivíduos imunocompetentes, além dos dados relacionados ao mecanismo de infecção e patogênese *in vitro* permanecer sem força para demonstrar a relação causal em NMSC (Bouvard *et al.*, 2009; revisado por Pfister, 2003).

Grupo	Tipos de HPV	Comentários
Tipos de α-HPV		
1	16	Tipo de HPV mais oncogênico, conhecido por causar câncer em vários sítios anatômicos
1	18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59	Evidência suficiente em câncer de colo de útero
2A	68	Evidência limitada em humanos e forte em mecanística para o câncer de colo de útero
2B	26, 53, 66, 67, 70, 73, 82	Evidência limitada em humanos para o câncer de colo de útero
2B	30, 34, 69, 85, 97	Evidência limitada ou suficiente de câncer em humanos
3	6, 11	--
Tipos de β-HPV		
2B	5 e 8	Evidência limitada de câncer de pele em pacientes com epidermodisplasia verruciforme
3	Outros tipos beta e gama	--

FONTE: Adaptado de Bouvard *et al.*, 2009.

Figura 3 – Tipos de papilomavírus humanos (HPV) avaliados pelo grupo de trabalho da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC). Na primeira coluna, estão descritos os grupos desenvolvidos pela IARC para referir-se ao potencial carcinogênico de organismos ou substâncias analisadas. Assim, quando considerado altamente carcinogênico a humanos é inserido no grupo 1; quando possivelmente carcinogênico nos grupos 2A e 2B; e quando não carcinogênico no grupo 3.

2.2.1 Mecanismo molecular da infecção e patogenia por β -HPV

Estudos tem sugerido que a alta carga de β -HPV parece ser importante para iniciar o processo de infecção viral (Boxman *et al.*, 1997; Iannacone *et al.*, 2012; Karagas *et al.*, 2006, 2010; Proby *et al.*, 2011; Weissenborn *et al.*, 2012). Foi observado que em lesões de pele em uma população saudável, o número de cópias de HPV cutâneos é maior que o registrado em lesões pré-câncer advindas destes, assim como em lesão NMSC posteriormente desenvolvidas. Visando compreender melhor este achado, ensaios de hibridização *in situ* das lesões pré-câncer confirmaram que poucos núcleos eram positivos para DNA de HPV (Weissenborn *et al.*, 2005). Além disso, análises de transcritos virais de alguns tipos de β -HPV tem sugerido que estes vírus não apresentam atividade

transcricional em indivíduos com SCC não portadores de EV (Arron *et al.*, 2011). Isso sugere que certos tipos virais do gênero β -HPV devem atuar em uma fase precoce da carcinogênese epitelial, e não na manutenção do tumor como se observa nos casos de infecção por α -HPV, sendo esta hipótese denominada “mecanismo *hit-and-run*” (revisado por Pfister, 2003).

Os β -HPV são encontrados infectando queratinócitos da camada basal de epitélios e células-tronco em folículos capilares (reservatórios de HPV cutâneos) (Boxman *et al.*, 1997), uma vez que, para dar início à infecção, o vírus precisa da maquinaria celular de transcrição e replicação ativa. Portanto, assim como os demais tipos de α -HPV, os β -HPV são estritamente dependentes do estado de diferenciação do epitélio estratificado para completar seu ciclo de vida. Os β -HPV codificam as proteínas E1, E2, E4, E6, E7, mas não E5, uma vez que não possuem o gene correspondente (Figura 1). Em lesões benignas de EV, é possível observar a transcrição de todo genoma viral, como já demonstrado para HPV-5 (pertencente à espécie β -1) (Haller *et al.*, 1995).

Após a entrada do vírus em células da camada basal do epitélio, uma das primeiras etapas do ciclo viral é a transcrição dos genes *E1* e *E2*. Foi observado que a elevada expressão da proteína E2 de HPV-8 (pertencente à espécie β -1) é capaz de regular negativamente os níveis de expressão da subunidade β 4 de integrinas em queratinócitos primários humanos (*primary human keratinocytes*, PHK), gerando um possível desprendimento das células infectadas na membrana basal (Oldak *et al.*, 2004). Além disso, a proteína E2 de HPV-8 foi observada ligando-se aos fatores de transcrição da família C/EBP e podendo contribuir na diferenciação das células infectadas (Hadaschik *et al.*, 2003; Sperling *et al.*, 2012). No núcleo destas células, pode-se notar que a proteína E2 de β -HPV é

capaz de ligar-se às regiões adjacentes de centrômeros/cinetócoro durante a mitose, podendo levar a danos genômicos (Oliveira *et al.*, 2006; Sakakibara *et al.*, 2011).

Em relação à expressão das oncoproteínas E6 e E7 de HPV cutâneos, suas funções estão em investigação tanto em estudos *in vitro* quanto *in vivo*. Sabe-se que HPV-5 é identificado em lesões benignas em portadores de EV e é observada a expressão de transcritos de E6 e principalmente E7 nas camadas epidérmicas mais diferenciadas (Haller *et al.*, 1995).

A LCR de β -HPV identificados em EV, por sua vez, difere-se dos demais gêneros de HPV. Primeiramente, foi observado que a LCR deste gênero viral possui aproximadamente metade do tamanho (cerca de 400 pb), comparado ao demais tipos virais de outros gêneros. Posteriormente, notou-se que, em queratinócitos infectados com HPV-8, o fator regulador 7 e 3 de interferons (IRF-7 e -3, respectivamente) eram capazes de ligarem-se a LCR e controlar a expressão dos genes virais (Akgül *et al.*, 2005b; Kim *et al.*, 2000; Oldak *et al.*, 2011; Ruhland e de Villiers, 2001). O IRF-7, expresso nas camadas suprabasais do epitélio, foi capaz de interagir com promotores tardios do HPV-8, através de ligação direta ao DNA viral na LCR, e assim aumentar a atividade transcricional viral, sendo que a incidência de UVB intensifica a ligação e a resposta. Em contraste, o IRF-3, expresso em todas as camadas do epitélio humano, foi capaz de suprimir a expressão de transcritos de HPV-8. Diferentemente do observado com E6 de HPV-16 que consegue bloquear a atividade de IRF-3, a E6 de HPV-8 liga-se com baixa afinidade a IRF-3 e não é capaz de marcá-la para degradação. Ao aumentar a quantidade de IRF-3 de forma sintética nos queratinócitos, a atividade antiviral é intensificada gerando um estado de imunidade celular que

impede o HPV-8 de evadir o sistema imune (Oldak *et al.*, 2011). Portanto, tem se analisado a possibilidade de IRF-3 como alvo terapêutico (Oldak *et al.*, 2011; revisado por Smola, 2014).

Diversos experimentos *in vitro* têm demonstrado o potencial de transformação celular de diversos tipos de β -HPV, podendo-se especular que a proteína E6 de tipos virais deste gênero fazem uso de diversas estratégias para promover a tumorigênese (Tabela 1). Foi observado que as oncoproteínas E6/E7 de diversos tipos de β -HPV foram capazes de imortalizar queratinócitos primários humanos, sugerindo assim potencial carcinogênico *in vivo*. Assim, sugere-se que a progressão tumoral pode ocorrer sem a necessidade da expressão constitutiva de oncoproteínas virais na manutenção do processo carcinogênico, uma vez que diversas vias são ativadas em um processo de retroalimentação (*feedback*) positivo. Entretanto, os mecanismos moleculares pelos quais as proteínas E6 e E7 de β -HPV atuam no processo oncogênico não estão completamente elucidados, sendo necessário estudos adicionais.

Trabalhos também recentemente publicados têm também demonstrando o papel dos β -HPV no desenvolvimento de tumores em modelos murinos. Camundongos transgênicos expressando a região precoce de HPV-8, sob o promotor de queratina-14, dirigiu a expressão dos transgenes às células basais, levando ao desenvolvimento espontâneo de tumores na pele. Neste estudo, 6% dos camundongos desenvolveram SCC, sendo que a oncoproteína E6 de HPV-8 foi observada ser suficiente para induzir os tumores (Schaper *et al.*, 2005). Em relação à expressão de E6/E7 por HPV-38 (pertencente à espécie β -2), apesar de não resultar na formação espontânea de tumor, esta foi capaz de gerar lesão pré-cancerosa e SCC, após irradiação crônica de luz UV. Portanto, evidencia-se que,

quando há exposição à luz UV, a formação do tumor torna-se acelerada e aumentada (Marcuzzi *et al.*, 2009). Corroborando também a estes achados, foi notado em camundongos transgênicos infectados com transgene E6/E7 de HPV-20 (pertencente à espécie β -1), irradiados cronicamente com luz UVB, que há aumento das taxas de formação de papilomas, apesar de rara ocorrência de SCC (Michel *et al.*, 2006).

Perante isso, observa-se que o infiltrado inflamatório crônico parece ter papel importante na progressão neoplásica (Coussens *et al.*, 2002), como já observado em portadores de EV (revisado por Smola, 2014). Apesar de a proteína E7 dos β -HPV não serem capazes de promover a carcinogênese *in vivo*, apresentam aptidão para evadir o sistema imune do hospedeiro e gerar um microambiente propício às infecções e a carcinogênese, principalmente induzida pela oncoproteína E6 de β -HPV (Tabela 1) (Huibregtse *et al.*, 1993; Marcuzzi *et al.*, 2009; Viarisio *et al.*, 2011). Ainda mais, pode-se concluir que o uso de modelos animais é importante para demonstrar o possível papel oncogênico de alguns tipos de β -HPV, principalmente quando há exposição crônica a luz UV, bem como a importância em se compreender as respostas inflamatórias crônicas na promoção da tumorigênese.

Tabela 1 - Sumário de resultados de estudos *in vitro* e *in vivo* da interação entre as oncoproteínas E6 e E7 de HPV cutâneos e proteínas intracelulares.

Oncoproteína	Tipos de HPV	Proteína de Interação	Ação observada	Referências
E6	HPV-1 e -8	MAML1	Suprime a via de NOTCH mantendo a célula hospedeira indiferenciada; aumenta os danos ao genoma.	Brimer <i>et al.</i> , 2012; Meyers <i>et al.</i> , 2013; Nicolas <i>et al.</i> , 2003; Rozenblatt <i>et al.</i> , 2012; Tan <i>et al.</i> , 2012
	HPV-17a, -38, -49 e -93	p53	Altera a forma pós-translacional da p53 impedindo-a de unir-se aos seus ligantes.	Cornet <i>et al.</i> , 2012; Huibregtse <i>et al.</i> , 1991; Steger e Pfister, 1992; White <i>et al.</i> , 2012a
	HPV-77	p53 e outros ligantes da via	Inibe seletivamente a transcrição de genes pro-apoptóticos após radiação UVB.	Giampieri e Storey, 2004
	HPV-23	PK2	Impede a fosforilação de p53 através de interação com o domínio da proteína quinase 2 (PK2).	Muschik <i>et al.</i> , 2011
	HPV-38	Δ p73	Afeta a sinalização indireta de p53 através da indução da expressão da isoforma Δ p73 (inibidor de p53)	Accardi <i>et al.</i> , 2006
	HPV-8 e -38	Telomerase	Ativa a telomerase de maneira dependente de E6-AP, apesar da interação física estável não ter sido observada.	Bedard <i>et al.</i> , 2008; Gabet <i>et al.</i> , 2008; White <i>et al.</i> , 2012
	HPV-5, -8, -20, -22, -38, -76, -92 e -96	Bak	Desenvolve atividade anti-apoptótica através da degradação proteolítica da proteína pró-apoptótica Bak.	Jackson <i>et al.</i> , 2000; Underbrink <i>et al.</i> , 2008
	HPV-5, -8, -20 e -25	Acetiltransferases e p300/CBP	Realiza ligação específica tanto com a acetiltransferases quanto ao co-ativador transcricional p300/CBP, afetando a sinalização tumorigênica, e a acetilação em eventos de transcrição dependentes de p53.	Howie <i>et al.</i> , 2011; Müller-Schiffmann <i>et al.</i> , 2006; White <i>et al.</i> , 2012a, 2012b;
E7	HPV-5 e -8	ATR	Suprime a diferenciação celular e expressão da quinase ATR levando ao aumentando de quebra das fitas duplas do DNA induzidas por luz UVB, além de manter os dímeros de timina formados.	Giampieri e Storey, 2004; Howie <i>et al.</i> , 2011; Wallace <i>et al.</i> , 2012
	HPV-5 e -38	pRb e CUL3	Desestabiliza pRb e CUL3 e marca-as para degradação.	Caldeira <i>et al.</i> , 2003; Schmitt <i>et al.</i> , 1994; White <i>et al.</i> , 2012b
	HPV-8	MT1-MMP	Induz MT-MMP levando a proliferação celular, angiogênese e ativação de protease pró-angiogênica MMP-2 envolvida na invasão tumoral.	Akgül <i>et al.</i> , 2005a, 2006; Smola-Hess <i>et al.</i> , 2005; Sternlicht <i>et al.</i> , 2011
	HPV-8	C/EBPbeta	Suprime especificamente a expressão de CCL20 prejudicando o recrutamento de células de Langerhans.	Sperling <i>et al.</i> , 2012

ATR- ataxia telangiectasia e proteína relacionada com RAD3; CCL20- quimiocina (motivo C-C) ligante 20; CUL3- Cullin-3; E6-AP- proteína associada a E6; MAML1- Mastermind-like 1; MMP2- metaloproteinase 2; MT1-MMP- metaloproteinase 1 ligada à membrana; PK2- proteína quinase 2; pRb- proteína do retinoblastoma; UVB- raio ultravioleta B; Δ p73- isoforma delta da p73.

Conforme resumido na Tabela 1, diversos estudos foram conduzidos para elucidar os mecanismos moleculares resultantes da infecção por β -HPV *in vitro*, bem como *in vivo* em modelos murinos transgênicos. Estes indicam que as oncoproteínas codificados por β -HPV têm potencial para promover os passos iniciais da carcinogênese. Isso afeta diretamente as funções normais dos

queratinócitos e modula ativamente o microambiente local. A evasão do sistema imunológico local inibe a diferenciação e aumenta o limiar a danos no DNA induzidos por UV. Isso resulta também no aumento do tempo de vida das células hospedeiras através de prevenção de apoptose induzido por UV. Assim, há cada vez mais evidências de que alguns tipos virais do gênero beta-papilomavírus desempenham um papel importante no desenvolvimento do câncer de pele humano. No entanto, mais pesquisas são necessárias para entender as diferenças entre os mecanismos moleculares dos HPV cutâneos e mucosos na carcinogênese.

2.3 Câncer de pele não-melanoma (NMSC)

O câncer de pele não-melanoma (*non-melanoma skin cancer*, NMSC) é o câncer mais comum no mundo, correspondendo a 20% dos casos de câncer, sendo 18 a 20 vezes mais frequente que o câncer de pele do tipo melanoma (Leiter *et al.*, 2014). Em comparação com outros cânceres, pouco se sabe sobre a incidência de NMSC, uma vez que registros de câncer tradicionais muitas vezes excluem NMSC ou o registram de forma incompleta: falhas na identificação e registro do tipo de NMSC observado; primeiro caso de um paciente com NMSC é registrado, entretanto tumores subsequentes não são incluídos (Leiter *et al.*, 2014; Lomas *et al.*, 2012). Além disso, a maioria dos dados de incidência de NMSC advém de estudos locais (cidades), não sendo possível considerar os dados como verdadeiros para uma região geográfica maior (país) (Lomas *et al.*, 2012).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), o NMSC corresponde a 25% de todos os tumores malignos registrados no país e apresenta a maior incidência e mais baixa mortalidade. Para o ano de 2016 esperam-se mais de 175

mil novos casos, sendo cerca de 80,8 mil em homens e 94,9 mil em mulheres; enquanto que a taxa de mortalidade em 2013 foi de 1,7 mil casos, sendo 1 mil em homens e 769 em mulheres (INCA, 2016c).

Ainda assim, observa-se que a incidência de NMSC vem aumentando em diversos países e, embora a razão para isto não seja plenamente clara, relaciona-se com o aumento da exposição ao sol (luz UV) e o início de serviços de registros mais estruturados e aperfeiçoadas (Lomas *et al.*, 2012). Apesar disso, o NMSC tem se tornado um problema crescente nos serviços de saúde em todo o mundo, uma vez que, apesar da mortalidade ser baixa (abaixo de 2 mortes/ano), a morbidade é significativa, principalmente quando ocorre em áreas de alta visibilidade como cabeça e pescoço (Leiter *et al.*, 2014; Lomas *et al.*, 2012).

Um estudo elaborado pelo Hospital do Câncer de Ribeirão Preto (2011) apresentou dados sobre gastos públicos e privado para o Estado de São Paulo para o diagnóstico e tratamento destes tumores. Os autores observaram que o NMSC afeta aproximadamente 0,06% da população brasileira, sendo que não existem políticas públicas para prevenção e análises do impacto econômico do diagnóstico. Visando determinar estes valores, foram estimados os custos do diagnóstico e tratamento de NMSC no Estado de São Paulo entre 2000 a 2007. Foi observado que 95% dos NMSC são diagnosticados em estágios precoces e representam um impacto financeiro ao sistema público e privado de saúde de cerca de R\$ 37 milhões e R\$ 26 milhões ao ano, respectivamente (Souza *et al.*, 2011).

Os principais subtipos de NMSC são o carcinoma basocelular (*basal cell carcinoma*, BCC), correspondendo a 70% dos NMSC, e o carcinoma de células escamosas (*squamous cell carcinoma*, SCC) que compõe 20% dos NMSC.

Ambos os cânceres surgem na camada mais externa da pele denominada epiderme e raramente metastatizam (Figura 4).

Uma vez que NMSC é um problema crescente para os serviços de saúde em todo o mundo, há uma grande necessidade de estudos que avaliem a epidemiologia e os modos de prevenção deste grupo de cânceres, a fim de que se possa rastrear esta doença a partir de indivíduos suscetíveis que apresentem ou não lesões pré-câncer.

FONTE: Adaptado de Mayo Clinic, 2016

Figura 4 – Esquema de células que compõem a epiderme da pele normal (à esquerda) e o desenvolvimento dos cânceres não-melanoma (NMSC) (à direita): carcinoma de células escamosas (SCC), a partir das células escamosas; carcinoma basocelular (BCC), a partir das células basais.

2.3.1 Carcinoma basocelular (BCC)

O BCC surge nas células basais localizadas na camada mais profunda da epiderme (Figura 4) e apresentam-se geralmente como lesões múltiplas, centralizadas no local de origem e raramente fatais em indivíduos de idade avançada (acima de 50 anos). As principais causas conhecidas atualmente são a exposição acumulada ao sol no decorrer da vida ou longos episódios ocasionais de exposição com ocorrência de queimaduras. Portanto, os tumores surgem em

áreas corpóreas de maior exposição à luz UV (principalmente UVB) como face, orelhas, pescoço, couro cabeludo, ombros e dorso. Em raros casos, estes tumores podem ocorrer em áreas não expostas, podendo-se atribuir aos processos de carcinogênese química ou física (contato com arsênico, exposição à radiação), assim como de imunidade (lesões que não cicatrizam ou de complicada cicatrização, doenças de pele inflamatórias crônicas, queimaduras, infecções vacinais ou advindas de tatuagens). Ainda assim, é difícil determinar uma causa única para tumores do tipo BCC quando encontrados em regiões do corpo protegidas do sol ou em indivíduos jovens.

Qualquer indivíduo que se exponha à luz solar é suscetível a desenvolver BCC, porém há outras características fenotípicas que aumentam o risco como possuir pele branca (caucasiana), cabelo loiro ou ruivo, olhos azuis, verdes ou acinzentados. Embora as pessoas mais velhas sejam geralmente as mais afetadas, a idade de incidência desta neoplasia vem diminuindo nas duas últimas décadas devido principalmente à alta exposição à luz solar principalmente em atividades de lazer. Portanto, ainda que seja incomum em crianças, ocasionalmente é observado em adolescentes, com uma alta em indivíduos entre 20 e 30 anos. Quanto ao gênero de maior detecção, tem se observado uma igualdade entre eles nos últimos 30 anos. O diagnóstico de BCC era mais comum em homens, uma vez que era associado a ocupações que exigiam longos períodos de exposição ao sol. Entretanto, atualmente se detecta duas vezes mais BCC em mulheres em torno de 40 anos que em homens na mesma faixa etária (revisado por Skin Cancer Foundation, 2016a).

Os estágios iniciais do BCC são facilmente tratáveis, com índices de cura de aproximadamente 100%. Entretanto, quanto maior o tumor, mais extenso é o

tratamento podendo danificar o tecido adjacente e gerar cicatrizes e desfiguração consideráveis. Além disso, o risco de recidiva é elevado, seja na mesma área acometida ou outra região do corpo, sendo que o diagnóstico de BCC no couro cabeludo e nariz são os de maior risco de recidiva nos dois primeiros anos (revisado por Skin Cancer Foundation, 2016a).

2.3.2 Carcinoma de células escamosas (SCC)

O SCC surge nas células escamosas que constituem a maior parte da epiderme (Figura 4), podendo ocorrer em todas as partes do corpo incluindo membranas mucosas e genitais, embora se desenvolva mais comumente em áreas constantemente expostas ao sol (braços, pernas, pescoço, rosto e couro cabeludo), e principalmente se nestas áreas há danos teciduais advindos da radiação como enrugamento da pele, mudanças na pigmentação e perda de elasticidade.

Entretanto, há diversos fatores que aumentam o risco de desenvolver SCC como fenótipo de pele e cabelos claros, olhos azuis, verdes e acinzentados; ter diagnosticado anterior de BCC ou SCC (confere 15 vezes maior chance); condições hereditárias nas quais a pele é mais susceptível aos danos advindos dos raios UV (p.e. xeroderma pigmentoso¹). Apesar de indivíduos com pele mais escura terem menos chance de desenvolver câncer de pele, indivíduos afrodescendentes também apresentam risco de desenvolver SCC principalmente devido às inflamações cutâneas pré-existentes ou queimaduras. Além disso, o SCC é duas vezes mais frequente em homens e raramente se manifesta antes dos 50 anos, sendo que 80% dos casos são diagnosticados em indivíduos com

¹ Desordem genética de reparo do DNA na qual a capacidade normal do organismo para remover o dano causado pela radiação ultravioleta (UV) é deficiente (James *et al.*, 2006).

mais de 60 anos, ocorrendo a primeira detecção geralmente aos 70 anos (Athas *et al.*, 2003; revisado por Skin Cancer Foundation, 2016b).

A exposição solar crônica é a principal causa de SCC. Sabe-se que o uso de câmaras de bronzamento artificial aumenta em 2,5 vezes a chance de desenvolver SCC quando comparado aos indivíduos que não realizam este procedimento (Karagas *et al.*, 2002). Feridas na pele como queimaduras, cicatrizes previamente expostas à raio-X, úlceras e a exposição à produtos químicos a base de petróleo e arsênio também são causas importantes do SCC, além de infecções agudas e crônicas. Assim, observa-se que condições que levam a uma baixa da imunidade (portadores de HIV, quimioterapia, indivíduos transplantados, exposição excessiva ao sol) também aumentam o risco de desenvolver SCC.

Além disso, há casos em que o desenvolvimento deste é espontâneo e não associado a nenhum fator de risco conhecido, sugerindo-se em alguns casos tendência hereditária (Asgari *et al.*, 2016). Entretanto, em grande parte dos casos o SCC desenvolve-se a partir de lesões pré-câncer advindas de outras patologias que em geral tem como fator intrínseco danos cumulativos advindos da exposição aos raios UV (Tabela 2).

Tabela 2 - Doenças caracterizadas como lesões pré-câncer para o carcinoma de células escamosas (SCC). Dentre estas, a queratose actínica é a principal lesão pré-câncer, enquanto que a doença de Bowen é considerada um estágio precoce de SCC.

Doença	Características
Queratose actínica (AK)	Lesões ásperas, descamativas, pouco elevadas, de coloração entre marrom e vermelho, variando de 1 mm a 2,6 cm de diâmetro e encontradas em áreas expostas ao Sol, sendo identificada na maioria das vezes em pessoas mais velhas. Especialistas consideram as queratoses como uma forma inicial de SCC, pois entre 2% e 10% das queratoses não tratadas evoluem a SCC e entre 40% e 60% dos casos de SCC inicia-se a partir de uma queratose não tratada.
Queilite actínica	Forma clínica de AK que ocorre muitas vezes no lábio inferior, uma vez que este recebe maior exposição à luz solar, comparado ao lábio superior. Os sintomas são de pele seca, rachada, fina, pálida ou branca. Se não tratado de forma imediata, a queilite actínica pode induzir o desenvolvimento de SCC no lábio.
Leucoplasia	Manchas brancas na língua, gengivas, bochechas ou em outras regiões dentro da cavidade oral que têm potencial de evoluir para SCC. Podem aparecer a partir de irritações crônicas devido a doenças ou hábitos (morder a parte interna do lábio, consumo de álcool ou tabaco) ou em arestas dos dentes e dentaduras, entretanto na maioria das vezes, são causadas pelo sol.
Doença de Bowen	Estágio prematuro e não invasivo do SCC. Aparece como uma mancha marrom e/ou vermelha resistente que pode ser confundida com psoríase ou eczema. Se não tratada, pode invadir outras estruturas da pele. É causada na maioria dos casos pela exposição aos raios solares ou ao arsênico, mas também de outras radiações e substâncias químicas cancerígenas. Fatores genéticos e outros traumas podem estar relacionados também ao desenvolvimento.

AK- queratose actínica; cm- centímetro; HPV- papilomavírus humano; mm- milímetro; SCC- carcinoma de células escamosas.

2.4 Estudo da Infecção por HPV em homens (HIM Study)

O Estudo da Infecção por HPV em homens (*HIM Study*) foi proposto com o objetivo principal de aumentar o conhecimento acerca da infecção por HPV em homens. Este estudo prospectivo internacional de grande porte está sendo conduzido em três países do continente americano: Brasil, México e Estados Unidos (EUA), a fim de comparar a detecção de HPV em homens em locais com alta incidência de câncer de colo de útero (Brasil e México) com regiões de baixa incidência (EUA). Para isso, o Estudo HIM acompanhou aproximadamente 4 mil homens de 18-44 anos, a cada seis meses por quatro anos. Além destes, um pequeno grupo de aproximadamente 500 homens com idades entre 45 e 70 anos também foram seguidos. Este estudo foi financiado pelo Instituto Nacional de

Saúde do Estados Unidos (NIH-USA) e tem como pesquisadores principais: Dr.^a Anna Giuliano do H. Lee Moffitt Cancer Center and Research Institute em Tampa, Flórida (EUA); Prof.^a Dr.^a Luisa Lina Villa do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo e Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Brasil); e Dr. Eduardo Lazcano-Ponce do Instituto Nacional de Saúde Pública do México em Cuernavaca, Morelos (México).

No México, os homens foram recrutados no Instituto de Medicina y Seguridad Social (IMSS), da área do Estado de Morelos. No Brasil, os homens foram recrutados inicialmente no Centro de Referência e Treinamento em DST/AIDS e também na população em geral. No EUA, os participantes eram oriundos da Universidade do Sul da Flórida e da área metropolitana da grande Tampa. Antes do início do estudo, as comissões de ética em estudos com humanos da Universidade do Sul da Flórida (EUA), o Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer (Brasil), Centro de Referência e Treinamento em DST/AIDS (Brasil) e o Instituto de Medicina y Seguridad Social (México) do México aprovaram todos os procedimentos. Todos os participantes assinaram os termos de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo A).

Os participantes das coortes foram recrutados a partir de setembro de 2005 e seguidos até agosto de 2013. A inclusão dos participantes foi finalizada em setembro de 2009 com um total de 4.292 homens, dos quais 1.443 eram do Brasil, 1.426 do EUA e 1.423 do México, tendo sido realizadas em quatro anos aproximadamente 18 mil consultas. Notou-se que 80% dos homens que compareceram à primeira consulta, subsequente à denominada consulta zero (admissão, 15 dias antes), completaram os quatro anos de seguimento no estudo e forneceram informações fidedignas referente à incidência e persistência da

infecção por HPV. Conforme previsto no protocolo, o grupo com idade acima de 45 anos foi composto por aproximadamente 180 homens em cada centro (Giuliano *et al.*, 2008a).

Inicialmente o estudo teve como objetivos específicos: (1) determinar a incidência e persistência de 37 tipos de α -HPV que comumente afetam o trato genital feminino em amostras coletadas da região genital externa dos participantes; (2) estudar a resposta imune humoral à infecção por HPV em homens; (3) identificar fatores (por exemplo, comportamento sexual, uso de preservativo, circuncisão, infecções sexualmente transmitidas concomitantes) independentemente associados com a aquisição, persistência e remissão de infecções por HPV tipo-específicas em homens.

Em cada uma das nove consultas clínicas programadas, os participantes preencheram um questionário, submeteram-se a um exame que incluiu inspeção visual da pele da genitália externa, forneceram uma amostra de sangue, de células da boca (enxágue bucal), de esfregaços da pele do pênis (sulco coronal, glândula do pênis e corpo do pênis, coletadas individualmente e combinadas em apenas uma amostra por homem/visita) e do canal anal (nos indivíduos que aceitaram esta coleta). Caso o indivíduo apresentasse lesão em algum dos sítios anatômicos em alguma visita, uma amostra foi coletada para diagnóstico e o indivíduo encaminhado para eventual tratamento.

O questionário aplicado a cada visita contém perguntas versando sobre o comportamento sexual e hábitos pessoais do participante, incluindo também características sócio-demográficas, aculturação, estado de circuncisão, histórico de DST, medidas contraceptivas, uso de preservativos, consumo de álcool, história de esfregaços citológicos (Papanicolaou) anormais nas parcerias sexuais

femininas, além do consumo presente e passado de tabaco. Desta forma, tem sido possível relacionar a infecção por HPV às determinantes de risco de persistência da infecção e do desenvolvimento de neoplasias através das informações obtidas e analisadas a partir dos questionários epidemiológicos (revisado por Nunes, 2013).

Os espécimes genitais, de canal anal e oral, além de amostras de lesões, foram transportados ao laboratório da Dr.^a Anna Giuliano, no H. Lee Moffitt Cancer Center (Tampa, FL, EUA), onde foram armazenados a -80°C até que a detecção e genotipagem de HPV fossem realizadas. As amostras ainda estão em testes para a presença de DNA viral utilizando-se a reação em cadeia de polimerase (PCR) empregando-se os iniciadores consenso PGMY09/11 capazes de amplificar um fragmento de 450 pb do gene *L1* de uma ampla gama de tipos de α -HPV genitais (Gravitt *et al.*, 2000).

Com o objetivo de verificar a suficiência e qualidade do DNA extraído, um fragmento do gene de β -globina humana é co-amplificado empregando-se os iniciadores PCO4 e GH20. A genotipagem de HPV é realizada utilizando-se o método de hibridização reversa em tiras, denominado *Linear Array*, em todas as amostras do Estudo (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA, EUA) (Gravitt *et al.*, 1998). Em resumo, os produtos de PCR marcados com biotina são desnaturados e acrescentados às tiras contendo oligonucleotídeos correspondendo a cada um dos tipos de α -HPV em posições específicas: -6, -11, -16, -18, -26, -31, -33, -35, -39, -40, -42, -45, -51 a -59, -61, -62, -64, -66, -67, -68, -69, -70, -71, -72, -73, -81, -82, -83, -84, -IS39, e -CP6108. A interpretação das tiras é feita com um molde marcado com linhas indicando a posição de cada sonda em relação à marca de referência.

Análises iniciais deste estudo incluíram amostras genitais de 1.160 homens recrutados de março de 2005 a dezembro de 2006. Neste grupo de indivíduos a prevalência da infecção por α -HPV foi de 65,2%, sendo 12% por tipos de alto risco oncogênico, 20,7% por tipos de baixo risco oncogênico, 17,8% infecção múltipla por tipos de alto e baixo risco oncogênicos e 14,7% de infecções não-classificadas (Giuliano *et al.*, 2008a). A prevalência da infecção por α -HPV foi maior entre os participantes recrutados no Brasil (72,3%) em comparação ao EUA (61,3%) e ao México (61,9%). Observou-se associação entre a infecção por qualquer tipo de α -HPV e o número de parceiros sexuais totais e recentes (últimos três meses) (Giuliano *et al.*, 2008a). Ademais, foi observada que a circuncisão estava associada ao menor risco de detecção de α -HPV (Giuliano *et al.*, 2009). A circuncisão foi mais comumente observada entre os participantes do EUA (83,2%), sendo mais rara no México (14,1%) e Brasil (14,9%). Ao contrário do que se verifica entre mulheres, não foi observada associação entre idade e a infecção por HPV (Giuliano *et al.*, 2008a).

A alta prevalência de infecções por HPV não-classificadas (14,7%) detectadas entre os participantes desta coorte foi intrigante. Estas incluíam amostras positivas por PCR, entretanto negativas quando submetidas à genotipagem pela metodologia de *Linear Array* que é capaz de identificar 37 tipos de α -HPV mais comumente detectados em amostras de colo de útero. As infecções não-classificadas foram mais comuns entre os indivíduos recrutados no Estados Unidos (20,0%) em comparação com México (13,5%) e Brasil (10,0%). Uma prevalência semelhante de tipos de HPV não-classificados foi também observada em amostras de epitélio da genitália externa de homens no EUA

(Nielson *et al.*, 2007). Interessantemente, foi observado que a infecção por tipos não-classificados diminuiu significativamente com a idade.

Estas amostras categorizadas como infecção não-classificadas poderiam ser resultado da amplificação não específica de genes não relacionados ao HPV, ou representar infecções por tipos de HPV diferentes dos detectados pela metodologia empregada. Com o objetivo de caracterizar estas amostras, foi realizado um estudo piloto em que 204 espécimes foram analisados através de reação de PCR do tipo *nested* empregando-se os iniciadores genéricos para α -HPV PGMY09/11 e GP5+/6+ nas reações externa e interna, respectivamente, resultando na amplificação final de um fragmento de aproximadamente 150 pb do gene *L1* de diversos tipos deste gênero viral. Entre estas amostras da genitália externa não-classificadas observou-se uma alta prevalência de tipos pertencentes aos gêneros β - e γ -HPV (Sichero *et al.*, 2013). Em seguida, um subconjunto de 17 amostras genitais foi analisado usando a tecnologia Luminex para detecção de β -HPV e observaram-se infecções por múltiplos tipos na maior parte dos esfregaços (Tommasino M. e Gheit T., comunicação pessoal). Estas análises foram realizadas no Laboratório de Infecções e Biologia do Câncer da Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (Lyon, França), supervisionado pelo Dr. Massimo Tommasino.

Estes dados sugeriram que o protocolo baseado em PCR-sequenciamento utilizado estaria subestimando a real prevalência de tipos de HPV "cutâneos" entre estas amostras não-classificadas. A fim de compreender o significado desses tipos virais na história natural da infecção pelo HPV, tornou-se necessária uma análise mais ampla e detalhada.

2.5 Tecnologias para detecção e tipagem do HPV

Alguns estudos mostram que o teste de detecção de DNA de HPV, adjunto ao teste citológico (Papanicolaou), é capaz de identificar mulheres com alto risco de desenvolver câncer de colo de útero, especialmente em casos de infecção persistente por HPV de alto risco (Muñoz *et al.*, 2003). Além disso, a detecção e tipagem do HPV são importantes não apenas em estudos epidemiológicos, para caracterizar a distribuição de diferentes tipos virais em todo o mundo, mas também com o intuito de monitorar a eficácia das vacinas profiláticas disponíveis contra o HPV.

Várias técnicas estão disponíveis atualmente para a detecção e genotipagem de DNA de HPV como a hibridização *in situ*, ensaio de captura híbrida 2 e outras metodologias baseadas em amplificação por PCR de fragmentos específicos do genoma viral, seguido pela genotipagem através de sequenciamento, RFLP (polimorfismo de tamanho de fragmentação de restrição) ou hibridização com sondas tipo-específicas (revisado por IARC, 2007). Mais recentemente, os ensaios baseados em diferentes protocolos de PCR, seguidos por genotipagem através de hibridização reversa, foram desenvolvidos e validados para detecção e tipificação de diversos α -HPV (Gravitt *et al.*, 1998; Kleter *et al.*, 1999; van den Brule *et al.*, 2002). No entanto, para estudos epidemiológicos, estes ensaios podem ser limitados: nas técnicas de detecção mais utilizados, aproximadamente 40 sondas tipo-específicas são hibridizadas simultaneamente em uma amostra; e grande parte das técnicas depende de interpretação visual dos sinais gerados. Portanto, conforme sugerido por Ma e col. (2014), a compreensão da prevalência de HPV pode estar limitada pelo estreito espectro dos métodos de detecção de HPV.

A tecnologia Luminex baseia-se no uso de esferas de poliestireno com diâmetro de aproximadamente 5,6 μM corados internamente com dois fluoróforos espectralmente diferentes nos quais é possível acoplar sondas de oligonucleotídeos. O desenvolvimento de 100 conjuntos de esferas com diferentes espectros de absorbância permite a utilização simultânea de 100 sondas tipo específicas diferentes numa única reação (Figura 5). Além disso, esta tecnologia é útil em estudos de grande escala uma vez que é possível analisar 96 produtos de PCR em cada reação simultaneamente, além da semi-quantificação da carga de DNA viral inferida indiretamente pela fluorescência medida (Gheit *et al.*, 2007) (Figura 6).

A tecnologia Luminex tem sido utilizada com sucesso para a genotipagem de 45 tipos diferentes de HPV através do uso de produtos de PCR amplificados com os iniciadores genéricos PGMY09/11 (Gravitt *et al.*, 1998; Wallace *et al.*, 2005) e GP5+/6+ (Schmitt *et al.*, 2006; van den Brule *et al.*, 2002), capazes de identificar um amplo espectro de tipos de α -HPV. Também tem sido utilizada eficazmente para detectar e genotipar β -HPV (Gheit *et al.*, 2007). Estudos têm mostrado que a metodologia Luminex é mais sensível para a detecção de HPV em amostras clínicas em comparação com as metodologias baseadas em hibridação reversa (Schmitt *et al.*, 2006), sendo assim adequada para aplicações diagnósticas e epidemiológicas.

FONTE: Adaptado de QuimiNet.com

Figura 5 – Componentes da reação para genotipagem de β-HPV via tecnologia Luminex. Até 100 distintas microesferas de poliestireno acopladas a sondas oligonucleotídicas podem ser utilizadas no processo diagnóstico. Na metodologia descrita neste projeto, faz-se uso de 43 sondas distintas complementarem ao gene *E7* de β-HPV.

