THALITA ARAUJO SANT'ANA

**ATIVIDADE MUCOSOTRÓPICA DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) NO
PROCESSO CARCINOGENICO EM DIFERENTES SÍTIOS DE INFECÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP / Instituto Butantan - IPT, para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

SÃO PAULO
2017

THALITA ARAUJO SANT'ANA

**ATIVIDADE MUCOSOTRÓPICA DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) NO
PROCESSO CARCINOGENICO EM DIFERENTES SÍTIOS DE INFECÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP / Instituto Butantan IPT, para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Dra Rita de Cássia Stocco.

SÃO PAULO
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Sant\'Ana, Thalita Araújo
Atividade mucosotrópica do Papilmavírus Humano
(HPV) no processo carcinogênico em diferentes sítios
de infecção / Thalita Araújo Sant\'Ana; orientador
Rita de Cássia Stocco . -- São Paulo, 2017.
152 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. HPV. 2. Sítios de infecção. 3. Disseminação
viral. 4. Achados citológicos. 5. Transcritos
virais. I. , Rita de Cássia Stocco, orientador. II.
Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato (a): Thalita Araújo Sant'Ana

Título da Tese: Atividade mucosotrópica do Papilomavírus Humano (HPV) no processo carcinogênico em diferentes sítios de infecção.

Orientador (a): Profa. Dra. Rita de Cássia Stocco

A comissão julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública
realizada a/...../....., considerou:

() Aprovado (a) () Reprovado (a)

Examinador (a): Assinatura:.....
Nome:
Instituição:

Examinador (a) : Assinatura:.....
Nome:
Instituição:

Examiandor (a): Assinatura:.....
Nome:
Instituição:

Examinador (a): Assinatura:.....
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:.....
Nome:
Instituição:

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA

COMPLEXO HOSPITALAR
HUOC/PROCAPE

Continuação do Parecer: 1.160.681

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto APROVADO, conforme a Resolução 466/12.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto APROVADO, conforme a Resolução 466/12.

RECIFE, 28 de Julho de 2015

Assinado por:
Magaly Bushatsky
(Coordenador)

Endereço: Rua Arnóbio Marques, 310

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.100-130

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)3184-1460

Fax: (81)3184-1271

E-mail: cep_huoc.procape@yahoo.com.br

Ao meu amado avô **Fernando Pereira de Araújo**, a pessoa mais bondosa, amorosa, generosa e digna que eu já conheci na vida. Um ser humano inexplicável, extraordinário, sem você nada disso seria possível. Meu eterno obrigada, vovô.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a **Deus**, pela graça da vida, por ter me dado toda força, coragem e a vontade de realizar mais essa etapa da minha vida e por não ter me deixado fracassar diante das dificuldades.

Agradeço a minha amada família, minha mãe **Fernanda Maria Agostinho de Araújo**, quem me ensinou o valor do estudo, da dignidade, do amor incondicional e que sempre me apoiou em todas as minhas escolhas. Meu pai, **Clodulfo Ribeiro Sant'Ana Filho** a quem eu devo os ensinamentos da persistência, luta e abdicção, quem me ensinou que na vida nós não podemos ter tudo, e que para alcançar aquilo que realmente queremos é necessário mais que correr atrás. Minha amada irmã **Thatiane Araújo Sant'Ana**, quem sempre esteve do meu lado, quem sempre torceu pelas minhas conquistas como se fossem dela e quem eu sei que posso contar em todas as horas.

Aos meus avôs **Fernando Pereira de Araújo**, **Maria Agostinho de Araújo** (*in memoriam*) **Clodulfo Ribeiro Sant'Ana** e **Miracy Sant'Ana**, por serem presentes, amáveis, por dedicarem tanto amor por mim e por serem tão especiais na minha vida.

Ao meu cunhado **Marcelo Menezes** e a amiga **Kátia Gajete** por todas as palavras de apoio e incentivo durante esses anos. E por serem fundamentais e essenciais em épocas em que tive que estar ausente.

A minha orientadora **Dra. Rita de Cássia Stocco**, não tenho palavras para agradecer a senhora, obrigada por ter me aceitado como orientada, por ter caminhado junto comigo durante esses quatro anos, por ter me ajudado, me auxiliado nesse trabalho e por ter sempre estado do meu lado, o meu eterno e muito obrigada.

A **Dra. Maria Tereza Cartaxo**, por ter me aceitado no Laboratório de Biologia Molecular, onde dei os primeiros passos como aluna e pesquisadora, onde tudo começou, obrigada pelo oportunidade, por ter me dado a chance de realizar minha pesquisa e tantas outras realizações que alcançamos juntas.

A **Rayssa Aciolly**, minha grande companheira nessa jornada, quem esteve do meu lado na bancada, nas coletas e em tantos procedimentos nesse quatro anos, obrigada por nunca ter dito não e por ter feito tanto, essa realização é sua também.

A **Tatiana Villarim**, uma pessoa maravilhosa, atenciosa, amiga e uma profissional exemplar, obrigada por todo o trabalho, ajuda e dedicação.

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Biologia Molecular, **Luísa Lima**, **Bárbara Oliveira**, **Jonathan Medeiros**, **Giwellington Albuquerque**, **Juliana Souza**,

Amanda Nunes, Nelsione Salles, Maria do Carmo Oliveira, Maíra Mafra, Oswaldo Júnior, Elker Iene, Edilene Dellalubera, obrigada pelo maravilhoso convívio e pela amizade.

Ao **CISAM**, por aceitar a realização desse trabalho e por disponibilizar o local para as coletas;

As **pacientes do CISAM**, o meu muito obrigada, obrigada pela disponibilidade em participar da pesquisa, sem dúvidas, sem vocês, nada disso seria possível.

Ao médico **Dr. Stephan Welkovic**, agradeço imensamente a participação nesse trabalho e toda a colaboração nas coletas das pacientes;

Aos **funcionários, enfermeiras e técnicas do CISAM**, obrigada pelo suporte, pela atenção e disponibilidade nesse trabalho, sempre fui bem atendida e recepcionada por vocês.

A **Aloy Silva**, por todo o suporte nas coletas;

À **Adriana Vieira**, obrigada pela amizade, pela ajuda, por todas as discussões científicas, por muitas vezes clarear meus pensamentos e por todo o auxílio em tudo que eu precisei.

À **Nara Diniz**, foram anos trabalhando lado a lado, obrigada pela paciência, pelos ensinamentos e por todo o suporte durante esses anos.

Ao professor **Rafael Moreira**, por todo o suporte na parte estatística do trabalho;

Ao **programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia**, pela oportunidade de crescimento científico e pessoal, aos professores, por tantos ensinamentos e aos funcionários, sempre tão solícitos em ajudar;

Aos amigos **Aline Teixeira, Luis Virgílio, Katie Riciluca, Thiago Oliveira, Giovana Salustiano, Andrew Krupinski, Bruno Yamamoto, Marcela Bordenalli e Ivana Campos**, foram as primeiras pessoas que conheci no doutorado, os primeiros amigos que fiz na primeira disciplina que cursei e caminhamos juntos durante esses quatro anos. Meu eterno obrigada pela amizade, pelos momentos de descontração e por saber que sempre posso contar com vocês.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Genética do Instituto Butantan, **Rodrigo Araldi, Rodrigo Franco, Jaqueline Mazzuchelli, Diego Módolo, Taylene Alexandra, Roberta Fiusa, Dra. Suely Assaf**, obrigada pela receptividade e por toda a ajuda disponibilizada durante esse anos.

Agradeço a amiga **Thatiana Melo**, por toda a atenção, por me ajudar em áreas desconhecidas, pelas discussões e por receber sempre tão carinhosamente.

À amiga de infância **Luiza Moraes**, obrigada por sempre me receber de braços abertos na sua casa, pela amizade e por ser minha família aqui, fazendo com que eu nunca me sentisse sozinha.

À **Renata Freitas**, pela receptividade de sempre, obrigada.