FONTE: Adaptado de Zheng e He, 2012

Figura 6 – Processo de detecção de β-HPV pela tecnologia Luminex. Funcionando como um citômetro de fluxo, as microesferas são decodificadas de acordo com sua coloração óptica única via detector de microesferas (laser de classificação realizando análise qualitativa), enquanto que o detector de analito (laser repórter) identifica a fluorescência (advinda da atividade da ficoeritrina-R-estreptavidina ligada à biotina dos iniciadores) emitida por cada produto nucleotídico pareado a sondas ao redor da microesfera lida (análise semi-quantitativa).

3 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

1. Determinar a prevalência de 43 tipos de beta-HPV em 729 homens participantes do estudo HIM que forneceram amostras anogenitais e orais em mesma visita de seguimento;
2. Identificar fatores demográficos e sexuais independentemente associados com a detecção de DNA destes tipos de HPV nos diferentes sítios anatômicos analisados.

4 MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo e população

Mais de 4 mil participantes foram incluídos no Estudo HIM advindos de São Paulo (Brasil), Cuernavaca (México) e Tampa (EUA), entre 2005 e 2009, e acompanhados a cada seis meses num período médio de quatro anos.

Os critérios de elegibilidade para participação no estudo incluíram: (a) idades entre 18-44 anos e um grupo menor entre 45 e 70 anos; (b) residentes no sul da Flórida (EUA), São Paulo (Brasil) ou Estado de Morelos (México); (c) não ter diagnóstico anterior de câncer de pênis ou ânus (não foram excluídos os participantes que apresentaram câncer de cabeça e pescoço); (d) não apresentar diagnóstico anterior de verrugas genitais ou anais; (e) não reportar atuais sintomas de ou tratamento para doenças sexualmente transmissíveis (DST); (f) não participar de estudos de imunização para vacina de HPV; (g) não ser portador de HIV ou ter diagnóstico de AIDS; (h) não apresentar histórico de prisão, morar na rua ou fazer uso de drogas nos últimos seis meses; (i) concordar com as 10 consultas programadas a cada seis meses durante quatro anos, assim como não possuir planos de mudar de município dentro deste período (Giuliano *et al.*, 2008a; Kreimer *et al.*, 2011; Nyitray *et al.*, 2011). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos em todas as instituições envolvidas (Anexo A e B).

A seleção dos participantes que compuseram o presente projeto foi realizada de forma randômica incluindo 243 homens de cada localidade do Estudo HIM (Brasil, México e EUA). Cada participante contribuiu, em uma mesma visita, com dados demográficos e de comportamento sexual, uma amostra genital, uma de

canal anal e um enxágue oral. Entretanto as visitas dos indivíduos incluídos diferiam.

4.2 Coleta dos espécimes

Os participantes completaram um auto questionário com aproximadamente 88 itens (cerca de 20 minutos para preenchimento) através de auto entrevista assistida por computador (*computer-assisted self-interview*, CASI) produzido no idioma de cada local em que foi aplicado (português, espanhol ou inglês). As perguntas realizadas tratavam principalmente de características demográficas, uso de substâncias tóxicas e comportamentos sexuais (Giuliano *et al.*, 2008; Nyitray *et al.*, 2011).

O exame clínico da genitália externa consistiu da coleta de células via esfregaço fazendo uso de três hastes estéreis cobertas com Dracon pré-umedecido. A primeira haste foi utilizada para coleta de material biológico do sulco coronal e glândula. A segunda foi usada para coleta de células nas áreas dorsal e ventral do corpo peniano. Por fim, a última haste foi utilizada para coleta de células na região escrotal. Posteriormente, as três hastes foram adicionadas juntas em um mesmo tubo contendo solução tamponada preservante (*Specimen Transport Medium*, STM, Digene Corporation, Gaithersburg, MD, EUA), e esta amostra então foi denominada “genital externa”.

Em uma haste separada, coletaram-se células via esfregaço da borda anal e linha dentada. Esta amostra foi também adicionada em um tubo com STM e rotulado como espécime de “canal anal”.

Por fim, os enxágues orais foram obtidos de bochecho por 15 segundos e gargarejo, também por 15 segundos, sendo o líquido resultante expectorado em um copo e denominado como amostra “oral”.

4.3 Digestão e extração orgânica do DNA

Aproximadamente 200 μ L dos espécimes anogenitais ou enxágues orais foram digeridos em 200 μ L de solução de lise (10 mM Tris-HCl pH=8, 1 mM EDTA pH=8, 1 mg/mL proteinase K, 1% SDS) por incubação por 16 horas. Posteriormente, a extração orgânica (fenol/clorofórmio) foi realizada. Foram acrescentados 200 μ L de uma solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico na concentração 25:24:1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) em cada amostra digerida e foi misturada vigorosamente por um minuto em vortex e centrifugada por cinco minutos a 13.362 g (equivalente a 12.000 rpm) a fim de separar os componentes aquosos dos lipofílicos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo no qual foram adicionados 200 μ L de solução de clorofórmio:álcool isoamílico na concentração 24:1. A mistura foi novamente misturada vigorosamente por um minuto em vortex e centrifugada por cinco minutos a 13.362 g. A fase aquosa formada foi transferida para um novo tubo para então prosseguir com a precipitação do DNA. Para tanto, 20 μ L de acetato de amônio 3 M e 500 μ L de etanol 100% foram adicionados à amostra e incubados a -80°C por duas horas. Posteriormente, a solução com o DNA precipitado foi submetida à centrifugação por 20 minutos a 13.362 g a 4°C. A solução então foi descartada e o precipitado lavado com 500 μ L de etanol 70% e a amostra foi submetida à centrifugação por mais 10 minutos a 13.362 g a 4°C. Visando eliminar resíduos de álcool, o tubo foi seco em um banho seco por 10 minutos a 65°C.

Finalmente, o DNA extraído foi ressuspenso em 60 µL de água deionizada e destilada. O DNA então foi estocado a -20°C até que as análises de genotipagem fossem realizadas.

4.4 Detecção e genotipagem de beta-papilomavírus

4.4.1 PCR multiplex

A detecção de DNA de β-HPV foi realizada através da metodologia de genotipagem tipo-específica denominada PCR multiplex baseada em microesferas (*type-specific PCR bead-based multiplex genotyping*, TS-MPG), sendo esta já descrita anteriormente (Gheit *et al.*, 2007). Esta técnica consiste de uma PCR multiplex que faz uso de uma mistura de 43 pares de iniciadores marcados com biotina capazes de amplificar fragmentos com tamanhos entre 180 e 280 pb da sequência do gene *E7* de β-HPV de cinco espécies distintas: β-1 (HPV-5, -8, -12, -14, -19, -20, -21, -24, -25, -36, -47, -93, -98, -99, -105, -118, -124 e -143), β-2 (HPV-9, -15, -17, -22, -23, -37, -38, -80, -100, -104, -107, -110, -111, -113, -120, -122, -145 e -151), β-3 (HPV-49, -75, -76 e -115), β-4 (HPV-92) e β-5 (HPV-96 e -150) foram adicionados na mesma reação de PCR um par de iniciadores biotinilados para detecção de β-globina a fim de avaliar a qualidade e suficiência do DNA genômico extraído. Todos os pares de iniciadores utilizados foram desenvolvidos pelo Dr. Tarik Gheit no Laboratório de Infecção e Biologia do Câncer da IARC, em Lyon, na França.

A reação de PCR multiplex foi realizada fazendo uso do QIAGEN Multiplex PCR kit (Qiagen, Dusseldorf, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante (10 µL de DNA em uma reação de volume final 25 µL). No

termociclador, o DNA primeiramente foi desnaturado por 15 minutos a 95°C. Posteriormente, foram efetuados 45 ciclos de amplificação, sendo que cada ciclo foi composto por 30 segundos de desnaturação a 94°C, 3 minutos de anelamento a 63°C e 1,5 minutos de alongamento da cadeia a 72°C. Por fim, o material amplificado foi estendido por 10 minutos a 72°C. Como controle negativo foram incluídos na reação de PCR um tubo com a mistura de reação, porém sem DNA; e uma amostra somente com água (branco) para controle na etapa de hibridização.

4.4.2 Ensaio de hibridização

As sondas β -HPV tipo-específicas foram acopladas às microesferas de poliestireno pelo Dr. Tarik Gheit no Laboratório de Infecção e Biologia do Câncer da IARC, em Lyon, na França. Para a genotipagem dos β -HPV pela tecnologia Luminex foram utilizados 10 μ L dos produtos de PCR (Schmitt *et al.*, 2006).

O ensaio de hibridização consistiu primeiramente em adicionar 40 μ L de solução de sondas acopladas às microesferas aos produtos amplificados em placas de 96 poços. Estimou-se que este volume de solução microesferas-sondas contém em torno de 200 microesferas acopladas a cada sonda β -HPV tipo-específica. Em seguida, os produtos de PCR foram desnaturados por aquecimento a 95°C por 15 minutos. Após incubação em gelo por 1 minuto, a placa foi agitada a 1,6 g (equivalente a 500 rpm) a 40°C por 30 minutos, no escuro, para possibilitar a hibridização entre as sondas e os produtos amplificados. As misturas então hibridizadas foram transferidas para uma placa com filtro que permite lavagem a vácuo (*Multiscreen Filter Plates*, Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) e foram utilizados 100 μ L de solução de lavagem (PBS 1X,

Tween 20 0,02%) a fim de dispensar os produtos não hibridizados. Em seguida, foram adicionados 50 µL de uma solução de estreptavidina-R-ficoeritrina (Bio-rad, Hercules, CA, EUA) diluída 1:750 em solução de coloração (Sarcozyl 20%, Tris HCl 1 mM, EDTA 0,5mM, 4,5 M TMAC), com o intuito de ligar a estreptavidina da solução à biotina dos iniciadores, assim como possibilitar a reação entre ficoeritrina e a solução de coloração preparada. Após incubação por 30 minutos a 0,6 g (equivalente a 600 rpm) a temperatura ambiente, foram realizadas duas lavagens com 100 µL de solução de lavagem. As microesferas-sondas hibridizadas ao produto de PCR foram finalmente ressuspensas em 100 µL de solução de lavagem por incubação a 600 rpm por 5 minutos para então seguir à análise no equipamento Luminex 200 (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha).

As leituras foram realizadas no programa xPONENT 3.1 (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) configurado para discriminar microesferas individuais de duplas no intervalo de 8.000-15.000 (*Doublet Discriminator Gate*, D.D.Gate) num período de 60 segundos (*time-out*). Os resultados foram expressos através da intensidade de fluorescência média (MFI) de pelo menos 100 microesferas por analito (sonda tipo-específica). Portanto, as amostras testadas apresentaram um valor distinto em MFI para cada analito avaliado. Fazendo uso do programa Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, Santa Rosa, CA, EUA), o arquivo fornecido pelo xPONENT foi processado. Primeiramente, foi realizado o cálculo do valor de corte (*cutoff*) para cada analito o qual inclui o cálculo da mediana das amostras para cada analito, a adição de 5 MFI às medianas resultantes de cada analito e a multiplicação destes valores por 1,1. Posteriormente, subtrai-se o valor de corte de cada analito dos valores MFI fornecidos pelo equipamento para cada

amostra correspondente. Foram consideradas positivas somente as amostras que apresentaram resultados finais acima de 20 MFI.

4.5 Análises estatísticas

Os dados demográficos e de comportamento sexual foram cruzados com os resultados encontrados na genotipagem para β -HPV, para cada sítio anatômico, fazendo uso do teste de chi-quadrado de Pearson, onde a associação foi considerada significativa quando $P < 0,05$. A infecção por DNA de β -HPV foi definida como a identificação de ao menos um tipo de β -HPV no sítio anatômico observado. Múltiplas infecções foram definidas como a presença de mais de um tipo de DNA de β -HPV identificado em um mesmo sítio anatômico do participante.

A orientação sexual foi categorizada baseada nas respostas fornecidas pelos participantes em resposta a questão “ter relação sexual vaginal ou oral com uma mulher”, “ter relação sexual oral com um homem” e “ter relação sexual anal com um homem”. Assim, homens que têm sexo com mulheres (*men that have sex with women*, MSW) foram definidos como homens que reportaram relação sexual somente com mulheres; homens que têm sexo com homens (*men that have sex with men*, MSM) como os homens que reportaram atividade sexual oral ou anal apenas com homens; e “homens que tem sexo com mulheres e homens” (*men that have sex with women and men*, MSWM) como homens que reportaram relação sexual vaginal, anal ou oral com mulheres e anal ou oral com homens. Por fim, definiu-se que homens que não apresentaram atividade sexual nem com homens nem mulheres foram caracterizados como “virgens”.

A razão de chances (*odds ratios*, OR) e o intervalo de confiança ao nível de 95% (95% IC) foram calculados usando regressão logística para avaliar os fatores

associados com a detecção de algum β -HPV em cada sítio anatômico. O método *Backwards elimination* foi utilizado para selecionar os fatores independentemente associados com a detecção de algum β -HPV em cada sítio anatômico e somente os fatores que apresentaram valor de $P \leq 0,20$ foram inseridos no modelo multivariado. Todas as análises foram realizadas no programa SAS versão 9.3 (SAS Institute, Cary, NC, EUA).

5 RESULTADOS

A população deste estudo era em sua maior parte branca (52%), não hispânica (56%), não circuncidado (63%), casada ou amasiada (51%), com idade inferior a 44 anos (87%) e não fumante (60%). A maior parte dos indivíduos eram homens que fazem sexo com mulheres (85%), sendo que grande parte destes reportou ter até nove parceiras sexuais ao longo da vida (55%) (dados não mostrados).

Dentre os 729 homens inicialmente incluídos neste estudo, quatro foram excluídos das análises devido a problemas técnicos durante a extração de DNA das amostras oriundas destes indivíduos de ao menos uma localização anatômica. A amplificação do gene da β -globina foi observada em 697 (97,2%), 713 (99,4%) e 717 (100%) das amostras genitais, do canal anal e orais, respectivamente. Entre as amostras que puderam ser submetidas à detecção e tipagem de β -HPV, oito homens apresentaram ao menos um espécime inadequado (β -globina e β -HPV negativos) e foram excluídos das análises. Assim, no final este projeto englobou a análise epidemiológica de 717 homens (238 EUA, 241 Brasil e 238 México) que apresentaram amostras adequadas para os três sítios anatômicos (β -globina positiva e β -HPV negativo; ou β -globina negativa e β -HPV positiva) (Figura 7).

Ao menos um tipo de β -HPV foi detectado em um dos três sítios anatômicos em 637 (89%) homens, sendo ao menos um tipo detectado em 557 (77,7%) amostras genitais, 389 (54,3%) do canal anal e 210 (29,3%) da cavidade oral (Figura 8A). As maiores prevalências de β -HPV foram observadas entre as amostras de canal anal e oral de residentes no México comparadas aos

indivíduos do Brasil e EUA. Ainda mais, nas amostras de canal anal e enxágue oral, a prevalência de β -HPV foi significativamente maior com o aumento da idade (Figura 8B).

Um total de 3.302 infecções simples foi detectado nos três sítios anatômicos dos 717 homens incluídos na análise. As principais espécies virais detectadas foram β -1 (1.281/3.302, 38,8%) e β -2 (1.682/3.302, 50,9%), independente do sítio anatômico analisado. Os tipos virais mais comumente detectados nos três sítios anatômicos foram HPV-21 e HPV-24 (ambos pertencentes à espécie β -1) e HPV-22 e HPV-38 (ambos da espécie β -2) (Tabela 3). O HPV-150 foi o único tipo viral capaz de ser detectado pela metodologia empregada que não foi detectado em nenhum dos sítios anatômicos. A infecção por múltiplos tipos virais de β -HPV simultaneamente foi mais comumente observada na região genital (2-19 tipos) do que na região do canal anal (2-9 tipos) ou cavidade oral (2-11 tipos) (Tabela 3).

Com o objetivo de compreender a relação entre a detecção de β -HPV e os fatores demográficos e de comportamento sexual observado, foi realizada análise multivariada de regressão logística para cada sítio anatômico individualmente. A análise das amostras genitais não incluiu as variáveis “idade”, “orientação sexual” e “número de bebidas alcoólicas ingeridas por mês” uma vez que estas não atingiram significância estatística no OR bruto (Tabela 4). Portanto, estas variáveis foram consideradas como não explicativas para a detecção de β -HPV na região genital externa masculina. Ainda assim, observou-se uma tendência ao aumento da prevalência de DNA de β -HPV com o aumento da idade (Figura 8B; Tabela 4) e orientação sexual MSM (Tabela 4). Por outro lado, observou-se menor presença de β -HPV quando houve relato de ingestão de álcool comparado àqueles que nunca beberam (Tabela 5).

Figura 7 – Desenho do estudo indicando o número de amostras analisadas por sítio anatômico e país.

Em aproximadamente metade da população deste estudo (54%) foi detectada ao menos um tipo de β -HPV na região do canal anal. Os homens que residiam no Brasil (OR=0,49, 95% IC 0,33-0,73) e no EUA (OR=0,55, 95% IC 0,38-0,80) foram significativamente menos associados à detecção de β -HPV no canal anal comparado aos homens que residiam no México (Figura 8A, Tabela 4). Homens mais velhos, comparados à faixa de 18-30 anos, estavam associados marginalmente com o aumento de detecção de ao menos um tipo de β -HPV no canal anal após o ajuste por país de residência (Figura 8B; Tabela 5). Também

foram desenvolvidos modelos que incluíam o número de parceiros masculinos em relações sexuais anais no decorrer da vida, entretanto não houve alteração nos valores de OR, tanto na associação com país de residência quanto com idade (dados não mostrados).

Figura 8 – Prevalência geral de beta-papilomavírus humano (β -HPV) por (A) país e (B) idade nas amostras genitais, de canal anal e cavidade oral, coletados em mesma visita, de 717 homens participantes do Estudo da Infecção por HPV em Homens (HIM). O valor de P (p) foi calculado pelo teste de chi-quadrado.

Tabela 3 - Frequência de tipos de beta-papilomavírus humano (β -HPV) nas regiões genitais, canal anal e cavidade oral, coletados em mesma visita, de 717 homens participantes do Estudo da Infecção por HPV em Homens (HIM).

Espécies	Tipo	Genital n (%)	Anal canal n (%)	Oral n (%)
B1	HPV-5	70 (9,8)	34 (4,7)	11 (1,5)
	HPV-8	86 (12,0)	45 (6,3)	20 (2,8)
	HPV-12	77 (10,7)	25 (3,5)	14 (2,0)
	HPV-14	36 (5,0)	10 (1,4)	3 (4,0)
	HPV-19	15 (2,1)	7 (1,0)	4 (0,6)
	HPV-20	16 (2,2)	6 (0,8)	1 (0,1)
	HPV-21	128 (17,9)	79 (11,0)	56 (7,8)
	HPV-24	110 (15,3)	53 (7,4)	30 (4,2)
	HPV-25	3 (0,4)	0 (0,0)	1 (0,1)
	HPV-36	3 (0,4)	3 (0,4)	5 (0,7)
	HPV-47	49 (6,8)	15 (2,1)	11 (1,5)
	HPV-93	10 (1,4)	7 (1,0)	8 (1,1)
	HPV-98	29 (4,0)	17 (2,4)	8 (1,1)
	HPV-99	10 (1,4)	1 (0,1)	0 (0,0)
	HPV-105	46 (6,4)	19 (2,6)	2 (0,3)
	HPV-118	2 (0,3)	2 (0,3)	0 (0,0)
	HPV-124	72 (10,0)	17 (2,4)	2 (0,3)
	HPV-143	2 (0,3)	1 (0,1)	0 (0,0)
B2	HPV-9	46 (6,4)	15 (2,1)	5 (0,7)
	HPV-15	27 (3,8)	7 (1,0)	7 (1,0)
	HPV-17	57 (7,9)	14 (2,0)	9 (1,3)
	HPV-22	127 (17,7)	62 (8,6)	21 (2,9)
	HPV-23	87 (12,1)	26 (3,6)	2 (0,3)
	HPV-37	19 (2,6)	7 (1,0)	0 (0,0)
	HPV-38	198 (27,6)	87 (12,1)	45 (6,3)
	HPV-80	17 (2,4)	10 (1,4)	0 (0,0)
	HPV-100	54 (7,5)	19 (2,6)	15 (2,1)
	HPV-104	13 (1,8)	3 (0,4)	0 (0,0)
	HPV-107	79 (11,0)	30 (4,2)	4 (0,6)
	HPV-110	86 (12,0)	34 (4,7)	17 (2,4)
	HPV-111	97 (13,5)	44 (6,1)	19 (2,6)
	HPV-113	32 (4,5)	9 (1,3)	0 (0,0)
	HPV-120	63 (8,8)	23 (3,2)	2 (0,3)
	HPV-122	54 (7,5)	16 (2,2)	4 (0,6)
	HPV-145	18 (2,5)	4 (0,6)	1 (0,1)
	HPV-151	35 (4,9)	9 (1,3)	3 (0,4)
B3	HPV-49	57 (7,9)	25 (3,5)	8 (1,1)
	HPV-75	24 (3,3)	8 (1,1)	2 (0,3)
	HPV-76	94 (13,1)	43 (6,0)	19 (2,6)
	HPV-115	22 (3,1)	13 (1,8)	0 (0,0)
B4	HPV-92	8 (1,1)	5 (0,7)	0 (0,0)
B5	HPV-96	6 (0,8)	5 (0,7)	0 (0,0)
	HPV-150	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Múltiplas infecções*	2 tipos	109 (15,2)	89 (12,4)	46 (6,4)
	3 tipos	80 (11,2)	52 (7,3)	17 (2,4)
	4 tipos	65 (9,1)	23 (3,2)	7 (1,0)
	5 tipos	49 (6,8)	15 (2,1)	5 (0,7)
	6 tipos	32 (4,5)	15 (2,1)	1 (0,1)
	≥7 tipos	83 (11,6)	11 (1,5)	3 (0,4)

*n – número de homens em cada categoria; frequência refere-se ao n/número total de homens (717)

A prevalência de β -HPV na cavidade oral foi menor quando comparada à registrada na genital externa e no canal anal, sendo independente do país de registro (Figura 8A). Homens residentes no Brasil (OR=0,39, 95% IC 0,26-0,60) e no EUA (OR=0,46, 95% IC 0,31-0,70) foram significativamente menos associados à detecção de ao menos um tipo de β -HPV na cavidade oral, comparado aos homens inscritos no México (Figura 8A, Tabela 6). Participantes na faixa de idade de 45-70 anos (OR=1,79, 95% IC 1,09-2,96) foram significativamente associados com o aumento da detecção de ao menos um tipo de β -HPV na cavidade oral comparado aos homens inseridos na faixa etária de 18-30 anos. Por fim, observou-se que fumantes (OR=0,50, 95% IC 0,32-0,80) e ex-fumantes (OR=0,74, 95% IC 0,48-1,13) foram significativamente menos associados com a detecção de ao menos um tipo de β -HPV na cavidade oral comparado aos homens que nunca fumaram (modelo ajustado para idade e país de residência).

Tabela 4 - Características demográfica e sexual associadas à detecção de ao menos um tipo de DNA de beta-papilomavírus humano (β-HPV) na região genital de 717 homens participantes do Estudo da Infecção por HPV em Homens (HIM).

Características	Genital (N=717)		OR bruto (95%IC)	OR ajustado (95%IC)
	Negativo (N=160)	Positivo (N=557)		
País de residência				
EUA	60 (37,5)	178 (32,0)	0,77 (0,50-1,18)	-
Brasil	51 (31,9)	190 (34,1)	0,97 (0,62-1,50)	-
México	49 (30,6)	189 (33,9)	1,00 (Ref.)	-
Idade (em anos)				
18-30	85 (53,1)	240 (43,1)	1,00 (Ref.)	1,00 (Ref.)
31-44	59 (36,9)	239 (42,9)	0,96 (0,66-1,38)	1,45 (0,98-2,15)
45-70	16 (10,0)	78 (14,0)	1,73 (0,96-3,12)	1,82 (0,98-3,36)
Raça				
Branca ou caucasiana	88 (55,0)	282 (50,6)	1,00 (Ref.)	-
Negra ou afrodescendente	24 (15,0)	70 (12,6)	0,91 (0,54-1,53)	-
Asiático	2 (1,3)	10 (1,8)	1,56 (0,34-7,26)	-
Outra/miscigenada	42 (26,3)	169 (30,3)	1,26 (0,83-1,90)	-
Recusa	4 (2,5)	26 (4,7)	2,03 (0,69-5,97)	-
Etnia				
Hispânico	63 (39,6)	248 (44,8)	1,00 (Ref.)	-
Não hispânico	96 (60,4)	306 (55,2)	0,81 (0,57-1,16)	-
Educação (em anos)				
≤12	64 (40,5)	248 (44,8)	1,00 (Ref.)	-
13-15	49 (31,0)	148 (26,7)	0,78 (0,51-1,19)	-
≥16	45 (28,5)	158 (28,5)	0,91 (0,59-1,39)	-
Estado civil				
Solteiro	77 (48,4)	209 (37,7)	1,00 (Ref.)	-
Casado/Amasiado	66 (41,5)	296 (53,3)	1,65 (1,14-2,40)	-
Divorciado/Separado/Viúvo	16 (10,1)	50 (9,0)	1,15 (0,62-2,14)	-
Circuncisão				
Não circuncidado	100 (62,5)	354 (63,6)	1,00 (Ref.)	-
Circuncidado	60 (37,5)	203 (36,5)	0,96 (0,66-1,38)	-
Número de parceiras sexuais femininas na vida				
0	29 (18,1)	69 (12,6)	1,00 (Ref.)	-
1	11 (6,9)	49 (8,9)	1,87 (0,85-4,10)	-
2-9	60 (37,5)	215 (39,1)	1,51 (0,90-2,53)	-
10-49	47 (29,4)	193 (35,1)	1,73 (1,01-2,96)	-
+50	13 (8,1)	24 (4,4)	0,78 (0,35-1,73)	-
Número de parceiros anais masculinos na vida				
0	135 (87,7)	466 (85,7)	1,00 (Ref.)	-
1-9	15 (9,7)	48 (8,8)	0,93 (0,50-1,71)	-
+10	4 (2,6)	30 (5,5)	2,17 (0,75-6,28)	-
Orientação sexual				
MSW	111 (70,3)	413 (75,1)	1,00 (Ref.)	1,00 (Ref.)
MSM	3 (1,9)	16 (2,9)	1,43 (0,41-5,01)	1,43 (0,40-5,06)
MSWM	20 (12,7)	68 (12,4)	0,91 (0,53-1,57)	1,02 (0,58-1,80)
Virgens	24 (15,2)	53 (9,6)	0,59 (0,35-1,00)	0,60 (0,34-1,04)
Consumo de cigarros				
Fumante	33 (20,6)	109 (19,6)	0,96 (0,66-1,38)	-
Ex-fumante	34 (21,3)	112 (20,1)	0,91 (0,59-1,43)	-
Não fumante	93 (58,1)	335 (60,3)	1,00 (Ref.)	-
Bebidas alcoólicas (por mês)				
0	31 (20,1)	144 (26,5)	1,00 (Ref.)	1,00 (Ref.)
1-30	121 (78,6)	393 (72,4)	0,70 (0,45-1,08)	0,68 (0,43-1,07)
>30	2 (1,3)	6 (1,1)	0,65 (0,12-3,35)	0,70 (0,13-3,70)

A razão de chances (*odds ratios*, OR) e o intervalo de confiança ao nível de 95% (95% IC) foram calculados através de regressão logística que avaliou os fatores de associação inseridos nesta à detecção de ao menos um tipo β-HPV. O método *Backwards elimination* foi escolhido para determinar os fatores independentemente associados com a detecção de algum β-HPV em cada sítio anatômico, sendo considerado significativo, e incluído no modelo multivariado, somente os fatores que apresentassem valor de $P \leq 0,20$.

Tabela 5 - Características demográfica e sexual associadas à detecção de ao menos um tipo de DNA de beta-papilomavírus humano (β -HPV) na região do canal anal de 717 homens participantes do Estudo da Infecção por HPV em Homens (HIM).

Características	Canal anal (N=717)		OR bruto (95%IC)	OR ajustado (95%IC)
	Negativo (N=328)	Positivo (N=389)		
País de residência				
EUA	122 (37,2)	116 (29,8)	0,50 (0,35-0,72)	0,55 (0,38-0,80)
Brasil	124 (37,8)	117 (30,1)	0,50 (0,34-0,72)	0,49 (0,33-0,73)
México	82 (25,0)	156 (40,1)	1,00 (Ref.)	1,00 (Ref.)
Idade (em anos)				
18–30	165 (50,3)	160 (41,1)	1,00 (Ref.)	1,00 (Ref.)
31–44	129 (39,3)	169 (43,4)	1,35 (0,99-1,85)	1,30 (0,93-1,82)
45–70	34 (10,4)	60 (15,4)	1,82 (1,13-2,92)	1,59 (0,98-2,58)
Raça				
Branca ou caucasiana	185 (56,4)	185 (47,6)	1,00 (Ref.)	-
Negra ou afrodescendente	53 (16,2)	41 (10,5)	0,77 (0,49-1,22)	-
Asiático	3 (0,9)	9 (2,3)	3,00 (0,80-11,26)	-
Outra/miscigenada	75 (22,9)	136 (35,0)	1,81 (1,28-2,57)	-
Recusa	12 (3,7)	18 (4,6)	1,50 (0,70-3,20)	-
Etnia				
Hispanico	119 (36,5)	192 (49,6)	1,00 (Ref.)	-
Não hispanico	207 (63,5)	195 (50,4)	0,58 (0,43-0,79)	-
Educação (em anos)				
≤12	123 (38)	189 (48,7)	1,00 (Ref.)	-
13-15	100 (30,9)	97 (25,0)	0,63 (0,44-0,91)	-
≥16	101 (31,2)	102 (26,3)	0,66 (0,46-0,94)	-
Estado civil				
Solteiro	147 (45,1)	139 (35,8)	1,00 (Ref.)	-
Casado/Amasiado	151 (46,3)	211 (54,4)	1,48 (1,08-2,02)	-
Divorciado/Separado/Viúvo	28 (8,6)	38 (9,8)	1,44 (0,84-2,46)	-
Circuncisão				
Não circuncisado	200 (61,0)	254 (65,3)	1,00 (Ref.)	-
Circuncisado	128 (39,0)	135 (34,7)	0,83 (0,61-1,13)	-
Número de parceiras sexuais femininas na vida				
0	41 (12,6)	57 (14,8)	1,00 (Ref.)	-
1	28 (8,6)	32 (8,3)	0,82 (0,43-1,57)	-
2–9	116 (35,7)	159 (41,3)	0,99 (0,62-1,57)	-
10–49	117 (36,0)	123 (32,0)	0,76 (0,47-1,22)	-
+50	23 (7,1)	14 (3,6)	0,44 (0,2-0,95)	-
Número de parceiros anais masculinos na vida				
0	274 (85,9)	327 (86,3)	1,00 (Ref.)	-
1–9	29 (9,1)	34 (9,0)	0,98 (0,58-1,65)	-
+10	16 (5,0)	18 (4,8)	0,94 (0,47-1,88)	-
Orientação sexual				
MSW	242 (74,7)	282 (73,4)	1,00 (Ref.)	-
MSM	8 (2,5)	11 (2,9)	1,18 (0,47-2,98)	-
MSWM	42 (13,0)	46 (12,0)	0,94 (0,60-1,48)	-
Virgens	32 (9,9)	45 (11,7)	1,21 (0,74-1,96)	-
Consumo de cigarros				
Fumante	65 (19,9)	77 (19,8)	0,94 (0,64-1,37)	-
Ex-fumante	73 (22,3)	73 (18,8)	0,79 (0,54-1,15)	-
Não fumante	189 (57,8)	239 (61,4)	1,00 (Ref.)	-
Bebidas alcóolicas (por mês)				
0	69 (21,8)	106 (27,9)	1,00 (Ref.)	-
1–30	245 (77,3)	269 (70,8)	0,72 (0,50-1,01)	-
>30	3 (1,0)	5 (1,3)	1,09 (0,25-4,69)	-

A razão de chances (*odds ratios*, OR) e o intervalo de confiança ao nível de 95% (95% IC) foram calculados através de regressão logística que avaliou os fatores de associação inseridos nesta à detecção de ao menos um tipo β -HPV. O método *Backwards elimination* foi escolhido para determinar os fatores independentemente associados com a detecção de algum β -HPV em cada sítio anatômico, sendo considerado significativo, e incluído no modelo multivariado, somente os fatores que apresentassem valor de $P \leq 0,20$.

Tabela 6 - Características demográfica e sexual associadas à detecção de ao menos um tipo de DNA de beta-papilomavírus humano (β-HPV) cavidade oral de 717 homens participantes do Estudo da Infecção por HPV em Homens (HIM).

Características	Oral (N=717)			
	Negativo (N=507)	Positivo (N=210)	OR bruto (95%IC)	OR ajustado (95%IC)
País de residência				
EUA	186 (36,7)	52 (24,8)	0,40 (0,27-0,6)	0,39 (0,26-0,60)
Brasil	181 (35,7)	60 (28,6)	0,47 (0,32-0,7)	0,46 (0,31-0,70)
México	140 (27,6)	98 (46,7)	1,00 (Ref.)	1,00 (Ref.)
Idade (em anos)				
18–30	246 (48,5)	79 (37,6)	1,00 (Ref.)	1,00 (Ref.)
31–44	207 (40,8)	91 (43,3)	0,84 (0,58-1,22)	1,19 (0,82-1,74)
45–70	54 (10,7)	40 (19,1)	2,31 (1,43-3,73)	1,79 (1,09-2,96)
Raça				
Branca ou caucasiana	284 (56)	86 (41,0)	1,00 (Ref.)	-
Negra ou afrodescendente	70 (13,8)	24 (11,4)	1,13 (0,67-1,91)	-
Asiático	9 (1,8)	3 (1,4)	1,10 (0,29-4,16)	-
Outra/miscigenada	123 (24,3)	88 (41,9)	2,36 (1,64-3,40)	-
Recusa	21 (4,1)	9 (4,3)	1,42 (0,63-3,20)	-
Etnia				
Hispânico	194 (38,6)	117 (55,7)	1,00 (Ref.)	-
Não hispânico	309 (61,4)	93 (44,3)	0,50 (0,36-0,69)	-
Educação (em anos)				
≤12	207 (41,2)	105 (50,0)	1,00 (Ref.)	-
13-15	145 (28,9)	52 (24,8)	0,71 (0,48-1,05)	-
≥16	150 (29,9)	53 (25,2)	0,70 (0,47-1,03)	-
Estado civil				
Solteiro	219 (43,5)	67 (31,9)	1,00 (Ref.)	-
Casado/Amasiado	239 (47,4)	123 (58,6)	1,68 (1,19-2,39)	-
Divorciado/Separado/Viúvo	46 (9,1)	20 (9,5)	1,42 (0,79-2,57)	-
Circuncisão				
Não circuncisado	310 (61,1)	144 (68,6)	1,00 (Ref.)	-
Circuncisado	197 (38,9)	66 (31,4)	0,72 (0,51-1,02)	-
Número de parceiras sexuais femininas na vida				
0	70 (13,9)	28 (13,5)	1,00 (Ref.)	-
1	44 (8,8)	16 (7,7)	0,91 (0,44-1,87)	-
2–9	188 (37,5)	87 (41,8)	1,16 (0,70-1,92)	-
10–49	171 (34,1)	69 (33,2)	1,01 (0,60-1,70)	-
+50	29 (5,8)	8 (3,9)	0,69 (0,28-1,69)	-
Número de parceiros anais masculinos na vida				
0	420 (85,5)	181 (87,4)	1,00 (Ref.)	-
1–9	43 (8,8)	20 (9,7)	1,08 (0,62-1,89)	-
+10	28 (5,7)	6 (2,9)	0,50 (0,20-1,22)	-
Orientação sexual				
MSW	366 (73,2)	158 (76,0)	1,00 (Ref.)	-
MSM	14 (2,8)	5 (2,4)	0,83 (0,29-2,34)	-
MSWM	66 (13,2)	22 (10,6)	0,77 (0,46-1,30)	-
Virgens	54 (10,8)	23 (11,1)	0,99 (0,59-1,66)	-
Consumo de cigarros				
Fumante	111 (21,9)	31 (14,8)	0,58 (0,37-0,90)	0,50 (0,32-0,80)
Ex-fumante	107 (21,2)	39 (18,6)	0,75 (0,49-1,14)	0,74 (0,48-1,13)
Não fumante	288 (56,9)	140 (66,7)	1,00 (Ref.)	1,00 (Ref.)
Bebidas alcóolicas (por mês)				
0	119 (24,1)	56 (27,6)	1,00 (Ref.)	-
1–30	368 (74,5)	146 (71,9)	0,84 (0,58-1,22)	-
>30	7 (1,4)	1 (0,5)	0,30 (0,04-2,53)	-

A razão de chances (*odds ratios*, OR) e o intervalo de confiança ao nível de 95% (95% IC) foram calculados através de regressão logística que avaliou os fatores de associação inseridos nesta à detecção de ao menos um tipo β-HPV. O método *Backwards elimination* foi escolhido para determinar os fatores independentemente associados com a detecção de algum β-HPV em cada sítio anatômico, sendo considerado significativo, e incluído no modelo multivariado, somente os fatores que apresentassem valor de $P \leq 0,20$.

6 DISCUSSÃO

Diversos estudos têm demonstrado que mais de 80% dos indivíduos saudáveis são detectados com múltiplos tipos de HPV cutâneos na pele normal de diversos sítios anatômicos, sendo que os folículos pilosos têm se apresentado como os prováveis reservatórios naturais destes vírus (Hampras *et al.*, 2014). Observou-se anteriormente uma alta incidência de β - e γ -HPV na região anogenital de participantes do estudo HIM que apresentavam espécimes positivos para HPV pela metodologia de *Linear Array*, entretanto negativos para quando testadas utilizando-se sondas tipo-específicas para diversos tipos de α -HPV (Giuliano *et al.*, 2008; Sichero *et al.*, 2014, 2015).