À todos os meus amigos, de Recife, do Rio de Janeiro e de São Paulo, seria injusto citar nomes, mas queria deixar registrado o meu muito obrigada, por cada palavra de incentivo, de apoio, por segurarem a onda, por entenderem minha ausência, pela torcida e por serem tão especiais. Eu sei, eu tenho os melhores amigos do mundo.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho, seja com uma palavra de apoio ou um suporte técnico, recebam meus sinceros agradecimentos.

A coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Persistir, testar, falhar, descobrir e alcançar. Nós incansavelmente temos dentro de nós a ignorância e a sabedoria, lutando arduamente para alcançar o desconhecido e revelar tudo aquilo que mudará a ciência, os protocolos, as gerações de indivíduos, a medicina e a vida. Tantos foram os feitos que nos trouxeram até aqui, tantos foram os erros e acertos, tantas foram as curas do corpo, da mente e da alma, tantos foram os desafios e tantas foram as conquistas da verdadeira sabedoria, o saber de que nada sabemos. A luta continuará sendo árdua para alcançar, através da inquietude dos cientistas, o processo solitário da cura (KATIA GAJETE).

RESUMO

SANT'ANA, T. A. **Atividade mucosotrópica do Papilomavírus Humano (HPV) no processo carcinogênico em diferentes sítios de infecção.** 2017. 152 f Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O Papilomavírus Humano (HPV) é uma das mais incidentes e prevalentes infecções do mundo atual, sendo o comportamento sexual um fator determinante para a o acometimento da infecção. Estima-se que 75% das pessoas sexualmente ativas irão se infectar pelo vírus, em algum momento de suas vidas, dessa forma, o HPV é um importante desafio de saúde pública. O HPV tem sido associado a vários tipos de câncer, além do câncer cervical, já foi associado com o câncer oral e de orofaringe. O fato do HPV também ter correlação com as lesões precursoras do câncer cervical aumenta a importância da detecção precoce do vírus e da elucidação dos fatores de risco para o acometimento da infecção. O HPV já foi detectado em diversas amostras biológicas, entre elas estão a mucosa cervical, a mucosa oral e o sangue periférico. Diante da alta incidência do HPV na população brasileira e do baixo número de estudos que abordem a disseminação sistêmica do vírus, é relevante a análise da presença do DNA viral nos diferentes sítios de infecção em um mesmo indivíduo. Dessa forma, este trabalho visa estudar o comportamento do HPV na mucosa oral, na cérvix e no sangue, procurando avaliar características do vírus e buscando um maior entendimento do seu mecanismo de disseminação. O material analisado foi constituído por amostras das mucosas cervical, oral e do sangue de cinquenta pacientes do sexo feminino, perfazendo um total de 150 sítios. A detecção viral foi realizada por PCR com iniciadores genéricos e específicos para os tipos HPV-16, HPV-18, HPV-31 e HPV-33, todos HPVs de alto risco. Nenhuma paciente foi negativa para os quatro tipos virais nos três sítios analisados. O HPV-16 foi o tipo viral mais presente nos sítios de infecção e também foi o tipo viral mais prevalente nos três sítios, simultaneamente, 32 pacientes apresentaram esse perfil. Todos os quatro tipos virais que estavam presente no sangue, também estavam presentes na mucosa cervical, na mucosa oral ou em ambas as mucosas. Através da citologia foi possível identificar a presença de seis achados citológicos, sugestivos da infecção pelo HPV. Na mucosa cervical detectamos estes achados em 23 pacientes (46%) e na mucosa oral em 24 pacientes (48%). Também foi possível realizar a detecção dos transcritos virais de E6, E6/E7 e L1 nos sítios analisados. A presença simultânea do mesmo tipo viral nos três sítios de infecção, reforça a provável disseminação do HPV em um mesmo indivíduo e o possível papel do sangue como um disseminador no organismo. Os resultados do nosso trabalho demonstram a alta prevalência do HPV e a atividade viral nos três sítios analisados.

Palavras-chave: Papilomavírus humano. Mucosa cervical. Mucosa oral. Sangue periférico. Disseminação viral. Achados citológicos.

ABSTRACT

SANT'ANA, T. A. **Mucosotropic activity of Human Papillomavirus (HPV) in carcinogenic process at different infection sites.** 2017. 152 p Ph. D. Thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Human Papillomavirus (HPV) is one of the most incident and prevalent infections of the current world, with sexual behavior being one determining factor of infection. It is estimated that 75% of sexually active people will become infected with the virus in some moment of their lives. Thus, HPV is an important challenge in public health. It has been associated to several types of cancers; besides cervical cancer it was already associated to oral and oropharyngeal cancer. The fact of HPV also have correlation with cervical cancer precursor lesions, increase the importance of virus early detection and elucidation of risk factors for infection. HPV was already detected in several biological samples, including cervical mucosa, oral mucosa and peripheral blood. In view of the high incidence of HPV in Brazilian population and low number of studies that address viral systemic spread, analysis of viral DNA presence is relevant at the different sites of infection in the same individual. Thus, this work aims to study HPV behavior in oral, cervical mucosa and blood, trying to evaluate virus characteristics and seeking a better understanding of its mechanism and spreading. Analyzed material was constituted by cervical, oral mucosa and blood samples of fifty female patients, making a total of 150 sites. Viral detection was performed by PCR, with generic and specific primers for the types HPV-16, HPV-18, HPV-31 and HPV-33, all high-risk HPVs. No patient was negative in the four viral types at the three analyzed sites. HPV-16 was the most prevalent viral type at the three sites. Simultaneously, 32 patients had this profile. All four viral types that were present in the blood were also present in the cervical mucosa, oral mucosa or both. Through cytology it was possible to identify the presence of six cytologic findings, suggestive of infection by HPV. These findings were detected in cervical mucosa of 23 patients (46%) and in oral mucosa of 24 patients (48%). In addition, it was possible to detect viral transcripts of E6, E6 / E7 and L1 at the analyzed sites. Simultaneous presence of the same viral type at the three sites of infection reinforces the probable HPV spreading in a same individual and the possible role of blood as a disseminator in the organism. The results of our study also demonstrate HPV high prevalence and viral activity in the three analyzed sites.

Keywords: Human Papillomavirus. Cervical mucosa. Oral mucosa. Peripheral blood. Viral spreading. Cytological findings.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Filogenia dos PVS baseada por meio de sequências da ORF L1	27
Figura 2 - Modelo estrutural do genoma do Papilomavírus Humano.....	29
Figura 3 - Relação de evolução entre os Papilomavírus Humano (HPVs)	30
Figura 4 - Prevalência de alguns tipos do HPV nas diferentes regiões do Brasil.....	34
Figura 5 - Representação esquemática da entrada do HPV	38
Figura 6 - Estágios do ciclo viral do Papilomavírus Humano em epitélio estratificado escamoso. Expressão das proteínas precoces e tardias	39
Figura 7 - Interação das oncoproteínas do Papilomavírus Humano	41
Figura 8 - Verrugas associadas a infecção pelo HPV	43
Figura 9 - Tipo de lesões mucosas benignas	44
Figura 10 - Lesões intraepiteliais do colo do útero diagnosticadas pela citologia e pela histologia	46
Figura 11 - Modelo de progressão do câncer cervical	48
Figura 12 - Diferentes sítios anatômicos que podem ser acometidos no câncer de cabeça e pescoço.....	49
Figura 13 - Porções do colo do útero e seus respectivos epitélios.....	51
Figura 14 - Células escamosas e células glandulares.....	52
Figura 15 - Corrida eletroforética em gel de agarose 2% com os produtos da PCR para o gene da β -actina	70
Figura 16 - Corrida eletroforética em gel de agarose 2% com produtos da PCR com os iniciadores MY e GP+ para o gene L1 do HPV	71
Figura 17 - Corrida eletroforética em gel de agarose 2% com produtos da PCR para detecção do HPV-16 (A) e HPV-18 (B)	73
Figura 18 - Corrida eletroforética em gel de agarose 2% com produtos da PCR para detecção do HPV-31 (A) e HPV-33 (B)	73
Figura 19 - Achados citológicos na mucosa cervical.....	93
Figura 20 - Achados citológicos na mucosa oral.....	94
Figura 21 - Corrida eletroforética em gel de agarose 2% com produtos da RT- PCR para detecção dos transcritos virais de E6 de HPV-16.....	97