Até o momento cinco artigos foram publicados pelo estudo HIM que tiveram como foco a análise da frequência de DNA de HPV cutâneos nas amostras coletadas. O primeiro estudo abordou a larga distribuição de tipos de HPV na região genital de participantes inicialmente categorizados como não-classificados. Esse estudo descreveu a presença de 86 tipos diferentes HPV nesse grupo de 508 espécimes, sendo que em 13,7% das amostras foram detectados tipos virais pertencentes ao gênero α -HPV, 38,7% ao β -HPV e 2,0% ao γ -HPV, com maior prevalência dos tipos HPV-107 e HPV-120 dentre os β -HPV. Neste estudo, a detecção e genotipagem viral foi realizada por PCR, seguida de sequenciamento, fazendo uso dos iniciadores PGMY09/11 *nested* com GP5+/6+ e FAP59/64, que amplificam um amplo espectro de tipos de α -HPV e β -HPV, respectivamente (Sichero *et al.*, 2013).

Ainda em 2013, o grupo publicou um trabalho que avaliou a prevalência de DNA de β -HPV na superfície de lesões genitais externas (*external genital lesions*,

EGL) de participantes que não apresentaram lesões em visitas prévias (6 e 12 meses antes). Fazendo uso da metodologia Luminex, foram analisados 69 homens em que se detectou DNA de β -HPV em 61,1% das EGL, com maior prevalência dos HPV-38 (16,7%), -5 (15,3%) e -12 (12,5%) (Campbell *et al.*, 2013).

No ano seguinte (2014), dois trabalhos mais foram publicados investigando a prevalência de HPV cutâneos em amostras de indivíduos participantes do estudo HIM. No primeiro, foram analisadas amostras epiteliais advindas de pele normal (antebraço) e sobrancelha de 209 homens. Detectou-se, via metodologia Luminex, DNA de β -HPV em 67,3% das amostras de pele normal e 56,5% das amostras de sobrancelha, com prevalência significativamente maior dos HPV-5 (17,3% pele normal e 7,7% sobrancelha), -12 (19,9% pele normal e 9,6% sobrancelha), -21 (7,7% pele normal e 3,3% sobrancelha) e -24 (16,0% pele normal e 8,1% sobrancelha). Em relação aos γ -HPV, a prevalência de DNA viral observada foi 26,8% nas amostras de pele normal e 15,9% de sobrancelha. Ainda mais, foi observado que indivíduos mais velhos e com história de queimaduras solares graves estavam mais associados à persistência de HPV cutâneos (Hampras *et al.*, 2014).

O outro estudo publicado no mesmo ano (2014) buscou determinar a diversidade de HPV em amostras genitais previamente categorizadas como não-classificadas, além de compreender a associação desta detecção com fatores demográficos e comportamentais dos indivíduos cujos espécimes foram avaliados. Fazendo uso de PCR com os iniciadores PGMY09/11 *nested* com GP5+/6+ e FAP59/64, seguido por sequenciamento, foi detectado DNA de α -HPV, β -HPV e γ -HPV em 20%, 73,2% e 6,6% das 404 amostras analisadas,

respectivamente. Os tipos de β -HPV mais prevalentes foram HPV-107 (11,7%), -38 (7,8%) e -120 (6,8%), sendo que não foi observada associação entre a detecção destes vírus com nenhum dos fatores sócio-demográficos avaliados (Sichero *et al.*, 2014).

O último trabalho publicado pelo Estudo HIM até o momento que avaliou a prevalência de HPV cutâneos teve como objetivo determinar a frequência destes tipos em amostras de canal anal previamente categorizadas como não-classificadas (Anexo C). Através de PCR, seguida de sequenciamento, detectou-se α -HPV, β -HPV e γ -HPV em 27,7%, 67,0% e 5,3% nas 199 amostras analisadas, respectivamente. Os β -HPV mais prevalentes foram HPV-22 (9,6%), -107 (7,4%) e -120 (7,4%). Adicionalmente foi observado que tipos virais pertencentes ao gênero β -HPV eram mais detectados em indivíduos de meia idade (31-44 anos) e nos homens que fazem sexo somente com mulheres (MSW) (Sichero *et al.*, 2015).

O presente estudo expande de maneira importante o conhecimento acerca da prevalência de DNA de β -HPV no trato anogenital e oral (amostras coletadas em mesma visita) de homens do estudo HIM. Foram analisadas amostras oriundas de 717 homens, independentemente da prevalência de α -HPV obtido por *Linear Array*, utilizando uma metodologia que permite a detecção simultânea de 43 tipos de β -HPV (Schmitt *et al.*, 2006). Além disso, este é o primeiro relato sobre a prevalência de β -HPV na cavidade oral de participantes do estudo HIM.

6.1 Prevalência de β -HPV nos diferentes sítios anatômicos

O DNA de β -HPV foi detectado em 77,7% dos esfregaços genitais, sendo este achado similar à prevalência registrada, também pela metodologia Luminex,

entre participantes do estudo HIM saudáveis (61,1%), coletados de 6-12 meses antes de apresentarem lesões genitais externas (EGL) (Pierce Campbell *et al.*, 2013). No entanto, estes resultados contrastam com os cerca de 40% de prevalência de β -HPV mensurada na genital externa de homens saudáveis (sem lesão) fazendo uso de metodologia de PCR, seguida de sequenciamento (Sichero *et al.*, 2013, 2014), sendo esta tendência também observada nas amostras de canal anal dos homens do estudo HIM (54,3% por Luminex *versus* 31,6% por PCR-sequenciamento) (Sichero *et al.*, 2015). Pelo exposto, recentemente muitos estudos tem buscado fazer uso desta tecnologia que apresenta uma alta sensibilidade na detecção de DNA de HPV cutâneos nos diversos sítios anatômicos (Donà *et al.*, 2015; Gheit *et al.*, 2007; Torres *et al.*, 2015).

No presente estudo, o DNA de β -HPV foi menos prevalente no canal anal de homens residentes do EUA (48,7%) e Brasil (48,6%) comparado aos homens do México (65,6%). Outros estudos utilizando esta mesma metodologia em amostras de canal anal registraram 65,5% e 27,2% de prevalência de DNA de β -HPV em 437 e 153 homens HIV negativos da Espanha e Itália, respectivamente (Donà *et al.*, 2015; Torres *et al.*, 2015).

As amostras obtidas de enxágues orais também foram significativamente mais prevalentes nos homens residentes no México (41,2%), comparado aos homens no Brasil (24,9%) e no EUA (21,9%). Considerando todos os homens analisados, a prevalência de β -HPV neste sítio anatômico foi 29,3%, sendo similar à registrada em estudo com 25 espécimes orais advindos de indivíduos saudáveis coletados na Itália (25%) (Paolini *et al.*, 2013), e diferente da detectada entre 317 homens HIV negativos e mulheres saudáveis coletados no EUA (74%) (Bottalico *et al.*, 2011).

Assim, embora haja poucos estudos para traçar paralelos, os dados apresentados sugerem que a prevalência de β -HPV no canal anal e cavidade oral podem variar amplamente por país e região do mundo.

6.2 Detecção de 43 genótipos distintos de β -HPV

Conforme discutido, algumas das publicações anteriores do estudo HIM analisaram a prevalência de β -HPV utilizando a metodologia de PCR, seguida por sequenciamento. Entretanto, utilizando-se essa metodologia foi observado que houve dificuldade em detectar múltiplos tipos virais em uma mesma amostra, uma vez que, embora fossem observados picos sobrepostos nas sequências de leitura (cromatogramas) que sugerem a presença de mais de um tipo viral, estas sequências geradas eram ilegíveis. Esta hipótese foi confirmada através de estudo realizado com um pequeno número de amostras analisadas por Luminex (Sichero *et al.*, 2015). Assim, neste projeto optou-se por empregar esta metodologia a fim de detectar e caracterizar um grande número de tipos virais simultaneamente e confirmar que a ocorrência de múltiplos β -HPV em uma mesma amostra é um evento comum, principalmente na região genital na qual foram identificados até 19 tipos virais em um mesmo espécime. Utilizando-se também Luminex, foram detectados múltiplos tipos de HPV cutâneos em biópsias de EGL e nos esfregaços de pele normal anterior ao desenvolvimento de lesão entre os participantes do estudo HIM (Hampras *et al.*, 2014; Pierce Campbell *et al.*, 2013).

Outros trabalhos também descrevem a ocorrência de múltiplos tipos de β -HPV em outros sítios anatômicos de homens, demonstrando que a ocorrência de vírus deste gênero em humanos é comum. Amostras oriundas de canal anal de

MSM coletados na Itália continham entre dois e cinco diferentes tipos em um mesmo espécime avaliado (24,1%) (Donà *et al.*, 2015); enquanto que MSM oriundos da Espanha e de alguns outros países da América Latina e Europa, apresentaram 46,6% de infecção múltipla no caso de indivíduos HIV negativos e 61,9% dos homens co-infectados por HIV (Torres *et al.*, 2015). Em enxágues orais coletados no EUA, múltiplos tipos de HPV cutâneos foram observados em 4,6% (7/150) dos homens analisados (Paolini *et al.*, 2013).

Os tipos virais mais prevalentes nos três sítios anatômicos foram HPV-21 e HPV-24 (β -1); HPV-22 e HPV-38 (β -2). Destes, apenas o HPV-38 tem sido frequentemente reportado na literatura em diversos sítios anatômicos de homens, como em canal anal, genitália, EGL, sobrancelha e pele (Donà *et al.*, 2015; Hampras *et al.*, 2014; Pierce Campbell *et al.*, 2013; Sichero *et al.*, 2014, 2015; Torres *et al.*, 2015).

6.3 Fatores associados à detecção de β -HPV

Diversos foram os fatores comportamentais avaliados nos indivíduos deste estudo, sendo que apenas o tabagismo foi significativamente relacionado à detecção de β -HPV na cavidade oral, isto é, fumantes e ex-fumantes apresentaram um risco significativamente menor de serem detectados com DNA de β -HPV, comparado aos não fumantes. Esta associação indica que a deposição e/ou infecção por β -HPV podem variar entre os sítios anatômicos. Entretanto, investigações adicionais são necessárias para elucidar as bases biológicas desta observação.

Por outro lado, a forte associação conhecida e registrada em diversas publicações entre o comportamento sexual e a detecção de α -HPV em homens e

mulheres evidencia claramente que a relação entre as atividades sexuais e os gêneros de HPV são diferentes. Os β -HPV parecem não estar associados ao comportamento sexual, como já observado em diversos sítios anatômicos nos mais variados estudos, inclusive entre os participantes do estudo HIM (Donà *et al.*, 2015; Hampras *et al.*, 2014; Sichero *et al.*, 2014, 2015). Perante isso, entende-se que uma das limitações do estudo HIM é a ausência de perguntas no questionário epidemiológico que abordassem atividades sexuais não penetrativas (p.e. masturbação, a prática de anilingua, contato com fômites). Portanto, não se pôde avaliar a influência do contato direto de mãos, boca ou outro objeto com a genitália externa, canal anal e cavidade oral dos participantes e que poderiam ser úteis para melhor compreender os mecanismos de transmissão deste gênero viral (Liu *et al.*, 2015). Todavia, a alta prevalência de DNA de β -HPV na pele normal (67,3%) e sobrancelha (56,5%) em participantes do estudo HIM coletados no EUA (Hampras *et al.*, 2014) apoiam fortemente que a detecção de β -HPV na cavidade oral e região anogenital de homens pode simplesmente ser reflexo da deposição de partículas virais liberadas de outras partes do corpo ou de auto-inoculação.

Uma limitação deste projeto é o fato de que foram analisados apenas 43 dos 51 tipos de β -HPV já descritos até o momento (International Human Papillomavirus Reference Center, 2016), além do fato da análise de HPV cutâneos não ter sido estendida a tipos virais do gênero γ -HPV. Portanto, devido à identificação continua de novos tipos de HPV cutâneos, este estudo provavelmente subestimou a prevalência real dos β - e γ -HPV, uma vez que diversos genótipos virais não foram testados (Arroyo *et al.*, 2013; Bzhalava *et al.*, 2014).

O epitélio cutâneo infectado com tipos específicos de β -HPV apresentam uma maior susceptibilidade à danos ao DNA induzidos por radiação ultravioleta (UV) (Hampras *et al.*, 2014). Embora estudos funcionais recentes sugiram que os HPV cutâneos podem também apresentar potencial oncogênico, não é provável que esses vírus causem doenças nos sítios anatômicos não expostos à radiação UV (Antonsson *et al.*, 2003). O possível papel dos β -HPV como co-fator no desenvolvimento de lesões na região genital e cavidade oral de homens precisa ser melhor elucidado. Portanto, maiores estudos de seguimento prospectivo com homens e mulheres são necessários.

7 CONCLUSÕES

A análise de detecção simultânea de 43 tipos de β -HPV em amostras anogenitais e orais de homens do estudo HIM demonstrou que a prevalência destes tipos cutâneos é elevada e esperada quando comparada a trabalhos anteriores nestes sítios anatômicos. Os fatores sexuais e demográficos associados com a detecção resultaram tanto em observações já descritas, como a associação de β -HPV à idade mais avançada e a não associação com o comportamento sexual; quanto em observações descritas neste trabalho pela primeira vez, como a forte associação de detecção de β -HPV na cavidade oral em indivíduos não fumantes.

Percebe-se que são necessários, não somente estudos epidemiológicos ou de mecanismos moleculares, mas sim uma complementariedade entre estes, para compreender os achados biológicos sobre HPV cutâneos. Diferente da história natural de α -HPV, ainda se necessita delinear a história natural de HPV cutâneos, desde o processo de entrada e infecção da célula hospedeira até a distribuição e função nos tecidos.

Com a implantação de programas de vacinação contra HPV, espera-se que haja um possível processo de eliminação dos genótipos incluídos na vacina na população, ao mesmo tempo em que se espera observar a substituição por outros tipos virais. Além disso, com o advento de novas tecnologias mais sensíveis para caracterização e detecção viral, a quantidade de tipos detectados na natureza tende a aumentar e a possibilidade de associações significativas também. Portanto, torna-se imprescindível relacionar com cautela os achados

epidemiológicos buscando fundar-se no conhecimento biológico das patologias associadas.

O aumento da incidência da luz UV em grande parte dos países tem levado a uma epidemia de NMSC. Portanto, a associação destes tumores aos seus fatores de risco torna possível planejar melhores políticas de prevenção, além do uso de protetor solar e diminuição da exposição ao sol.

Por fim, espera-se que a colaboração entre os achados pela comunidade científica nos próximos anos possa complementar e determinar o papel de HPV cutâneos nos cânceres de pele.

8 REFERÊNCIAS

Accardi R, Dong W, Smet A, Cui R, Hautefeuille A, Gabet AS, et al. Skin human papillomavirus type 38 alters p53 functions by accumulation of deltaNp73. *EMBO Rep.* 2006; 7(3):334–40.

Akgül B, García-Escudero R, Ghali L, Pfister HJ, Fuchs PG, Navsaria H, et al. The E7 protein of cutaneous human papillomavirus type 8 causes invasion of human keratinocytes into the dermis in organotypic cultures of skin. *Cancer Res.* 2005a; 65(6):2216–23.

Akgül B, Lemme W, García-Escudero R, Storey A, Pfister HJ. UV-B irradiation stimulates the promoter activity of the high-risk, cutaneous human papillomavirus 5 and 8 in primary keratinocytes. *Arch Virol.* 2005b; 150(1):145–51.

Akgül B, Pfefferle R, Marcuzzi GP, Zigrino P, Krieg T, Pfister H, et al. Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9, MMP-13, and MT1-MMP in skin tumors of human papillomavirus type 8 transgenic mice. *Exp Dermatol.* 2006; 15(1):35–42.

Bosch FX, Broker TR, Forman D, Moscicki AB, Gillison ML, Doorbar J, et al. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. *Vaccine.* 2013; 31 Suppl 7:H1-31.

Aleman L, Saunier M, Alvarado-Cabrero I, Quirós B, Salmeron J, Shin HR, et al. Human papillomavirus DNA prevalence and type distribution in anal carcinomas worldwide. *Int J Cancer.* 2015; 136(1):98–107.

Aleman L, Cubilla A, Halec G, Kasamatsu E, Quirós B, Masferrer E, et al. Role of Human Papillomavirus in Penile Carcinomas Worldwide. *Eur Urol.* 2016; S0302-2838(15)01215-4.

Antonsson A, Forslund O, Ekberg H, Sterner G, Hansson BG. The ubiquity and impressive genomic diversity of human skin papillomaviruses suggest a commensalic nature of these viruses. *J Virol.* 2000; 74(24):11636–41.

Antonsson A, Karanfilovska S, Lindqvist PG, Hansson BG. General Acquisition of Human Papillomavirus Infections of Skin Occurs in Early Infancy. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(6):2509–14.

Arron ST, Ruby JG, Dybbro E, Ganem D, Derisi JL. Transcriptome sequencing demonstrates that human papillomavirus is not active in cutaneous squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol.* 2011; 131(8):1745–53.

Arroyo LS, Smelov V, Bzhalava D, Eklund C, Hultin E, Dillner J. Next generation sequencing for human papillomavirus genotyping. *J Clin Virol.* 2013; 58(2):437–42.

Asgari MM, Wang W, Ioannidis NM, Itnyre J, Hoffmann T, Jorgenson E, et al. Identification of Susceptibility Loci for Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *J Invest Dermatol.* 2016; S0022-202X(16)00363-8.

Athas WF, Hunt WC, Key CR. Changes in nonmelanoma skin cancer incidence between 1977-1978 and 1998-1999 in Northcentral New Mexico. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003; 12(10):1105–8.

Bedard KM, Underbrink MP, Howie HL, Galloway DA. The E6 oncoproteins from human betapapillomaviruses differentially activate telomerase through an E6AP-dependent mechanism and prolong the lifespan of primary keratinocytes. *J Virol.* 2008; 82(8):3894–902.

Bernard HU. Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches. *Antivir Ther.* 2002; 7(4):219–37.

Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol.* 2005; 32 Suppl 1:S1–6.

Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*. 2010; 401(1):70–9.

Bottalico D, Chen Z, Dunne A, Ostoloza J, McKinney S, Sun C, et al. The oral cavity contains abundant known and novel human papillomaviruses from the Betapapillomavirus and Gammapapillomavirus genera. *J Infect Dis*. 2011; 204(5):787–92.

Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, et al. A review of human carcinogens—Part B: biological agents. *Lancet Oncol*. 2009; 10(4):321–2.

Boxman IL, Berkhout RJ, Mulder LH, Wolkers MC, Bouwes Bavinck JN, Vermeer BJ, et al. Detection of human papillomavirus DNA in plucked hairs from renal transplant recipients and healthy volunteers. *J Invest Dermatol*. 1997; 108(5):712–5.

Brimer N, Lyons C, Wallberg AE, Vande Pol SB. Cutaneous papillomavirus E6 oncoproteins associate with MAML1 to repress transactivation and NOTCH signaling. *Oncogene*. 2012; 31(43):4639–46.

Bzhalava D, Mühr LS, Lagheden C, Ekström J, Forslund O, Dillner J, et al. Deep sequencing extends the diversity of human papillomaviruses in human skin. *Sci Rep*. 2014; 4:1–7.

Caldeira S, Zehbe I, Accardi R, Malanchi I, Dong W, Giarrè M, et al. The E6 and E7 proteins of the cutaneous human papillomavirus type 38 display transforming properties. *J Virol*. 2003; 77(3):2195–206.

Chahoud J, Semaan A, Chen Y, Cao M, Rieber A, Rady P, et al. Association Between beta-Genus Human Papillomavirus and Cutaneous Squamous Cell Carcinoma in Immunocompetent Individuals-A Meta-analysis. *JAMA dermatology*. 2015; *in press*.

Chouhy D, Bolatti EM, Pérez GR, Giri AA. Analysis of the genetic diversity and phylogenetic relationships of putative human papillomavirus types. *J Gen Virol*. 2013; 94(Pt 11):2480–8.

Cornet I, Bouvard V, Campo MS, Thomas M, Banks L, Gissmann L, et al. Comparative Analysis of Transforming Properties of E6 and E7 from Different Beta Human Papillomavirus Types. *J Virol*. 2012; 86(4):2366–70.

Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002; 420(6917):860–7.

de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004; 324(1):17–27.

de Villiers EM. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology*. 2013; 445(1-2):2–10.

Deng Q, Li J, Pan Y, Liu F, He Z, Liu M, et al. Prevalence and Associated Risk Factors of Human Papillomavirus in Healthy Skin Specimens Collected from Rural Anyang, China, 2006-2008. *J Invest Dermatol*. 2016; *in press*.

Donà M, Gheit T, Latini A, Benevolo M, Torres M, Smelov V, et al. Alpha, beta and gamma Human Papillomaviruses in the anal canal of HIV-infected and uninfected men who have sex with men. *J Infect*. 2015; 71(1):74–84.

Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*. 2012; 30 Suppl 5:F55–70.

Forman D, de Martel C, Lacey CJ, Soerjomataram I, Lortet-Tieulent J, Bruni L, et al. Global Burden of Human Papillomavirus and Related Diseases. *Vaccine*. 2012; 30 Suppl 5:F12–23.

Forslund O, Johansson H, Madsen KG, Kofoed K. The nasal mucosa contains a large spectrum of human papillomavirus types from the betapapillomavirus and gammapapillomavirus genera. *J Infect Dis*. 2013; 208(8):1335–41.

Gabet AS, Accardi R, Bellopede A, Popp S, Boukamp P, Sylla BS, et al. Impairment of the telomere/telomerase system and genomic instability are associated with keratinocyte immortalization induced by the skin human papillomavirus type 38. *FASEB J*. 2008; 22(2):622–32.

Gheit T, Billoud G, de Koning MN, Gemignani F, Forslund O, Sylla BS, et al. Development of a Sensitive and Specific Multiplex PCR Method Combined with DNA Microarray Primer Extension To Detect Betapapillomavirus Types. *J Clin Microbiol*. 2007; 45(8):2537–44.

Giampieri S, Storey A. Repair of UV-induced thymine dimers is compromised in cells expressing the E6 protein from human papillomaviruses types 5 and 18. *Br J Cancer*. 2004; 90(11):2203–9.

Giuliano AR, Lazcano-Ponce E, Villa L, Flores R, Salmeron J, Lee JH, et al. The Human Papillomavirus Infection in Men Study: Human Papillomavirus Prevalence and Type Distribution among Men Residing in Brazil, Mexico, and the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008a; 17(8):2036–43.

Giuliano AR, Tortolero-Luna G, Ferrer E, Burchell AN, de Sanjose S, Kjaer SK, et al. Epidemiology of Human Papillomavirus Infection in Men, Cancers other than Cervical and Benign Conditions. *Vaccine*. 2008b; 26 Suppl 10:K17–28.

Giuliano AR, Lazcano-Ponce E, Villa LL, Flores R, Salmeron J, Lee JH, et al. Circumcision and sexual behavior: Factors independently associated with human papillomavirus detection among men in the HIM study. *Int J Cancer*. 2009; 124(6):1251–7.

Gravitt PE, Peyton CL, Apple RJ, Wheeler CM. Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single-hybridization, reverse line blot detection method. *J Clin Microbiol*. 1998; 36(10):3020–7.

Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlée F, Hildesheim A., et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(1):357–61.

Hadaschik D, Hinterkeuser K, Oldak M, Pfister HJ, Smola-Hess S. The Papillomavirus E2 protein binds to and synergizes with C/EBP factors involved in keratinocyte differentiation. *J Virol.* 2003; 77(9):5253–65.

Haller K, Stubenrauch F, Pfister H. Differentiation-dependent transcription of the epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus type 5 in benign lesions. *Virology.* 1995; 214(1):245–55.

Hampras SS, Giuliano AR, Lin HY, Fisher KJ, Abrahamsen ME, Sirak BA, et al. Natural History of Cutaneous Human Papillomavirus (HPV) Infection in Men: The HIM Study. *PLoS One.* 2014; 9(9):e104843.

Howie HL, Koop JI, Weese J, Robinson K, Wipf G, Kim L, et al. Beta-HPV 5 and 8 E6 promote p300 degradation by blocking AKT/p300 association. *PLoS Pathog.* 2011; 7(8):e1002211.

Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J.* 1991; 10(13):4129–35.

Iannacone MR, Gheit T, Waterboer T, Giuliano AR, Messina JL, Fenske NA, et al. Case-control study of cutaneous human papillomaviruses in squamous cell carcinoma of the skin. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2012; 21(8):1303–13.

IARC Working Group. *IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans: Human Papillomaviruses.* Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2007.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). *Anal.* Rio de Janeiro: INCA - Ministério da Saúde; 2016 [citado em 29 mar. 2016a]. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/anal>.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). *Boca.* Rio de Janeiro: INCA - Ministério da Saúde; 2016 [citado em 29 mar. 2016b]. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/boca>.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). *Pele Não Melanoma.* Rio de Janeiro: INCA - Ministério da Saúde; 2016 [citado em 29 mar. 2016c]. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_ao_melanoma.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). *Pênis.* Rio de Janeiro: INCA - Ministério da Saúde; 2016 [citado em 19 mar. 2016d]. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/penis>.

International Human Papillomavirus Reference Center. *Human papillomavirus reference clones.* Estocolmo: Karolinska Institutet; 2015 [citado em 21 mar. 2016]. Disponível em: [http://hvpcenter.se/html/refclones.html?%3C?php%20echo%20time\(\);%20?%3E](http://hvpcenter.se/html/refclones.html?%3C?php%20echo%20time();%20?%3E).

Jablonska S, Dabrowski J, Jakubowicz K. Epidermodysplasia Verruciformis as a Model in Studies on the Role of Papovaviruses in Oncogenesis. *Cancer Res.* 1972; 32(3):583–9.

Jackson S, Harwood C, Thomas M, Banks L, Storey A. Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *Genes Dev.* 2000; 14(23):3065–73.

James W, Berger T, Elston D. *Andrews' Diseases of the Skin: Clinical Dermatology.* 10th edition. Saunders; 2006.

Johansson H, Bzhalava D, Ekström J, Hultin E, Dillner J, Forslund O. Metagenomic sequencing of “HPV-negative” condylomas detects novel putative HPV types. *Virology*. 2013; 440(1):1–7.

Karagas MR, Stannard VA, Mott LA, Slattery MJ, Spencer SK, Weinstock MA. Use of tanning devices and risk of basal cell and squamous cell skin cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2002; 94(3):224–6.

Karagas MR, Nelson HH, Sehr P, Waterboer T, Stukel TA, Andrew A, et al. Human papillomavirus infection and incidence of squamous cell and basal cell carcinomas of the skin. *J Natl Cancer Inst*. 2006; 98(6):389–95.

Kim TK, Kim T, Kim TY, Lee WG, Yim J. Chemotherapeutic DNA-damaging drugs activate interferon regulatory factor-7 by the mitogen-activated protein kinase kinase-4-cJun NH2-terminal kinase pathway. *Cancer Res*. 2000; 60(5):1153–6.

Kleter B, van Doorn LJ, Schrauwen L, Molijn A, Sastrowijoto S, ter Schegget J, et al. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *J Clin Microbiol*. 1999; 37(8):2508–17.

Kreimer AR, Villa A, Nyitray AG, Abrahamsen M, Papenfuss M, Smith D, et al. The Epidemiology of Oral HPV Infection among a Multinational Sample of Healthy Men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011; 20(1):172–82.

Leiter U, Eigentler T, Garbe C. Epidemiology of skin cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2014; 810:120–40.

Lewandowsky F, Lutz W. Ein Fall einer bisher nicht beschriebenen Hauterkrankung (Epidermodysplasia verruciformis). *Archiv für Dermatologie und Syphilis*. 1922; 141(2): 193–203.

Liu Z, Rashid T, Nyitray AG. Penises not required: a systematic review of the potential for human papillomavirus horizontal transmission that is non-sexual or does not include penile penetration. *Sex Health*. 2015; 13(1):10–21.

Lomas A, Leonardi-Bee J, Bath-Hextall F. A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol*. 2012; 166(5):1069–80.

Lorincz AT, Reid R, Jenson AB, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman RJ. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol*. 1992; 79(3):328–37.

Ma Y, Madupu R, Karaoz U, Nossa CW, Yang L, Yooseph S, et al. Human Papillomavirus Community in Healthy Persons, Defined by Metagenomics Analysis of Human Microbiome Project Shotgun Sequencing Data Sets. *J Virol*. 2014; 88(9):4786–97.

Marcuzzi GP, Hufbauer M, Kasper HU, Weissenborn SJ, Smola S, Pfister H. Spontaneous tumour development in human papillomavirus type 8 E6 transgenic mice and rapid induction by UV-light exposure and wounding. *J Gen Virol*. 2009; 90(Pt 12):2855–64.

Mayo Clinic. *Types of skin cancer*. Rochester: Mayo Clinic; 2015 [citado em 19 mar. 2016]. Disponível em: <https://twitter.com/MayoClinic/status/643159721214656513/photo/1>.

McBride AA, Sakakibara N, Stepp WH, Jang MK. Hitchhiking on host chromatin: how papillomaviruses persist. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1819(7):820–5.

Meyers JM, Spangle JM, Munger K. The human papillomavirus type 8 E6 protein interferes with NOTCH activation during keratinocyte differentiation. *J Virol*. 2013; 87(8):4762–7.

Michel A, Kopp-Schneider A, Zentgraf H, Gruber AD, de Villiers EM. E6/E7 expression of human papillomavirus type 20 (HPV-20) and HPV-27 influences proliferation and differentiation of the skin in UV-irradiated SKH-hr1 transgenic mice. *J Virol.* 2006; 80(22):11153–64.

Müller-Schiffmann A, Beckmann J, Steger G. The E6 protein of the cutaneous human papillomavirus type 8 can stimulate the viral early and late promoters by distinct mechanisms. *J Virol.* 2006; 80(17):8718–28.

Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003; 348(6):518–27.

Muschik D, Braspenning-Wesch I, Stockfleth E, Rösl F, Hofmann TG, Nindl I. Cutaneous HPV23 E6 prevents p53 phosphorylation through interaction with HIPK2. *PLoS One.* 2011; 6(11):e27655.

Nicolas M, Wolfer A, Raj K, Kummer JA, Mill P, van Noort M, et al. Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nat Genet.* 2003; 33(3):416–21.

Nielson CM, Flores R, Harris RB, Abrahamsen M, Papenfuss MR, Dunne EF, et al. Human Papillomavirus Prevalence and Type Distribution in Male Anogenital Sites and Semen. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007; 16(6):1107–14.

Nunes EM. *A História Natural da Infecção por Papilomavírus Humano em Homens* [Trabalho de Conclusão de Curso]. Universidade Federal de Pelotas; 2013.

Nyitray AG, Carvalho da Silva R, Baggio ML, Lu B, Smith D, Abrahamsen M, et al. Age-Specific Prevalence of and Risk Factors for Anal Human Papillomavirus (HPV) among Men Who Have Sex with Women and Men Who Have Sex with Men: The HPV in Men (HIM) Study. *J Infect Dis.* 2011; 203(1):49–57.

Oldak M, Smola H, Aumailley M, Rivero F, Pfister H, Smola-Hess S. The human papillomavirus type 8 E2 protein suppresses beta4-integrin expression in primary human keratinocytes. *J Virol*. 2004; 78(19):10738–46.

Oldak M, Maksym RB, Sperling T, Yaniv M, Smola H, Pfister HJ, et al. Human papillomavirus type 8 E2 protein unravels JunB/Fra-1 as an activator of the beta4-integrin gene in human keratinocytes. *J Virol*. 2010; 84(3):1376–86.

Oldak M, Tolzmann L, Wnorowski A, Podgórska MJ, Silling S, Lin R, et al. Differential regulation of human papillomavirus type 8 by interferon regulatory factors 3 and 7. *J Virol*. 2011; 85(1):178–88.

Oliveira JG, Colf LA, McBride AA. Variations in the association of papillomavirus E2 proteins with mitotic chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(4):1047–52.

Paolini F, Rizzo C, Sperduti I, Pichi B, Mafera B, Rahimi SS, et al. Both mucosal and cutaneous papillomaviruses are in the oral cavity but only alpha genus seems to be associated with cancer. *J Clin Virol*. 2013; 56(1):72–6.

Pfister H. Chapter 8: Human papillomavirus and skin cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003; (31):52–6.

Pierce Campbell CM, Lin HY, Fulp W, Papenfuss MR, Salmerón JJ, Quiterio MM, et al. Consistent Condom Use Reduces the Genital Human Papillomavirus Burden Among High-Risk Men: The HPV Infection in Men Study. *J Infect Dis*. 2013; 208(3):373–84.

Proby CM, Harwood CA, Neale RE, Green AC, Euvrard S, Naldi L, et al. A case-control study of betapapillomavirus infection and cutaneous squamous cell carcinoma in organ transplant recipients. *Am J Transplant*. 2011; 11(7):1498–508.

QuimiNet.com. *Milliplex Map*. Cidade do México: QuimiNet.com; 2015 [citado em 20 mar. 2016]. Disponível em: <http://www.quiminet.com/articulos/milliplex-map-multianalisis-cuantitativo-de-perfiles-proteicos-con-la-tecnologia-xmap-de-luminex-44723.htm>.

Quint KD, Genders RE, de Koning MN, Borgogna C, Gariglio M, Bouwes Bavinck JN, et al. Human Beta-papillomavirus infection and keratinocyte carcinomas. *J Pathol*. 2015; 235(2):342–54.

Reuschenbach M, Tran T, Faulstich F, Hartschuh W, Vinokurova S, Kloor M, et al. High-risk human papillomavirus in non-melanoma skin lesions from renal allograft recipients and immunocompetent patients. *Br J Cancer*. 2011; 104(8):1334–41.

Rollison DE, Pawlita M, Giuliano AR, Iannacone MR, Sondak VK, Messina JL, et al. Measures of cutaneous human papillomavirus infection in normal tissues as biomarkers of HPV in corresponding nonmelanoma skin cancers. *Int J Cancer*. 2008; 123(10):2337–42.

Rozenblatt-Rosen O, Deo RC, Padi M, Adelmant G, Calderwood MA, Rolland T, et al. Interpreting cancer genomes using systematic host network perturbations by tumour virus proteins. *Nature*. 2012; 487(7408):491–5.

Ruhland A, de Villiers EM. Opposite regulation of the HPV 20-URR and HPV 27-URR promoters by ultraviolet irradiation and cytokines. *Int J Cancer*. 2001; 91(6):828–34.

Sakakibara N, Mitra R, McBride AA. The papillomavirus E1 helicase activates a cellular DNA damage response in viral replication foci. *J Virol*. 2011; 85(17):8981–95.

Schaper ID, Marcuzzi GP, Weissenborn SJ, Kasper HU, Dries V, Smyth N, et al. Development of skin tumors in mice transgenic for early genes of human papillomavirus type 8. *Cancer Res*. 2005; 65(4):1394–400.

Schmitt A, Harry JB, Rapp B, Wettstein FO, Iftner T. Comparison of the properties of the E6 and E7 genes of low- and high-risk cutaneous papillomaviruses reveals strongly transforming and high Rb-binding activity for the E7 protein of the low-risk human papillomavirus type 1. *J Virol.* 1994; 68(11):7051–9.

Schmitt M, Bravo IG, Snijders PJ, Gissmann L, Pawlita M, Waterboer T. Bead-based multiplex genotyping of human papillomaviruses. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(2):504–12.

Sichero L, Pierce Campbell CM, Ferreira S, Sobrinho J, Luiza Baggio M, Galan L, et al. Broad HPV distribution in the genital region of men from the HPV infection in men (HIM) study. *Virology.* 2013; 443(2):214–7.

Sichero L, Pierce Campbell CM, Fulp W, Ferreira S, Sobrinho JS, Baggio M, et al. High genital prevalence of cutaneous human papillomavirus DNA on male genital skin: the HPV Infection in Men Study. *BMC Infect Dis.* 2014; 14:677.

Sichero L, Nyitray AG, Nunes EM, Nepal B, Ferreira S, Sobrinho JS, et al. Diversity of human papillomavirus in the anal canal of men: the HIM Study. *Clin Microbiol Infect.* 2015; 21(5):502–9.

Simard EP, Torre LA, Jemal A. International trends in head and neck cancer incidence rates: differences by country, sex and anatomic site. *Oral Oncol.* 2014; 50(5):387-403.

Skin Cancer Foundation. *Carcinoma basocelular*. Nova Iorque: Skin Cancer Foundation; 2010 [citado em 18 mar. 2016a]. Disponível em: <http://www.skincancer.org/pt-PT/basal-cell-carcinoma>.

Skin Cancer Foundation. *Carcinoma de células escamosas*. Nova Iorque: Skin Cancer Foundation; 2010 [citado em 18 mar. 2016b]. Disponível em: <http://www.skincancer.org/pt-PT/squamous-cell-carcinoma>.

Smola S. Human papillomaviruses and skin cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2014; 810:192–207.

Smola-Hess S, Pahne J, Mauch C, Zigrino P, Smola H, Pfister HJ. Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase in papillomavirus-positive cells: role of the human papillomavirus (HPV) 16 and HPV8 E7 gene products. *J Gen Virol.* 2005; 86(Pt 5):1291–6.

Souza RJ, Mattedi AP, Corrêa MP, Rezende ML, Ferreira AC. Estimativa do custo do tratamento do câncer de pele tipo não-melanoma no estado de São Paulo - Brasil. *An Bras Dermatol.* 2011; 86(4):657–62.

Sperling T, Oldak M, Walch-Rückheim B, Wickenhauser C, Doorbar J, Pfister H, et al. Human papillomavirus type 8 interferes with a novel C/EBP β -mediated mechanism of keratinocyte CCL20 chemokine expression and Langerhans cell migration. *PLoS Pathog.* 2012; 8(7):e1002833.

Steger G, Pfister H. In vitro expressed HPV 8 E6 protein does not bind p53. *Arch Virol.* 1992; 125(1-4):355–60.

Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001; 17:463–516.

Tan MJ, White EA, Sowa ME, Harper JW, Aster JC, Howley PM. Cutaneous β -human papillomavirus E6 proteins bind Mastermind-like coactivators and repress Notch signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109(23):E1473–80.

Tanigaki T, Endo H. A case of epidermodysplasia verruciformis (Lewandowsky-Lutz, 1922) with skin cancer: histopathology of malignant cutaneous changes. *Dermatologica.* 1984; 169(2):97–101.

Torres M, Gheit T, McKay-Chopin S, Rodríguez C, Romero JD, Filotico R, et al. Prevalence of beta and gamma human papillomaviruses in the anal canal of men who have sex with men is influenced by HIV status. *J Clin Virol.* 2015; 67:47–51.

Ulrich C, Kanitakis J, Stockfleth E, Euvrard S. Skin cancer in organ transplant recipients--where do we stand today? *Am J Transplant*. 2008; 8(11):2192–8.