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição percentual das variáveis sociodemográficas e biológicas das pacientes	69
Gráfico 2 - Distribuição percentual das variáveis comportamentais e clínicas das pacientes .	70
Gráfico 3 - Distribuição percentual dos iniciadores genéricos nos três sítios de infecção	72
Gráfico 4 - Distribuição percentual do HPV-16, HPV-18, HPV-31 nos três sítios de infecção	75
Gráfico 5 - Detecção do HPV com iniciadores genéricos e específicos nos três sítios de infecção	75
Gráfico 6 - Comparação dos sítios negativos com os iniciadores genéricos (MY e GP) e com os iniciadores específicos (HVP-16, HPV-18, HPV-31 e HPV-33)	76
Gráfico 7 - Co-infecção do HPV-16, HPV-18, HPV-31 e HPV-33 nos três sítios de infecção	91
Gráfico 8 - Correlação da co-infecção na mucosa cervical com o tipo de lesão intraepitelial das pacientes	92
Gráfico 9 - Tipos dos achados citológicos detectados na mucosa cervical e na mucosa oral. .	96
Gráfico 10 - Detecção dos transcritos virais de E6 , E6/E7 e L1 do HPV nos três sítios de infecção	98

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Correlação entre a terminologia dos graus de NIC e do Sistema Bethesda	47
Quadro 2 - Iniciadores utilizados na análise da qualidade do DNA e na detecção do HPV, suas sequências, ciclagens para amplificação e os tamanhos esperados dos fragmentos amplificados	64
Quadro 3 - Iniciadores específicos utilizados na tipificação do HPV para HPV-16 e HPV-18	65
Quadro 4 - Iniciadores específicos utilizados na tipificação do HPV para HPV-31 e HPV-33	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Detecção do HPV na região L1 com os iniciadores genéricos	71
Tabela 2 - Detecção do HPV-16, HPV-18, HPV-31 e HPV-33 nos três sítios de infecção	74
Tabela 3 - Análise das características comportamentais, clínicas e biológicas com a detecção do HPV-16, HPV-18, HPV-31 e HPV-33 na mucosa cervical.....	78
Tabela 4 - Análise das características comportamentais e biológicas com a detecção do HPV-16, HPV-18, HPV-31 e HPV-33 na mucosa oral	82
Tabela 5 - Detecção dos tipos virais na mucosa oral e no sangue periférico em relação as lesões intraepiteliais na mucosa cervical.....	84
Tabela 6 - Descrição do HPV-16, HPV-18, HPV-31 e HPV-33 em mais de um sítio de infecção	85
Tabela 7 - Correlação do HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33 nos três sítios de infecção....	87
Tabela 8 - Identificação dos achados citológicos nas mucosas cervical e oral e detecção do HPV-16, HPV-18, HPV-31 e HPV-33.....	95
Tabela 9 - Detecção dos transcritos virais e dos achados citológicos	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BVP	PAPÍLOMAVIRUS BOVINO
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCEO	Carcinoma de Células Escamosas Oral
CDK	Ciclinas Dependentes de Kinases
CE	Câncer de Esôfago
CEC	Carcinoma Escamoso Celular
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CIAP	Centro Integrado de Anatomia Patologia
CISAM	Centro Integrado de Saúde Amaury de Medeiros
DNA	ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO
E	Proteínas virais classificadas como precoces (E-Early)
E2F	Proteína se liga e inativa fatores de transcrição
E6AP	Proteína (Ubiquitina ligase- E3)
EA	Eosina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (Ethylenediamine tetraacetic acid)
EV	Epidermodisplasia Verruciforme
G6	Orange
HPSG	Glicosaminoglicanos de Heparan Sulfato
HPV	PAPILOMAVÍRUS HUMANO
HSIL	Lesão intraepitelial de alto grau
hTERT	Transcriptase Reversa da Telomerase Humana
HUOC	Hospital Universitário Oswaldo Cruz
ICTV	Comitê internacional de taxonomia dos vírus (International Committee on the taxonomy of viroses)
IgA	Imunoglobulina A
Kb	Kilobase
L	Proteínas virais classificadas como tardias (L-Late)
LCR	Região longa de controle (Long Control Region)
LSIL	Lesão intraepitelial de baixo grau
ml	Mililitro
Ng	Nanograma

NIC	Neoplasias intraepiteliais cervicais
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORFs	Quadros abertos de leituras (Open reading frames)
OSCC	Carcinoma escamoso celular oral da orofaringe
P53	Proteína supressora tumoral
p97	Promotor
pb	Pares de base
pbMCs	Células mononucleares do sangue periférico (Peripheral blood mononuclear cells)
pbS	Tampão fosfato-salino (Phosphate buffered saline)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction)
pRB	Proteína do Retinoblastoma
PV	Papilomavírus
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ácido ribonucleico
TBS	Sistema Bethesda
Tf	Transferina
TfR	Receptor de Transferrina
UPE	Universidade de Pernambuco
URR	Região de regulação Upstream (Upstream Regulation Region)
USP	Universidade de Pernambuco
ZT	Zona de Transformação
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	22
1.1 Objetivos.....	24
1.1.1 <i>Objetivo geral</i>	24
1.1.2 <i>Objetivos específicos</i>	24
2 REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1 Papilomavírus (PV), aspectos gerais.....	25
2.2 Classificação geral dos PVs.....	26
2.3 Organização genômica do PV	27
2.4 Papilomavírus Humano (HPV).....	29
2.5 Tipos virais do HPV	31
2.6 Prevalência do HPV	32
2.7 Características de infecção pelo HPV	35
2.8 Fatores de risco para HPV	35
2.9 Processo de infecção viral	36
2.10 Ação das proteínas do HPV no processo carcinogênico.....	39
2.10.1 <i>Lesões causadas pelo HPV</i>	42
2.10.1.1 <i>Lesões benignas associadas ao HPV</i>	42
2.10.2 <i>Lesões malignas associadas ao HPV</i>	45
2.10.2.1 <i>Câncer cervical</i>	45
2.10.2.2 <i>Câncer de cabeça e pescoço</i>	48
2.11 Sítios de infecção do HPV	51
2.11.1 <i>Colo do útero</i>	51
2.11.2 <i>Cavidade oral</i>	53
2.11.3 <i>Sangue periférico</i>	55
2.12 Transmissão do HPV.....	56
2.13 Disseminação do HPV entre sítios em um mesmo indivíduo	58
3 MATERIAL E MÉTODOS	60
3.1 Localização do estudo	60
3.2 Seleção de pacientes	60
3.3 Coleta de material biológico.....	60
3.3.1 <i>Coleta de sangue periférico</i>	60
3.3.2 <i>Coleta de células da mucosa cervical para extração de DNA e RNA</i>	60