Underbrink MP, Howie HL, Bedard KM, Koop JI, Galloway DA. E6 proteins from multiple human betapapillomavirus types degrade Bak and protect keratinocytes from apoptosis after UVB irradiation. *J Virol*. 2008; 82(21):10408–17.

van den Brule AJ, Pol R, Fransen-Daalmeijer N, Schouls LM, Meijer CJL, Snijders PJ. GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *J Clin Microbiol*. 2002; 40(3):779–87.

Viarisio D, Mueller-Decker K, Klotz U, Aengeneyndt B, Kopp-Schneider A, Gröne HJ, et al. E6 and E7 from beta HPV38 cooperate with ultraviolet light in the development of actinic keratosis-like lesions and squamous cell carcinoma in mice. *PLoS Pathog*. 2011; 7(7):e1002125.

Wallace J, Woda BA, Pihan G. Facile, comprehensive, high-throughput genotyping of human genital papillomaviruses using spectrally addressable liquid bead microarrays. *J Mol Diagn*. 2005; 7(1):72–80.

Wallace NA, Robinson K, Howie HL, Galloway DA. HPV 5 and 8 E6 abrogate ATR activity resulting in increased persistence of UVB induced DNA damage. *PLoS Pathog*. 2012; 8(7):e1002807.

Weissenborn SJ, Nindl I, Purdie K, Harwood C, Proby C, Breuer J, et al. Human papillomavirus-DNA loads in actinic keratoses exceed those in non-melanoma skin cancers. *J Invest Dermatol*. 2005; 125(1):93–7.

Weissenborn S, Neale RE, Waterboer T, Abeni D, Bavinck JN, Green AC, et al. Beta-papillomavirus DNA loads in hair follicles of immunocompetent people and organ transplant recipients. *Med Microbiol Immunol*. 2012; 201(2):117–25.

White EA, Kramer RE, Tan MJ, Hayes SD, Harper JW, Howley PM. Comprehensive analysis of host cellular interactions with human papillomavirus E6 proteins identifies new E6 binding partners and reflects viral diversity. *J Virol*. 2012a; 86(24):13174–86.

White EA, Sowa ME, Tan MJ, Jeudy S, Hayes SD, Santha S, et al. Systematic identification of interactions between host cell proteins and E7 oncoproteins from diverse human papillomaviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012b; 109(5):E260–7.

World Health Organization (WHO). *Screening as well as vaccination is essential in the fight against cervical cancer*. Geneva: World Health Organization; 2015 [citado em 22 março de 2016]. Disponível em: <http://www.who.int/reproductivehealth/topics/cancers/fight-cervical-cancer/en/>

zur Hausen H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta*. 1996; 1288(2):F55–78.

9 ANEXOS

Anexo A

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) fornecido aos voluntários do Estudo da Infecção por HPV em Homens (HIM) no Brasil.

Participante:

Nº Identificação:

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE

Informativo sobre participação em pesquisa, autorização de coleta de amostras e compartilhamento de informações sobre sua saúde.

Vamos lhe pedir que participe da extensão do estudo chamado:

História Natural da Infecção por HPV em Homens - Estudo HIM.

O TCLE contém informações importantes sobre o porquê da pesquisa, como será sua participação, tipo de procedimentos, possíveis riscos e benefícios, inconvenientes ou desconfortos, e outros detalhes, que poderão lhe ajudar a decidir se quer ou não participar da extensão do Estudo.

Leia este documento atentamente antes de decidir se quer ou não tomar parte desta etapa do estudo.

Esclareça suas dúvidas com nossa equipe e ainda diretamente com o médico do estudo. Se preferir, converse também com seus familiares e amigos.

Você só deve assinar o TCLE quando decidir que está de acordo com o que será feito, quer e pode participar.

A pessoa responsável por um estudo clínico é chamado de Investigador Principal e neste caso será a Dra Anna Giuliano, Ph.D. do Moffitt Cancer Center - Estados Unidos. No entanto, outras pessoas estão envolvidas e podem atuar em nome do responsável seja em Tampa, Flórida; Cuernavaca, México; ou em São Paulo, Brasil.

No Brasil a Co-Investigadora Principal é a Dra Luisa Lina Vila, Ph.D. (Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo/ Instituto do Câncer do Estado de São Paulo - ICESP) e o Co-Investigador Médico responsável pelos procedimentos clínicos é o Dr Roberto José Carvalho da Silva, Ph.D. do Centro de Referência DST/ Aids (CRT-DST/ Aids), instituição onde a pesquisa vem sendo conduzida.

Este estudo vem sendo financiado pelo “National Institutes of Health, NIH” (Institutos Nacionais de Saúde dos Estados Unidos da América)

Dr. Eduardo Ronner Lagonegro
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Centro de Referência e Treinamento-DST/AIDS

Por que esta pesquisa está sendo feita?

O objetivo desse estudo é entender o que acontece na infecção pelo papilomavírus humano (HPV) nos homens. Também são pesquisados quais os fatores que estão relacionados ao HPV em homens, incluindo outras doenças sexualmente transmissíveis (DST).

O HPV é um vírus transmitido através da relação sexual, e outros contatos, sendo comum em homens e mulheres. Alguns tipos deste vírus podem causar verrugas genitais. Outros tipos de HPV provocam alterações no colo do útero ou câncer em mulheres. Cânceres associados às infecções por HPV no ânus, orofaringe (boca e garganta) e pênis são menos frequentes.

A maioria das pessoas com HPV não têm sinais e sintomas da infecção. Ainda, não há tratamento eficiente contra o vírus. Na maioria dos casos a infecção passa despercebida, curando-se espontaneamente. Por meio deste estudo, os pesquisadores esperam aprender mais sobre a infecção por HPV em homens, a fim de desenvolver programas eficientes para reduzir o risco das doenças causadas pelo HPV em homens e mulheres.

O uso de preservativos pode ajudar a diminuir as chances de transmissão de HPV e outras doenças sexualmente transmissíveis entre parceiros sexuais. No entanto, se a infecção por HPV estiver na pele não coberta pelo preservativo, é possível que ocorra a transmissão.

Por que estamos pedindo para você continuar participando deste estudo?

Você é um dos 4.000 homens que completou as 10 visitas previstas no estudo HIM conduzido no Brasil, EUA e México.

Agradecemos pela sua colaboração e perguntamos se estaria interessado em continuar por mais por 4 anos. Entendemos que ao longo dos próximos anos, teremos mais informações sobre as infecções por HPV e as doenças que ele causa tanto na região genital quanto anal e oral dos homens.

Dr. Eduardo Ronner Lagonegro
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Centro de Referência e Treinamento-DST/AIDS

Por quanto tempo e quantas vezes você terá que comparecer nesta etapa de extensão do estudo?

Você terá que realizar mais 4 visitas anuais por mais 4 anos. Neste período você passará em consultas com o médico e demais atividades orientadas pela equipe. A maior parte das visitas levará aproximadamente 1 hora, mas algumas até poderão ser mais curtas.

As atividades realizadas em cada visita serão as mesmas, como segue abaixo:

- Exame da pele da região genital e anal: o médico irá esfregar, cuidadosamente, um “cotonete” molhado com soro fisiológico na parte externa de seu pênis, escroto e canal anal para testar a presença de HPV. Se o médico encontrar lesões ou verrugas visíveis, também serão colhidas amostras dessas áreas usando um “cotonete” molhado.
- Coleta de amostra oral: visando analisar a presença de HPV, será pedido que você faça bochecho e gargarejo com líquido comumente utilizado para higiene bucal. Aparelhos e próteses dentárias removíveis deverão ser retirados no momento do bochecho.
- Coleta de amostras de sangue: a equipe clínica vai coletar de uma veia do seu braço cerca de 2 a 3 colheres de sopa de sangue com uma agulha nova e estéril. O sangue será testado para anticorpos contra HPV (proteínas produzidas pelo corpo como parte de sua defesa contra HPV).
- Questionário: será pedido que você reponda a um questionário com perguntas sobre sua história e hábitos sexuais. Por exemplo, podemos perguntar sobre o número de parcerias sexuais e a data de sua última relação. Algumas destas perguntas são pessoais e íntimas e você pode se recusar a responder a qualquer questão. Contudo, reforçamos que elas são de grande importância para que se possa conhecer melhor a infecção pelo HPV e os fatores de risco relacionados ao desenvolvimento das doenças causadas por este vírus. Também será perguntado sobre sua história médica, atividade física e o médico o questionará sobre sintomas e medicamentos em uso.

Se entre as visitas, você observar alguma lesão ou alteração na pele da região genital e anal, deverá contatar a equipe do estudo. Se necessário lhe será agendada

uma visita extra, na qual poderá ser coletado material da lesão e o médico discutirá com você o tratamento melhor indicado.

Quantas pessoas vão participar da extensão do estudo HIM?

Cerca de 4000 homens de 18 a 70 anos participaram da primeira etapa do estudo nos 3 centros (BR1443, MX 1429 e EUA 1427). Neste período de extensão participarão pelo menos 2100 homens.

O tratamento atual que você recebe para algum possível problema de saúde vai mudar se você continuar neste estudo?

O tratamento que você recebe agora do seu médico habitual não vai mudar se você participar da extensão do estudo. Você terá plena liberdade para deixar a pesquisa a qualquer momento, sem causar ressentimentos, nem mudar seu atendimento médico.

Lembre-se de que é importante nos informar quando não puder comparecer a uma consulta marcada, se mudar de endereço e telefone ou se, por algum motivo for deixar o estudo.

(Muitas pessoas têm HPV. A maioria das infecções passa despercebida e pode ser eliminada espontaneamente. Você não vai precisar fazer mudanças no seguimento de sua saúde ou da(o) parceira(o). De qualquer maneira, é aconselhável que suas parceiras façam regularmente o exame de prevenção do câncer do colo do útero (Papanicolaou), independente de você apresentar HPV).

O que acontece se decidir que não vai participar?

Se você decidir que não vai participar da extensão deste estudo, tudo bem. Esta escolha não vai interferir nos cuidados com sua saúde.

Não há tratamento para a infecção por HPV em homens ou mulheres, mas há opções de tratamento para as doenças causadas por este vírus, como por exemplo para as verrugas visíveis, podendo aparecer novas verrugas durante o tratamento. As opções de tratamento das lesões causadas pelo HPV incluem: aplicações de agentes terapêuticos como ácido bicloro ou tricloro-acético, podofilina, podofilotoxina, imiquimod, crioterapia (congelamento), eletrocauterização, terapia a

laser ou excisão (remoção cirúrgica). Os tratamentos serão feitos de acordo com o critério médico do serviço onde você estiver sendo tratado.

Como você pode começar a participar da continuidade deste Estudo?

Se você decidir participar do estudo, precisará assinar este **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, que é um documento de consentimento pós-informado, isto é, você só permite ser pesquisado depois de entender as razões e condições do estudo e as aceitar.

A equipe de estudo precisa reconvocar homens que possam retornar sempre que uma visita estiver agendada, por isso é pedido a você informações completas para contato. Isto é necessário para que possamos enviar lembretes sobre consultas com hora marcada e contatos adicionais a pedido médico.

Ao final de cada visita será marcada sua próxima consulta clínica.

Assim como anteriormente, em todas as visitas desta etapa você terá que seguir corretamente as seguintes instruções: 24 horas antes não fazer sexo e 12 horas antes não lavar os órgãos genitais. Deverá ainda evitar ingerir alimentos 30 minutos antes da coleta oral. Estes cuidados são necessários para a pesquisa de HPV.

A equipe do estudo vai lembrá-lo da próxima visita. Dependendo da forma de contato escolhida você receberá um telefonema, uma carta lembrete ou um e-mail duas semanas antes da data marcada. Além disso, vamos contatá-lo no dia anterior à data da consulta. Se por alguma razão você quiser abandonar o estudo pedimos que nos avise.

O que vai acontecer durante a extensão do estudo?

Reforçamos que em cada visita:

- O médico fará um exame da pele dos seus órgãos genitais e coletará amostras para a realização de teste de HPV. Se lesões visíveis ou verrugas estiverem presentes, também serão coletadas amostras destas áreas. Você será avisado se o médico encontrar qualquer ferida ou lesão que necessite de tratamento.
- Será pedido que você faça bochecho e gargarejo para coletar células da boca para testes de HPV.
- Será coletada amostra de sangue para teste de anticorpos contra HPV.

- Você preencherá questionários sobre sua história sexual, história médica, atividade física e hábitos alimentares. O médico o questionará sobre sintomas e medicamentos em uso.

Resultados dos exames realizados no estudo

Testes de HPV: Os testes realizados de amostras genitais, anais e da orofaringe serão utilizados apenas para fins de pesquisa. Utilizaremos testes comerciais capazes de detectar um grande número de HPVs que infectam estes locais do corpo, mas que não são utilizados regularmente nas clínicas. Além disso, ainda não há tratamento específico para eliminar este vírus. Os resultados dos testes de HPV não estarão disponíveis para você ou seu médico no momento. Entretanto, no caso das doenças causadas pelo HPV como condiloma (verrugas genitais) e outras, o tratamento lhe será assegurado por meio de procedimentos padrão que serão efetuados por médicos do CRT-DST/ AIDS.

Haverá ajuda para reposição das despesas se você participar do estudo?

Você vai ser reembolsado pelas despesas com transporte e refeição, necessárias à sua participação. Em cada visita completada, você receberá a quantia de R\$30,00 (trinta reais) na forma de vale-refeição, além de vale-transporte (metrô e ônibus).

Quanto vai custar para você participar da extensão do estudo?

Nenhum valor será cobrado pela sua participação no Estudo. Você não vai ter que pagar pelos testes ou procedimentos realizados e não precisa ter um plano de saúde para participar.

Quais são os eventuais benefícios se você participar da extensão do estudo?

Nós não sabemos se sua saúde será beneficiada caso você participe da extensão do estudo. Este e outros estudos poderão ajudar os pesquisadores a conhecer quais as características da transmissão do HPV, por quanto tempo os homens têm a infecção e o que causa o aparecimento de lesões. Entretanto, no caso das doenças causadas pelo HPV como condiloma (verrugas genitais) e outras, o tratamento lhe será assegurado conforme rotina do CRT-DST/Aids.

Quais são os riscos de você participar da extensão do estudo?

Quando for coletado o sangue você poderá sentir um pouco de dor local, sensação de tontura ou eventualmente desmaiar. Há um pequeno risco do lugar da picada ficar roxo ou raramente apresentar infecção.

As coletas dos esfregaços genitais com “cotonetes” não vão lhe causar dor, mas podem lhe trazer um pouco de desconforto local.

Os bochechos e gargarejos para coleta de células orais eventualmente poderão lhe causar enjôo, ou engasgo.

As perguntas feitas nos questionários são pessoais e íntimas podendo deixar você envergonhado ou incomodado. Você pode se recusar a respondê-las. Também pode retirar seu consentimento a qualquer momento, porém sua colaboração é muito importante para a continuidade do estudo.

Se você precisar de cuidados de saúde enquanto fizer parte do estudo?

Dependendo da gravidade do problema vá ao hospital mais próximo, Unidade Básica de Saúde ou procure seu médico habitual. Se quiser, leve consigo uma cópia deste consentimento pós-informado e diga que você participa desse estudo.

As Clínicas Médicas do CRT-DST/AIDS não fornecem tratamento de emergência e podem não estar em condições de dar qualquer assistência que você possa precisar.

O que vamos fazer para que seus dados e resultados do estudo não sejam vistos por outras pessoas?

As informações fornecidas neste estudo serão mantidas em sigilo de acordo com a lei. O questionário será marcado com um código e não com seu nome. Se você concordar em ser contatado, não será mencionado sobre os objetivos do estudo. Amostras e dados enviados aos Estados Unidos, serão somente marcadas com códigos. Os registros do estudo serão mantidos em arquivo trancado. Apenas as pessoas e instituições descritas a seguir poderão ver seus registros devendo manter suas informações em sigilo. São elas:

- A equipe que acompanha você no estudo;

- Pessoas encarregadas de garantir que a pesquisa seja conduzida de maneira correta e de verificar se protegemos seus direitos e segurança;
- Os Comitês de Ética das instituições envolvidas;
- O patrocinador do estudo (Institutos Nacionais de Saúde dos EUA, N.I.H.);
- O Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Países envolvidos;
- O Departamento Americano que regulamenta Alimentos e Drogas (FDA);
- Comissão Nacional de Ética em Pesquisa;
- Agência Nacional Vigilância Sanitária.

As publicações resultantes desta pesquisa nunca revelarão o seu nome ou qualquer outra referência que o identifique.

O que acontece se você decidir não participar da extensão do estudo?

Você deve participar desse estudo somente se quiser. Se decidir não participar:

- Você não vai ter problemas ou perda dos direitos que normalmente tem.
- Você continuará a se beneficiar dos mesmos cuidados à saúde.
- Você pode continuar a receber tratamento do seu médico habitual.

O que acontece se você decidir participar da extensão do estudo e mais tarde quiser sair?

Se você decidir que não quer mais participar, informe à equipe assim que possível.

Existem motivos para nós excluirmos você do estudo mais tarde?

Mesmo que você queira continuar, você poderá ser retirado do estudo se for detectado algum risco relativo à sua participação ou se a pesquisa for encerrada.

Suas dúvidas podem ser respondidas pela equipe

Estudo HPV

Fone: (11)5549-1967 e (11)5087-9832

e-mail: hpv.estudo@gmail.com

C.R.T.- DST / AIDS

Rua Santa Cruz, 81 - Vila Mariana CEP 04121-000 São Paulo, SP

PABX: (11)5087-9911

Se você quiser fazer perguntas sobre esse estudo telefone para:

Dr. Roberto Carvalho – Médico responsável pela coleta das amostras e procedimentos médicos.

Fones: (11)5549-1967 e (11)5087-9832

Dra. Luisa Lina Villa – Pesquisadora responsável pelo estudo no Brasil

Fones: (11) 3893-4363 e-4369; 21761814

Se tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de um estudo ligue:

Dr. Eduardo Ronner Lagonegro – Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do C.R.T.- DST / AIDS.

Fone: (11) 5087-9837

Assinatura do Consentimento Pós-informado.

Cabe a você decidir se quer participar da extensão desse estudo.

Eu, de livre vontade, dou meu consentimento para participar da extensão do estudo. Eu entendo que esta é uma pesquisa médico-científica. Eu recebi uma cópia desse instrumento de consentimento pós-informado.

_____	_____
Assinatura do Participante do Estudo	Data

_____	_____
Nome em Letra de Forma do Participante do Estudo	Número RG

Declaração da Pessoa que obteve o Consentimento Pós-Informado

Eu expliquei cuidadosamente sobre os objetivos e procedimentos do estudo.

A pessoa que está dando seu consentimento para participar da extensão desse estudo:

- Entende a linguagem que está sendo usada.
- Entende o conteúdo deste documento e é capaz de compreender a explicação.
- Não demonstrou qualquer dificuldade para entender o que significa tomar parte na extensão do estudo.

Ao que eu saiba, quando esta pessoa assinar este instrumento, estará ciente:

- Do que trata a extensão desse estudo;
- O que precisa ser feito;
- Quais poderiam ser os eventuais benefícios;
- Quais poderiam ser os riscos conhecidos;
- Que sua participação no estudo é voluntária.

_____	_____
Assinatura do profissional que obteve o consentimento	Data

Nome em Letra de Forma do profissional que obteve o consentimento

Permissão para armazenar amostras restantes da extensão do estudo

Será pedida sua permissão para que, após completados os testes do estudo, suas amostras restantes sejam armazenadas em um banco de amostras para uso futuro nas instituições envolvidas. As amostras terão um código e serão armazenadas sem qualquer informação pessoal que possa relacioná-las a você. Os códigos do estudo que correlacionam você com as amostras armazenadas serão mantidos pela equipe em uma área privada e trancada.

As amostras serão usadas apenas para avaliação de doenças infecciosas ou imunomarcadores de infecção. Elas ficarão armazenadas por um período inicial de 5 (cinco) anos para futuros testes realizados pelos investigadores. Conforme a Resolução CNS nº 347/ 2005, se um pesquisador quiser utilizar estas amostras em um futuro estudo precisará submeter a proposta da pesquisa aos Comitês de Ética envolvidos, bem como você deverá ser novamente consultado sobre seu desejo de autorizar, ou não o uso de suas amostras, através de novo termo de consentimento.

A informação sobre os resultados dos testes com as amostras restantes será definida no estudo a ser realizado futuramente. De qualquer maneira, isto não vai alterar os cuidados à sua saúde.

Também, a qualquer momento, você pode decidir que você não quer que suas amostras sejam armazenadas. Nesse caso o responsável pelo estudo vai garantir que suas amostras sejam destruídas.

_____ Eu dou meu consentimento para armazenarem minhas amostras restantes para futuros estudos de pesquisa, que só poderão ser utilizadas após minha assinatura em novo termo de consentimento.

_____ Eu **não** dou meu consentimento para armazenar nem usar as minhas amostras restantes para futuros estudos de pesquisa.

Assinatura do Voluntário

Data

Nome em Letra de Forma

Permissão para ser contatado em futuros estudos

Se houver estudos futuros, você precisa autorizar que a equipe entre em contato, através do endereço fornecido. Você pode concordar ou não.

_____ Eu concordo em ser contatado para futuros estudos sobre a infecção por HPV e assuntos correlatos.

_____ Eu **não** quero ser contatado para estudos futuros.

Assinatura do Voluntário

Data

Nome em Letra de Forma

Permissão para coleta de esfregaço anal durante a fase de extensão do estudo

Como parte deste estudo, é importante que também seja testada a presença do HPV na borda e canal do ânus. Para tanto, o médico irá esfregar cuidadosamente, um "cotonete" ou escovinha molhada com soro fisiológico na parte externa de seu ânus e parte inicial do canal anal, fazendo leves movimentos circulares.

Se houver lesões visíveis ou verrugas serão colhidas amostras dessas áreas usando um "cotonete" ou escovinha molhada ou uma pinça própria. Você será informado se o médico encontrar quaisquer feridas ou lesões que precisem ser tratadas.

Você não é obrigado a aceitar a coleta de esfregaço anal para continuar no estudo.

No entanto, se você concordar em colher amostras do ânus, além daquelas do pênis, escroto e boca, por favor, assine abaixo.

____ Eu permito a coleta de amostras da borda e do canal anal para testar a presença de HPV.

____ Eu **não** quero que sejam colhidas amostras do ânus.

Assinatura do Voluntário

Data

Nome em Letra de Forma

Assinatura do Médico

Data

Nome do Médico em letra de forma

Anexo B

**Documento fornecido pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo declarando ciência perante a
execução do Projeto nº 195/14.**

CIÊNCIA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em **24.06.14** tomou ciência do Projeto nº **195/14** intitulado “**Prevalência e diversidade de Beta-papilomavírus em amostras anogenitais e orais de homens do estudo HIM**”, vinculado à pós-graduação do Departamento de Radiologia e Oncologia , que não envolverá atividade prática e/ou experimental no âmbito da Faculdade de Medicina ou Instituto do Câncer do Estado de São Paulo e que conta com prévia aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Referência e Treinamento DST/AIDS.

Pesquisador(a) Responsável: Dra. Laura Sichero

Pesquisador(a) Executante : Emily Montosa Nunes

CEP-FMUSP, 24 de Junho de 2014

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo C

Artigo publicado com colaboração de Emily Montosa Nunes, junto grupo de trabalho do Estudo da Infecção por HPV em Homens (HIM), no ano 2015.

Diversity of human papillomavirus in the anal canal of men: the HIM Study

L. Sichero¹, A. G. Nyitray², E. M. Nunes¹, B. Nepal², S. Ferreira¹, J. S. Sobrinho¹, M. L. Baggio¹, L. Galan³, R. C. Silva⁴, E. Lazcano-Ponce⁵, A. R. Giuliano⁶ and L. L. Villa^{1,7}, on behalf of the HIM Study Group

1) Molecular Biology Laboratory, Centre of Translational Oncology, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), São Paulo, Brazil, 2) Center for Infectious Diseases, The University of Texas School of Public Health, Houston, TX, USA, 3) Ludwig Institute for Cancer Research, 4) Centro de Referência e Treinamento DST/Aids, São Paulo, Brazil, 5) Centro de Investigación en Salud Poblacional, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, México, 6) Center for Infection Research in Cancer, H. Lee Moffitt Cancer Center and Research Institute, Tampa, FL, USA and 7) Department of Radiology and Oncology, School of Medicine of the University of São Paulo and HPV Institute, School of Medicine, Santa Casa de São Paulo, Brazil

Abstract

Human papillomavirus (HPV) infections are associated with the development of anogenital lesions in men. There are no reports describing the distribution of non- α HPV types in the anal canal of a sexually diverse group of men. The HPV Infection in Men (HIM) Study is a multicentre study on the natural history of HPV infection in Brazil, Mexico, and the USA. At baseline, 12% of anal canal PCR HPV-positive specimens were not typed by the Roche Linear Array, and were considered to be unclassified. Our goals were to characterize HPVs among these unclassified specimens at baseline, and to assess associations with participant socio-demographic and behavioural characteristics. Unclassified HPVs were typed by sequencing of amplified PGM09/11 products or cloning of PGM09/GP + nested amplicons followed by sequencing. Further analysis was conducted with FAP primers. Of men with unclassified HPV in the anal canal, most (89.1%) were men who have sex with women. Readable sequences were produced for 62.8% of unclassified specimens, of which 75.2% were characterized HPV types. Eighteen, 26 and three different α -HPV, β -HPV and γ -HPV types were detected, respectively. α -HPVs were more commonly detected among young men (18–30 years) than among older men (45–70 years), whereas β -HPVs were more frequent among mid-adult men (31–44 years). β -HPVs were more common among heterosexual men (85.0%) than among non-heterosexual men. All β -HPVs detected among non-heterosexual men were β 2-HPV types. The high prevalence of β -HPV in the anal canal of men who do not report receptive anal sex is suggestive of other forms of transmission that do not involve penile–anal intercourse.

Clinical Microbiology and Infection © 2015 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Anal canal, cutaneous HPV, HIM Study, human papillomavirus, males, prevalence, unclassified types

Original Submission: 13 August 2014; **Revised Submission:** 16 December 2014; **Accepted:** 21 December 2014

Editor: G. Antonelli

Article published online: XXX

Corresponding author: L. Sichero, Center of Translational Oncology, ICESP, Av. Dr. Arnaldo, 251, 8 andar, 01246-000, Cerqueira César, São Paulo, SP, Brazil
E-mail: laura.sichero@icesp.org.br

Introduction

Although anal canal cancer is an uncommon disease, the incidence is increasing in developed countries [1]. Human

papillomavirus (HPV) causes most cases of anal cancers (80–90%), and HPV-16 is the most prevalent type in these tumours (~80%) [2]. Among men, the incidence of HPV-associated anal cancer is highest in men who have sex with men (MSM) and in human immunodeficiency virus (HIV)-infected males [3].

The HPV genome consists of a circular double-stranded DNA molecule of ~8000 bp. HPV types differ by $\geq 10\%$ in the complete *L1* gene sequence [4]. To date, 199 different HPV types have been fully sequenced, and nearly all cluster into three genera: α -HPV, β -HPV, and γ -HPV. Whereas α -HPVs have been mainly isolated

from mucosal and genital lesions, and are thus categorized as mucosal types, β -HPVs and γ -HPVs have been mostly isolated from the skin, and have been grouped together as cutaneous HPV [4]. The β -HPV and γ -HPV genera have more genotypes than the α -HPV genus, and partial DNA sequence information points to the existence of hundreds of putative novel HPV types of both viral genera [5,6]. Recent data indicate a high prevalence of cutaneous HPV at diverse anatomical sites that are different from those from which they were isolated [7–11].

The HPV Infection in Men (HIM) Study is an ongoing, prospective anogenital HPV natural history study of >4000 men aged 18–70 years residing in Brazil, Mexico, and the USA. The baseline anal canal genotype-specific HPV prevalence in this population was 16.3%; another 12.4% of specimens were positive for HPV DNA, but could not be classified as any of the 37 genotypes identified by the Roche Linear Array, and were grouped as unclassified HPV [12]. Our aims were to characterize HPV types among anal canal unclassified HPV specimens collected at baseline, and to evaluate associated socio-demographic and behavioural risk factors.

Materials and methods

Clinical samples and study design

Men were enrolled in Brazil (São Paulo), Mexico (Cuernavaca) and the USA (Tampa) between 2005 and 2009, reported no prior diagnosis of anogenital warts or cancers, and had no recent symptoms of or treatment for a sexually transmitted infection, including HIV/AIDS. Men completed a pre-enrolment (baseline) visit, and were enrolled on completion of their second (enrolment) visit 2 weeks post-baseline; they were then followed up every 6 months for up to 4 years. Details of the HIM Study are described elsewhere [12,13]. This cross-sectional analysis included the 3524 men who completed their baseline visit between September 2005 and June 2009 and consented to collection of anal canal exfoliated cells. The ethics committees of participating hospitals and institutions approved all study procedures, and participants provided written informed consent to the study protocol.

At baseline, men completed an 88-item computer-assisted self-interview covering information about demographic characteristics, substance use, and sexual behaviours. Specimens were obtained from the genital area with Dacron swabs (Digene, Gaithersburg, MD, USA). With a separate swab, exfoliated cells from between the anal verge and the dentate line were collected. All staff collecting anal canal samples were trained to avoid touching the perianal skin with the swab. All samples were placed in standard transport medium and stored at -80°C until HPV testing.

HPV detection

DNA extraction was conducted with the QIAamp Media MDx Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Samples were tested for PCR amplification with PGMY09/11 primers, and HPV genotyping was conducted with the Roche Linear Array (Roche Molecular Diagnostics, Alameda, CA, USA), which is able to discriminate 37 α -HPV types (oncogenic types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, and 66; non-oncogenic types 6, 11, 26, 40, 42, 53, 54, 55, 61, 62, 64, 67–73, 81–84, IS39, and CP6108) [14]. Samples that tested PCR-positive and Linear Array-negative with all specific HPV probes were considered to be unclassified and included in the present study.

Unclassified HPV characterization

Purified HPV DNA was initially genotyped by direct sequencing of PGMY09/11 PCR amplicons or cloning of these fragments followed by sequencing. Next, 1 μL of PGMY09/11-negative products was used in a nested PCR with GP5+/6+ primers [15]; positive samples were sequenced following cloning. Finally, nested PCR-negative samples were subjected to a novel amplification reaction employing FAP59/64 primers [16], and positive samples were analysed exclusively by direct sequencing. AmpliTaq Gold polymerase (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA) was used in all PCRs. Purification of the amplicons with the EXO SAP-IT (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) was performed before sequencing. Sequencing was conducted in an ABI 3130XL Genetic Analyzer (AB Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) with the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (AB Applied Biosystems). Sequence identity was determined through comparison with the BlastN database.

Statistical analysis

Men were categorized as men who have sex with women (MSW), MSM, men who have sex with both men and women, and men who denied having any sex, based on their self-reported recent (previous 3–6 months) and lifetime penetrative sexual behaviour [17]. Specimens were classified in one of five categories: HPV-negative, HPV-positive for a characterized type, HPV-positive for an uncharacterized type, untyped (i.e. inconclusive), or inadequate (human β -globin PCR-negative). Characterized HPV types were additionally classified according to genus and species. Differences in socio-demographic and behavioural risk factors considered to be associated with the presence of a specific HPV genus (α , β , or γ) and species ($\beta 1$ or $\beta 2$) were evaluated with Fisher's exact test. All statistical tests were two-sided, and attained statistical significance at $\alpha = 0.05$. Analyses were performed with SAS version 9.3 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

Results

A total of 4299 men attended the pre-enrolment visit of the HIM Study from June 2005 to December 2009. Of these, 3524 men (82.0%) consented to collection of anal canal exfoliated cells (Fig. 1). Funding restrictions allowed PCR and genotyping on only the first 1970 specimens collected. Three men were eliminated because they reported HIV infection. Of the remaining 1967 anal specimens, 1706 (86.7%) were β -globin-positive and available for analysis. Of these 1706 valid specimens, 1276 (74.8%) were negative for any HPV DNA, whereas HPV DNA was detected by PCR or Linear Array genotyping in the remaining 430 specimens: 213 were PCR-positive and Linear Array-negative (unclassified specimens); 14 of these had an insufficient volume of DNA, leaving 199 available for sequencing. Unclassified HPV specimens included 55, 71 and 73 men from the USA, Brazil, and Mexico, respectively. During statistical analysis, one participant was excluded owing to age inclusion criteria, leaving a total of 198 participants retained in final analyses. Although slight differences were observed in participants' characteristics by country, most men with unclassified HPV were young (18–30 years, 37.9%) or mid-adult (31–44 years, 40.9%); 45.0% were married, and 84.6% were MSW (Table 1). A large proportion of men reported having had

sexual intercourse with three to nine lifetime female sexual partners (42.8%).

For unclassified HPV characterization, a broad spectrum of viral types from the α -HPV, β -HPV and γ -HPV genera were identified. Successful DNA sequences were obtained from 125 (62.8%) samples; 31 (24.8%) were considered to be uncharacterized once sequence comparison analysis indicated elevated identity to partial HPV nucleotide sequences in GenBank, although no type designation has yet been made. We were able to successfully type 94 (75.2%) of the 125 sequenced specimens: 26 (27.7%), 63 (67.0%) and five (5.3%) belonged to the α -HPV, β -HPV and γ -HPV genera, respectively (Table 2). The most common α -HPV types were HPV-74 (4.3%) and HPV-13 (3.2%), the most common β -HPV types were HPV-22 (9.6%), HPV-107 and HPV-120 (7.4% each), and the most common γ -HPV types were HPV-147 and HPV-130 (2.1% each) (Fig. 2). Some differences in HPV type-specific distribution were observed across countries. For example, γ -HPVs were not detected in specimens from the USA, HPV-13 was only detected in Mexico, and HPV-74 was not detected in Mexico.

Overall, 25 specimens (12.6%) were considered to be inadequate because of non-amplification of the human β -globin gene, indicating that the DNA extracted was insufficient or degraded (Table 2). Furthermore, 17 (8.6%) were HPV-negative with all primers, suggesting spurious amplification during the

FIG. 1. Diagram showing the selection of specimens from the HPV Infection in Men (HIM) Study pre-enrolment visit included in this analysis. *First group of samples subjected to human papillomavirus (HPV) detection and typing. **A positive PCR sample that did not hybridize to any specific HPV probe. HIV, human immunodeficiency virus.

TABLE 1. Characteristics of HPV Infection in Men Study participants with unclassified human papillomavirus DNA in the anal canal

Characteristic	USA (n = 55), n (%)	Brazil (n = 70), n (%)	Mexico (n = 73), n (%)	Total (n = 198), n (%)	p ^a
Age (years)					0.0031
18–30	29 (52.6)	27 (38.6)	19 (26.0)	75 (37.9)	
31–44	13 (23.7)	34 (48.6)	34 (46.6)	81 (40.9)	
45–70	13 (23.7)	9 (12.8)	20 (27.4)	42 (21.2)	
Median	24	34	39	35	
Race					<0.001
White	36 (65.4)	44 (65.7)	0 (0.0)	80 (40.4)	
Black	12 (21.8)	19 (28.3)	0 (0.0)	31 (15.7)	
Mixed/other	7 (12.8)	4 (6.0)	73 (100.0)	84 (42.4)	
Refused/missing	–	–	–	3 (1.5)	
Ethnicity					<0.001
Spanish/Hispanic/Latino	4 (9.5)	25 (36.2)	70 (100.0)	99 (50.0)	
Non-Hispanic	38 (90.5)	44 (63.8)	0 (0.0)	82 (41.4)	
Refused/missing	–	–	–	17 (8.6)	
Marital status					<0.001
Single, never married	30 (55.6)	23 (32.9)	12 (16.7)	65 (32.8)	
Married	14 (25.9)	27 (38.6)	48 (66.7)	89 (45.0)	
Cohabiting	2 (3.7)	12 (17.1)	10 (13.9)	24 (12.1)	
Divorced/separated/widow	8 (14.8)	8 (11.4)	2 (2.7)	18 (9.1)	
Refused/missing	–	–	–	2 (1.0)	
Education					<0.001
<12 years	4 (7.3)	14 (20.0)	40 (54.8)	58 (29.3)	
Completed 12 years	11 (20.0)	30 (42.8)	13 (17.8)	54 (27.3)	
13–16 years	37 (67.3)	22 (31.4)	15 (20.6)	74 (37.4)	
≥17 years	3 (5.4)	4 (5.7)	5 (6.8)	12 (6.1)	
Sexual orientation					0.036
MSW	49 (89.1)	53 (76.8)	62 (88.6)	164 (84.6)	
MSM	2 (3.6)	4 (5.8)	0 (0.0)	6 (3.1)	
MSMW	0 (0.0)	8 (11.6)	3 (4.3)	11 (5.6)	
No sex	4 (7.3)	4 (5.8)	5 (7.1)	13 (6.7)	
Lifetime number of female partners					0.002
No sex	7 (21.9)	6 (9.2)	5 (7.2)	18 (10.9)	
1–2	7 (21.9)	8 (12.3)	10 (14.5)	25 (15.0)	
3–9	11 (34.3)	20 (30.8)	40 (58.0)	71 (42.8)	
10–1000	7 (21.9)	31 (47.7)	14 (20.3)	52 (31.3)	
Lifetime number of male anal sex partners					0.005
No sex	52 (94.5)	49 (72.1)	66 (91.7)	167 (85.7)	
1–2	3 (5.5)	8 (11.8)	4 (5.5)	15 (7.7)	
3–9	0 (0.0)	5 (7.3)	1 (1.4)	6 (3.1)	
10–1000	0 (0.0)	6 (8.8)	1 (1.4)	7 (3.5)	

MSM, men who have sex with men; MSW, men who have sex with women; MSMW, men who have sex with men and women.

^ap-value obtained with Fisher's exact test.

previous PCR/Linear Array analysis. Direct sequencing of 32 (16.0%) FAP59/64 PCR-positive specimens was inconclusive, owing to overlapping peak patterns hindering sequence analysis and thus HPV genotyping. Data from the three centres were combined for the remaining analyses, which included 125 specimens for which readable DNA sequences were generated.

No risk factors were significantly associated with the detection of a specific HPV genus or species. Nevertheless,

α-HPVs were more commonly detected among young men (18–30 years) than among older men (45–70 years), whereas β-HPVs were more prevalent in mid-adult men (31–44 years) ($p = 0.06$) (Table 3). Additionally, as compared with α-HPVs, β-HPVs were non-significantly more prevalent among MSW than among MSM ($p = 0.4$) and among men who reported never using condoms during vaginal sex within the past 3 months than among those who said they always used a condom ($p = 0.3$). Interestingly, all β-HPVs detected among MSM and MSMW were from the β2 species (Table 3).

TABLE 2. Human papillomavirus (HPV) type distribution of previously unclassified HPV infections, by country

	USA (n = 55)		Brazil (n = 71)		Mexico (n = 73)		Total (n = 199)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Any HPV type ^a	21	38.2	50	70.5	54	74.0	125	62.8
Uncharacterized HPV	6	28.6	13	26.0	12	22.2	31	24.8
Characterized HPV	15	71.4	37	74.0	42	77.8	94	75.2
α-HPV	6	40.0	10	27.0	10	23.8	26	27.7
β-HPV	9	60.0	25	67.6	29	69.1	63	67.0
γ-HPV	–	–	2	5.4	3	4.1	5	5.3
HPV-negative	11	20.0	3	4.2	3	4.1	17	8.6
Inadequate sample	15	27.3	3	4.2	7	9.6	25	12.6
Inconclusive ^b	8	14.5	15	21.1	9	12.3	32	16.0

^aCharacterized and uncharacterized types.^bSequences could not be interpreted.

Discussion

Recently, the prevalence of anal β-HPV infection and the type distribution were analysed among Slovenian MSM, of whom 17% were HIV-positive, and β-HPV was detected in 65.2% of specimens [9]. To our knowledge, this is the first report to describe the distribution of cutaneous HPVs in the anal canal of men from three countries, most of whom are MSW, and to investigate the risk factors associated with β-HPV detection. We analysed 199 anal canal samples obtained from the HIM

FIG. 2. Human papillomavirus (HPV) type distribution by HPV genus and species (on the x-axis) among unclassified anal canal specimens of the HPV Infection in Men (HIM) Study at baseline ($n = 94$).

Study at the baseline visit that had been categorized as unclassified HPV specimens [12]. Eighteen, 26 and three different α -HPV, β -HPV and γ -HPV types were detected, respectively. β -HPVs were more common among heterosexual men (85.0%) than among non-heterosexual men.

Unreadable sequences (and thus inconclusive typing) were generated after direct sequencing of FAP54/69 PCR products of 16% of the specimens for which overlapping peak patterns in sequencing chromatograms were obtained, suggesting the presence of multiple HPV types. This is a common finding when these primers are used for a broad range of β -HPVs, and it has been shown by DNA sequencing of a number of clones or by Luminex methodology that these, in fact, correspond to multiple infections. It has been shown not only in the normal skin and cutaneous tumours [8] but also in the oral cavity and the nasal mucosa [7,8] that multiple detection of β -HPVs is more frequent than that of α -HPVs. Collectively, these findings point towards cutaneous HPVs being a commensal component of the microbiological flora of the human skin throughout the body [18,19].

The nucleotide sequences of 31 anal canal specimens corresponded to incomplete FAP59/64 sequences previously

deposited in the GenBank database (uncharacterized HPV types). In fact, >200 different presumed new HPV types are waiting for full genome characterization, the majority of which cluster within the γ -HPV genus [4–6]. Some differences were observed regarding the prevalence of individual types among the three geographical locations. Additionally, as previously observed for the 37 α -HPV types that can be identified with the Linear Array, a higher diversity of β -HPV and γ -HPV genotypes was detected in Brazil and Mexico than in the USA [20].

Overall, anal canal unclassified HPV detection at the baseline visit was more common in young and middle-aged adults, married men, and MSW reporting three to nine female lifetime sexual partners. In a previous study including 222 MSW from two US cities, the overall HPV infection rate was 24.8%, and another 7.7% of the men had unclassified infection at anal sites [21]. Unfortunately, risk factor analysis was restricted to men with HPV infections that could be characterized by the Linear Array, precluding any comparisons.

In this study, α -HPVs were more common among young men (18–30 years), whereas middle-aged men (45–70 years) most frequently harboured β -HPVs. Furthermore, α -HPV types

TABLE 3. Prevalence of α -human papillomaviruses (HPVs) and β -HPVs among unclassified anal canal specimens at baseline, by age and by sexual behaviour characteristics

	All α^a , n (%)	β -Species			
		All β , n (%)	B1, n (%)	B2, n (%)	Other β , n (%)
Age ^b (years)					
18–30	14 (53.5)	18 (29.0)	5 (38.5)	11 (25.0)	2 (40.0)
31–44	7 (30.2)	32 (51.6)	6 (46.1)	25 (56.8)	1 (20.0)
45–70	5 (16.3)	12 (19.4)	2 (15.4)	8 (18.2)	2 (40.0)
Sexual orientation					
No sex	2 (8.4)	3 (5.0)	1 (7.7)	1 (2.4)	1 (20.0)
MSW	17 (70.9)	51 (85.0)	12 (92.3)	35 (83.3)	4 (80.0)
MSM	2 (8.4)	2 (3.3)	0 (0.0)	2 (4.8)	0 (0.0)
MSMW	3 (12.3)	4 (6.7)	0 (0.0)	4 (9.5)	0 (0.0)
Lifetime number of female partners					
No sex	3 (15.0)	4 (7.1)	1 (8.3)	2 (5.0)	1 (25.0)
1–2	4 (20.0)	8 (14.3)	0 (0.0)	8 (20.0)	0 (0.0)
3–9	5 (25.0)	25 (44.7)	6 (50.0)	18 (45.0)	1 (25.0)
10–1000	8 (40.0)	19 (33.9)	5 (41.7)	12 (30.0)	2 (50.0)
Number of female partners in the past 3 months					
None	11 (55.0)	23 (42.6)	3 (27.3)	18 (45.0)	2 (66.7)
1	4 (20.0)	20 (35.7)	5 (45.4)	14 (35.0)	1 (33.3)
≥2	5 (25.0)	11 (19.7)	3 (27.3)	8 (20.0)	0 (0.0)
Lifetime number of male anal sex partners					
No sex	17 (68.0)	54 (87.1)	13 (100.0)	36 (81.8)	5 (100.0)
1–2	3 (12.0)	3 (4.8)	0 (0.0)	3 (6.8)	0 (0.0)
3–9	0 (0.0)	3 (4.8)	0 (0.0)	3 (6.8)	0 (0.0)
10–1000	5 (20.0)	2 (3.3)	0 (0.0)	2 (4.6)	0 (0.0)
Number of male anal sex partners in the past 3 months					
None	21 (84.0)	60 (96.8)	13 (100.0)	42 (95.4)	5 (100.0)
1	0 (0.0)	1 (1.6)	0 (0.0)	1 (2.3)	0 (0.0)
≥2	4 (16.0)	1 (1.6)	0 (0.0)	1 (2.3)	0 (0.0)
Condom use during vaginal sex in the past 3 months					
Always	3 (15.0)	6 (10.6)	1 (8.3)	5 (12.2)	0 (0.0)
Sometimes	7 (35.0)	19 (33.3)	4 (33.3)	15 (36.6)	0 (0.0)
Never	4 (20.0)	22 (38.6)	6 (50.0)	14 (34.2)	2 (50.0)
No recent vaginal sex	6 (30.0)	10 (17.5)	1 (8.3)	7 (17.0)	2 (50.0)
Condom use during anal sex in the past 3 months					
Always	3 (18.7)	7 (24.1)	2 (40.0)	5 (22.7)	0 (0.0)
Sometimes	3 (18.7)	1 (3.5)	0 (0.0)	1 (4.6)	0 (0.0)
Never	3 (18.7)	7 (24.1)	1 (20.0)	5 (22.7)	1 (50.0)
No recent anal sex	7 (43.8)	14 (48.3)	2 (40.0)	11 (50.0)	1 (50.0)

MSM, men who have sex with men; MSW, men who have sex with women; MSMW, men who have sex with men and women.

^aDifferences in α -HPVs and β -HPVs, and in β 1-HPVs and β 2-HPVs, by exposure were assessed with Fisher's exact test.^bAll *p*-values were >0.10, with the exception of age (*p* 0.06), which was different among men in whom we detected α -HPVs vs. β -HPVs.

were more commonly detected among previously unclassified specimens obtained from MSM and MSWM than were cutaneous HPV types. In fact, for this population, it has been reported that the HPV infection prevalence among MSM is four to ten times higher than that among MSW for HPVs discriminated by the Linear Array, whereas MSW and MSM had almost the same prevalence of unclassified HPV [12]. Although the small sample size may explain the lack of sufficient power to identify risk factors for β -HPV infection, we cannot exclude the possibility of other unmeasured factors being associated with anal β -HPV detection. For example, the questionnaire completed by HIM Study participants focused mostly on penetrative sexual practices, and did not ask questions about masturbation and non-penetrative sexual activities. It is plausible that direct digit/object contact may favour viral transmission of cutaneous HPV to the anal area. In fact, evidence of hand transmission to the anogenital region has been reported for α -HPVs [22], and α -HPV has been detected on the fingers of women infected in the cervix [23]. The possibility remains that the detection of β -HPVs in the anal canal may represent the deposition of virions shed from other body sites.

This study was designed to identify HPVs that were detected in the anal canal of men and grouped together as unclassified HPVs at baseline. Thus, potential limitations of this study include the exclusion of specimens for which an HPV type was assigned by Linear Array, although these specimens may also co-harbour β -HPVs and/or γ -HPVs. Co-detection of α -HPVs and β -HPVs was commonly observed in the oral cavity [7] and in penile condylomas [24].

We recently reported the broad distribution of β -HPVs and γ -HPVs in genital specimens of men from the HIM Study [11,25]. We also observed among these men that β -HPV DNA is prevalent in 61.1% of external genital lesions, and that most viral DNA is detected on the normal genital skin before external genital lesion development [26].

Although HPVs are widely detected throughout the human body, the role of cutaneous HPVs in the development of lesions and skin cancer has not been determined. Some studies indicate that skin infected with β -HPVs has increased susceptibility to UV radiation-induced DNA damage, which may precede skin cancer development. Currently, however, it is only accepted that HPV-5 and HPV-8 are associated with benign and malignant

lesions of the cutaneous disease epidermodysplasia verruciformis [27]. Additionally, the mere detection of HPV DNA by PCR in healthy skin does not necessarily correspond to active viral infection. It has been hypothesized that true infections should contain viral transcripts as an indication of viral activity. Interestingly, α -HPV and β -HPV DNAs were detected in the oral cavity, but only α -HPV transcripts were present in cancer specimens [28].

This study provides evidence that cutaneous HPV is a common finding in the anal canal in men. At present, it is not known whether β -HPVs influence lesion development in the anogenital region of men; determination of a possible role of β -HPVs and γ -HPVs as cofactors in the oncogenesis of anogenital cancer may be hampered by the ubiquity of these viral types on the skin surface. Larger studies with extended follow-up in MSM and MSW will contribute to this knowledge, and may help in the evaluation of strategies for prevention of anal cancer in men.

Transparency declaration

A. R. Giuliano receives research funding from Merck Sharp & Dohme Corp. L. L. Villa and A. R. Giuliano are consultants of Merck Sharp & Dohme Corp. for HPV vaccines. None of the other authors has conflicts of interest to report.

Ethical approval

Ethical approval was given by the University of South Florida (IRB# 102660), Ludwig Institute for Cancer Research, Centro de Referência e Treinamento em Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS, and Instituto Nacional de Salud Pública de México.

Acknowledgements

Financial support was provided by the Ludwig Institute for Cancer Research, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (grants 10/15282-3 to L. Sichero and 08/57889-1 to L. L. Villa), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (grant 573799/2008-3 to L. L. Villa). The infrastructure of the HIM Study cohort was supported through a grant from the National Cancer Institute, National Institutes of Health, to A. R. Giuliano (CA R01CA098803). The authors would like to thank the HIM Study teams in the USA (Moffitt Cancer Center, Tampa, FL: H. Y. Lin, C. Gage, K. Eyring, K. Kennedy, K. Isaacs, A. Bobanic, D.

J. Ingles, M. T. O'Keefe, M. R. Papenfuss, M. B. Schabath, and C. M. Pierce Campbell), Brazil (Centro de Referência e Treinamento em DST/AIDS, Fundação Faculdade de Medicina Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, and Ludwig Institute for Cancer Research, São Paulo: E. Gomes, E. Brito, F. Cernicchiaro, R. Cintra, R. Cunha, R. Matsuo, V. Souza, B. Fietzek, R. Hessel, V. Relvas, F. Silva, J. Antunes, G. Ribeiro, R. Bocalon, R. Otero, R. Terreri, S. Araujo, M. Ishibashi, and the CRT-DST/AIDS nursing team), and Mexico (Instituto Mexicano del Seguro Social and Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca: J. Salmerón, M. Quiterio Trenado, A. Cruz Valdez, R. Alvear Vásquez, O. Rojas Juárez, R. González Sosa, A. Salgado Morales, A. Rodríguez Galván, P. Román Rodríguez, A. Landa Vélez, M. Zepeda Mendoza, G. Díaz García, V. Chávez Abarca, J. Ruiz Sotelo, A. Gutiérrez Luna, M. Hernández Nevárez, G. Sánchez Martínez, A. Ortiz Rojas, and C. Barrera Flores).

References

- [1] Grulich AE, Poynten IM, Machalek DA, Jin F, Templeton DJ, Hillman RJ. The epidemiology of anal cancer. *Sex Health* 2012;9:504–8.
- [2] Alemany L, Saunier M, Alvarado-Cabrero I, Quirós B, Salmeron J, Shin HR, et al., on behalf of the HPV VVAP Study Group. Human papillomavirus DNA prevalence and type distribution in anal carcinomas worldwide. *Int J Cancer* 2015;136:98–107.
- [3] Giuliano AR, Lazcano-Ponce E, Villa LL, Flores R, Salmeron J, Lee JH, et al. The human papillomavirus infection in men study: human papillomavirus prevalence and type distribution among men residing in Brazil, Mexico, and the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17:2036–43.
- [4] de Villiers EM. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology* 2013;445:2–10.
- [5] Bzhalava D, Mühr LS, Lagheden C, Ekström J, Forslund O, Dillner J, et al. Deep sequencing extends the diversity of human papillomaviruses in human skin. *Sci Rep* 2014;4:5807.
- [6] Chouhy D, Bolatti EM, Pérez GR, Giri AA. Analysis of the genetic diversity and phylogenetic relationships of putative human papillomavirus types. *J Gen Virol* 2013;94:2480–8.
- [7] Bottalico D, Chen Z, Dunne A, Ostolozza J, McKinney S, Sun C, et al. The oral cavity contains abundant known and novel human papillomaviruses from the Betapapillomavirus and Gammapapillomavirus genera. *J Infect Dis* 2011;204:787–92.
- [8] Forslund O, Johansson H, Madsen KG, Kofoed K. The nasal mucosa contains a large spectrum of human papillomavirus types from the Betapapillomavirus and Gammapapillomavirus genera. *J Infect Dis* 2013;208:1335–41.
- [9] Mlakar B, Kocjan BJ, Hosnjak L, Komlos KF, Milosevic M, Poljak M. Betapapillomavirus in the anal canal of HIV positive and HIV negative men who have sex with men. *J Clin Virol* 2014;61:237–41.
- [10] Sagdeo A, Gormley RH, Abuabara K, Tyring SK, Rady P, Elder DE, et al. The diagnostic challenge of vulvar squamous cell carcinoma: clinical manifestations and unusual human papillomavirus types. *J Am Acad Dermatol* 2014;70:586–8.
- [11] Sichero L, Pierce Campbell CM, Ferreira S, Sobrinho JS, Luiza Baggio M, Galan L, et al. Broad HPV distribution in the genital region of men from the HPV infection in men (HIM) study. *Virology* 2013;443:214–7.

- [12] Nyitray AG, Carvalho da Silva RJ, Baggio ML, Lu B, Smith D, Abrahamsen M, et al. Age-specific prevalence of and risk factors for anal human papillomavirus (HPV) among men who have sex with women and men who have sex with men: the HPV in men (HIM) study. *J Infect Dis* 2011;203:49–57.
- [13] Giuliano AR, Lee JH, Fulp W, Villa LL, Lazcano E, Papenfuss MR, et al. Incidence and clearance of genital human papillomavirus infection in men (HIM): a cohort study. *Lancet* 2011;377:932–40.
- [14] Gravitt PE, Peyton CL, Apple RJ, Wheeler CM. Genotyping of 27 human papillomavirus types by using LI consensus PCR products by a single-hybridization, reverse line blot detection method. *J Clin Microbiol* 1998;36:3020–7.
- [15] de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 1995;76:1057–62.
- [16] Forslund O, Antonsson A, Nordin P, Stenquist B, Hansson BG. A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin. *J Gen Virol* 1999;80:2437–43.
- [17] Nyitray AG, Carvalho da Silva RJ, Baggio ML, Smith D, Abrahamsen M, Papenfuss M, et al. Six-month incidence, persistence, and factors associated with persistence of anal human papillomavirus in men: the HPV in men study. *J Infect Dis* 2011;204:1711–22.
- [18] Antonsson A, Forslund O, Ekberg H, Sterner G, Hansson BG. The ubiquity and impressive genomic diversity of human skin papillomaviruses suggest a commensal nature of these viruses. *J Virol* 2000;74:11636–41.
- [19] Astori G, Lavergne D, Benton C, Höckmayr B, Egawa K, Garbe C, et al. Human papillomaviruses are commonly found in normal skin of immunocompetent hosts. *J Invest Dermatol* 1998;110:752–5.
- [20] Nyitray AG, Smith D, Villa L, Lazcano-Ponce E, Abrahamsen M, Papenfuss M, et al. Prevalence of and risk factors for anal human papillomavirus infection in men who have sex with women: a cross-national study. *J Infect Dis* 2010;201:1498–508.
- [21] Nyitray A, Nielson CM, Harris RB, Flores R, Abrahamsen M, Dunne EF, et al. Prevalence of and risk factors for anal human papillomavirus infection in heterosexual men. *J Infect Dis* 2008;197:1676–84.
- [22] Sonnex C, Strauss S, Gray JJ. Detection of human papillomavirus DNA on the fingers of patients with genital warts. *Sex Transm Infect* 1999;75:317–9.
- [23] Partridge JM, Hughes JP, Feng Q, Winer RL, Weaver BA, Xi LF, et al. Genital human papillomavirus infection in men: incidence and risk factors in a cohort of university students. *J Infect Dis* 2007;196:1128–36.
- [24] Heideman DA, Waterboer T, Pawlita M, Delis-van Diemen P, Nindl I, Leijte JA, et al. Human papillomavirus-16 is the predominant type etiologically involved in penile squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2007;25:4550–6.
- [25] Sichero L, Pierce Campbell CM, Fulp W, Ferreira S, Sobrinho JS, Baggio ML, et al. High genital prevalence of cutaneous human papillomavirus DNA on male genital skin: the HPV Infection in Men Study. *BMC Inf Dis*. 2015 in press.
- [26] Pierce Campbell CM, Messina JL, Stoler MH, Jukic DM, Tommasino M, Gheit T, et al. Cutaneous human papillomavirus types detected on the surface of male external genital lesions: a case series within the HPV Infection in Men Study. *J Clin Virol* 2013;58:652–9.
- [27] Orth G. Genetics and susceptibility to human papillomaviruses: epidermodysplasia verruciformis, a disease model. *Bull Acad Natl Med* 2010;194:923–40.
- [28] Paolini F, Rizzo C, Sperduti I, Pichi B, Mafera B, Rahimi SS, et al. Both mucosal and cutaneous papillomaviruses are in the oral cavity but only alpha genus seems to be associated with cancer. *J Clin Virol* 2013;56:72–6.

Anexo D

Capítulo intitulado “Carcinogênese Biológica”, publicado com colaboração de Emily Montosa Nunes, no livro Fundamentos de Oncologia Molecular (ISSB: 9788538806844) no ano 2015.

Jimena Paola Hochmann Valls
Emily Montosa Nunes
Laura Sichero

INTRODUÇÃO

Em 2009, a Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (*International Agency for Research on Cancer*, IARC) reuniu cientistas de diversos países com a intenção de identificar agentes carcinogênicos biológicos, associá-los ao desenvolvimento de tumores nos diferentes sítios anatômicos humanos e compreender os mecanismos associados. A união destes conhecimentos originou a Monografia IARC Volume 100B, um manuscrito de extrema relevância na área de carcinógenos biológicos atualmente. Fazem parte desta compilação os vírus da hepatite B (HBV) e C (HCV), vírus Epstein-Barr (EBV), herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi (KSHV), vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1), alguns tipos de papilomavírus humano (HPV), vírus linfotrópico humano de células T (HTLV-1), a bactéria *Helicobacter pylori* e os helmintos *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis viverrini* e *Schistosoma haematobium*. Sabe-se que somente o HBV, HCV, HPV e *H. pylori* são responsáveis por 1,9 milhão de casos de câncer no mundo, principalmente os tumores hepático, cervical e gástrico, respectivamente.

As infecções crônicas devidas a agentes biológicos contribuem com aproximadamente 20% das causas de câncer mundialmente (12,7 milhões em 2,1 milhões dos casos de câncer). Essa fração pode variar até dez vezes, de acordo com a região, sendo maior em regiões em desenvolvimento (mais de 30% na África subsaariana) do que em desenvolvidas (menos de 6% na América do Norte, Austrália e Nova Zelândia). Portanto, torna-se de extrema importância a identificação, o rastreamento e tratamento destas patologias, a fim de possibilitar a prevenção e as terapias dos cânceres associados. Ao fim deste capítulo espera-se que o leitor compreenda: (i) como os agentes biológicos atuam como agentes de promoção tumoral; (ii) sítios anatômicos cujos tumores estão associados aos diferentes agentes infecciosos; (iii) mecanismos de carcinogênese empregados pelos organismos biológicos infectantes; e (iv) importância do estudo desses na prevenção dos cânceres a eles associados.

DESTAQUES

- Promoção tumoral advinda de carcinógenos biológicos.
- Agentes virais associados a câncer.
- Agentes não virais associados a câncer.

CARCINÓGENOS BIOLÓGICOS

Existem fortes evidências biológicas e epidemiológicas de que diversos agentes infecciosos estão associados etiologicamente ao desenvolvimento de vários tipos de cânceres, uma vez que são capazes de agir como promotores de tumores humanos (**Figura 4.1**). Até o momento, o trabalho de maior relevância já publicado foi a Monografia IARC volume 100 B (2012), que traz diversos estudos sobre os agentes infecciosos considerados “carcinógenos biológicos” que são categorizados, segundo a IARC, como parte do grupo 1 de agentes carcinógenos, isto é, fazem parte dos agentes classificados como carcinogênicos em humanos (**Tabela 4.1**). Perante a IARC, um carcinógeno pode ser: carcinogênico (grupo 1), provavelmente carcinogênico (grupo 2A), possivelmente carcinogênico (grupo 2B), não classificáveis (grupo 3), ou provavelmente não carcinogênico (grupo 4). Para que os agentes infecciosos fossem reconhecidos como carcinogênicos foi necessário que estes organismos preenchessem alguns critérios, como: taxa de incidência do organismo e tumor associado, não contemporaneidade entre a infecção pelo organismo patogênico e o desenvolvimento da neoplasia, distribuição geográfica da infecção, além do cumprimento dos postulados biológicos indispensáveis à associação.

Primeiramente, para que um agente etiológico seja relacionado ao desenvolvimento de um tumor, é necessário que a incidência da neoplasia seja maior em pessoas infectadas em comparação a indivíduos não infectados. Quanto à presença do marcador biológico, este deve ser anterior ao surgimento do tumor, uma vez que geralmente as infecções são crônicas. Ademais, é indispensável que a distribuição geográfica da infecção coincida com a da neoplasia primária.

FIGURA 4.1. Câncer e doenças infecciosas. Novos casos de câncer atribuídos a infecções em 2008, separados por regiões geográficas ou países.

Adaptado de Martel et al., 2014.

TABELA 4.1. Grupo 1: Carcinogênicos. Lista divulgada pela IARC dos agentes biológicos considerados carcinogênicos (grupo 1).

Agentes carcinogênicos – grupo 1	Cânceres no qual há evidências suficientes da associação	Outros sítios em que a evidência é limitada	Evidência de mecanismos de estabilidade
Vírus do Epstein-Barr (EBV)	Carcinoma nasofaríngeo, linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin, linfoma não Hodgkin relacionado a imunossupressão	Carcinoma gástrico, carcinoma linfóepitelioma	Proliferação celular, inibição de apoptose, instabilidade genômica, migração celular
Vírus da hepatite B (HBV)	Carcinoma hepatocelular	Colangiocarcinoma, linfoma não Hodgkin	Inflamação, cirrose hepática
Vírus da hepatite C (HCV)	Carcinoma hepatocelular e linfoma não Hodgkin	Colangiocarcinoma	Inflamação, cirrose hepática, fibrose hepática
Herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi (KSHV)	Sarcoma de Kaposi	Doença multicêntrica de Castleman	Proliferação celular, inibição de apoptose, instabilidade genômica, migração celular
Vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1)	Sarcoma de Kaposi, linfoma de Hodgkin, linfoma não Hodgkin, câncer cervical, anal e da conjuntiva	Câncer vulvar, vaginal, peniano, de pele não melanoma, hepatocelular	Imunossupressão (ação indireta)
Papilomavírus (HPV)	Carcinoma cervical, vulvar, vaginal, peniano, anal, de cavidade oral, orofaríngeo e de tonsila	Câncer de laringe	Imortalização, instabilidade genômica, inibição da resposta a danos no DNA, atividade antiapoptótica
Vírus linfotrópico humano de células T (HTLV-1)	Leucemia-linfoma de células T do adulto (LLcTA) e linfoma	-	Transformação e imortalização de células T
<i>Helicobacter pylori</i>	Carcinoma gástrico, linfoma gástrico MALT	-	Inflamação, estresse oxidativo, expressão gênica e alteração celular e da expressão gênica, metilação, mutação
<i>Clonorchis sinensis</i>	Colangiocarcinoma	-	-
<i>Opisthorchis viverrini</i>	Colangiocarcinoma	-	Inflamação, estresse oxidativo, proliferação celular
<i>Schistosoma haematobium</i>	Câncer de bexiga	-	Inflamação e estresse oxidativo.

Adaptado de Bouvard et al., 2009.

O cumprimento dos postulados biológicos também é de extrema importância nesta relação, uma vez que prova o papel do agente infeccioso no desenvolvimento do tumor. Portanto, a detecção do organismo ou seu material genético é causa necessária em todos os casos da doença, além da colocação do agente infeccioso junto à lesão tumoral. O isolamento do agente a partir das lesões, fazendo-o crescer em placa (via inoculação em cultura) e por fim reproduzi-lo, a partir da cultura, em animal de experimentação inoculado, finaliza o processo de teste da associação entre o agente biológico e o câncer. Entretanto, o maior obstáculo na busca de associação das infecções por organismos biológicos como promotores tumorais reside na complexidade das neoplasias humanas, uma vez que os tumores

FIGURA 4.2. História natural da infecção por HTLV-1 e o desenvolvimento do câncer. Após a transcrição reversa e integração no genoma hospedeiro, o HTLV-1 se propaga mediante expansão clonal das células infectadas. Após a infecção, este vírus transmite-se majoritariamente por contato entre células, promovendo a proliferação clonal das células infectadas. A expressão de TAX-1 é suprimida por linfócitos T citotóxicos in vivo.

sofrem influência multifatorial durante seu desenvolvimento, tornando a relação difícil de ser feita.

AGENTES CARCINÓGENOS VIRAIS

Dentre os agentes biológicos para os quais existem evidências funcionais e epidemiológicas suficientes de associação com o câncer (carcinógenos grupo 1) estão vírus RNA e de DNA de diferentes famílias. Os vírus de RNA associados a cânceres são: HTLV-1, HIV-1 e HCV. Entre os vírus de DNA estão os HBV, EBV, KSHV e alguns tipos de HPV.

Os vírus associados às neoplasias humanas não são agentes carcinogênicos eficientes, uma vez que apenas poucas pessoas infectadas desenvolvem os tumores associados. Desta forma, a infecção viral é apenas um dos elementos que compõem a promoção tumoral, sendo necessários vários fatores adicionais para o desenvolvimento do câncer, como a presença de outros carcinógenos (ex., fumo, radiação ultravioleta), além da ação de agentes que afetam a imunidade do hospedeiro ao vírus e às células tumorais, assim como o acúmulo de mutações celulares. Apesar disso, os vírus oncogênicos são bastante heterogêneos na complexidade do seu genoma, no tipo de neoplasia que geram e nos requerimentos de cofatores necessários para a tumorigênese. Seguem em detalhes as associações entre agentes infecciosos e câncer, cujas evidências acumuladas são suficientemente fortes para um estabelecimento do vínculo etiológico.

VÍRUS RNA

Vírus linfotrópico-1 de células T (HTLV-1)

A infecção pelo vírus HTLV-1 está associada ao desenvolvimento de leucemias e linfoma de linfócitos T. Estima-se que mais de 20 milhões de pessoas estão infectadas pelo HTLV-1 ao redor do mundo e a transmissão se dá principalmente por aleitamento materno, mas outras vias de transmissão incluem a sexual e a sanguínea. Este vírus apresenta-se com alta prevalência em regiões do sudoeste do Japão, sendo que nestas áreas também é possível observar a alta prevalência desses tumores associados. O HTLV-1 também é endêmico em outras regiões como a África Central, América do Sul e Central. Apenas 3-5% dos indivíduos afetados desenvolvem leucemias em um período de latência que varia entre 20-30 anos.

O HTLV-1 é um retrovírus que possui um genoma de RNA linear de fita simples que infecta linfócitos T CD4⁺. As células tumorais apresentam o genoma do vírus integrado no DNA do hospedeiro, estabelecendo assim uma infecção persistente. O risco de desenvolver leucemia-linfoma de células T do adulto (LLcTA) é de 2-4% entre os portadores do HTLV-1, sendo que o período de latência, desde a infecção primária até a LLcTA, é de aproximadamente 60 anos no Japão e 40 anos na Jamaica.

O processo de carcinogênese por este vírus é mediado por mecanismos diretos e indiretos. O mecanismo direto ocorre devido à ação dos produtos dos genes virais regulatórios *TAX* e *REX*, que se constituem de reguladores transcricionais e pós-transcricionais, respectivamente; *TAX* é uma fosfoproteína de 40 kDa que ativa a transcrição das ciclinas A, D2, E, além de genes envolvidos na apoptose. Ela interage com muitos fatores celulares que resultam na transativação de alguns genes e transrepressão de outros, modulando assim o ciclo celular e a apoptose. Foi observado que *TAX* apresenta capacidade transformante em fibroblastos *in vitro* em ensaios de *Soft Agar* e em estudos *in vivo* em camundongos.

A proteína *REX* regula a expressão gênica viral pós-transcricionalmente, aumentando tanto o nível de RNA sem *splicing* no núcleo quanto a exportação nuclear, expressão dos transcritos sem *splicing* de *gag/pol* e transcritos *env* com *splicing*, estabilizando assim a tradução das proteínas virais. O gene *HBZ* de HTLV-1 é transcrito a partir da fita complementar do genoma pró-viral. Recentemente foi observado que o transcrito desse gene é detectado em todas as células oriundas dos linfomas HTLV-1 positivos, uma vez que este gene é essencial no crescimento destas células. O ciclo de vida do vírus HTLV-1 é similar ao ciclo de outros retrovírus, mas uma característica típica destes consiste na transmissão por contato célula-célula. (**Figura 4.2**). Uma fração de pessoas desenvolve o câncer de células T após um longo período com leucemia, sendo que aproximadamente 60% dos casos não expressam *TAX*.

Quanto aos mecanismos indiretos que podem levar ao desenvolvimento da neoplasia, estes estão associados à imunodeficiência. A perturbação dos mecanismos de vigilância imunológica causada por este vírus deve ser vista como central na indução das neoplasias associadas. Anticorpos contra proteínas virais estão presentes em indivíduos infectados, entretanto ainda não se sabe sobre a influência destes sobre a patogênese associada a essas infecções.

FIGURA 4.2. História natural da infecção por HTLV-1 e o desenvolvimento do câncer.

Após a transcrição reversa e integração no genoma hospedeiro, o HTLV-1 se propaga mediante expansão clonal das células infectadas. Após a infecção, este vírus transmite-se majoritariamente por contato entre células, promovendo a proliferação clonal das células infectadas. A expressão de *TAX*-1 é suprimida por linfócitos T citotóxicos *in vivo*.

Adaptado de IARC, 2012.

Vírus da Imunodeficiência Humana-1 (HIV-1)

Este pequeno vírus de RNA fita simples linear envelopado pertence à família dos *Retroviridae*. Sua célula-alvo é o linfócito T CD4⁺. Este vírus associa-se etiologicamente não apenas à síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), como também ao sarcoma de Kaposi, ao linfoma não Hodgkin e carcinomas cervical e anal.

A cada ano são registradas aproximadamente cinco milhões de novas infecções por HIV-1 e três milhões de mortes por AIDS ao redor do mundo. Estima-se que mais de 42 milhões de pessoas no mundo estão infectadas com o vírus HIV-1.

O HIV-1 é transmitido através de sêmen, placenta, leite materno e sangue. O tempo que demora entre a infecção aguda e o desenvolvimento da AIDS varia de 6 meses até 25 anos, definido pelo baixo número de células T CD4⁺. Embora o genoma viral se encontre integrado ao genoma celular, esse vírus não causa transformação maligna diretamente, já que não possui oncogenes. Entretanto, pela interação direta entre o envelope viral e o receptor celular T CD4⁺, aliado também ao correceptor de quimiocina CCR5 ou CXCR4-, o HIV-1 infecta e leva à morte de células críticas para a resposta imune efetiva.

Assim, o dano causado ao sistema imune resulta em um aumento da suscetibilidade às infecções bacterianas, como também às advindas de outros vírus que podem resultar no aparecimento de linfomas, carcinomas, melanomas, carcinomas cutâneos e mucosos. Entre as neoplasias causadas por infecção com vírus oportunistas estão: sarcoma de Kaposi, causado pelo herpesvírus 8 (HHV-8); linfomas não Hodgkin, causados por EBV; carcinoma cervical e anal, originado após infecção com alguns tipos de HPV.

Foi também sugerido o envolvimento direto do HIV-1 no desenvolvimento do sarcoma de Kaposi devido à promoção da proliferação celular pela proteína viral TAT. Persiste, portanto, o conceito de que o defeito na resposta imune celular é essencial para a proteção contra uma variedade de patógenos responsáveis pela morbidade e mortalidade por neoplasias nos indivíduos infectados. Durante a replicação viral ocorre uma alta taxa de mutações e isto gera uma grande variabilidade no genoma do vírus, sendo este um aspecto fundamental, no que consiste à resistência a terapia utilizando-se drogas antivirais.

Vírus da Hepatite C (HCV)

O HCV é um vírus de RNA fita simples linear de polaridade positiva, envelopado, que pertence à família dos *Flaviviridae*. O vírus está localizado principalmente no fígado, órgão pelo qual possui tropismo. A associação entre a infecção pelo vírus da hepatite C e o desenvolvimento do carcinoma hepático foi recentemente descrita. A infecção por este vírus causa uma inflamação de fígado mais severa que a causada pelo vírus HBV, sendo que 80% dos portadores deste vírus desenvolvem cirrose crônica e carcinoma hepático. Estima-

se que 2,2% da população mundial estão infectados com este vírus, sendo as taxas de incidência maiores em algumas áreas da Itália, Japão (> 10%) e Egito (15-20%). Mais recentemente observaram-se altas taxas de prevalência da infecção também no Paquistão.

O HCV pode ser transmitido por transfusão de sangue, transplantes de órgãos e por agulhas contaminadas. Pacientes infectados em geral são assintomáticos e somente cerca de 15-27% dos pacientes infectados cronicamente com o vírus desenvolvem cirrose. O tempo para desenvolver doenças do fígado é variável, além de também estar relacionado com cofatores como o álcool e coinfeção por HIV e/ou HBV.

Existem limitadas evidências de que o vírus HCV seja oncogênico. Embora o genoma viral seja detectado no tecido tumoral e nos fluidos corpóreos dos indivíduos soropositivos, a possibilidade do mecanismo de transformação ser por meio de mutagênese insercional foi descartada. Isso porque estes vírus não dependem da integração ao genoma do hospedeiro para se replicar. Ademais, estes vírus não possuem oncogenes virais, embora recentemente foi sugerido um papel da proteína de *core* viral no processo tumorigênico: observou-se que camundongos transgênicos para o gene da proteína de *core*, ou que superexpressam essa proteína desenvolvem carcinoma hepatocelular. Adicionalmente, embora o HCV não codifique nenhum oncogene, tem sido observado que a proteína viral NS3, que tem atividade de helicase e serina protease, liga-se à supressora tumoral p53, além de ser capaz de transformar fibroblastos NIH3T3. O HCV também expressa a fosfoproteína NS5A que, ao interagir com a proteína celular p21, demonstra-se como uma reguladora negativa da expressão de p21 e desencadeia a proliferação celular.

O dano hepático crônico, acoplado à inflamação, são fatores fundamentais para o desenvolvimento de lesões. A severidade e a taxa de progressão da inflamação do fígado são variáveis entre os pacientes infectados com HCV.

VÍRUS DNA

Vírus da hepatite B (HBV)

O vírus da hepatite B é um vírus de DNA fita dupla circular envelopado que pertence à família *Hepadnaviridae*. Este se replica pela ação de uma transcriptase reversa para infectar hepatócitos (vírus hepatotrópico). Este vírus expressa três proteínas de superfície (*Small Hepatitis B surface protein*, SHB, *Medium Hepatitis B surface protein*, MHB e *Large Hepatitis B surface protein*, LHB).

A infecção por HBV é uma das mais prevalentes mundialmente, estima-se que mais de dois bilhões de pessoas estão infectadas, sendo detectadas a cada ano mais de cinco milhões de novas infecções, principalmente em recém-nascidos, devido à transmissão vertical. Um milhão de pessoas morrem a cada ano por doenças crônicas do fígado associadas à HBV tais como cirrose e carcinoma hepatocelular

(HCC). O carcinoma hepatocelular é um dos cânceres mais comuns no mundo e a infecção por HBV é responsável por 50-90% dos casos de HCC em áreas consideradas de alto risco. A maior parte das infecções é assintomática ou com sintomas moderados, principalmente em crianças. Entretanto, nas infecções que ocorrem durante a infância há maior probabilidade de persistência viral. Ainda assim, uma minoria das pessoas infectadas por HBV desenvolvem a neoplasia, o que ressalta a importância de outros cofatores como consumo de álcool ou tabaco. O HBV é transmitido por sêmen e sangue de pessoas infectadas. Durante a infecção aguda e crônica são produzidas grandes quantidades de partículas compostas apenas pelo envelope viral (HBsAg), que são liberadas na circulação sanguínea e facilmente detectáveis, sendo importantes para o diagnóstico da infecção.