3.3.3 Coleta de células da mucosa cervical e confecção do esfregaço nas lâminas.....	61
3.3.4 Coleta de células da mucosa oral para extração de DNA e RNA	61
3.3.5 Coleta de células da mucosa oral e confecção do esfregaço na lâmina.....	61
3.4 Análise Molecular do DNA	62
3.4.1 Extração de DNA de sangue.....	62
3.4.2 Extração de DNA das mucosas cervical e oral	62
3.4.3 Quantificação do DNA	62
3.4.4 Avaliação da qualidade do DNA extraído.....	62
3.4.5 Detecção por PCR convencional com os iniciadores genéricos MY e GP+.....	63
3.4.6 Detecção específica com iniciadores para HPV-16 e HPV-18.....	64
3.4.7 Detecção específica com iniciadores para HPV-31 e HPV-33	65
3.5 Análise molecular do RNA.....	66
3.5.1 Separação de células.....	66
3.5.2 Extração de RNA.....	66
3.5.3 Construção do cDNA.....	67
3.5.4 Amplificação dos transcritos virais de E6 do HPV-16 e de E6/E7 do HPV-18.....	67
3.5.5 Amplificação dos transcritos virais de L1	67
3.6 Coloração dos esfregaços com amostras citológicas.....	67
3.7 Confecção das lâminas para citologia.....	67
3.8 Análise estatística	68
3.9 Considerações éticas.....	68
4 RESULTADOS	69
4.1 Perfil das pacientes: dados demográficos, biológicos, comportamentais e clínicos ...	69
4.2 Avaliação da qualidade do DNA extraído a partir das amostras coletadas	70
4.3 Detecção das sequências de DNA de HPV em amostras de sangue periférico, mucosas oral e cervical utilizando os iniciadores genéricos MY e GP.....	71
4.4 Identificação do HPV-16, HPV-18, HPV-31 e HPV-33 em amostras de sangue periférico, mucosas oral e cervical que foram positivas e negativas para os iniciadores genéricos.....	72
4.5 Comparação da detecção com os iniciadores genéricos e específicos	75
4.6 Associação dos tipos virais (HPV-16, HPV-18, HPV-31 e HPV-33), presentes na mucosa cervical e oral com as características comportamentais, clínicas e biológicas.....	77

4.7 Lesão intraepitelial x detecção dos quatro tipos do HPV na mucosa oral e sangue periférico	83
4.8 Comparação da presença dos tipos virais nos três sítios de infecção	85
4.9 Correlação dos quatro tipos virais nos três sítios de infecção	86
4.10 Co-infecção dos quatro tipos virais nos três sítios de infecção	90
4.11 Correlação da co-infecção na mucosa cervical com as lesões intraepiteliais de alto e baixo grau	91
4.12 Identificação dos achados citológicos nos esfregaços celulares da mucosa cervical e mucosa oral	92
<i>4.12.1 Achados citológicos e a detecção dos quatro tipos virais na mucosa cervical e mucosa oral.....</i>	<i>94</i>
<i>4.12.2 Descrição dos achados citológicos na mucosa cervical e na mucosa oral.....</i>	<i>96</i>
4.13 Avaliação dos transcritos virais do HPV na mucosa cervical, na mucosa oral e no sangue periférico	97
4.14 Correlação dos achados citológicos com a atividade viral nas mucosa oral.....	98
5 DISCUSSÃO	100
5.1 Análise da população estudada.....	100
5.2 Presença do HPV nos três sítios de infecção	101
5.3 Correlação das características comportamentais, clínicas e biológicas com os quatro tipos virais do HPV na mucosa cervical e mucosa oral	104
5.4 Lesão intraepitelial e os quatro tipos virais na mucosa oral e no sangue periférico	107
5.5 Presença dos quatro tipos virais nos sítios de infecção simultaneamente	108
5.6 Presença de diferentes tipos virais em diferentes sítios de infecção	113
5.7 Co-infecção dos quatro tipos virais nos três sítios de infecção	113
5.8 Análises dos achados citológicos na mucosa cervical e mucosa oral	115
5.9 Transcritos virais nos sítios de infecção	118
5.10 Ação viral do HPV na mucosa oral.....	119
6 CONCLUSÕES.....	121
REFERÊNCIAS*	123
APÊNDICES	
A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	149
B - FICHA ANAMNÉTICA	151

1 INTRODUÇÃO

Os Papilomavírus (PV) são um grupo altamente diverso de vírus, conhecidos por infectar hospedeiros diferentes, podendo infectar o epitélio escamoso da pele e mucosas, causando lesões benignas ou malignas (BERNARD et al., 2010). Uma das mais distintas características do grupo dos papilomavírus é que eles são altamente espécies-específicos. Além disso, apresentam uma preferência de tipos dos papilomavírus por sítios anatômicos distintos, onde eles podem causar lesões com aspectos clínicos diferentes (EGAWA et al., 2015).

São vírus com uma estrutura icosaédrica, não envelopados, que podem induzir o aparecimento de papilomas epiteliais benignos e têm sido implicados etiológicamente no carcinoma cervical humano e em outros tipos de carcinomas epiteliais (DAY et al., 2004). O genoma viral é constituído por Ácido Desoxirribonucleico (DNA) circular dupla-fita, com aproximadamente 8 Kb, envolto por um capsídeo viral formado pelas proteínas tardias L1 e L2 e diâmetro de aproximadamente 50 nm.

O genoma dos PVs é dividido em três regiões: região precoce (E- *Early*) – que codifica as proteínas E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, envolvidas na replicação viral e transformação oncogênica- região tardia (L-*Late*)- que codifica as proteínas responsáveis por formar o capsídeo viral- e a região não codificante *Long Control Region* (LCR) ou *Upstream Regulatory Region* (URR), que contém elementos de controle, que incluem origens de replicação (MODLEY et al., 2003).

Os PVs podem ser encontrados em um grande número de vertebrados, onde um dos mais conhecidos e mais estudado é o Papilomavírus Humano (HPV). O HPV é uma das mais incidentes e prevalentes infecções do mundo atual, sendo o comportamento sexual um fator determinante para a exposição e para o acometimento da infecção. Por ser um vírus com uma alta prevalência de infecção no Brasil, podendo acometer tanto homens quanto mulheres e por ter relevância em alguns tipos de câncer, sem dúvidas o HPV é um importante desafio de saúde pública.

Mais de 200 tipos de HPVs já foram identificados, eles são agrupados em cinco gêneros (alphapapillomavirus, betapapillomavirus, gammapapillomavirus, mu papillomavirus e nu papillomavirus) e também são divididos em HPVs de alto e baixo risco dependendo do seu potencial oncogênico (HÜBBERS; AKGÜL, 2015). Os HPVs são agrupados de acordo com o seu tropismo por determinados tipos de epitélio, sendo basicamente divididos em mucosos e cutâneos.

A entrada do HPV na célula hospedeira depende da ligação ao sulfato de heparina na membrana basal, essa ligação desencadeia alterações conformacionais que afetam as proteínas estruturais L1 e L2, essas alterações são um pré-requisito para a entrada do HPV na célula (SAPP; BIENKOWSKA-HABA, 2009). O vírus entra mediante endocitose, resultando no estabelecimento da infecção viral. Após a infecção, o genoma do vírus é mantido com um baixo número de cópias e a expressão dos genes virais é regulada e dependente da diferenciação das células infectadas pelo HPV.

A infecção pelo HPV é normalmente combatida pelo sistema imune do hospedeiro, no entanto, a persistência da infecção pode desencadear uma progressão para lesão maligna em companhia de outros fatores de risco. O HPV representa uma causa bem estabelecida para o câncer cervical e um fator significativo no desenvolvimento do câncer anogenital e no câncer de cabeça e pescoço, além da presença do vírus já ter sido detectada em carcinomas de mama (LAWSON et al., 2015) e no câncer de pulmão (CHEN et al., 2014).

A detecção do HPV não está só restrita a locais relevantes ao seu mecanismo de infecção, sendo possível detectar a presença do vírus em diferentes amostras biológicas como a mucosa oral, sangue periférico, placenta, sêmen, plasma e soro (BODAGHI et al., 2005; CECCATO JUNIOR et al., 2015; DEBUZ; OLIVEIRA; ALVES, 2010; FORESTA et al., 2013; FREITAS et al., 2013; JABERIPOUR et al., 2011; TSENG et al., 1999), de forma que a presença do vírus nesses sítios levantam questionamentos sobre a rota de transmissão e o papel que o mesmo pode ter, tornando-se importante analisar a presença do HPV nesses locais.

Além disso, embora a história natural da infecção das mucosas cervical e oral pelo HPV tenha sido bastante investigada, a capacidade que o vírus possui de infectar diferentes mucosas em um mesmo indivíduo ainda não está bem elucidada, levantando suposições sobre como essas mucosas foram infectadas, se a infecção ocorreu ao mesmo tempo ou se podem existir vias de disseminação do vírus no organismo.

A percepção que a detecção do HPV no sangue, não está só restrita a células metastáticas liberadas em estágios mais avançados do câncer (FORESTA et al., 2013), chama a atenção para o fato de que, o sangue, pode estar atuando como um agente disseminador do vírus no organismo. Assim sendo, diante da alta incidência do HPV na população brasileira e do baixo número de estudos que abordem a disseminação sistêmica do vírus, é relevante a análise da presença do DNA viral nos diferentes sítios de infecção, de forma que essa análise possa ajudar na compreensão da cadeia de infecção-disseminação-reinfecção do HPV no organismo contribuindo para o esclarecimento de possíveis tumores associados ao vírus.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar comparativamente a presença e atividade do Papilomavírus Humano (HPV) em amostras de cérvix, mucosa oral e sangue, em mulheres, contribuindo para o esclarecimento de possíveis tumores associados ao vírus.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Estabelecer através de exame anamnético o perfil destas mulheres em relação aos hábitos de vida, de maneira a identificar possíveis fatores de risco que possam estar associados a infecção pelo Papilomavírus Humano;
- b) Detectar sequências de DNA de HPV em amostras de sangue periférico, mucosas oral e cervical utilizando iniciadores genéricos;
- c) Identificar o HPV-16, HPV-18, HPV-31 e HPV-33 em amostras de sangue periférico, mucosas oral e cervical que foram positivas e negativas para os iniciadores genéricos;
- d) Associar os tipos virais (HPV-16, HPV-18, HPV-31 e HPV-33), separadamente, presentes na mucosa cervical e oral com os hábitos de vida identificados como possíveis fatores de risco para infecção viral;
- e) Comparar a presença dos tipos virais nos três sítios de infecção simultaneamente para verificar a possível disseminação viral;
- f) Correlacionar a presença da co-infecção pelos quatro tipos virais nos três sítios de infecção;
- g) Identificar achados citológicos nos esfregaços das mucosas oral e cervical;
- h) Identificar os transcritos virais de E6, E6/E7 e L1 para verificar suas possíveis atividades virais nas mucosas cervical e oral e no sangue periférico;
- i) Correlacionar os achados citológicos com a atividade viral na mucosa oral para demonstrar a ação do vírus nesses sítios.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Papilomavírus (PV), aspectos gerais

Os papilomavírus (PVs) constituem um grupo de vírus que infecta o epitélio de vertebrados, incluindo humanos, podendo causar lesões ou persistir de forma assintomática (BERNARD et al., 2010). Lesões verrugosas e papilomatosas que comprometem a pele são descritas desde a Grécia antiga, mas as pesquisas sobre os papilomavírus só tiveram início no século XX (LETO et al., 2011). Em 1949 por meio da microscopia eletrônica foi relatada a primeira observação de partículas de PV em verrugas humanas (STRAUSS; BUNTING; MELNICK, 1950) e em 1963 a estrutura do genoma viral foi desvendada (CRAWFORD; CRAWFORD, 1963).

Foram necessárias mais de três décadas de pesquisa e sequências isoladas de diversos PVs para estabelecer um banco de dados que permitiu um sistema de classificação desses vírus (VILLIERS et al., 2004). Mais de 300 papilomavírus já foram identificados e completamente sequenciados (EGAWA et al., 2015).

Com mais de 240 tipos distintos classificados em 37 gêneros, os papilomavírus podem ser o maior e mais bem sucedido grupo de vírus em vertebrados. É importante ressaltar que os PVs são um surpreendente sucesso evolutivo (VAN DOORSLAER, 2013).

Os PVs são vírus altamente espécie-específicos que podem infectar quase todos os vertebrados, como mamíferos, aves e répteis (VILLIERS et al., 2004). São vírus capazes de produzir infecções, exibindo um tropismo restrito ao hospedeiro e requerem uma diferenciação epitelial (WANG; RODEN et al., 2013). Além disso uma das características mais distintivas do grupo dos papilomavírus, é a preferência particular dos tipos do PVs para locais anatômicos distintos, onde eles podem causar lesões com diferentes características patológicas (EGAWA et al., 2015).

São vírus que usam os organismos animais para desenvolverem o seu ciclo e se replicarem, possuem a capacidade de infectar tanto células epiteliais, como cutâneas e mucosas. Têm, ainda, a habilidade de se manterem associados ao hospedeiro durante longos períodos de tempo, podendo causar infecções persistentes (ANDROPH, 2002; HEWLETT; SHEPHERD; LUXTON, 2003).

Os PVs causam tumores benignos (verruga e papilomas) em seu hospedeiro natural, alguns papilomas induzidos por tipos específicos de PVs apresentam alto risco de progressão maligna (VILLIERS et al., 2004).

2.2 Classificação geral dos PVs

Os primeiros tipos de PVs foram isolados há mais de 30 anos, mas uma dificuldade em encontrar um sistema de cultura de células apropriado para propagar estes vírus dificultou o progresso no estudo das funções virais e limitou o estabelecimento da taxonomia baseada nas propriedades biológicas (VILLIERS et al., 2004).

A disponibilidade e o desenvolvimento de novas técnicas laboratoriais no início das pesquisas até o momento atual têm ditado não só o andamento que novos PVs são identificados, mas também têm influenciado no sucesso em isolar e caracterizar genomas completos de membros da família *Papillomaviridae* (VILLIERS, 2013).

Houve uma tentativa de reconhecimento da classificação oficial para os PVs pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) nos anos 80, mas só em 2003 com a classificação baseada na similaridade das sequências, ela foi finalmente aceita (VILLIERS, 2013).

Os PVs são agrupados em gêneros (LETO et al. 2011), de forma que para classificar um vírus em um mesmo gênero, as diferenças de identidade da *Opening Reading Frames* (ORF) do gene L1, considerada a mais conservada entre os papilomavírus, devem ser menores que 30% (BERNARD et al., 2010), de modo que as espécies de um gênero dividem de 60% a 70% de similaridade (LETO et al., 2011).

Os PVs isolados são tradicionalmente descritos como tipos (VILLIERS et al., 2004). Essa classificação é baseada na sequência do gene L1 (CHOI; PARK, 2016), um vírus deverá ser classificado como sendo um novo tipo se possuir mais de 10% de bases na sequência do seu gene L1 diferentes da sequência de qualquer outro tipo existente (SANTOS et al., 2004). Diferenças entre 2% e 10% identificam um novo subtipo viral, enquanto a definição de uma nova variante se dá com menos de 2% de divergência entre as sequências de L1 (Figura 1) (VILLIERS et al., 2004).

Figura 1 - Filogenia dos PVS baseada por meio de sequências da ORF L1

Nota: O semicírculo externo representa os gêneros e o semicírculo interno refere-se a espécie do Papilomavírus.
Fonte: Bernard et al., 2010.

2.3 Organização genômica do PV

O genoma do PV é constituído por uma única molécula circular de DNA dupla-fita que compreende, aproximadamente, 8.000 pares de bases (pb) (BORZACCHIELLO; ROPERTO, 2008; WILLIAMNS et al., 2011). O genoma está envolto por um capsídeo composto de 72 subunidades protéicas, denominadas capsômeros (DOOBAR et al., 2016) e apresenta uma estrutura icosaédrica não envelopada, com diâmetro de aproximadamente 50 nm.

A organização genômica é similar entre os diversos tipos de papilomavírus (ZUR HAUSEN, 2002).

O genoma do Papilomavírus é dividido em três regiões distintas: a região longa de controle *Long Control Region* (LCR), também conhecida como *Upstream Regulatory Region* (URR), é uma região não codificadora, que contém elementos necessários para a regulação dos processos de replicação e transcrição viral. Além da LCR, existem outras duas regiões,

região de controle precoce (E- *Early Control Region*) e região de controle tardio (L- *Late Control Region*).