O desenvolvimento do carcinoma hepático após a infecção com HBV envolve uma combinação de mecanismos. A integração do genoma viral ao genoma celular é frequentemente observada em infecções crônicas e no câncer, o que indica que a ação transformante de HBV ocorre ao menos em parte por mutagênese insercional. Esta resulta na desregulação do gene *c-MYC* e na inativação de genes supressores de tumores. Além disso, há muito tempo discute-se como mecanismo direto de oncogênese o potencial carcinogênico do produto do gene *HBX* viral. A proteína codificada por este gene é o único produto viral que está consistentemente presente nas células tumorais, sendo essencial no estabelecimento da infecção produtiva. A proteína HBX vem sendo associada também à ativação de vias de sinalização que promovem a expressão de genes celulares associados à proliferação e ao sistema de reparo do DNA. Outro papel dessa proteína é ativar promotores de genes que apresentam sequências específicas para fatores celulares como, por exemplo, NF-KB, ATF/CREB, N-FAT, AP-1, c/EBP e p53. Dessa maneira são favorecidas a propagação de mutações e a estabilização do fenótipo maligno. Além disso, o desenvolvimento da doença hepática associa-se à resposta imune provocada pelo vírus na indução de linfócitos T citotóxicos que atacam os hepatócitos infectados. Esse dano hepático crônico pode levar à cirrose e ao carcinoma.

O câncer hepático por hepatite B pode ser prevenido por imunização com vacinas. À medida que a cobertura vacinal se amplia, a expectativa é de redução significativa dos tumores hepáticos causados por este vírus.

Papilomavírus Humano (HPV)

O papilomavírus humano (HPV) pertence à família dos *Papillomaviridae*, que possui 16 gêneros. Destes, o gênero alfa contém vírus que se associam ao desenvolvimento dos tumores de mucosas. Eles são vírus de DNA fita dupla circular (7.000-8.000 pb) pequenos e não envelopados que existem em uma forma cromatinizada.

O genoma do HPV está dividido em três regiões: região controladora da expressão gênica e replicação (*long control region*,

LCR); região precoce (*early*, E), que codifica proteínas requeridas na expressão viral e replicação; e a região tardia (*late*, L), que codifica proteínas do capsídeo viral (**Figura 4.3A**). As designações E e L referem-se à fase do ciclo viral quando essas proteínas são expressas.

O vírus transmite-se primordialmente por contato sexual e aproximadamente 30% da população sexualmente ativa se encontram infectados. Apesar da alta prevalência do vírus, a maior parte das infecções não leva ao desenvolvimento de lesões visíveis.

De fato, a maioria das infecções é eliminada pelo próprio sistema imune em tempos variáveis. Uma infecção persistente por alguns tipos de alto risco é considerada o principal fator de risco para o desenvolvimento de lesões precursoras do carcinoma de colo de útero. Estudos da história natural das infecções por HPV revelam que o tempo entre a infecção primária por determinados tipos de HPV e o desenvolvimento de neoplasias intraepiteliais cervicais, carcinoma *in situ* e câncer invasivo é relativamente longo. As neoplasias cervicais têm um pico de incidência de 25-30 anos, enquanto a incidência do câncer cervical tem um pico de 45-55 anos. A progressão das lesões precursoras de câncer cervical depende de alguns fatores como múltiplos parceiros sexuais, a idade precoce da primeira relação sexual, fumo e uso de anticoncepcionais orais.

O hospedeiro do vírus HPV é o humano, infectando o epitélio estratificado, tanto os sítios mucosos (mucosotrópico) como os cutâneos (epiteliotrópico) (**Figura 4.3B**). Os vírus mucosotrópicos podem ser divididos em HPV de alto e baixo risco, de acordo com seu potencial oncogênico. Até o momento existem descritos 199 tipos de HPV, dos quais cerca de 40 infectam o trato anogenital. A denominação alto risco identifica tipos denominados oncogênico, já que epidemiologicamente estão associados ao desenvolvimento de neoplasias malignas.

A IARC classifica como carcinogênicos os tipos de HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 66. O HPV-16 encontra-se em 50% de todos os cânceres de colo de útero, enquanto a detecção do HPV 18 dá-se em 10-20% dos cânceres cervicais.

Os HPV expressam duas proteínas codificadas pelos genes precoces E6 e E7, que consistem de oncoproteínas próprias do vírus, sem homólogos celulares. Elas associam-se com proteínas celulares que estão envolvidas na progressão do ciclo celular. A oncoproteína E6 liga-se à proteína celular supressora de tumor p53 e E7 associa-se com pRb, levando estas à degradação e consequentemente favorecendo a proliferação celular desregulada, alterando o processo de diferenciação celular dos queratinócitos infectados, sendo que estas oncoproteínas cooperam para a imortalização destas células cultivadas *in vitro*. Esses genes são os únicos no genoma do HPV que são expressos constitutivamente nas linhagens celulares derivadas de carcinoma de colo de útero. Mais recentemente, foram descritas outras interações de E6 de HPV-16 com proteínas celulares: E6-AP, E6-BP, E6TP1, paxilina, sendo que estas estão envolvidas na transdução de sinais, apoptose e regulação da transcrição. Assim como E6, a proteína

FIGURA 4.4. Interação putativa *in vivo* entre EBV e as células hospedeiras. Ao contato do vírus com a saliva, ele entra no epitélio tonsilar situado na orofaringe, onde ocorre infecção latente, na qual

FIGURA 4.3. Esquema do ciclo de vida do HPV. A fase de entrada da infecção ocorre na superfície da célula, onde o vírus penetra e libera o DNA viral. O DNA viral se replica no núcleo da célula, onde ocorre a transcrição dos genes virais. O DNA viral se replica no núcleo da célula, onde ocorre a transcrição dos genes virais.

FIGURA 4.3. Esquema do ciclo de vida do HPV. A fase de entrada da infecção ocorre na superfície da célula, onde o vírus penetra e libera o DNA viral. O DNA viral se replica no núcleo da célula, onde ocorre a transcrição dos genes virais. O DNA viral se replica no núcleo da célula, onde ocorre a transcrição dos genes virais.

FIGURA 4.3. Esquema do ciclo de vida do HPV. A fase de entrada da infecção ocorre na superfície da célula, onde o vírus penetra e libera o DNA viral. O DNA viral se replica no núcleo da célula, onde ocorre a transcrição dos genes virais. O DNA viral se replica no núcleo da célula, onde ocorre a transcrição dos genes virais.

FIGURA 4.3. Esquema do ciclo de vida do HPV. A fase de entrada da infecção ocorre na superfície da célula, onde o vírus penetra e libera o DNA viral. O DNA viral se replica no núcleo da célula, onde ocorre a transcrição dos genes virais. O DNA viral se replica no núcleo da célula, onde ocorre a transcrição dos genes virais.

FIGURA 4.3. Esquema do ciclo de vida do HPV. A fase de entrada da infecção ocorre na superfície da célula, onde o vírus penetra e libera o DNA viral. O DNA viral se replica no núcleo da célula, onde ocorre a transcrição dos genes virais. O DNA viral se replica no núcleo da célula, onde ocorre a transcrição dos genes virais.

FIGURA 4.3. Esquema do ciclo de vida do HPV. A fase de entrada da infecção ocorre na superfície da célula, onde o vírus penetra e libera o DNA viral. O DNA viral se replica no núcleo da célula, onde ocorre a transcrição dos genes virais. O DNA viral se replica no núcleo da célula, onde ocorre a transcrição dos genes virais.

FIGURA 4.3. Esquema do ciclo de vida do HPV. A fase de entrada da infecção ocorre na superfície da célula, onde o vírus penetra e libera o DNA viral. O DNA viral se replica no núcleo da célula, onde ocorre a transcrição dos genes virais. O DNA viral se replica no núcleo da célula, onde ocorre a transcrição dos genes virais.

FIGURA 4.3. Esquema do ciclo de vida do HPV. A fase de entrada da infecção ocorre na superfície da célula, onde o vírus penetra e libera o DNA viral. O DNA viral se replica no núcleo da célula, onde ocorre a transcrição dos genes virais. O DNA viral se replica no núcleo da célula, onde ocorre a transcrição dos genes virais.

FIGURA 4.3. Esquema do genoma do HPV e o ciclo natural da infecção.

A. Em E estão representados os genes precoces, e em L os genes tardios. URR corresponde à região não traduzida do vírus. **B.** O ciclo de vida produtivo dos HPV está diretamente relacionado à diferenciação celular epitelial. Acredita-se que a infecção do papilomavírus ocorre através de microtraumas ocorridos no epitélio, expondo as células basais à entrada do vírus. À esquerda está apresentado um diagrama da pele e observa-se o perfil da expressão gênica do HPV-16 durante o processo de diferenciação até a superfície celular. O vírus entra na célula por microlesões nos queratinócitos da camada basal, onde o genoma do HPV se estabelece como epissomo, com cerca de 50 cópias por célula. As proteínas precoces são expressas em baixos níveis para manutenção do genoma e proliferação celular. O vírus inicia uma etapa de replicação vegetativa nas camadas suprabasais, onde começa a diferenciação celular, e o empacotamento e liberação dos vírions ocorre nas camadas mais superficiais do epitélio. Durante esta etapa de diferenciação da célula basal, o promotor p97 regula a expressão das oncoproteínas E6 e E7 necessárias para a entrada na fase S do ciclo celular. Por outro lado, o promotor P670 está ativado nas camadas suprabasais, e regula a expressão das proteínas envolvidas na replicação viral, aumentando assim sua abundância, e facilita a amplificação do genoma viral. Nas camadas mais suprabasais os papilomavírus codificam duas proteínas estruturais L1 e L2, que são as responsáveis pelo empacotamento do DNA em novos vírions.

E7 também interage com outras proteínas reguladoras da proliferação celular, tais como p107, p130, HDAC (histona desacetilases), AP-1, além de ciclinas.

Adaptado de Muñoz et al., 2006.

Adaptado de Doorbar, 2005.

Atualmente existem vacinas profiláticas disponíveis em muitos países contra os tipos mais prevalentes de HPV, tanto os associados ao desenvolvimento de câncer, HPV-16 e 18, quanto os causadores de verrugas genitais e papilomatose respiratória recorrente, HPV-6 e 11. Os estudos têm demonstrado alta eficiência para a prevenção de infecções persistentes e das lesões de colo de útero, vulva, vagina, pênis, e ânus associados aos tipos de HPV incluídos nas vacinas. Além disso, estas vacinas podem ser consideradas seguras, já que são toleradas por pessoas de qualquer idade e gênero. A rápida incorporação destas vacinas na sociedade vem de encontro à necessidade de adotar medidas preventivas mais eficazes contra tumores que afetam centenas de indivíduos a cada ano em todo o mundo.

Vírus Epstein-Barr (EBV)

O vírus Epstein-Barr foi o primeiro vírus associado a tumor identificado, em 1964, em uma linhagem celular derivada de linfoma de Burkitt. O Epstein-Barr é um herpesvírus e encontram-se dois tipos virais nos humanos: EBV-1 e EBV-2A, sendo que estes diferem na sequência dos genes que codificam os antígenos nucleares (EBNA-2, EBNA-3A/3, EBNA-3B/4 e EBNA-3C/6). O EBV-2 immortaliza células B *in vitro* menos eficientemente que o EBV-1. A diferença na eficiência de immortalização dos tipos de EBV deve-se à divergência nas sequências do EBNA-2. O genoma do vírus EBV constitui-se de uma molécula de DNA dupla fita linear que não se integra ao genoma do hospedeiro. O efeito oncogênico deve-se à expressão de poucos dos 90 genes presentes em seu genoma. Dentre estes, apenas alguns são importantes para a infecção e estão associados à immortalização celular. Entre eles está o gene que codifica a proteína de membrana LMP-1, a qual possui função semelhante a um receptor de superfície celular. Essa proteína induz a expressão de BCL-2, uma proteína que antagoniza a morte celular por apoptose. Ademais, a proteína viral LMP-1 interage com várias proteínas da via de sinalização de TNFR mediante o domínio C-terminal, estas interações resultam na ativação de genes dependentes de NF- κ B. Uma anormalidade genética frequentemente detectada em células tumorais infectadas por EBV consiste de um rearranjo cromossômico em que o gene celular *c-MYC* posiciona-se próximo a uma região promotora de um gene de imunoglobulina, resultando na superexpressão de *c-MYC*.

O EBV é transmitido por saliva e fluido do trato aéreo respiratório. A infecção primária por EBV resulta em forte resposta imune da célula que controla a infecção, portanto novas células infectadas com os vírus agem como se já tivessem eliminado o vírus através de respostas específicas das células T, e assim os vírus podem persistir por toda a vida do hospedeiro dentro das células B de memória, nas quais as proteínas virais não são expressas (**Figura 4.4**).

FIGURA 4.4. Interação putativa *in vivo* entre EBV e as células hospedeiras. Ao contato do vírus com a saliva, ele entra no epitélio tonsilar situado na orofaringe, onde ocorre infecção lítica, na qual ocorre a amplificação do genoma viral. Em seguida, este vírus infecta as células B naive em tecidos adjacentes, e converte-as em linfoblastos ativos, usando a maquinaria de transcrição celular de proliferação (latência III). Três proteínas virais da via de proliferação são EBNA-3A, EBNA-3B, e EBNA-3C, que possuem como função regular negativamente o crescimento celular. Isso permite que a célula migre ao linfonodo para iniciar uma reação no centro germinal e estabelecer uma via de transcrição com falhas (latência II). Esta via com falhas envia sinais de sobrevivência para permitir que a célula saia do centro germinal como célula B de memória. Logo, a maquinaria de transcrição de latência (latência 0), onde a expressão de todas as proteínas virais é diminuída, inicia suas funções no restante das células B de memória. Estas células são mantidas por homeostase como células B de memória normais. Quando estas se dividem, ocasionalmente ativam a via EBNA-1 (latência I). As células B de memória eventualmente voltam para as tonsilas, onde sofrem diferenciação celular no plasma e iniciam a replicação viral. O vírus resultante é novamente liberado na saliva.

Adaptado de Bollard et al., 2012.

Vírus do Sarcoma de Kaposi (KSHV)

O herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi (KSHV) é considerado um herpesvírus de células tumorais, e foi isolado pela primeira vez em 1994. Ele apresenta um genoma de DNA dupla fita linear, e seu genoma é parecido com o dos herpesvírus, com uma única região onde estão os genes virais. KSHV é prevalente na África Central, em vários países do sul da Europa e América. Este vírus é mais frequentemente observado em homens que fazem sexo com homens.

Esse vírus, assim como os herpesvírus, pode estabelecer infecções latentes ao longo da vida do hospedeiro humano. As células infectadas possuem um reservatório onde a progênie viral pode amplificar para disseminar-se dentro do hospedeiro. Ele se transmite via saliva e, em países onde a sua prevalência é alta, a infecção ocorre durante a infância e aumenta com a idade. O KSHV é classificado pela IARC como provavelmente carcinogênico (grupo 2A), porque a evidência ainda é limitada quanto a sua associação direta com o desenvolvimento de câncer. Entretanto há vários estudos que mostram uma associação entre a infecção por KSHV e o desenvolvimento do sarcoma de Kaposi, com riscos relativos de até dez vezes. O vírus expressa cinco proteínas que possuem propriedades transformantes, pois afetam a regulação do ciclo celular e a sobrevivência das células tumorais *in vivo* e *in vitro*. Devido ao fato de que somente algumas destas proteínas são expressas durante a latência viral, a maioria das células tumorais não somente necessita de transformações diretas, mas também de efeitos indiretos na oncogênese mediada por KSHV, por isso se diz que o mecanismo de oncogênese mediado por este vírus ainda não está bem elucidado.

AGENTES CARCINÓGENOS NÃO VIRAIS

De acordo com a monografia da IARC, a bactéria *H. pylori* e os helmintos *O. viverrini*, *C. sinensis* e *S. haematobium* também são considerados agentes carcinogênicos biológicos. Acredita-se que a infecção crônica gerada por estes organismos é causa principal para o desenvolvimento, respectivamente, de câncer gástrico e linfoma gástrico MALT (*mucosa-associated lymphoid tissue*), com 780 mil casos incidentes por ano mundialmente (90% de associação), colangiocarcinoma (câncer das vias biliares) com cerca de dois mil casos em áreas endêmicas anualmente (sudeste da Ásia); e câncer de bexiga, com aproximadamente seis mil casos por ano em áreas endêmicas (África subsaariana, Sudão, Egito e Iêmen).

Helicobacter pylori

A *H. pylori* é uma bactéria altamente heterogênea, com uma grande diversidade genômica. Apesar disso, uma análise detalhada de seus genes mostra que as diversas cepas de *H. pylori* têm potencial essencialmente metabólico, possuindo como células-alvo as secretoras de muco gástrico, nas quais se fixam próximo a junções intercelulares. Ainda assim, os seres humanos costumam abrigar diversas cepas,

sendo que estas podem se modificar genotípica e fenotipicamente durante a colonização em um único hospedeiro.

A bactéria *H. pylori* é gram-negativa, flagelada e espiralada e coloniza o trato gastrointestinal de aproximadamente 50% da população mundial. A infecção por esse patógeno ocorre geralmente na primeira infância e pode permanecer durante toda a vida se não tratada no curso de 2 semanas. Sua prevalência no hospedeiro varia com a idade, o nível socioeconômico, geografia e raça, sendo que estudos sorológicos demonstram que a prevalência da infecção por este patógeno aumenta com a idade, além de ser maior em países em desenvolvimento devido ao baixo grau de escolaridade, renda familiar, saneamento básico e condições de higiene. Entretanto, em todos os indivíduos infectados ocorre um processo inflamatório cuja evolução é extremamente variável.

A maior parte dos indivíduos infectados não apresenta sintomas; no entanto, há uma porcentagem de afetados que desenvolve gastrite sintomática, úlceras gástricas e duodenais, adenocarcinoma gástrico e linfoma gástrico MALT, sendo que também há registros da associação com câncer de esôfago, carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma, colorretal, pâncreas, pulmão, cabeça e pescoço e leucemia, em especial linfoma não Hodgkin. Desde 1994 o *H. pylori* é classificado como carcinógeno biológico pela IARC, devido a sua forte associação com o desenvolvimento de câncer gástrico, um dos mais prevalentes no mundo. Foi detectado, via estudos de caso-controle, que 70-90% dos casos de câncer gástrico possuem *H. pylori* associado, provando assim seu papel como carcinógeno biológico. Entretanto, é importante ressaltar que, assim como todo agente carcinógeno, a progressão da infecção crônica à lesão cancerosa é lenta, podendo demorar de 4-6 décadas para que se observem as primeiras alterações histológicas neoplásicas.

Segundo a última edição GLOBOCAN (2012) realizada pela IARC, o câncer gástrico é o quinto mais incidente no mundo, terceiro entre homens e o quinto em mulheres, sendo cerca de duas vezes mais incidente no gênero masculino. Aproximadamente 71% dos casos de câncer gástrico ocorrem em países em desenvolvimento, sendo que a maior taxa se dá na Ásia, América Latina e no Caribe. A incidência em países desenvolvidos está diminuindo, mas mundialmente as taxas aumentam e a última estimativa mundial apontou a ocorrência de aproximadamente um milhão de casos novos em 2012. Já no Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) espera 12,8 mil casos de câncer gástrico em homens, na quarta posição, e 7,5 mil em mulheres, em quinto lugar, para o ano de 2014¹. Ensaio terapêuticos visando à eliminação do patógeno apresentaram quadros de remissão de linfomas de baixo grau. Ainda assim, estima-se que 9% de todas as mortes pelo câncer gástrico sejam devidas às inflamações crônicas do estômago. Tais dados mostram a importância de se tratar desde o princípio as infecções advindas deste patógeno.

O *H. pylori* possui uma gama de características que possibilitam sua sobrevivência na camada mucosa do epitélio gástrico. Essas bactérias possuem a capacidade de aderir às células epiteliais mucosas e evadir a resposta imunológica, gerando uma colonização per-

FIGURA 4.3. Distribuição dos parasitas *C. sinensis* e *Q. viverrini* no sudeste da Ásia. A diferença entre as cores indica desde regiões sem dados de transmissão até regiões altamente endêmicas.

¹ Taxas brutas de incidência por 100 habitantes.

sistente devido à interação entre uma grande família de proteínas da membrana externa bacteriana e as células hospedeiras. A infecção do trato gastrointestinal ocorre por meio da ingestão desta bactéria, uma vez que esta pode estar presente, em sua forma transiente, na boca, quando regurgitada, e nas fezes. Acredita-se que a transmissão possa ocorrer de forma oral-oral, gastro-oral e fecal-oral, além da possível infecção pela via alimentar. O contato estrito dentro do núcleo familiar (entre mãe e filhos, pais e filhos, irmãos, cônjuges) também tem se mostrado como fator de risco, sendo que quanto maior a densidade familiar, ou também um grande aglomerado de crianças em um agregado familiar, maior é o risco. Após sua ingestão, esse patógeno sobrevive à acidez gástrica devido à produção de urease, que hidrolisa a ureia em dióxido de carbono e amônia, permitindo que a bactéria sobreviva nesse meio. Enquanto seus lipopolissacarídeos desempenham papel importante na interação bactéria-hospedeiro, a presença de flagelos possibilita sua orientação e motilidade pelo muco, permitindo seu deslocamento até a superfície das células epiteliais.

Apesar dessas nítidas interações, a evasão imunológica ocorre. Ao mesmo tempo em que os lipopolissacarídeos (LPS) são potenciais estimuladores do sistema imune, estes têm baixa atividade por parte do *H. pylori*. A síntese desses dá-se por mais de 20 genes espalhados pelo genoma bacteriano, o que dificulta sua identificação pelo organismo infectado. Contrário a mecanismos de evasão, tem-se como aliada às defesas do organismo a neutrofilia intensa associada à resposta inflamatória mononuclear que sempre acompanha a infecção por este patógeno.

A maioria das cepas de *H. pylori* expressa a citotoxina vacuolizante VacA. Essa citotoxina tem a capacidade de atingir a membrana mitocondrial das células, formando poros e provocando a liberação do citocromo C, induzindo assim a apoptose. Além disso, a proteína VacA pode interagir com proteínas do citoesqueleto e aumentar a permeabilidade entre as células epiteliais, o que gera vacúolos intracelulares, suprimindo o sistema imune do hospedeiro.

Diversas cepas do *H. pylori* possuem uma região genômica composta por 31 genes denominada “ilha de patogenicidade cag” (cag-PAI). Esses genes formam um aparato de secreção que insere a proteína CagA dentro da célula do hospedeiro. Depois de entrar nas células, a proteína CagA é fosforilada e interfere com uma série de vias de transdução de sinal celulares, alterando o fenótipo, a proliferação e o processo de apoptose. As células epiteliais e o infiltrado inflamatório produzem citocinas em resposta à expressão da CagA, gerando a inflamação gástrica. Estudos epidemiológicos indicam que a positividade para a proteína bacteriana CagA (**CagA-positivo**) confere maior risco de desenvolvimento de câncer gástrico.

A resposta do hospedeiro é iniciada após a adesão do patógeno às células epiteliais gástricas. As alterações que ocorrem nessas células dependem das funções desempenhadas pelas proteínas codificantes via cag-PAI, VacA, entre outras. A principal quimiocina inflamatória produzida pelas células epiteliais, em resposta à proteína CagA, é a interleucina 8 (IL-8), cuja expressão leva à ativação de neutrófilos e macrófagos que liberam espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO). Essas espécies não apenas agridem o patógeno como podem

Como já dito, mais de uma cepa pode coexistir no organismo, portanto é possível que um indivíduo seja **CagA-positivo** e negativo ao mesmo tempo.

provocar danos oxidativos ao DNA, causando instabilidade genética. Além disso, sugere-se que o *H. pylori* seja capaz de limitar a produção de NO bactericida, o que lhe possibilita a sobrevivência em condições de estresse oxidativo. Dessa maneira, as características de virulência da bactéria e a resposta do hospedeiro podem determinar a transformação celular e o desenvolvimento da neoplasia.

Perante o exposto, a detecção e o rastreamento desse patógeno são de extrema importância à saúde pública. Para isto, faz-se uso da sorologia via ensaio imunoenzimático (ELISA) para imunoglobulina G (IgG) anti-*H. pylori*. A sorologia para anticorpos CagA é a mais sensível em pessoas infectadas por cepas positivas a esta proteína, entretanto a IgG anti-*H. pylori* é a mais utilizada em triagem. Outros testes diagnósticos estão disponíveis, entretanto são menos utilizados.

Opisthorchis viverrini e *Clonorchis sinensis*

Os platelmintos *O. viverrini* e *C. sinensis* são helmintos muito próximos dentro da classe Trematoda e pertencem à mesma família (*Opisthorchiidae*). Devido a essa familiaridade, a fisiopatologia, as manifestações clínicas e a infecção gerada são muito semelhantes. Ambos parasitas hepáticos são endêmicos no Nordeste da Tailândia e em diversas áreas do Sudeste da Ásia, como na China, Coreia do Sul, Coreia do Norte, Vietnã, Laos, República Democrática do Congo, Camboja, e com registros também em Cingapura, Malásia e parte da Rússia. A infecção por esses é considerada um importante problema de saúde pública nessas regiões, além da preocupação com a infecção de turistas e a exportação de peixes contaminados. A taxa de infecção mundial é atualmente próxima a 45 milhões, sendo 35 milhões de infectados com *C. sinensis* e 10 milhões com *O. viverrini* (Figura 4.5). Os parasitas adultos hermafroditas são encontrados geralmente nos

Adaptado de IARC, 2012.

FIGURA 4.5. Distribuição dos parasitas *C. sinensis* e *O. viverrini* no sudeste da Ásia. A diferença entre as cores indica desde regiões sem dados de transmissão até regiões altamente endêmicas.

FIGURA 4.6. Ciclo de vida dos parasitas *C. sinensis* e *O. viverrini*. Os hospedeiros intermediários primários são os caracóis de água doce (pertencentes às famílias Hydrobiidae, Bithyniidae e Malaniidae) que ingerem ovos excretados via fezes pelo hospedeiro final, e favorecem ao helminto um ambiente para que haja, por meio de reprodução assexuada, liberação diária de milhares de cercárias após 1 a 2 meses da infecção. Estas formas nadantes livres penetram o tecido de peixes (pele e músculos), fazendo-os atuar como hospedeiros intermediários, encistando estes para que se tornem metacercárias: formas infecciosas após 21 dias da infecção. Os peixes hospedeiros destes parasitas englobam a mais de 130 espécies de peixes de água doce pertencentes a mais de 16 famílias e tendo como principal a Cyprinidae, a maior família de peixes de água doce com mais de 2.000 espécies, dentre as quais estão inseridas as carpas e diversos peixes importantes à alimentação. Os humanos são infectados por meio da ingestão da carne de peixe crua ou malcozida, contendo as formas metacercárias dos parasitas. Apesar disso, essa não é a única forma de contaminação, pois há diversos fatores, diretos e indiretos, que levam à transmissão desses helmintos aos humanos, como baixo grau de escolaridade; falta de saneamento básico e condições de higiene; uso de animais e/ou fezes como adubo; hábito de alimentar-se de peixes de água doce crus ou malcozidos; aquicultura de água doce em local inadequado e com água não tratada; baixa ou inexistente atividade de controle de transmissão em áreas endêmicas. Porém, independentemente da forma que levou à ingestão das metacercárias, estas se estabelecem no duodeno e na união do ducto pancreático com o ducto biliar (ampola hepatopancreática). A maturação do helminto demora cerca de 1 mês e o ciclo de vida dá-se no fígado.

Adaptado de IARC, 2012.

ductos biliares intra-hepáticos – sendo observados, no caso de infecções crônicas, também na vesícula biliar, ducto biliar extra-hepático e ducto pancreático – de seus hospedeiros finais, que incluem humanos, cães, gatos entre outras espécies.

Esses dois parasitas têm ciclos de vida semelhantes e, assim como as demais infecções advindas de agentes carcinógenos biológicos, esses helmintos são capazes de acompanhar seus hospedeiros por toda a vida, sendo registrado como tempo médio de vida do parasita em humanos aproximadamente 10 anos (**Figura 4.6**).

A maioria dos indivíduos infectados de forma crônica não apresentam sintomas específicos, no entanto, em casos leves pode ocorrer perda de apetite, dor abdominal, indigestão, diarreia ou constipação. Manifestações mais graves das doenças dependerão da duração da infecção, o número de parasitas e a localização da infecção. A infecção aguda pode causar obstrução dos ductos biliares intra-hepáticos, inflamação, hiperplasia adenomatosa e fibrose periductal. Por sua vez, a infecção crônica está associada com o aumento do tamanho do fígado e desnutrição, sendo que em casos raros é possível observar inflamação da bexiga e vias biliares, além de doenças hepatobiliares como colangite, colecistite, colelitíase, hepatomegalia e fibrose do trato periportal. Ademais, esses parasitas são reconhecidos como agentes etiológicos do colangiocarcinoma, câncer originado das células biliares. Diversos estudos apontam a associação entre a presença hiperendêmica dessas parasitoses e a alta prevalência desse tipo tumoral. Vale a pena ressaltar que esse tipo de câncer é a causa principal de morte no nordeste da Tailândia, local este que apresenta *O. viverrini* endêmico 20 vezes mais elevado

que no sul deste país. Estima-se que a infecção por *O. viverrini* ou *C. sinensis* aumente o risco para o desenvolvimento de colangiocarcinoma em aproximadamente cinco vezes (**Figura 4.7**).

O câncer de fígado é o principal câncer entre homens (33,4/100.000) e o terceiro tipo mais observado em mulheres (12,3/100.000) da Tailândia, sendo que em muitos estudos os dados de colangiocarcinoma estão inseridos nas estatísticas de cânceres hepáticos. Foi observado que casos de colangiocarcinoma em homens diagnosticados com câncer de fígado na região nordeste da Tailândia têm sido relatados serem extremamente mais altos que no sul, 85,5% contra 10%, respectivamente, sendo registrada a maior incidência de colangiocarcinoma do mundo (113,4/100.000 homens).

Já na Coreia do Sul foi registrada a maior incidência do mundo em câncer de fígado: 44,9/100.000 em homens e 12/100.000 em mulheres, sendo observado colangiocarcinoma em 22,3% dos homens e 36,1% em mulheres. Segundo o governo sul-coreano, a incidência e a mortalidade deste tipo de câncer variam de acordo com a região geográfica, sendo quatro vezes maior em regiões endêmicas ao *C. sinensis*.

A presença desses parasitas nos ductos hepáticos promove sua irritação, além de modificações patológicas epiteliais. Dessa forma, acredita-se que a carcinogênese mediada por esses helmintos esteja associada à hiperplasia do epitélio dos ductos biliares, a qual gera irritação. Inflamações crônicas causadas pelos parasitas no epitélio resultam em vulnerabilidade celular através de alterações hiperplásicas adenomatosas que são capazes de gerar possíveis danos ao DNA durante a proliferação descontrolada. O aumento da formação de carcinógenos endógenos, junto à produção de óxido nítrico pelas células do infiltrado inflamatório, também são capazes de promover a produção de compostos nitrosos reativos, como o peroxinitrito (ONOO⁻). Altas concentrações desses compostos podem levar à transformação das células do epitélio nas vias biliares.

Adaptado de Bragazzi et al., 2012.

FIGURA 4.7. Incidência mundial de colangiocarcinoma (casos/100 mil habitantes). Os dados são relativos ao período entre 1977 e 2007. Em rosa estão áreas com baixa incidência (menos de seis casos em 100 mil indivíduos) e em verde estão os países que apresentam este câncer com maiores taxas (mais que seis casos em 100 mil pessoas).

FIGURA 4.6. Ciclo de vida dos parasitas *C. sinensis* e *O. viverrini*. Os hospedeiros intermediários primários são os caracóis de água doce (pertencentes às famílias Hydrobiidae, Bithyniidae e Malaniidae) que ingerem ovos excretados via fezes pelo hospedeiro final, e favorecem ao helminto um ambiente para que haja, por meio de reprodução assexuada, liberação diária de milhares de cercárias após 1 a 2 meses da infecção. Estas formas nadantes livres penetram o tecido de peixes (pele e músculos), fazendo-os atuar como hospedeiros intermediários, encistando estes para que se tornem metacercárias: formas infecciosas após 21 dias da infecção. Os peixes hospedeiros destes parasitas englobam a mais de 130 espécies e peixes de água doce pertencentes a mais de 16 famílias.

Da mesma forma como o *O. viverrini* e *C. sinensis*, o *S. haematobium* também pertence à classe Trematoda dos platelmintos, como demonstrado na relação genética entre os membros desta classe na Figura 4.8.

As diferenças entre estas sete espécies se dará na localização final no hospedeiro, espécies hospedeiras intermediárias, patologia induzida, número, tamanho e forma dos ovos, sendo que os *Schistosoma* são os únicos hermafroditas com sexos separados.

FIGURA 4.8. Espécies de *Schistosoma*. Relação filogenética entre membros da classe Trematoda.

Depois de serem ingeridas pelo hospedeiro final, as metacercárias, estas se estabelecem no duodeno e na união do ducto pancreático com o ducto biliar (ampola hepatopancreática). A maturação do helminto demora cerca de 1 mês e o ciclo de vida dá-se no fígado.

Assim, na busca de tentar diminuir os casos de infecção crônica, a utilização do diagnóstico correto em postos de saúde, após a anamnese indicativa de parasitose, faz-se necessária. Como nas demais helmioses, o diagnóstico é baseado na identificação do ovo em microscópio advindo de amostras de fezes. Também foi observado que os níveis de etenos advindos da peroxidação lipídica de células epiteliais do ducto biliar são três a quatro vezes maiores na urina de pacientes infectados com *O. viverrini*. Além de biomarcador urinário desta infecção, estes possuem ação pró-mutagênica: geram modificações no genoma do hospedeiro e aumentam a probabilidade de colangiocarcinoma. Apesar de pouco se conhecer o genoma desses helmintos, também já foi sugerido o diagnóstico de *O. viverrini* via assinatura gênica de metabólitos advindos deste parasita (metabolismo xenobiótico).

De qualquer maneira, mesmo que se mantenham altas as taxas de prevalência desses parasitas, percebe-se que os índices de colangiocarcinoma são relativamente baixos, indicando que existam outros cofatores essenciais para o desenvolvimento dessa neoplasia. Exemplo disso é a ingestão de álcool, que foi associada ao aumento significativo de risco à infecção por *C. sinensis*. Além de inflação crônica advinda da ativação de vias de estresse oxidativo, que podem ser dadas não somente devido a mecanismos xenobióticos do *O. viverrini*, outros alimentos e patologias hepáticas também podem contribuir. Portanto, acredita-se que esses parasitas não sejam os iniciadores, mas os promotores desse tipo de tumor.

Schistosoma haematobium

A esquistossomose urinária é causada pelo *S. haematobium* e é considerada uma parasitose endêmica na África e no Mediterrâneo oriental. Estima-se que existam mais de 700 milhões de pessoas em 74 países expostas ao risco de infecção e quase 200 milhões de infectados, dos quais 85% estão somente na África subsaariana.

Adaptado de IARC, 2012.

Aproximadamente 95% dos casos de esquistossomose são devidos a infecções com *S. haematobium*, sendo este endêmico em 53 países no Oriente Médio e na maior parte do continente africano.

A esquistossomose é uma infecção amplamente encontrada em regiões rurais, apesar de ser um problema crescente nos centros urbanos com baixo ou inexistente saneamento básico. Córregos, lagoas e lagos são fontes comuns à infecção, mas nas últimas décadas tem-se observado a presença desse helminto também em reservatórios artificiais e sistemas de irrigação, bem como o crescimento de migrações tem colaborado para a disseminação deste patógeno. Assim, a endemia do *S. haematobium* deve-se a variações nas populações de caracóis e ao contato humano com a água contaminada.

A distribuição da doença dá-se de forma diferente entre os infectados: a prevalência e intensidade da infecção geralmente se distribuem em uma curva típica na qual há um pico nas idades de 5 a 15 anos e uma diminuição nos adultos. Padrões relacionados ao gênero dão-se devido a fatores comportamentais (em mulheres, para fins domésticos), profissionais (pescadores, agricultores, trabalhadores em campos de irrigação), culturais e religiosos. Além desses, não se podem descartar também fatores genéticos, respostas imunes ao hospedeiro, infecções concomitantes, grandes agrupamentos familiares e clima. A possibilidade de que adultos possam desenvolver imunidade ao helminto foi sugerida também como motivo da diminuição desta patologia com o aumento da idade. De fato, tem-se observado que a imunidade inata colabora para os baixos níveis em adultos, entretanto não é o único fator, mostrando a necessidade de maiores estudos na epidemiologia da esquistossomose para que se compreendam melhor os mecanismos de resistência.

Mesmo com a produção de centenas de ovos por dia, a infecção por *S. haematobium* muitas vezes é assintomática. Apenas uma pequena parte dos infectados desenvolve a doença crônica depois de variados períodos de exposição e infecção (**Figura 4.9**).

Dessa forma, as principais manifestações clínicas desta infecção ocorrem nas vias urinárias, por ser o local de produção dos ovos. Sintomas como dificuldade para urinar e achado de sangue na urina são comuns nesse tipo de infecção, uma vez que a deposição dos ovos em conglomerados na parede da bexiga provoca ulceração e inflamação do tecido. Complicações mais graves associadas a esse parasita são infecções e dilatações renais até a insuficiência renal fatal, derivadas dos granulomas provocados pelos ovos nas proximidades dos ureteres. Além disso, é possível observar infecções crônicas distantes devido a cerca de metade dos ovos produzidos não alcançarem o lúmen da bexiga e serem encaminhados à corrente sanguínea com possibilidade de serem retidos em qualquer tecido. Assim, a manifestação das doenças causadas por esses parasitas depende da duração da infecção, do número de parasitas e da localização da infecção. O tempo de vida de um verme adulto é uma média de 3 a 5 anos, mas pode ser até mais de 30 anos, sendo que uma pessoa infectada pode abrigar centenas destes parasitas, mesmo com o *S. haematobium* não se multiplicando

FIGURA 4.9. Ciclo de vida do *S. haematobium*. O principal hospedeiro definitivo desse parasita é o homem (dentro outros mamíferos), enquanto os hospedeiros intermediários são os caracóis de água doce da espécie *Bulinus* sp. A forma infectante desse parasita (cercária) é encontrada em águas doces, podendo ficar até 72 horas no ambiente e encontrar seu hospedeiro final pela turbulência das águas e elementos excretados por humanos. A entrada no hospedeiro final se dá pela penetração através da pele, a qual leva de 3 a 5 minutos. Uma vez na circulação sanguínea, esses parasitas se alojam nos vasos da parede da bexiga, do sistema genitourinário e do plexo sangüíneo perivesical de maneira geral, onde se alimentam de partículas de sangue e iniciam a deposição de centenas de ovos por dia. Estes ovos penetram a parede da bexiga e, graças a enzimas proteolíticas secretadas pela larva cilada (miracidio) dentro da estrutura, auxiliam na migração dos ovos ao interior do lúmen para que então sejam excretados na urina. Em contato com a água, os ovos ecodem e o miracidio possui 48 horas para encontrar seu hospedeiro intermediário via estímulos externos, como a luz e produtos químicos expelidos pelos caracóis. Os esporocístos são produzidos por reprodução assexuada e dão origem a larvas infectantes, sendo produzidos milhares por dia e podendo ser assim por meses.