As três regiões do genoma viral são constituídas por uma série de oito ORFs que codificam as proteínas virais (FERNANDES et al., 2013).

A LCR localiza-se entre o fim da região L1 e o começo da região E6, compreende cerca de 10% do genoma e contém elementos de controle (MOODLEY et al., 2003; SOUTO; FALHARI; CRUZ, 2005), que incluem origens de replicação e também sítios de ligação a fatores de transcrição (FELLER et al., 2009).

As proteínas L1 e L2, pertencem à região tardia e são responsáveis por formar o capsídeo viral. O capsídeo é composto de 360 moléculas da proteína L1, que são dispostas em 72 capsômeros, organizados em estruturas pentaméricas (BIENKOWSKA-HABA; SAPP, 2011) e 12 moléculas da proteína L2, as quais se interligam por pontes dissulfídicas. A proteína L1 tem, entre outras, a função de mediar a ligação viral à superfície celular e L2 programa a inclusão do genoma viral no capsídeo, promovendo a organização do vírion (FAY et al., 2004; STAUFFER et al., 1998).

A proteína L2 fica basicamente dentro do capsídeo e apenas porções de resíduos N-terminal são expostas na superfície do capsídeo (BIENKOWSKA-HABA; SAPP, 2011).

Os genes da região E correspondem a 50% do genoma, codificam três oncoproteínas, E5, E6 e E7, onde a proteína E5 está envolvida na transformação celular, participa da replicação do DNA viral e contribui para a evasão do sistema imune na célula infectada (FERNANDES et al., 2013; MORSHED et al., 2014). As proteínas E6 e E7 têm um papel central na transformação maligna por ação do HPV e causam danos na regulação do controle do ciclo celular (MORSHED et al., 2014).

As proteínas E1, E2 e E4 são proteínas regulatórias, onde E1 tem papel na replicação do genoma, E2 modula a transcrição viral e E4 modula a replicação e contribui para a liberação vírus (Figura 2) (EGAWA et al., 2015; MORSHED et al., 2014).

Figura 2 - Modelo estrutural do genoma do Papilomavírus Humano

Nota: Partícula viral e Representação esquemática do genoma circular do vírus.

Fonte: Modificado a partir de Sapp; Bienkowska-Haba, 2009; Egawa et al., 2015.

2.4 Papilomavírus Humano (HPV)

Um dos PVs mais conhecido e estudado é o Papilomavírus Humano (HPV), o qual é um dos mais incidentes e prevalentes no mundo atual, causando lesões benignas ou malignas na boca, laringe, ânus, colo do útero e genitálias, tornando-se um desafio para a saúde pública (CECCATO JUNIOR et al., 2015; LIU et al., 2015).

É um vírus pequeno, pertencente à família *Papillomaviridae* (SHUKLA et al., 2009). Mais de 200 tipos de HPVs já foram identificados (GALLOWAY; LAIMINS, 2015). Os HPVs são agrupados em 5 gêneros (alphapapillomavirus, betapapillomavirus, gammapapillomavirus, mu papillomavirus e nu papillomavirus), os gêneros alpha e beta são comumente os mais estudados (Figura 3) (GALLOWAY; LAIMINS, 2015).

Figura 3 - Relação de evolução entre os Papilomavírus Humano (HPVs)

Nota: Os tipos de Papilomavírus encontrados em humanos são divididos em 5 gêneros, onde os gêneros alpha, beta (em azul) e gamma (em verde), representam os maiores grupos. Os Alphapapilomavírus incluem os tipos de baixo-risco mucosotrópicos, que causam verrugas genitais (destacados em amarelos), e os tipos de alto-risco mucosotrópicos causadores de lesões cervicais e câncer (destacados em rosa). A árvore filogenética é baseada no alinhamento dos genes E1, E2, L1 e L2.

Fonte: Modificada a partir de Egawa et al., 2015.

São considerados microorganismos que exibem uma relação com o hospedeiro altamente espécie-específico (DUNNE; MARKOWITZ, 2006; SCHEURER; TORTOLERO-LUNA; ADLER-STORTHZ, 2005). Podem ser divididos em dois grupos de acordo com o tropismo celular, aqueles que infectam a superfície queratinizada da pele, causando verrugas comuns, e os que infectam a mucosa da boca, trato respiratório e especialmente o trato anogenital (FERNANDES et al., 2013), dessa forma são classificados em mucosos ou cutâneos.

O gênero alphapapillomavirus inclui os tipos do HPV que infectam a mucosa cervical, a mucosa oral (CHOI; PARK, 2016), causam verrugas genitais e verrugas na pele (DOORBAR et al., 2012), além de fazerem parte desse gênero os tipos HPV-16 e HPV-18 que estão comumente associados com o câncer cervical e também estão presentes os tipos

HPV-7 e HPV-2, que estão associados com o aparecimento de verrugas na pele (LETO et al., 2011).

Os Betapapillomavirus incluem os tipos cutâneos de baixo e alto risco (DOORBAR et al., 2012), onde os tipos HPV-5 e HPV-8 são os mais comumente identificados na pele de indivíduos com Epidermodisplasia Verruciforme (EV) (LETO et al., 2011). Os Mupapillomavirus englobam os tipos associados com lesões cutâneas benignas e que não apresentam relação com o câncer (DOORBAR et al., 2012), onde o tipo HPV-1 causa lesões vulgares e planares (LETO et al., 2011). Os Nupapillomavirus estão associados com lesões benignas cutâneas, eventualmente detectados em câncer de pele e os Gammapapillomavirus incluem os tipos associados com lesões cutâneas benignas, onde alguns tipos podem ser detectados na mucosa oral (DOORBAR et al., 2012).

O potencial carcinogênico dos papilomavírus humanos foi descoberto em 1950 em pacientes com epidermodisplasia verruciforme (LETO et al., 2011). São vírus com um alto potencial transformante, vários dos quais estão implicados em alguns tipos de câncer, como câncer cervical, câncer anogenital e tumores de cabeça e pescoço (DAY; SCHELHAAS, 2014).

Estima-se que, no Brasil, haja cerca de 500 mil a 1 milhão de casos novos por ano da infecção pelo HPV, enquanto são registrados 80 mil casos de Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS), 200 mil a 500 mil casos de herpes, 100 mil casos de sífilis e 800 mil ocorrências de gonorréia (TRISTÃO et al., 2012).

2.5 Tipos virais do HPV

Convencionalmente os Papilomavírus isolados são descritos por tipos (VILLIERS et al., 2004). Os tipos de HPV são classificados em alto risco e baixo risco de acordo com a propensão das células infectadas à transformação maligna (HÜBBERS; AKGÜL, 2015). Além disso as infecções pelos HPVs de baixo risco são eliminadas com maior frequência e maior rapidez do que as infecções pelos HPVs de alto risco (RATAUVA et al., 2011).

Os HPVs de baixo risco podem causar lesões cutâneas (GALLOWAY; LAIMINS, 2015) e lesões nas mucosas, incluindo a mucosa oral (RATAUVA et al., 2011). Dentre alguns tipos considerados de baixo risco estão os HPV-6, HPV-11, HPV-40, HPV-43, HPV-44, HPV-54, HPV-61, HPV-70, HPV-72, HPV-81 (MUNOZ et al., 2003).

É importante ressaltar que os tipos virais mesmo aqueles que são estritamente relacionados, podem mostrar patologias distintas e predileção por diferentes sítios de infecção

(DOORBAR et al., 2016). Como é o caso do HPV-6 e HPV-11, eles são tipos similares, estão inclusos no mesmo grupamento de espécies (Alphapapillomavirus 10) e apesar de causarem papilomas de aparência similar, HPV-6 mostra uma preferência por sítios genitais comparado ao HPV-11 que é o tipo mais proeminente em sítios orais (DOORBAR et al., 2016; EGAWA et al., 2015).

Os HPVs de alto risco também são denominados oncogênicos. Dentre alguns tipos considerados de alto risco estão os HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-66, HPV-68, HPV-69, HPV-73, HPV-82 (WAGGONER, 2003).

Os tipos HPV-16, HPV-31, HPV-35 estão inseridos no grupo de espécies alphapapilomavírus 9 e são classificados como carcinogênicos em humanos. A associação do HPV-16 e do câncer cervical é dez vezes mais forte que a associação com os tipos 31 e 35, e desses 3 tipos, o HPV-16 é o único associado com tumores na região da orofaringe (EGAWA et al., 2015), demonstrando que HPVs de alto risco correlacionados também podem em, alguns casos, mostrar patologias distintas.

Uma diferença importante entre os HPVs de alto e baixo risco é que os HPVs de alto risco têm uma alta tendência de se integrarem ao genoma do hospedeiro, causando lesões intraepiteliais de alto grau e câncer, enquanto os HPVs de baixo risco são preferencialmente mantidos como episômos circulares extracromossômicos (CHEN et al., 2014).

2.6 Prevalência do HPV

A infecção pelo HPV é muito comum na população brasileira e mundialmente, com taxas de prevalência variando entre as diferentes regiões geográficas, de acordo com o nível de desenvolvimento e características da população, onde a prevalência do vírus é maior em regiões menos desenvolvidas, do que em regiões mais desenvolvidas (FERNANDES et al., 2013; MUCHIRI et al., 2012).

A prevalência viral só é definida, na maioria dos países, pelos trabalhos científicos, pois a pesquisa do DNA viral ainda não é difundida na rotina clínica, normalmente a busca é por indícios da presença do vírus, pela detecção de lesões em diferentes partes do corpo, sobretudo nas regiões genital e oral e lesões cancerígenas (SOUZA, 2016). Forman et al. (2012) indicaram que a prevalência mundial de infecção por HPV estaria entre 11 e 12%, sendo possível observar ainda uma grande variação regional desta prevalência e um maior

número de casos nos países considerados em desenvolvimento, com poucas exceções. Particularmente as maiores prevalências foram observadas no Caribe e na África oriental, nas quais os índices excederam 30% e a menor na Ásia ocidental (1,7%). Na América do Sul a taxa observada foi de 15,3%, acima da considerada média mundial, 11,7%.

A distribuição da incidência dos tipos de HPV é bastante variável geograficamente, segundo Zeng et al. (2016), os cinco tipos de HPV de alto risco mais frequentes em pacientes com câncer cervical são os HPV-16, HPV-18, HPV-33, HPV-45 e HPV-31, enquanto que os tipos mais comuns na população feminina em geral são os HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-58 e HPV-52. Em um estudo realizado por Baloch et al. (2015) na população chinesa, o HPV-16 (6,9%) foi o mais prevalente, seguido pelo HPV-33 (3,6%), HPV-52 (3,4%), HPV-58 (2,5%) e HPV-31 (2,1%), ainda foi descrito no estudo que o padrão de distribuição dos tipos do HPV varia bastante em diferentes regiões do país. Resultados obtidos por Ebrahim et al. (2016), na África, indicam o HPV-16 como o mais frequente, mas também foram detectados os HPVs 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e os autores expressaram a preocupação em relação às vacinas atualmente disponíveis que não previnem contra todos os HPVs de alto risco.

O Brasil é um dos líderes mundiais em incidência do HPV, sendo as mulheres o gênero mais acometido na população. Embora seja uma infecção que também se estende ao sexo masculino, acredita-se que o número de casos registrados seja menor em decorrência de uma menor procura dos homens ao serviço de urologia (GASPAR et al., 2015).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de 630 milhões de homens e mulheres estão infectados pelo HPV, e esses números podem aumentar ainda mais levando em consideração que a prevalência da infecção varia conforme o método de identificação do vírus. No Brasil o principal método de identificação do HPV é feito pelo exame citológico ou papanicolau, que apresenta baixa sensibilidade comparado a outras formas de rastreamento, podendo um percentual das pacientes apresentar resultados falso negativo (FEDRIZZI, 2011; TRINDADE et al., 2014).

O Brasil apresenta uma variação considerável tanto em relação à prevalência do HPV, quanto ao tipo do vírus. Ayres e Silva (2010) realizaram uma revisão sistemática e descreveram que a prevalência de infecções cervicais por HPV varia entre 13,7% e 54,3%, dentre mulheres com alterações citológicas, e entre 10% e 24,5% dentre as que apresentaram citologia normal.

Em contraste com dados disponíveis em relação a prevalência do HPV na mucosa cervical, pouca informação é disponível em outros sítios de infecção, onde a presença do vírus

representa um fator de risco para o câncer (FORMAN et al., 2012). No Brasil, o HPV-16 é o vírus mais prevalente em todas as regiões (BRUNO et al., 2014; SANTOS et al., 2013), em trabalhos como Oliveira et al. (2013), no sul do Brasil, fica evidente a prevalência do HPV-16, seguido do HPV-58, HPV-18 e HPV-33, tanto em lesões de alto grau, quanto em lesões de baixo grau. O HPV-58 tem apresentado uma alta prevalência, principalmente na região Nordeste do Brasil (BRUNO et al., 2014).

O HPV-18 é o segundo tipo mais prevalente nas regiões Norte, Sudeste e Sul (PEREIRA et al., 2007; RABELO-SANTOS et al., 2003), e já foi descrito como o menos frequente em um estudo no Nordeste do país, onde os autores descreveram que esse resultado podia estar relacionado à amostra predominantemente composta por citologias negativas, e sabe-se que esse tipo é altamente detectado em lesões cervicais (BRUNO et al., 2014; BZHALAVA et al., 2013). Os HPV-16 e o HPV-18 são responsáveis por 50% a 55% dos casos de lesões de alto grau e em torno de 70% do casos de câncer cervical, tanto na América do Sul, quanto no Brasil (FEDRIZZI, 2011).

Os HPV-31 e HPV-33 são mais frequentes no Nordeste e Centro-Oeste depois do HPV-16 (OLIVEIRA et al., 2013; RABELO-SANTOS et al., 2003; SANTOS et al., 2013).

A variação dos diversos tipos do HPV é debatida por Alves (2013), associando os principais tipos do HPV com as regiões do Brasil (Figura 4).

Figura 4 - Prevalência de alguns tipos do HPV nas diferentes regiões do Brasil

Nota: O HPV-16 é o mais descrito em todas as regiões.

Fonte: Modificado a partir de Alves, 2013.

2.7 Características de infecção pelo HPV

A infecção pelo HPV pode ser classificada em: (a) latente, a qual só pode ser diagnosticada por métodos de biologia molecular; (b) subclínica, na qual não há sintomas clínicos, mas há alterações sutis que podem ser diagnosticadas, por peniscopia, colpocitologia, colposcopia e/ou biópsia; (c) clínica, na qual há lesões evidentes ao exame clínico (TRISTÃO et al., 2012; XAVIER et al., 2007).

Apesar de ser estimado que 50% a 80% de homens e mulheres sexualmente ativas vão adquirir a infecção pelo HPV em algum momento de suas vidas, menos de 10% vão apresentar uma infecção persistente com tipos de HPV de alto risco o que contribuiria para o desenvolvimento do câncer (CHOI; PARK, 2016; FERNANDES et al., 2013).

A infecção pelo HPV é basicamente por contato sexual (FERNANDES et al., 2013) tanto homens quanto mulheres podem ser infectados, e são capazes ao mesmo tempo, de serem portadores assintomáticos, transmissores e vítimas da infecção do HPV (TRISTÃO et al., 2012). A penetração vaginal ou anal não é um requisito necessário para adquirir a infecção pelo vírus, de forma que o vírus pode ser transmitido pelo contato direto da pele ou mucosa durante contatos íntimos com os órgãos genitais ou pela superfície infectada de outras mucosas (CUBIE, 2013; FERNANDES et al., 2013). O potencial oncogênico do HPV depende de alguns fatores, entre eles estão o tipo viral, a persistência da infecção e à integração do DNA viral a célula hospedeira (SANTOS et al., 2013).