Devido à possibilidade de migração dos ovos via corrente sanguínea e posterior fixação em outros tecidos que não os urinários, pode-se observar inflamação crônica grave que atua como co-fator de risco aos cânceres citados.

FIGURA 4.9. Ciclo de vida do *S. haematobium*. O principal hospedeiro definitivo desse parasita é o homem (dentre outros mamíferos), enquanto os hospedeiros intermediários são os caracóis de água doce da espécie *Bulinus* sp. A forma infectante desse parasita (cercária) é encontrada em águas doces, podendo ficar até 72 horas no ambiente e encontrar seu hospedeiro final pela turbulência das águas e elementos excretados por humanos. A entrada no hospedeiro final se dá pela penetração através da pele, a qual leva de 3 a 5 minutos. Uma vez na circulação sanguínea, esses parasitas se alojam nos vasos da parede da bexiga, do sistema genitourinário e do plexo sanguíneo perivesical de maneira geral, onde se alimentam de partículas de sangue e iniciam a deposição de centenas de ovos por dia. Estes ovos penetram a parede da bexiga e, graças a enzimas proteolíticas secretadas pela larva ciliada (miracídio) dentro da estrutura, auxiliam na migração dos ovos ao interior do lúmen para que então sejam excretados na urina. Em contato com a água, os ovos eclodem e o miracídio possui 48 horas para encontrar seu hospedeiro intermediário via estímulos externos, como a luz e produtos químicos expelidos pelos caracóis. Os esporocistos são produzidos por reprodução assexuada e dão origem a larvas infectantes, sendo produzidos milhares por dia e podendo ser assim por meses.

Devido à possibilidade de **migração dos ovos** via corrente sanguínea e posterior fixação em outros tecidos que não os urinários, pode-se observar inflamação crônica grave que atue como co-fator de risco aos cânceres citados.

Adaptado de Young et al., 2012.

no hospedeiro definitivo. Portanto, o estado de infecção crônica é o resultado de infecções consecutivas. Na ausência de reinfeção, esta desaparece quando o *Schistosoma* morre, entretanto em áreas endêmicas, com uma exposição contínua, a reinfeção é uma regra e não exceção.

Diversos estudos apontam associação entre a presença hiperendêmica dessa parasitose e a alta prevalência de carcinomas epidermóides de bexiga, sendo que este tipo de câncer é conhecido por estar associado aos tecidos com inflamação crônica. Apesar de esta parasitose ser mais recorrente na infância, os picos do câncer de células escamosas da bexiga em países africanos são observados na segunda década da vida, indicando um período de latência de 20 a 30 anos. O câncer de bexiga é o nono câncer mais comum no mundo, com 430 mil novos casos diagnosticados em 2012. Foi três vezes mais comum em homens comparado a mulheres, possivelmente devido à ocupação (agrícola, no caso desta helmintose). O *S. haematobium* é considerado causa principal do câncer de bexiga epidermoide pela IARC desde 1994, especialmente em países em desenvolvimento e não desenvolvidos. É importante ressaltar que o tipo de carcinoma de bexiga mais comum no mundo é o urotelial (câncer de células transicionais), correspondendo a 99% em países desenvolvidos e apenas a 50% na África.

O carcinoma epidermoide de bexiga representa aproximadamente 31% dentre as neoplasias malignas em regiões endêmicas ao *S. haematobium* no Egito, sendo o tipo de câncer mais

frequente em homens e o segundo tipo mais frequente em mulheres. Em países do Mediterrâneo oriental, como Iraque, Zâmbia, Malawi e Kuwait, o câncer de bexiga é o tipo mais prevalente de neoplasia maligna. A IARC considera que existam evidências biológicas e epidemiológicas suficientes para definir a infecção pelo *S. haematobium* como causa principal do câncer de bexiga. Estima-se que a infecção por *S. haematobium* aumente o risco para o desenvolvimento de câncer de bexiga em aproximadamente cinco vezes, sendo observado, na maior parte dos casos, em jovens, perfil este diferente do tipo urotelial que se dá numa população com idade avançada. Além disso, o *S. haematobium* foi observado em 85% das secções microscópicas de carcinomas de células escamosas, ligeiramente mais comum em pacientes com níveis moderados e elevados da infecção (58%); *versus* 10% de carcinoma de células transicionais, mais comum em pacientes com baixas taxas de infecção (56%).

Além da associação aos diferentes tipos de cânceres de bexiga, uma série de estudos em andamento tem relacionado a infecção por *S. haematobium* a outros tipos de câncer. As lesões provocadas pela deposição dos ovos nos epitélios do trato genital e colo uterino foram as mais associadas, pois poderiam facilitar a inflamação crônica tecidual. Assim, a infecção por *S. haematobium* contribuiria indiretamente para o aumento do número de neoplasias genitais e do colo uterino associadas ao HPV. O câncer de próstata também apresenta certa associação, assim como o cistoadenocarcinoma de ovário, teratoma e tumores de Brenner, leiomiossarcoma uterino, câncer de mama masculino, carcinoma hepatocelular, linfoma, sarcoma de bexiga, tumor carcinoide retal, carcinoma de células renais.

Tem-se sugerido que um modo de se gerenciar o câncer de bexiga associado à esquistossomose é prevenir e controlar a disseminação do *S. haematobium*. O tratamento com praziquantel também tem sido avaliado como forma de impedir a evolução de lesões inflamatórias urinárias e genitais advindas dessa helmintose. Entretanto, poucos estudos foram publicados sobre o assunto até o momento. Recentemente foi realizado o sequenciamento do genoma completo do *S. haematobium* trazendo esperanças quanto a uma maior compreensão desta patologia e das demais helmintoses relacionadas.

Enquanto isso, vários estudos têm sido publicados sobre os mecanismos da carcinogênese induzida por *S. haematobium*, indicando que este processo é multifatorial e possui diversos estágios, os quais englobam vários mecanismos. Os ovos desse helminto induzem a uma resposta inflamatória crônica e de irritação na bexiga, que parece estar associada à evolução de lesões inflamatórias a tumores malignos. Essa resposta em torno dos ovos dá origem a fatores e produtos genotóxicos que podem causar instabilidades genômicas nas células hospedeiras. Essa instabilidade pode levar a alterações na regulação dos genes supressores tumorais e oncogenes, bem como na estimulação de respostas proliferativas nas células hospedeiras que visam reparar danos teciduais causados pela inflamação. Além disso, as células inflamatórias, infectadas pelo *Schistosoma*, foram encontradas partici-

FIGURA 4.3. Ciclo de vida do *S. haematobium*. O principal hospedeiro definitivo desse parasita é o homem (dentro outros mamíferos), enquanto os hospedeiros intermediários são os caracóis de água doce da espécie *Bulinus* sp. A forma infectante desse parasita (cercária) é encontrada em águas doces, podendo ficar até 72 horas no ambiente e encontrar seu hospedeiro final pela turbulência das águas e elementos excretados por humanos. A entrada no hospedeiro final se dá pela penetração através da pele, a qual leva de 3 a 5 minutos. Uma vez na circulação sanguínea, esses parasitas se alojam nos vasos da parede da bexiga, do sistema genitourinário e do plexo sanguíneo perivesical de maneira geral, onde se alimentam de partículas de sangue e iniciam a deposição de centenas de ovos por dia. Estes ovos penetram a parede da bexiga e, graças a enzimas proteolíticas secretadas pela larva ciliada (miracídio) dentro da estrutura, auxiliam na migração dos ovos ao interior do lúmen para que então sejam excretados na urina. Em contato com a água, os ovos eclodem e o miracídio possui 48 horas para encontrar seu hospedeiro intermediário via estímulos externos, como a luz e produtos químicos expelidos pelos caracóis. Os esporocístos são produzidos por reprodução assexuada e dão origem a larvas infectantes, sendo produzidos milhares por dia e podendo ser assim por meses.

Devido à possibilidade de migração dos ovos via corrente sanguínea e posterior fixação em outros tecidos que não os urinários, pode-se observar inflamação crônica grave que atue como co-fator de risco aos cânceres citados.

pando da ativação de vias metabólicas pró-carcinogênicas através da liberação de aflatoxinas e formação de nitrosaminas de óxido nítrico.

Acredita-se que a resposta imune do hospedeiro contra os ovos desse parasita seja a principal causa associada ao desenvolvimento da neoplasia. Dessa forma, o processo de carcinogênese mediado por esses helmintos estaria associado à fibrose induzida pelos ovos desse parasita, com consequente proliferação, hiperplasia e metaplasia do epitélio da bexiga, sendo que esta helmintose está associada a risco aumentado de metaplasia ou hiperqueratoses em mais de 2,8 vezes; infecção bacteriana crônica associada à infecção por *S. haematobium*, com consequente produção de nitrosaminas (compostos carcinogênicos), as quais podem gerar diversas mutações no *locus* p53; retenção da urina na bexiga por períodos prolongados, com consequente aumento das concentrações de produtos carcinogênicos endógenos associados à resposta imune do hospedeiro; aumento nos níveis de betaglicuronidase na bexiga, como consequência da infecção por esse parasita; aumento dos danos de alquilação no DNA comumente observado em tecidos com câncer de bexiga associado à esquistossomose.

Assim, está estabelecido que o *S. haematobium* leva à inflamação das células resultante do aumento de estresse oxidativo devido à deposição de ovos no tecido. Estudos sugerem que os níveis aumentados do estresse oxidativo levam a processos genotóxicos e de ativação de vias de reparo, os quais visam impedir que resíduos gerados pela resposta inflamatória provocada pelos ovos de *Schistosoma*, como óxido nítrico, gerem alquilações no DNA via compostos N-nitrosos. Um excesso de alterações no genoma pode resultar na associação observada de esquistossomose e carcinoma de bexiga.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Há consenso de que aproximadamente 20% dos cânceres que afetam humanos são causados por agentes infecciosos, significando que os tipos de cânceres associados são potencialmente evitáveis. Além disso, reduções substanciais desses agentes são também factíveis e, em muitos casos, perante gastos acessíveis. Entre as medidas de controle estão: prevenção via sangue e objetos (ex., agulhas) contaminados com HBV, HCV, HIV; detecção precoce e tratamento de infecções, como de lesões cervicais pré-cancerosas associadas ao HPV. Vacinas eficazes contra HBV e HPV estão atualmente disponíveis. Se uma alta cobertura for alcançada, as vacinas têm a capacidade de reduzir as desigualdades na saúde, podendo superar a necessidade de intervenções médicas. Assim, é possível perceber que simples ações profiláticas, de atenção à saúde pública (principalmente junto a infecções) e de diminuição da pobreza e conflitos sociais já seriam suficientes para alterar o quadro de cânceres endêmicos observado em diversos países em desenvolvimento.

Portanto, espera-se que médicos e profissionais da saúde deem uma maior atenção às infecções associadas ao câncer e apoiem a im-

plementação de estratégias de prevenção disponíveis atualmente, sobretudo nos países em desenvolvimento. A redução ou eliminação de fatores de risco trariam benefícios às populações intervindas, tanto através da diminuição na incidência e mortalidade por câncer, quanto na melhora da qualidade de vida destes indivíduos. Todavia, ainda se fazem necessários mais estudos acerca de agentes infecciosos associados ao câncer (ex., ciclo de vida, hospedeiros, incubações, cascatas moleculares), epidemiologia mundial das infecções associadas a cânceres, mecanismos de carcinogênese biológica que fortalecem a associação via transformação celular com um alto poder metastático. Por fim, o conhecimento bem embasado entre o agente biológico e a neoplasia pode colaborar tanto no estabelecimento de novas modalidades diagnósticas e erradicação dos agentes infecciosos, quanto no prognóstico das neoplasias via identificação de marcadores tumorais.

RESUMO

A carcinogênese biológica é o processo que transforma uma célula normal em neoplásica, mediante a ação de diversos agentes biológicos que podem ser virais ou não virais. O processo de transformação confere às células afetadas um conjunto de características que permitem a multiplicação descontrolada e autônoma. Existem evidências acumuladas de que dezenas de vírus são etiológicamente associados a diversos tipos de cânceres. Isto pode ser explicado, em parte, porque existem produtos de genes virais que interferem nas vias essenciais de controle de proliferação celular ou de evasão à morte celular, levando estas vias a alterarem-se e favorecerem o processo de malignidade da célula infectada. Os vírus podem ser divididos em dois grandes grupos, de acordo com a composição de seu genoma: vírus de RNA e de DNA.

Entre os tipos de vírus de RNA que podem induzir cânceres, destacam-se: vírus linfotrópico de células T (HTLV-1), associado ao linfoma de células T; vírus da imunodeficiência humana 1 (VIH-1), associado a um estado de imunodeficiência que predispõe ao desenvolvimento de lesões neoplásicas relacionadas a infecções oportunistas; vírus da hepatite C (HCV), associado ao carcinoma hepático. Entre os vírus de DNA que são capazes de induzir o desenvolvimento de câncer em humanos, estão: vírus da hepatite B (HBV), associado ao hepatocarcinoma; papilomavírus humano (HPV), associado ao desenvolvimento do câncer do colo de útero, vulvar, peniano, anal e oral, principalmente com a presença dos tipos oncogênicos 16 e 18; vírus Epstein-Barr, associado ao carcinoma nasofaríngeo, linfoma de Hodgkin e doenças imunoproliferativas em pacientes imunodeprimidos; vírus do sarcoma de Kaposi (KSHV), associado ao sarcoma de Kaposi.

Apesar desta associação, os vírus não são agentes carcinogênicos completamente eficientes, uma vez que a minoria dos indivíduos infectados desenvolve tumores associados. Portanto, a infecção viral é apenas um dos elementos que compõem a promoção tumoral, sendo necessários vários fatores adicionais para o desenvolvimento do câncer. Ainda assim, estima-se que um de cada sete casos de câncer estejam associados a vírus e, ao se incluir agentes não virais, como bactérias e helmintos, a taxa de casos de câncer associados a doenças infecciosas é de 18%. Assim, a bactéria *Helicobacter pylori* e os helmintos *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis viverrini* e *Schistosoma haematobium* também fazem parte da lista de carcinógenos biológicos (grupo 1) pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), pois geram infecção crônica fortemente associada ao desenvolvimento de cânceres.

Câncer como doença infecciosa

O câncer é uma doença com origem etiológica diversa. As primeiras evidências de que agentes infecciosos poderiam estar relacionados ao aparecimento do câncer surgiram ainda no século 19. Contudo, foi somente durante a década de 1980 que a associação entre vírus e câncer em humanos foi finalmente estabelecida. Hoje, sabe-se que infecções por diferentes agentes biológicos são a causa de aproximadamente 18% dos tumores que acometem os humanos, dos quais 15% são atribuídos à infecção por vírus. Inúmeros estudos epidemiológicos e biológicos geraram dados suficientes para que a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer considere como carcinogênico em humanos os vírus Epstein-Barr (EBV), vírus das hepatites B e C (HBV e HCV), vírus da imunodeficiência humana (HIV-1), herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi (KSHV), vírus linfotrópico humano de células T (HTLV-1), 13 tipos de papilomavírus humano (HPV), além dos agentes não virais *H. pylori*, *C. sinensis*, *O. viverrini* e *S. haematobium*.

O estudo da associação entre as infecções virais e o aparecimento do câncer teve grande impacto na compreensão dos mecanismos de carcinogênese. Entretanto, apesar de todos os esforços, muito ainda há por ser descoberto no que concerne aos mecanismos de transformação desencadeados por estes agentes biológicos.

... A POSSIBILIDADE
DE CONTROLAR
ESSAS INFECÇÕES
CAUSADORAS DE
TUMORES PODERÁ VIR
A TER UM IMPACTO
IMPORTANTE...

Mais estudos ainda devem ser conduzidos, a fim de gerar conhecimento suficiente para o desenvolvimento de terapias e vacinas que resultem na redução das neoplasias associadas. Já existem vacinas preventivas contra alguns tipos de HPV – associado ao desenvolvimento de câncer de colo de útero, e uma fração de tumores do canal anal, vagina, vulva, pênis

e orofaringe – e contra o vírus da hepatite B – uma causa conhecida de câncer hepático. Ademais, o tratamento com antibióticos da infecção pela bactéria *H. pylori* está associado a uma redução de desenvolvimento de câncer de estômago. Pelo exposto, fica claro que a possibilidade de controlar essas infecções cau-

sadoras de tumores poderá vir a ter um impacto importante no controle da morbidade e mortalidade por neoplasias em humanos. Assim, a possibilidade de se criar vacinas contra todas as infecções que desencadeiam o câncer resultaria na diminuição de até 20% das mortes por câncer no mundo.

Dra. Laura Sichero
Pesquisadora Científica –
Centro de Investigação Translacional em
Oncologia (CTO), Instituto do Câncer do
Estado de São Paulo (ICESP)

PARA SABER MAIS

- International Agency for Research on Cancer. Biological agents. Volume 100 B. A review of human carcinogens. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 2012;100B:1-441.

Descreve os agentes carcinógenos biológicos (grupo 1) segundo a Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (IARC).

- Sichero L, Villa LL, Termini L. Tratado de Oncologia. São Paulo: Ed. Atheneu; 2012. Capítulo 9, Câncer como Doença Infecciosa; p. 99-109.

Descreve os agentes carcinógenos (grupo 1, IARC) em português e com dados atualizados.

- de Martel C, Plummer M, Franceschi S. Infections causing cancers: world burden and potential for prevention. Public Health Forum. 2014; *in press*.

Descreve a relação entre a infecção advinda de agentes carcinógenos biológicos e câncer, com dados atualizados.

BIBLIOGRAFIA GERAL

1. Alter MJ. Prevention of spread of hepatitis C. *Hepatology*. 2002;36:1S93-S98.
2. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*. 2007;13:2436-41.
3. Anastos K, Kalish LA, Hessel N et al. The relative value of CD4 cell count and quantitative HIV-1 RNA in predicting survival in HIV-1 infected women: results of the woman's interagency HIV studies. *AIDS*. 1999;13:17-26.
4. Barth TF, Muller S, Pawlita M et al. Homogeneous immunophenotype and paucity of secondary genomic aberrations are distinctive features of endemic but not sporadic Burkitt's lymphoma with MYC rearrangements. *Journal of Pathology*. 2004;203:940-5.
5. Bollard C, Rooney CM, Heslop HE. T-cell therapy in the treatment of post-transplant lymphoproliferative disease. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2012;9:510-519.
6. Bouvard V, Baan R, Straif K et al. A review of human carcinogens—Part B: biological agents. *Lancet Oncology*. 2009;10:321-2.
7. Bragazzi MC, Cardinale V, Carpino G et al. Cholangiocarcinoma: Epidemiology and risk factors. *Transl Gastrointest Cancer*. 2012;1:21-32.
8. Cavrois M, Leclercq I, Gout O et al. Persistent oligoclonal expansion of human T-cell leukemia virus type 1-infected circulating cells in patients with Tropical spastic paraparesis/HTLV-1 associated myelopathy. *Oncogene*. 1998;17:77-82.
9. Clavel F & Hance AJ. HIV drug resistance. *New England Journal of Medicine*. 2004;350:1023-35.
10. Chatlynne LG & Ablashi DV. Seroepidemiology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV). *Seminars in Cancer Biology*. 1999;9:175-85.
11. Doorbar J. The Papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology*. 2005;32:7-15.
12. Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet*. 1964;283:702-3.
13. Etoh K, Tamiya S, Yamaguchi K et al. Persistent clonal proliferation of human T-lymphotropic virus type I-infected cells in vivo. *Cancer Res*. 1997;57:4862-7.
14. Fourel G, Trepo C, Bougueleret L et al. Frequent activation of N-myc genes by hepadnavirus insertion in woodchuck liver tumors. *Nature*. 1990;347:294-8.
15. Gessain A & Mahieux R. A virus called HTLV-1. Epidemiological aspects. *Presse Medicale*. 2000;29:2233-9.
16. Hanchard B. Adult T-cell leukemia/lymphoma in Jamaica: 1986–1995. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1996;13:S20-25.
17. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2014 – Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 2014. p. 1-126.

18. Igakura T, Stinchcombe JC, Goon PK et al. Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science*. 2003;299:1713-6.
19. Inoue J, Itoh M, Akizawa T et al. HTLV-1 Rex protein accumulates unspliced RNA in the nucleus as well as in cytoplasm. *Oncogene*. 1991;6:1753-7.
20. Lepique AP, Rabachini T, Villa LL. HPV vaccination the beginning of the end of cervical cancer. A Review *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*. 2009;104:1-10.
21. Matsuoka M & Jeang KT. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nat Rev Cancer*. 2007;7:270-280.
22. Moriya K, Fujie H, Shintani Y et al. The core protein of the hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med*. 1998;4:1065-7.
23. Muñoz N, Castellasagué X, de González AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 2006;24:S31-10.
24. Murphy EL, Hanchard B, Figueroa JP et al. Modelling the risk of adult T-cell leukemia/lymphoma in persons infected with human T-lymphotropic virus type I. *Int J Cancer*. 1989;43:250-3.
25. Nishikawa, J, Imai S, Oda T et al. Epstein Barr virus promotes epithelial cell growth in the absence of EBNA2 and LMP-1 expression. *Journal of Virology*. 1999;73:1286-92.
26. Pezzotti P, Phillips NA, Dorrucchi M et al. Category of exposure to HIV and age in the progression to AIDS: longitudinal study of 1199 people with known dates of seroconversion. HIV Italian Seroconversion Study group. *BMJ*. 1996;313:583-6.
27. Schiff ER. Hepatitis C and alcohol. *Hepatology*. 1997;26:39-42.
28. Soulier J, Grollet L, Oksenhendler E et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in multicentric Castelman's disease. *Blood*. 1995;86:1276-80.
29. Tajima K & Hinuma Y. Epidemiology of HTLV-1/II in Japan and the world. *Gann Monogr Cancer Res*. 1992;39:129-149.
30. Takatsuki K, Yamaguchi K, Matsuoka M. ATL and HTLV-I-related diseases. In: Adult T-cell Leukemia Takatsuki K, editor. Oxford: Oxford University Press; 1994. p. 1-27.
31. Terradillos O, Billet O, Renard CA et al. The hepatitis B virus X gene potentiates c-myc induced liver oncogenesis in transgenic mice. *Oncogene*. 1997;14:395-404.
32. Thorley-Lawson DA. EBV the prototypical human tumor virus—just how bad is it? *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116:251-61.
33. Thorley-Lawson DA & Allday MJ. The curious case of the tumour virus: 50 years of Burkitt's lymphoma. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6:913-24.
34. Trottier H, Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*. 2006;24:S1-15.
35. Yasunaga J & Matsuoka M. Human T-cell leukemia virus type I induces adult T-cell leukemia: from clinical aspects to molecular mechanisms. *Cancer Control*. 2007;14:133-40.
36. Young LS & Rickinson AB. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:757-68.
37. Young ND, Jex AR, Li B et al. Whole-genome sequence of *Schistosoma haematobium*. *Nature genetics*. 2012;44:221-5.
38. Weinberg RA. *Biologia do Câncer*. Capítulo 11. Tumorigênese de Múltiplas Etapas. São Paulo: Ed. Artmed; 2010. p. 399-462.
39. World Cancer Research Fund International. Bladder cancer [Internet]. 2013 [citado em: 29 Jun 14]. Disponível em: http://www.wcrf.org/cancer_statistics/data_specific_cancers/bladder_cancer_statistics.php
40. World Cancer Research Fund International. Stomach cancer [Internet]. 2013 [citado em: 29 Jun 14]. Disponível em: http://www.wcrf.org/cancer_statistics/data_specific_cancers/stomach_cancer_statistics.php

Anexo E

Manuscrito referente aos resultados deste trabalho submetido à revista científica Virology (Elsevier) em 28 de março de 2016.

Manuscript Number:

Title: Diversity of Beta-papillomavirus at anogenital and oral anatomic sites of men: The HIM Study

Article Type: Regular Article

Section/Category: 10 Genomes & Evolution

Keywords: cutaneous human papillomavirus, males, HIM Study, prevalence, anogenital, oral.

Corresponding Author: Prof. Laura Sichero, PhD

Corresponding Author's Institution: Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

First Author: Emily Montosa Nunes

Order of Authors: Emily Montosa Nunes; Staci L Sudenga, PhD; Tarik Gheit, PhD; Massimo Tommasino, PhD; Maria L Baggio; Silvaneide Ferreira; Lenice Galan; Roberto C Silva, PhD; Christine M Pierce Campbell, PhD; Eduardo Lazcano-Ponce, PhD; Anna R Giuliano, PhD; Luisa L Villa, PhD; Laura Sichero, PhD

Abstract: Our goal was to describe prevalence of β -HPV types at three anatomic sites among 717 men from Brazil, Mexico and US enrolled in the HPV Infection in Men (HIM) Study. β -HPVs were genotyped using Luminex technology. Overall, 77.7%, 54.3% and 29.3% men were positive for any β -HPV type at the genitals, anal canal, and oral cavity, respectively. Men from US and Brazil were significantly less likely to have any β -HPV at the anal canal than men from Mexico. Older men were more likely to have any β -HPV at the anal canal compared to younger men. Prevalence of any β -HPV at the oral cavity was significantly associated with country of origin and age. Current smokers were significantly less likely to have β -HPV in the oral cavity than men who never smoked. Lack of associations between β -HPV detection and sexual behaviors suggests digital contact and autoinoculation as surrogate routes of viral transmission.

March 28th, 2016

Dr M. Emerman
Editor-in-Chief, Virology

Ref: Regular Article

Dear Professor M. Emerman,

Please find attached the file containing the manuscript “**Diversity of Beta-papillomavirus at anogenital and oral anatomic sites of men: The HIM Study**” by Nunes et al. As corresponding author I am submitting on behalf of all coauthors for possible publication as a Regular article in *Virology*.

The data is original, was not submitted to another journal, and all authors agreed with its content and have contributed significantly to the work.

Our goal was to describe the prevalence of 43 β -HPV types among samples collected at the same time point from the external genital skin, the anal canal, and oral cavity from men enrolled in the multinational HPV Infection in Men (HIM) cohort study (Brazil, the US and Mexico). We observed significant association between the detection of any β -HPV at the anal canal and oral cavity with country of origin and age. In this manuscript we describe for the first time β -HPV prevalence in the oral cavity of HIM study participants among which we observed that current smokers were significantly less likely to have β -HPV at the oral cavity than men that never smoked. Lack of associations between β -HPV detection and specific sexual behaviors suggests digital contact and autoinoculation as surrogate routes of transmission of these viruses.

We are looking forward to hearing from you.

Sincerely yours,

Laura Sichero, Ph.D.
Corresponding Author

Centro de Investigação Translacional em Oncologia - ICESP
Av. Dr. Arnaldo, 251, 8 andar
01246-000 Cerqueira César - São Paulo, SP
Phone: 55 11 3893 3010

1 **Highlights**

2

3 We described β -HPV in oral cavity of HIM cohort participants

4

5 β -HPV detection at anal canal and oral cavity associated with country and age

6

7 Current smokers were less likely to have β -HPV at the oral cavity than never smokers

8

9 β -HPV detection lacks associations with men sexual behavior

10

11

3/28/2016

Submit to: Virology

Title: Diversity of Beta-papillomavirus at anogenital and oral anatomic sites of men: The HIM Study

Authors: Emily Montosa Nunes^a, Staci L. Sudenga^b, Tarik Gheit^c, Massimo Tommasino^c, Maria Luiza Baggio^a, Silvaneide Ferreira^a, Lenice Galan^d, Roberto C. Silva^e, Christine M. Pierce Campbell^b, Eduardo Lazcano-Ponce^f, Anna R. Giuliano^b, Luisa L. Villa^{a,g}, Laura Sichero^a for the HIM Study group.

Affiliations:

^a Molecular Biology Laboratory, Center for Translational Research in Oncology, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

^b Department of Cancer Epidemiology, H. Lee Moffitt Cancer Center and Research Institute, Tampa, FL, USA.

^c Infections and Cancer Biology Group, International Agency for Cancer Research (IARC), Lyon, France.

^d Ludwig Institute for Cancer Research, São Paulo branch, São Paulo, Brazil.

^e Centro de Referência e Treinamento DST/Aids, São Paulo, Brazil.

^f Centro de Investigación en Salud Poblacional, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Mexico.

^g Department of Radiology and Oncology, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Correspondence to:

Laura Sichero, Ph.D. Center for Translational Research in Oncology - ICESP.
Av. Dr. Arnaldo, 251, 8 andar, 01246-000, Cerqueira César - São Paulo, SP, Brazil.
E-mail: laura.sichero@hc.fm.usp.br. Phone: 55-11- 3893 3010

Abbreviations: Human papillomavirus (HPV), *HPV Infection in Men Study (HIM Study)*, beta-HPV (β -HPV), alpha-HPV (α -HPV), gamma-HPV (γ -HPV), beta-globin (β -globin), men who have sex with men (MSM), men who have sex with women (MSW), men who have sex with men and women (MSMW), odds ratio (OR), confidence intervals (CI), adjusted OR (aOR), External Genital Lesions (EGL), penile intraepithelial neoplasia (PeIN).

Word count: Abstract: 150; Main text: 3,253

Running Title: Diversity of Beta-HPV in male.

1
2
3 **Footnote Page**
4
5
6
7

8 **Funding Statement:** This work was supported by Ludwig Institute for Cancer Research to [LLV];
9
10 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) [Grants numbers 13/01440-4 to
11
12 LS; 13/20470-1 and 15/12557-5 to EMN; 08/57889-1 to LLV]; Conselho Nacional de
13
14 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [Grant number 573799/2008-3 to LLV]. The
15
16 infrastructure of the HIM Study cohort was supported through a grant from the National Cancer
17
18 Institute (NCI), National Institutes of Health (NIH) (R01 CA098803 to ARG).
19
20
21
22
23
24
25
26

27 **Conflict of Interest**
28
29

30 ARG (IISP39582) and SLS (IISP53280) are current recipient of grant funding from Merck, and ARG
31
32 and LLV are members of the Merck Advisory Board for HPV prophylactic vaccines. No conflicts of
33
34 interest are declared for any of the remaining authors.
35
36
37
38
39
40
41

42 **Ethical approval**
43

44 Ethical approval was given by the University of South Florida (IRB# 102660), Ludwig Institute for
45
46 Cancer Research, Centro de Referência e Treinamento em Doenças Sexualmente Transmissíveis e
47
48 AIDS, and Instituto Nacional de Salud Pública de México.
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Summary

Our goal was to describe prevalence of β -HPV types at three anatomic sites among 717 men from Brazil, Mexico and US enrolled in the HPV Infection in Men (HIM) Study. β -HPVs were genotyped using Luminex technology. Overall, 77.7%, 54.3% and 29.3% men were positive for any β -HPV type at the genitals, anal canal, and oral cavity, respectively. Men from US and Brazil were significantly less likely to have any β -HPV at the anal canal than men from Mexico. Older men were more likely to have any β -HPV at the anal canal compared to younger men. Prevalence of any β -HPV at the oral cavity was significantly associated with country of origin and age. Current smokers were significantly less likely to have β -HPV in the oral cavity than men who never smoked. Lack of associations between β -HPV detection and sexual behaviors suggests digital contact and autoinoculation as surrogate routes of viral transmission.

Keywords: cutaneous human papillomavirus, males, HIM Study, prevalence, anogenital, oral.

Introduction

Most human papillomaviruses (HPV) encompass three genera: *alpha papillomavirus* (α -HPV), which are primarily isolated from mucosal and genital lesions, and *beta* and *gamma papillomavirus* (β - and γ -HPV), which have mostly been detected on the skin. β - and γ -HPV together comprise >100 viral types ubiquitously distributed throughout the body since early infancy, suggesting these may be part of the commensal flora^{1,2}. Next-generation sequencing further points towards the existence of hundreds of putative novel cutaneous HPV types^{3,4}. β -HPV 5 and 8 are recognized etiological agents of cutaneous squamous cell carcinoma (SCC) among epidermodysplasia verruciformis patients primarily in sun-exposed skin⁵. In addition, some studies provide data suggesting a possible role of certain β -HPVs in early stages of skin carcinogenesis among immunocompetent individuals^{6–11}. Nevertheless, further research is needed to better understand the widespread distribution of these viruses, and the potential association with SCC development^{8,12,13}.

We and others have recently described the high prevalence and diversity of β -HPVs at non-cutaneous anatomic sites^{14–19}. The purpose of this study was to describe the prevalence of 43 β -HPV types among samples collected at the same time point from the external genital skin, the anal canal, and oral cavity from men enrolled in the multinational *HPV Infection in Men (HIM)* cohort study.

Materials and Methods

Clinical samples

Over 4,000 HIM Study participants were enrolled in São Paulo, Brazil; Cuernavaca, Mexico; and Tampa, US between 2005 and 2009, and followed every six months for a median of four years. Inclusion criteria were age 18–70 years at enrollment, no prior anogenital cancer or warts (Note: no exclusion was based on head and neck cancer), and no current sexually transmitted disease (STD) diagnosis, including HIV. No exclusion was made for head and neck cancer. Detailed study methods

are described elsewhere^{20–22}. The study was approved by Human Subjects Committees at each study site. Informed consent was obtained from all participants prior to enrollment.

Men completed a self-administered computer-assisted self-interview (CASI) questionnaire gathering information about participant demographic characteristics, substance use, and sexual behaviors^{20, 21}. During the clinical examination, three different prewetted Dacron applicators were used to sample the external genitalia and scrotum of participants, and were later combined to form a single sample²⁰. Using a separate swab, exfoliated cells were collected from between the anal verge and the dentate line²¹. Oral gargle specimens were collected via mouthwash and processed as described²². For the present study, we selected the first 243 men enrolled in each country who had provided specimens from all three anatomic sites (genitals, anal canal, and oral cavity) at the same study visit.

β-HPV detection and characterization

Specimens were digested with proteinase K-SDS 1% and HPV DNA was obtained by organic extraction²³. HPV DNA was measured in all samples using type-specific PCR bead-based multiplex genotyping (TS-MPG) assays that combine multiplex polymerase chain reaction (PCR) and bead-based Luminex technology (Luminex Corp., Austin, TX, USA), as described elsewhere^{18, 24–29}. A mixture of specific biotinylated primers was used to amplify simultaneously ~250 bp of the *E7* gene of 43 β-HPV from five different species²⁵. Two primers for β-globin amplification were included to evaluate the quality of template DNA³⁰. Multiplex PCRs were performed with the QIAGEN multiplex PCR kit according to the instructions of the manufacturer (Qiagen, Dusseldorf, Germany). Following PCR amplification, 10μL of each reaction mixture was analyzed by a bead-based multiplex HPV genotyping protocol²⁴ in a Luminex 200 reader (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). The results are expressed as the median fluorescence intensity (MFI) of at least 100 beads per bead set. For each probe, the MFI values obtained when no PCR product was added to the hybridization mixture were

considered the background values. Cutoffs were computed by adding 20 MFI to 1.1X the median background values.

Statistical analysis

Questionnaire data for each participant were obtained from the same visit that the genital, anal canal and oral specimens were acquired. We compared demographic and sexual characteristics between men that were positive for any of the β -HPV types to men that were negative for all of the β -HPV types at each anatomic site using Pearson Chi-square tests. Multiple infections were defined as the presence of >1 β -HPV type at the same anatomic site. Sexual orientation was categorized based on self-reported recent (previous 3-6 months) and lifetime sexual behavior (vaginal, anal, and oral sex). Men were defined as “virgins” when they reported no female or male sexual partners ever.

Odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (95% CI) were calculated using logistic regression to assess factors associated with any β -HPV detection at each anatomic site. Backwards elimination was used to determine factors independently associated with any β -HPV detection at each anatomic site with p value ≤ 0.20 chosen as the a priori cutoff for retention in the multivariable model. All analyses were conducted using SAS version 9.3 (SAS Institute, Cary, NC).

Results

β -globin amplification was successful for 697 (97.2%), 713 (99.4%) and 717 (100%) samples from the genital, anal canal, and oral regions, respectively. Twelve men were excluded from the analysis: eight men had at least one inadequate specimen (β -globin negative/HPV negative) and for four men DNA isolation failed in one of the samples. Thus, the current analysis included 717 men (238 US, 241 Brazil and 238 Mexico) for whom results were considered adequate for all three anatomic sites (β -globin positive/ β -HPV negative or β -globin negative/ β -HPV positive) (Figure 1).

Overall, the majority of the study population (n=717) was less than 44 years old (87%), white (52%), non-Hispanic (56%), not circumcised (63%), married or cohabiting (51%), and never smoked (60%). A large proportion of these men reported having sex with women (85%) and the majority reported nine or less sexual partners (55%) (data not shown).

At least one β -HPV type was detected at any one of the three anatomic sites in 637 (89%) men. Any β -HPV was detected among 557 (77.7%) men at the genital, 389 (54.3%) at the anal canal and 210 (29.3%) at the oral cavity (Figure 2A). Men in Mexico had significantly higher prevalence of β -HPV at the anal canal ($p=0.0001$) and oral cavity ($p=0.0001$) compared to both men from the US and Brazil (Figure 2A). At the anal canal and oral cavity, β -HPV prevalence significantly increased with increasing age (Figure 2B).

A total of 3,302 single β -HPV infections across all anatomic sites were detected among the 717 men. Major β -HPV species detected were β -1 (1281/3302, 38.8%) and β -2 (1682/3302, 50.9%) regardless of the anatomic site. The most prevalent viral types at all three anatomic sites were HPV-21 and HPV-24 (β -1), and HPV-22 and HPV-38 (β -2) (Table 1). HPV-150 was the only type not detected in any of the samples tested. Multiple β -HPV types were more likely to be detected at the genital (ranged from 2-19 types detected) than at the anal canal (2-9) or oral cavity (2-11) (Table 1).

In multivariable logistic regression analyses, age, sexual orientation, and number of alcoholic drinks per month were retained in the final model as explanatory variables for detection of β -HPV at the external genital skin. However, none of these factors reached statistical significance in either unadjusted or multivariable analyses (Table 2). Although not statistically significant, trends were observed for higher prevalence and risk of at least one β -HPV type at the genitals with increasing age (Figure 2B; Table 2) and MSM sexual orientation (Table 2). In addition, men that reported any alcohol intake tended to present lower risk of at least one β -HPV type at the genitals compared to men that never drank alcohol.

1
2
3 Approximately half of the study population (54.3%) had at least one β -HPV type detected at the
4
5 anal canal. Men from Brazil (OR=0.49, 95% CI 0.33-0.73) and the US (OR=0.55, 95% CI 0.38-0.80)
6
7 were significantly less likely to have a β -HPV type detected at the anal canal compared to men from
8
9 Mexico (Figure 2A, Table 3). Older age (OR=1.59, 95% CI 0.98-2.58) was marginally independently
10
11 associated with increased detection of at least one β -HPV type at the anal canal after adjusting for
12
13 country. In models that also included lifetime number of male anal sex partners there was no change in
14
15 the odds ratios for the association with country or age (data not shown).
16
17
18
19

20 Oral β -HPV prevalence was lower compared to that at the genital and anal canal, regardless of
21
22 country (Figure 2A). Men from Brazil (OR=0.39, 95% CI 0.26-0.60) and the US (OR=0.46, 95% CI
23
24 0.31-0.70) were significantly less likely to have at least one β -HPV type detected at the oral cavity
25
26 compared to men from Mexico (Figure 2A, Table 4). Older age (OR=1.79, 95% CI 1.09-2.96 for men
27
28 ages 45-70 years compared to men 18-30 years) was significantly associated with increased detection
29
30 of at least one β -HPV type at the oral cavity. Finally, current (OR=0.50, 95% CI 0.32-0.80) smokers
31
32 were significantly less likely to have at least one β -HPV type detected at the oral cavity compared to
33
34 men who never smoked after adjusting for age and country.
35
36
37
38
39
40
41

42 Discussion

43
44 We previously reported the high prevalence of β - and γ -HPVs in the anogenital skin of HIM
45
46 study participants presumably α -HPV negative by means of not hybridizing to any type-specific probe
47
48 using the Linear Array methodology and thus categorized as unclassified HPV^{16,17,20}. We now widen
49
50 our analysis to assess β -HPV prevalence at the genital and anal canal of men at the same study visit
51
52 independent of α -HPV status using a methodology that allows simultaneous detection of 43 β -HPV
53
54 genotypes²⁴. Furthermore, we report for the first time β -HPV prevalence in the oral cavity of HIM
55
56
57
58
59 Study participants.
60
61
62
63
64
65

1
2
3 β-HPV DNA was detected in 77.7% of the genital specimens, similar to previously reported
4
5 data in external genital lesions (EGLs) (61.1%) and preceding normal genital skin specimens of HIM
6
7 participants using the Luminex technology³¹. Nevertheless, these findings contrast with the 40% of β-
8
9 HPV prevalence observed in male genital skin specimens using a PCR-sequencing protocol^{16,32}. A
10
11 similar prevalence was observed regarding β-HPV detection at the anal canal of HIM participants
12
13 (54.3% by Luminex versus 31.6% with PCR-sequencing)¹⁷. Therefore, recently most studies take
14
15 advantage of the higher sensitivity inherent of the Luminex technology for cutaneous HPV DNA
16
17 detection (Gheit et al. 2007; Donà et al. 2015; Torres et al. 2015).
18
19
20
21

22
23 β-HPV DNA was significantly less likely to be detected at the anal canal of men from the US
24
25 (48.7%) and Brazil (48.6%) compared to men from Mexico (65.6%). Using the same methodology, β-
26
27 HPV DNA was observed in 65.5% and 27.2% of anal canal specimens from HIV-negative men in
28
29 Spain and Italy, respectively^{18,29}. We found that the β-HPV prevalence in oral gargle samples was also
30
31 significantly higher in Mexican men (41.2%), compared to men from Brazil (24.9%) and the US
32
33 (21.9%). Overall, β-HPV prevalence in oral specimens of healthy men in the HIM Study (29.3%) was
34
35 similar to a study conducted in Italy among healthy individuals (25.0%)³³, but otherwise lower than
36
37 what has been observed among HIV-negative men and women with normal from the US (74%)¹⁴.
38
39 Although the small number of studies conducted to date preclude further conclusions, taken together
40
41 these data suggest that β-HPV prevalence at the anal canal and oral cavity may vary widely by country
42
43 and world region.
44
45
46
47
48

49
50 In general, we observed increased β-HPV detection with age, however this trend did not reach
51
52 statistical significance for anogenital specimens. Nevertheless, these results are consistent with our
53
54 prior findings using a PCR-sequencing method¹⁷. Higher β-HPV prevalence was observed at the anal
55
56 canal among middle-aged adults (31-44 years) and older men (>45 years) compared to younger men
57
58 (18-30 years), whereas no age associations were observed for the external genital skin. In this same
59
60
61
62
63
64
65

study population, men aged >45 years were also more likely to have prevalent and incident β -infection in eyebrow hairs and skin swabs²⁸.

The most prevalent viral types at all three anatomic sites were HPV-21 and HPV-24 (β -1), and HPV-22 and HPV-38 (β -2). Only HPV-38 has been consistently reported in the literature across multiple anatomic sites in men, including anal canal, genital, EGL, eyebrow hair and skin specimens^{16-18, 28, 29, 31}. Multiple β -HPV type detection is a common finding throughout the human body and hair follicles appears to be the natural reservoir for these viruses^{1, 15, 18, 29}. Our prior reports relying on PCR-sequencing indicated high prevalence of multiple β -HPV types in samples that were HPV positive by PCR but unclassified genotype due to overlapping peak patterns in sequence chromatograms^{17, 32}. In the present study, taking advantage of the Luminex methodology which improved our ability to detect a large number of viral types at once, we confirmed that multiple β -HPVs types is a common finding, especially at the external genital skin for which up to 19 viral types were simultaneously detected. Among HIM Study participants, detection of multiple cutaneous HPV types was also a common finding on EGLs and the normal cutaneous skin^{28, 31}.

Among behavioral factors assessed in the present study, only smoking was significantly associated with β -HPV detection in the oral cavity, where current smokers had a significantly lower likelihood of infection than never smokers. The association with smoking status was only observed at the oral cavity leading us to hypothesize that β -HPV dynamics vary by anatomic site of infection. Clearly, additional research is needed to further elucidate the biological underpinnings of these observations.

In contrast to the strong association between sexual behavior and α -HPV detection among men and women, our results, together with reports of others, suggest that sexual behaviors are not associated with the detection of cutaneous HPV types at the oral cavity and anogenital sites^{16, 17, 28, 29}. A limitation of the current study is that the HIM Study questionnaire did not assess sexual behaviors regarding

1
2
3 masturbation, rimming, or other non-penetrative sexual practices (only information about oral sex is
4
5 collected). For this reason, it was not possible to evaluate the influence of direct hand, mouth, or object
6
7 to penis, anal canal and mouth contact or other sexual practices that could be central to understanding
8
9 the mechanisms of transmission of these viruses ³⁴. Nevertheless, the high prevalence of β -HPV in the
10
11 normal skin (67.3%) and eyebrow hairs (56.5%) of HIM Study participants enrolled in the US ²⁸
12
13 strongly supports that detection of β -HPVs in the oral cavity and anogenital region of men may simply
14
15 reflect deposition of virions shed from other body sites ³⁵. It has to be noted that we examined only 43
16
17 of the 51 β -HPV types (see <http://www.hpvcenter.se/html/refclones.html>) characterized to date, and the
18
19 current analysis was not extended to γ -HPV genomes. Assuming new HPV cutaneous types are
20
21 continually identified, our study likely underestimated the prevalence of untested and unknown viral
22
23 genotypes.
24
25
26
27
28
29

30 Cutaneous skin infected with specific β -HPV types have a higher susceptibility to ultraviolet
31
32 radiation (UVR) induced DNA damage ²⁸. Although recent functional studies suggest that cutaneous
33
34 HPV types may also have oncogenic potential, these viruses are unlikely to cause disease at anatomic
35
36 sites not exposed to UVR ³¹. The possible role of β -HPV as co-factors in lesion development in the
37
38 genital region and oral cavity of men remains to be clarified. Larger studies with extended follow up
39
40 conducted prospectively in men and women are needed.
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figures and Tables Legends

Figure 1. Study design indicating number of participants in the *HPV Infection in Men Study* analyzed by anatomic site (external genital skin, anal canal and oral cavity) and country (US, Mexico and Brazil).

Figure 2. Overall β -HPV (Human papillomavirus) prevalence by (A) country and (B) age at the genital, anal canal and oral cavity of men participating in the HIM study (n=717). p value (p) were calculated by the Chi-square test.

Table 1. β -HPV (Human papillomavirus) type distribution at the genital, anal canal and oral cavity collected at the same visit of 717 men participating in the *HPV Infection in Men Study*.

Table 2. Demographic and sexual characteristics associated with at least one β -HPV type DNA detected at the genital in 717 men participating in the *HPV Infection in Men Study*.

Table 3. Demographic and sexual characteristics associated with at least one β -HPV type DNA detected in the anal canal in 717 men participating in the *HPV Infection in Men Study*.

Table 4. Demographic and sexual characteristics associated with at least one β -HPV type DNA detected in the oral cavity in 717 men participating in the *HPV Infection in Men Study*.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Infections and Cancer Biology Group (International Agency for Research on Cancer, Lyon, France), HIM Study Teams in the USA (Moffitt Cancer Center, Tampa, FL), Brazil (Centro de Referência e Treinamento em DST/AIDS, Fundação Faculdade de Medicina, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, Ludwig Institute for Cancer Research, São Paulo) and Mexico (Instituto Mexicano del Seguro Social, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca). This work was supported by Ludwig Institute for Cancer Research to [LLV]; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) [Grants numbers 13/01440-4 to LS; 13/20470-1 and 15/12557-5 to EMN; 08/57889-1 to LLV]; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [Grant number 573799/2008-3 to LLV]. The infrastructure of the HIM Study cohort was supported through a grant from the National Cancer Institute (NCI), National Institutes of Health (NIH) (R01 CA098803 to ARG).

References

- 1 Antonsson A, Forslund O, Ekberg H, Sterner G, Hansson BG. The ubiquity and impressive genomic diversity of human skin papillomaviruses suggest a commensalic nature of these viruses. *J Virol* 2000;**74**(24):11636–41. Doi: 10.1128/JVI.74.24.11636-11641.2000.
- 2 Antonsson A, Karanfilovska S, Lindqvist PG, Hansson BG. General Acquisition of Human Papillomavirus Infections of Skin Occurs in Early Infancy. *J Clin Microbiol* 2003;**41**(6):2509–14. Doi: 10.1128/JCM.41.6.2509.
- 3 Bzhalava D, Mühr LS, Lagheden C, Ekström J, Forslund O, Dillner J, et al. Deep sequencing extends the diversity of human papillomaviruses in human skin. *Sci Rep* 2014;**4**:1–7. Doi: 10.1038/srep05807.
- 4 Chouhy D, Bolatti EM, Pérez GR, Giri AA. Analysis of the genetic diversity and phylogenetic relationships of putative human papillomavirus types. *J Gen Virol* 2013;**94**(Pt 11):2480–8. Doi: 10.1099/vir.0.055137-0.
- 5 Jablonska S, Dabrowski J, Jakubowicz K. Epidermodysplasia Verruciformis as a Model in Studies on the Role of Papovaviruses in Oncogenesis. *Cancer Res* 1972;**32**(3):583–9.
- 6 Arron ST, Ruby JG, Dybbro E, Ganem D, Derisi JL. Transcriptome Sequencing Demonstrates that Human Papillomavirus is not Active in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *J Invest Dermatol* 2011;**131**(8):1745–53. Doi: 10.1038/jid.2011.91.
- 7 Weissenborn SJ, Nindl I, Purdie K, Harwood C, Proby C, Breuer J, et al. Human papillomavirus-DNA loads in actinic keratoses exceed those in non-melanoma skin cancers. *J Invest Dermatol* 2005;**125**(1):93–7. Doi: 10.1111/j.0022-202X.2005.23733.x.
- 8 Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, et al. A review of human carcinogens—Part B: biological agents. *Lancet Oncol* 2009;**10**(4):321–2. Doi: 10.1016/S1470-

2045(09)70096-8.

- 9 Rollison DE, Pawlita M, Giuliano AR, Iannacone MR, Sondak VK, Messina JL, et al. Measures
of cutaneous human papillomavirus infection in normal tissues as biomarkers of HPV in
corresponding nonmelanoma skin cancers. *Int J Cancer* 2008;**123**(10):2337–42. Doi:
10.1002/ijc.23795.
- 10 Astori G, Lavergne D, Benton C, Höckmayr B, Egawa K, Garbe C, et al. Human
papillomaviruses are commonly found in normal skin of immunocompetent hosts. *J Invest
Dermatol* 1998;**110**(5):752–5. Doi: 10.1046/j.1523-1747.1998.00191.x.
- 11 Howley Peter M, Pfister Herbert J. Beta genus papillomaviruses and skin cancer. *Virology*
2015;**479-480**:290–6. Doi: 10.1016/j.virol.2015.02.004.
- 12 Bzhalava D, Guan P, Franceschi S, Dillner J, Clifford G. A systematic review of the prevalence
of mucosal and cutaneous human papillomavirus types. *Virology* 2013;**445**(1-2):224–31. Doi:
10.1016/j.virol.2013.07.015.
- 13 Chahoud J, Semaan A, Chen Y, Cao M, Rieber AG, Rady P, et al. Association Between beta-
Genus Human Papillomavirus and Cutaneous Squamous Cell Carcinoma in Immunocompetent
Individuals-A Meta-analysis. *JAMA Dermatology* 2015;**77004**. Doi:
10.1001/jamadermatol.2015.4530.
- 14 Bottalico D, Chen Z, Dunne A, Ostoloza J, McKinney S, Sun C, et al. The oral cavity contains
abundant known and novel human papillomaviruses from the Betapapillomavirus and
Gammapapillomavirus genera. *J Infect Dis* 2011;**204**:787–92. Doi: 10.1093/infdis/jir383.
- 15 Forslund O, Johansson H, Madsen KG, Kofoed K. The nasal mucosa contains a large spectrum
of human papillomavirus types from the betapapillomavirus and gammapapillomavirus genera. *J
Infect Dis* 2013;**208**(8):1335–41. Doi: 10.1093/infdis/jit326.

- 1
2
3 16 Sichero L, Pierce Campbell CM, Fulp W, Ferreira S, Sobrinho JS, Baggio M, et al. High genital
4 prevalence of cutaneous human papillomavirus DNA on male genital skin: the HPV Infection in
5 Men Study. *BMC Infect Dis* 2014;**14**(1):1–16. Doi: 10.1186/s12879-014-0677-y.
6
7
8
9
10 17 Sichero L, Nyitray AG, Nunes EM, Nepal B, Ferreira S, Sobrinho JS, et al. Diversity of human
11 papillomavirus in the anal canal of men: the HIM Study. *Clin Microbiol Infect* 2015;**21**(5):502–
12 9. Doi: 10.1016/j.cmi.2014.12.023.
13
14
15
16
17
18 18 Torres M, Gheit T, McKay-Chopin S, Rodríguez C, Romero JD, Filotico R, et al. Prevalence of
19 beta and gamma human papillomaviruses in the anal canal of men who have sex with men is
20 influenced by HIV status. *J Clin Virol* 2015;**67**:47–51. Doi: 10.1016/j.jcv.2015.04.005.
21
22
23
24
25
26 19 Agalliu I, Gapstur S, Chen Z, Wang T, Anderson RL, Teras L, et al. Associations of Oral α -, β -,
27 and γ -Human Papillomavirus Types With Risk of Incident Head and Neck Cancer. *JAMA Oncol*
28 2016;**10461**:1–8. Doi: 10.1001/jamaoncol.2015.5504.
29
30
31
32
33
34 20 Giuliano AR, Lazcano-Ponce E, Villa LL, Flores R, Salmeron J, Lee JH, et al. The Human
35 Papillomavirus Infection in Men Study: Human Papillomavirus Prevalence and Type
36 Distribution among Men Residing in Brazil, Mexico, and the United States. *Cancer Epidemiol*
37 *Biomarkers Prev* 2008;**17**(8):2036–43. Doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0151.
38
39
40
41
42
43
44 21 Nyitray AG, Carvalho da Silva RJ, Baggio ML, Lu B, Smith D, Abrahamsen M, et al. Age-
45 Specific Prevalence of and Risk Factors for Anal Human Papillomavirus (HPV) among Men
46 Who Have Sex with Women and Men Who Have Sex with Men: The HPV in Men (HIM) Study.
47 *J Infect Dis* 2011;**203**(1):49–57. Doi: 10.1093/infdis/jiq021.
48
49
50
51
52
53
54 22 Kreimer AR, Villa A, Nyitray AG, Abrahamsen M, Papenfuss M, Smith D, et al. The
55 Epidemiology of Oral HPV Infection among a Multinational Sample of Healthy Men. *Cancer*
56 *Epidemiol Biomarkers Prev* 2011;**20**(1):172–82. Doi: 10.1158/1055-9965.EPI-10-0682.The.
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3 23 Green MR, Sambrook J. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 4th ed. New York: John
4
5 Inglis; 2012.
6
7
8 24 Schmitt M, Bravo IG, Snijders JF, Gissmann L, Pawlita M, Waterboer T. Bead-based multiplex
9
10 genotyping of human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 2006;**44**(2):504–12. Doi:
11
12 10.1128/JCM.44.2.504-512.2006.
13
14
15 25 Gheit T, Billoud G, de Koning MN, Gemignani F, Forslund O, Sylla BS, et al. Development of a
16
17 Sensitive and Specific Multiplex PCR Method Combined with DNA Microarray Primer
18
19 Extension To Detect Betapapillomavirus Types. *J Clin Microbiol* 2007;**45**(8):2537–44. Doi:
20
21 10.1128/JCM.00747-07.
22
23
24
25 26 Ruer JB, Pépin L, Gheit T, Vidal C, Kantelip B, Tommasino M, et al. Detection of alpha- and
27
28 beta-human papillomavirus (HPV) in cutaneous melanoma: a matched and controlled study
29
30 using specific multiplex PCR combined with DNA microarray primer extension. *Exp Dermatol*
31
32 2009;**18**(10):857–62. Doi: 10.1111/j.1600-0625.2009.00866.x.
33
34
35 27 Schmitt Markus, Dondog Bolormaa, Waterboer Tim, Pawlita Michael, Tommasino Massimo,
36
37 Gheit Tarik. Abundance of Multiple High-Risk Human Papillomavirus (HPV) Infections Found
38
39 in Cervical Cells Analyzed by Use of an Ultrasensitive HPV Genotyping Assay. *J Clin*
40
41 *Microbiol* 2010;**48**(1):143–9. Doi: 10.1128/JCM.00991-09.
42
43
44
45 28 Hampras SS, Giuliano AR, Lin HY, Fisher KJ, Abrahamsen ME, McKay-Chopin S, et al.
46
47 Natural History of Cutaneous Human Papillomavirus (HPV) Infection in Men: The HIM Study.
48
49 *PLoS One* 2014;**9**(9):e104843. Doi: 10.1080/87559129.2014.981826.
50
51
52
53 29 Donà MG, Gheit T, Latini A, Benevolo M, Torres M, Smelov V, et al. Alpha, beta and gamma
54
55 Human Papillomaviruses in the anal canal of HIV-infected and uninfected men who have sex
56
57 with men. *J Infect* 2015;**71**(1):74–84. Doi: 10.1016/j.jinf.2015.02.001.
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3 30 Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed
4 enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*
5 1988;**239**(4839):487–91.
6
7
8
9
10 31 Pierce Campbell CM, Messina JL, Stoler MH, Jukic DM, Tommasino M, Gheit T, et al.
11 Cutaneous human papillomavirus types detected on the surface of male external genital lesions:
12 A case series within the HPV Infection in Men Study. *J Clin Virol* 2013;**58**(4):652–9. Doi:
13 10.1016/j.jcv.2013.10.011.
14
15
16
17
18
19
20 32 Sichero L, Pierce Campbell CM, Ferreira S, Sobrinho JS, Luiza Baggio M, Galan L, et al. Broad
21 HPV distribution in the genital region of men from the HPV infection in men (HIM) study.
22 *Virology* 2013;**443**(2):214–7. Doi: 10.1016/j.virol.2013.04.024.
23
24
25
26
27
28 33 Paolini F, Rizzo C, Sperduti I, Pichi B, Mafera B, Rahimi SS, et al. Both mucosal and cutaneous
29 papillomaviruses are in the oral cavity but only alpha genus seems to be associated with cancer.
30 *J Clin Virol* 2013;**56**(1):72–6. Doi: 10.1016/j.jcv.2012.09.016.
31
32
33
34
35
36 34 Liu Z, Rashid T, Nyitray AG. Penises not required: a systematic review of the potential for
37 human papillomavirus horizontal transmission that is non-sexual or does not include penile
38 penetration. *Sex Health* 2015;**13**(1):10–21. Doi: <http://dx.doi.org/10.1071/SH15089>.
39
40
41
42
43
44 35 Hazard K, Karlsson A, Andersson K, Ekberg H, Dillner J, Forslund O. Cutaneous human
45 papillomaviruses persist on healthy skin. *J Invest Dermatol* 2007;**127**(1):116–9. Doi:
46 10.1038/sj.jid.5700570.
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure 1
[Click here to download Figure: Nunes-figure1.pptx](#)

A. Prevalence of beta-HPV by country

A. Prevalence of beta-HPV by country

Table 1. β -HPV (Human papillomavirus) type distribution at the genital, anal canal and oral cavity collected at the same visit of 717 men participating in the *HPV Infection in Men Study*.

Species	Type	Genital n(%)	Anal canal n(%)	Oral cavity n(%)
B1	HPV-5	70 (9.8)	34 (4.7)	11 (1.5)
	HPV-8	86 (12.0)	45 (6.3)	20 (2.8)
	HPV-12	77 (10.7)	25 (3.5)	14 (2.0)
	HPV-14	36 (5.0)	10 (1.4)	3 (4.0)
	HPV-19	15 (2.1)	7 (1.0)	4 (0.6)
	HPV-20	16 (2.2)	6 (0.8)	1 (0.1)
	HPV-21	128 (17.9)	79 (11.0)	56 (7.8)
	HPV-24	110 (15.3)	53 (7.4)	30 (4.2)
	HPV-25	3 (0.4)	0 (0.0)	1 (0.1)
	HPV-36	3 (0.4)	3 (0.4)	5 (0.7)
	HPV-47	49 (6.8)	15 (2.1)	11 (1.5)
	HPV-93	10 (1.4)	7 (1.0)	8 (1.1)
	HPV-98	29 (4.0)	17 (2.4)	8 (1.1)
	HPV-99	10 (1.4)	1 (0.1)	0 (0.0)
	HPV-105	46 (6.4)	19 (2.6)	2 (0.3)
	HPV-118	2 (0.3)	2 (0.3)	0 (0.0)
	HPV-124	72 (10.0)	17 (2.4)	2 (0.3)
	HPV-143	2 (0.3)	1 (0.1)	0 (0.0)
B2	HPV-9	46 (6.4)	15 (2.1)	5 (0.7)
	HPV-15	27 (3.8)	7 (1.0)	7 (1.0)
	HPV-17	57 (7.9)	14 (2.0)	9 (1.3)
	HPV-22	127 (17.7)	62 (8.6)	21 (2.9)
	HPV-23	87 (12.1)	26 (3.6)	2 (0.3)
	HPV-37	19 (2.6)	7 (1.0)	0 (0.0)
	HPV-38	198 (27.6)	87 (12.1)	45 (6.3)
	HPV-80	17 (2.4)	10 (1.4)	0 (0.0)
	HPV-100	54 (7.5)	19 (2.6)	15 (2.1)
	HPV-104	13 (1.8)	3 (0.4)	0 (0.0)
	HPV-107	79 (11.0)	30 (4.2)	4 (0.6)
	HPV-110	86 (12.0)	34 (4.7)	17 (2.4)
	HPV-111	97 (13.5)	44 (6.1)	19 (2.6)
	HPV-113	32 (4.5)	9 (1.3)	0 (0.0)
	HPV-120	63 (8.8)	23 (3.2)	2 (0.3)
	HPV-122	54 (7.5)	16 (2.2)	4 (0.6)
	HPV-145	18 (2.5)	4 (0.6)	1 (0.1)
	HPV-151	35 (4.9)	9 (1.3)	3 (0.4)
B3	HPV-49	57 (7.9)	25 (3.5)	8 (1.1)
	HPV-75	24 (3.3)	8 (1.1)	2 (0.3)
	HPV-76	94 (13.1)	43 (6.0)	19 (2.6)
	HPV-115	22 (3.1)	13 (1.8)	0 (0.0)
B4	HPV-92	8 (1.1)	5 (0.7)	0 (0.0)
B5	HPV-96	6 (0.8)	5 (0.7)	0 (0.0)
	HPV-150	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Multiple Infection*	2 types	109 (15.2)	89 (12.4)	46 (6.4)
	3 types	80 (11.2)	52 (7.3)	17 (2.4)
	4 types	65 (9.1)	23 (3.2)	7 (1.0)
	5 types	49 (6.8)	15 (2.1)	5 (0.7)
	6 types	32 (4.5)	15 (2.1)	1 (0.1)
	≥ 7 types	83 (11.6)	11 (1.5)	3 (0.4)

- number of men within each category; frequencies refers to n/total number of men (717)

Table 2. Demographic and sexual characteristics associated with at least one β -HPV type DNA detected at the genital in 717 men participating in the *HPV Infection in Men Study*.

Characteristics	Genital (N=717)		Unadjusted OR (95%CI)	Adjusted OR (95%CI)
	Negative (N=160)	Positive (N=557)		
Country of residence				
US	60 (37.5)	178 (32.0)	0.77 (0.50-1.18)	-
Brazil	51 (31.9)	190 (34.1)	0.97 (0.62-1.50)	-
Mexico	49 (30.6)	189 (33.9)	Ref.	-
Age (years)				
18–30	85 (53.1)	240 (43.1)	Ref.	Ref.
31–44	59 (36.9)	239 (42.9)	0.96 (0.66-1.38)	1.45 (0.98-2.15)
45–70	16 (10.0)	78 (14.0)	1.73 (0.96-3.12)	1.82 (0.98-3.36)
Race				
White	88 (55.0)	282 (50.6)	Ref.	-
Black or African American	24 (15.0)	70 (12.6)	0.91 (0.54-1.53)	-
Asian/pacific islander	2 (1.3)	10 (1.8)	1.56 (0.34-7.26)	-
Other/mixed race	42 (26.3)	169 (30.3)	1.26 (0.83-1.90)	-
Refused	4 (2.5)	26 (4.7)	2.03 (0.69-5.97)	-
Ethnicity				
Hispanic	63 (39.6)	248 (44.8)	Ref.	-
Non-Hispanic	96 (60.4)	306 (55.2)	0.81 (0.57-1.16)	-
Education (years)				
≤12	64 (40.5)	248 (44.8)	Ref.	-
13-15	49 (31.0)	148 (26.7)	0.78 (0.51-1.19)	-
≥16	45 (28.5)	158 (28.5)	0.91 (0.59-1.39)	-
Marital status				
Single	77 (48.4)	209 (37.7)	Ref.	-
Married/Cohabiting	66 (41.5)	296 (53.3)	1.65 (1.14-2.40)	-
Divorced/Separated/Widowed	16 (10.1)	50 (9.0)	1.15 (0.62-2.14)	-
Circumcision				
Not Circumcised	100 (62.5)	354 (63.6)	Ref.	-
Circumcised	60 (37.5)	203 (36.5)	0.96 (0.66-1.38)	-
Lifetime number of female sex partners				
0	29 (18.1)	69 (12.6)	Ref.	-
1	11 (6.9)	49 (8.9)	1.87 (0.85-4.10)	-
2–9	60 (37.5)	215 (39.1)	1.51 (0.90-2.53)	-
10–49	47 (29.4)	193 (35.1)	1.73 (1.01-2.96)	-
+50	13 (8.1)	24 (4.4)	0.78 (0.35-1.73)	-
Lifetime number of male anal sex partners				
0	135 (87.7)	466 (85.7)	Ref.	-
1–9	15 (9.7)	48 (8.8)	0.93 (0.50-1.71)	-
+10	4 (2.6)	30 (5.5)	2.17 (0.75-6.28)	-
Sexual orientation				
MSW	111 (70.3)	413 (75.1)	Ref.	Ref.
MSM	3 (1.9)	16 (2.9)	1.43 (0.41-5.01)	1.43 (0.40-5.06)
MSWM	20 (12.7)	68 (12.4)	0.91 (0.53-1.57)	1.02 (0.58-1.80)
Virgins	24 (15.2)	53 (9.6)	0.59 (0.35-1.00)	0.60 (0.34-1.04)
Cigarette smoking status				
Current	33 (20.6)	109 (19.6)	0.96 (0.66-1.38)	-
Former	34 (21.3)	112 (20.1)	0.91 (0.59-1.43)	-
Never	93 (58.1)	335 (60.3)	Ref.	-
Alcoholic drinks (per month)				
0	31 (20.1)	144 (26.5)	Ref.	Ref.
1–30	121 (78.6)	393 (72.4)	0.70 (0.45-1.08)	0.68 (0.43-1.07)
>30	2 (1.3)	6 (1.1)	0.65 (0.12-3.35)	0.70 (0.13-3.70)

Ref. – Reference value (1.00). Odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (95% CI) were calculated using logistic regression to assess factors associated with any β -HPV detection. Backwards elimination was used to determine factors independently associated with any β -HPV detection at each anatomic site with p value ≤ 0.20 chosen as the priori cutoff for retention in the multivariable model.

Table 3. Demographic and sexual characteristics associated with at least one β -HPV type DNA detected in the anal canal in 717 men participating in the *HPV Infection in Men Study*.

Characteristics	Anal canal (N=717)		Unadjusted OR (95%CI)	Adjusted OR (95%CI)
	Negative (N=328)	Positive (N=389)		
Country of residence				
US	122 (37.2)	116 (29.8)	0.50 (0.35-0.72)	0.55 (0.38-0.80)
Brazil	124 (37.8)	117 (30.1)	0.50 (0.34-0.72)	0.49 (0.33-0.73)
Mexico	82 (25.0)	156 (40.1)	Ref.	Ref.
Age (years)				
18–30	165 (50.3)	160 (41.1)	Ref.	Ref.
31–44	129 (39.3)	169 (43.4)	1.35 (0.99-1.85)	1.30 (0.93-1.82)
45–70	34 (10.4)	60 (15.4)	1.82 (1.13-2.92)	1.59 (0.98-2.58)
Race				
White	185 (56.4)	185 (47.6)	Ref.	-
Black or African American	53 (16.2)	41 (10.5)	0.77 (0.49-1.22)	-
Asian/pacific islander	3 (0.9)	9 (2.3)	3.00 (0.80-11.26)	-
Other/mixed race	75 (22.9)	136 (35.0)	1.81 (1.28-2.57)	-
Refused	12 (3.7)	18 (4.6)	1.50 (0.70-3.20)	-
Ethnicity				
Hispanic	119 (36.5)	192 (49.6)	Ref.	-
Non-Hispanic	207 (63.5)	195 (50.4)	0.58 (0.43-0.79)	-
Education (years)				
≤12	123 (38)	189 (48.7)	Ref.	-
13-15	100 (30.9)	97 (25.0)	0.63 (0.44-0.91)	-
≥16	101 (31.2)	102 (26.3)	0.66 (0.46-0.94)	-
Marital status				
Single	147 (45.1)	139 (35.8)	Ref.	-
Married/Cohabiting	151 (46.3)	211 (54.4)	1.48 (1.08-2.02)	-
Divorced/Separated/Widowed	28 (8.6)	38 (9.8)	1.44 (0.84-2.46)	-
Circumcision				
Not Circumcised	200 (61.0)	254 (65.3)	Ref.	-
Circumcised	128 (39.0)	135 (34.7)	0.83 (0.61-1.13)	-
Lifetime number of female sex partners				
0	41 (12.6)	57 (14.8)	Ref.	-
1	28 (8.6)	32 (8.3)	0.82 (0.43-1.57)	-
2–9	116 (35.7)	159 (41.3)	0.99 (0.62-1.57)	-
10–49	117 (36.0)	123 (32.0)	0.76 (0.47-1.22)	-
+50	23 (7.1)	14 (3.6)	0.44 (0.2-0.95)	-
Lifetime number of male anal sex partners				
0	274 (85.9)	327 (86.3)	Ref.	-
1–9	29 (9.1)	34 (9.0)	0.98 (0.58-1.65)	-
+10	16 (5.0)	18 (4.8)	0.94 (0.47-1.88)	-
Sexual orientation				
MSW	242 (74.7)	282 (73.4)	Ref.	-
MSM	8 (2.5)	11 (2.9)	1.18 (0.47-2.98)	-
MSWM	42 (13.0)	46 (12.0)	0.94 (0.60-1.48)	-
Virgins	32 (9.9)	45 (11.7)	1.21 (0.74-1.96)	-
Cigarette smoking status				
Current	65 (19.9)	77 (19.8)	0.94 (0.64-1.37)	-
Former	73 (22.3)	73 (18.8)	0.79 (0.54-1.15)	-
Never	189 (57.8)	239 (61.4)	Ref.	-
Alcoholic drinks (per month)				
0	69 (21.8)	106 (27.9)	Ref.	-
1–30	245 (77.3)	269 (70.8)	0.72 (0.50-1.01)	-
>30	3 (1.0)	5 (1.3)	1.09 (0.25-4.69)	-

Ref. – Reference value (1.00). Odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (95% CI) were calculated using logistic regression to assess factors associated with any β -HPV detection. Backwards elimination was used to determine factors independently associated with any β -HPV detection at each anatomic site with p value ≤ 0.20 chosen as the priori cutoff for retention in the multivariable model.

Table 4. Demographic and sexual characteristics associated with at least one β -HPV type DNA detected in the oral cavity in 717 men participating in the *HPV Infection in Men Study*.

Characteristics	Oral (N=717)		Unadjusted OR (95%CI)	Adjusted OR (95%CI)
	Negative (N=507)	Positive (N=210)		
Country of residence				
US	186 (36.7)	52 (24.8)	0.40 (0.27-0.6)	0.39 (0.26-0.60)
Brazil	181 (35.7)	60 (28.6)	0.47 (0.32-0.7)	0.46 (0.31-0.70)
Mexico	140 (27.6)	98 (46.7)	Ref.	Ref.
Age (years)				
18–30	246 (48.5)	79 (37.6)	Ref.	Ref.
31–44	207 (40.8)	91 (43.3)	0.84 (0.58-1.22)	1.19 (0.82-1.74)
45–70	54 (10.7)	40 (19.1)	2.31 (1.43-3.73)	1.79 (1.09-2.96)
Race				
White	284 (56)	86 (41.0)	Ref.	-
Black or African American	70 (13.8)	24 (11.4)	1.13 (0.67-1.91)	-
Asian/pacific islander	9 (1.8)	3 (1.4)	1.10 (0.29-4.16)	-
Other/mixed race	123 (24.3)	88 (41.9)	2.36 (1.64-3.40)	-
Refused	21 (4.1)	9 (4.3)	1.42 (0.63-3.20)	-
Ethnicity				
Hispanic	194 (38.6)	117 (55.7)	Ref.	-
Non-Hispanic	309 (61.4)	93 (44.3)	0.50 (0.36-0.69)	-
Education (years)				
≤12	207 (41.2)	105 (50.0)	Ref.	-
13-15	145 (28.9)	52 (24.8)	0.71 (0.48-1.05)	-
≥16	150 (29.9)	53 (25.2)	0.70 (0.47-1.03)	-
Marital status				
Single	219 (43.5)	67 (31.9)	Ref.	-
Married/Cohabiting	239 (47.4)	123 (58.6)	1.68 (1.19-2.39)	-
Divorced/Separated/Widowed	46 (9.1)	20 (9.5)	1.42 (0.79-2.57)	-
Circumcision				
Not Circumcised	310 (61.1)	144 (68.6)	Ref.	-
Circumcised	197 (38.9)	66 (31.4)	0.72 (0.51-1.02)	-
Lifetime number of female sex partners				
0	70 (13.9)	28 (13.5)	Ref.	-
1	44 (8.8)	16 (7.7)	0.91 (0.44-1.87)	-
2–9	188 (37.5)	87 (41.8)	1.16 (0.70-1.92)	-
10–49	171 (34.1)	69 (33.2)	1.01 (0.60-1.70)	-
+50	29 (5.8)	8 (3.9)	0.69 (0.28-1.69)	-
Lifetime number of male anal sex partners				
0	420 (85.5)	181 (87.4)	Ref.	-
1–9	43 (8.8)	20 (9.7)	1.08 (0.62-1.89)	-
+10	28 (5.7)	6 (2.9)	0.50 (0.20-1.22)	-
Sexual orientation				
MSW	366 (73.2)	158 (76.0)	Ref.	-
MSM	14 (2.8)	5 (2.4)	0.83 (0.29-2.34)	-
MSWM	66 (13.2)	22 (10.6)	0.77 (0.46-1.30)	-
Virgins	54 (10.8)	23 (11.1)	0.99 (0.59-1.66)	-
Cigarette smoking status				
Current	111 (21.9)	31 (14.8)	0.58 (0.37-0.90)	0.50 (0.32-0.80)
Former	107 (21.2)	39 (18.6)	0.75 (0.49-1.14)	0.74 (0.48-1.13)
Never	288 (56.9)	140 (66.7)	Ref.	Ref.
Alcoholic drinks (per month)				
0	119 (24.1)	56 (27.6)	Ref.	-
1–30	368 (74.5)	146 (71.9)	0.84 (0.58-1.22)	-
>30	7 (1.4)	1 (0.5)	0.30 (0.04-2.53)	-

Ref. – Reference value (1.00). Odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (95% CI) were calculated using logistic regression to assess factors associated with any β -HPV detection. Backwards elimination was used to determine factors independently associated with any β -HPV detection at each anatomic site with p value ≤ 0.20 chosen as the priori cutoff for retention in the multivariable model.