O mecanismo de resposta imune do hospedeiro desempenha um papel significativo no controle da infecção pelo vírus (ASHRAFI; SALMAN, 2016). Uma vez que o diagnóstico viral pode ser feito ainda na fase latente da infecção, torna-se possível o acompanhamento do paciente, a fim de alertar para o tratamento adequado de lesões ou alterações que possam surgir como consequência da progressão da infecção viral (TRISTÃO et al., 2012).

2.8 Fatores de risco para HPV

Entre os fatores de risco para a infecção pelo HPV, estão: multiplicidade de parceiros (FERNANDES et al., 2013; GASPAR et al., 2015; RAGIN et al., 2011; SANTOS et al., 2016), demonstrando ser um dos mais relevantes, tendo em vista que mulheres com tal comportamento possuem uma maior oportunidade de contato com diferentes tipos virais a cada relação com um novo parceiro sexual (GASPAR et al., 2015), alta paridade, tabagismo,

etilismo, idade do início da atividade sexual (SANTOS et al., 2015), medicamentos hormonais orais (SANTOS, et al., 2016), e idade (FEDRIZZI, 2011).

O consumo de álcool e o tabagismo são fatores de risco bem estabelecidos para o acometimento do câncer oral, em relação ao HPV ainda é um pouco controverso o papel que eles podem desempenhar no acometimento da infecção (BOUDA et al., 2000; FREITAS, 2016; KUMAR et al., 2015). Em relação ao etilismo é descrito que o álcool pode ajudar a evadir a resposta imune contra a infecção pelo vírus, e no caso do tabagismo as substâncias carcinogênicas do cigarro podem afetar a resposta imune e aumentar a susceptibilidade para a infecção (KUMAR et al., 2015).

Em relação a alta paridade tem sido visto que mulheres com três ou mais gestações apresentam maior risco para a infecção: possivelmente os fatores associados seriam imunossupressão própria da gestação e maior exposição do epitélio de transição metaplásico, mais suscetível à infecção pelo HPV que o epitélio cervical maduro (FEDRIZZI, 2011; FEDRIZZI et al., 2008).

Uma realidade bastante preocupante é a precocidade do início da atividade sexual cada vez mais cedo os jovens estão dando início a práticas sexuais, sem um trabalho de prevenção e orientação quanto ao riscos, sendo um destes riscos a infecção pelo HPV, que tem aumentado consideravelmente na população mais jovem (GASPAR et al., 2015; SANTOS et al., 2015).

2.9 Processo de infecção viral

No modelo de infecção viral em células epiteliais, o ciclo de replicação do papilomavírus está amplamente ligado aos processos de diferenciação destas células (CAMPO, 2003). Até o momento, o epitélio é considerado a principal, se não a única via biológica usada por estes vírus para a formação de novas partículas virais (DOORBAR et al., 2012; FELLER et al., 2009).

Inicialmente a infecção ocorre com o acesso das partículas infecciosas à camada basal do epitélio, o que só é possível por microabrasões no epitélio estratificado, expondo a camada basal ao ambiente (BIENKOWSKA-HABA; SAPP, 2011; DOORBAR, 2006; GALLOWAY; LAIMINS, 2015).

Para que o vírus penetre nas células basais, as proteínas L1 e L2 precisam estabelecer uma ligação com glicosaminoglicanos na membrana plasmática, após a microlesão

(BIENKOWSKA-HABA; SAPP, 2011). Dessa forma a entrada do vírus na célula hospedeira inicia-se com a proteína L1, que é responsável pela primeira interação com a superfície celular, por conter estruturas determinantes para a ligação inicial das partículas virais com o receptor de superfície celular sulfato de heparina (glicosaminoglicano) (BIENKOWSKA-HABA; SAPP, 2011; DAY; LOWY; SCHILLER, 2009; FERNANDES et al., 2013), demonstrando que o capsídeo viral desempenha um papel chave no processo de infecção (LARSSON et al., 2013).

Os Glicosaminoglicanos de Heparan Sulfato (HSPG) são receptores primários de superfície celular que medeiam a interação com Papilomavírus, bem como diversos outros vírus, bactérias e protozoários (SHAFTI-KERAMATI et al., 2003).

De maneira geral, a interação do capsídeo com o HSPG induz alterações conformacionais na porção amino-terminal de L2, permitindo que a proteína L2 seja exposta: esta exposição da porção protéica de L2 permite o acesso a sítios de reconhecimento pela furina convertase, promovendo a proteólise de L2 (FERNANDES et al., 2013; HORVATH et al., 2010). Acredita-se que a combinação da alteração conformacional e a clivagem promovida pela furina exponham um sítio secundário de ligação em L1, envolvido na internalização infecciosa da partícula viral (FERNANDES et al., 2013; SCHILLER et al., 2010).

As alterações morfológicas no vírus permitem sua entrada na célula, mediada pela integrina $\alpha 6$ da célula (DAY; SCHELHAAAS, 2014), que atua como um segundo receptor para o vírus (DOORBAR, 2005). Assim sendo, uma vez aderidos à membrana celular, a entrada do vírus na célula envolve a internalização através de endocitose, um processo que para o HPV ocorre de forma lenta em um período de horas (DAY et al., 2007), sendo um processo sem sincronia, onde existe uma variação de tempo dependendo do tipo do HPV (BIENKOWSKA-HABA; SAPP, 2011). A maior parte dos vírus entram nas células utilizando-se da endocitose mediada pela clatrina (FERNANDES et al., 2013), mas já foi descrito que diferentes tipos do HPV usam vias endocíticas diferentes, como é o caso do HPV-31, o qual usa via endocítica da caveolina (BIENKOWSKA-HABA; SAPP, 2011; DOORBAR, 2005; FERNANDES, 2013).

De forma convencional, os vírus endocitados via clatrina percorrem o interior das células através de endossomos, enquanto que os que entram via caveolina vão para uma estrutura intracelular conhecida como caveossomo (PELKMANS; HELENIUS, 2002).

Após a endocitose, os vírus são levados através do sistema endossomal, ainda é indeterminada como acontece a entrada do genoma do vírus no núcleo, mas sabe-se que L2

facilita a transferência para o núcleo (DAY; SCHELLAAS et al., 2014; DOORBAR, 2005). As proteínas L2 alojam sinais de localização celular medida pela proteína “Karyopherin”, a qual está envolvida em transporte de moléculas entre o citoplasma e o núcleo, podendo então permitir a entrada via complexo de poros nucleares (Figura 5) (DAY; SCHELLAAS, 2014).

Figura 5 - Representação esquemática da entrada do HPV

Legenda: **A:** Interação inicial com receptores celulares e modificações estruturais para a internalização do HPV. **B:** Endocitose do vírus, entrega ao sistema endossomal e transporte para núcleo.

Fonte: Modificada a partir de Day e Schelhaas, 2014.

Após a internalização viral, o genoma do vírus é estabelecido na célula em sua forma episomal (WRIGHT et al., 2006), com um número baixo de cópias (FERRAZ et al., 2012), onde não acontece integração ao genoma da célula hospedeira e dessa forma a replicação do DNA viral é realizada junto ao DNA do hospedeiro (DOORBAR, 2005).

Nessa fase há um baixo nível de expressão dos genes, suficiente para a manutenção do genoma do vírus. A expressão dos genes virais é regulada e dependente da diferenciação das células infectadas pelo HPV (DOORBAR et al., 2006; FERRAZ et al., 2012). Para a produção das partículas virais ocorre a amplificação do genoma do HPV, de modo que nas camadas basais a expressão dos genes E1, E2, E4, E5, E6, E7 contribui para a manutenção do genoma viral e indução da proliferação celular, aumentando o número de células infectadas com o HPV (DOORBAR et al. 2006; FERNANDES et al., 2013).

A montagem das partículas infecciosas ocorre nas camadas médias e superiores do epitélio (FERRAZ et al., 2012). Na fase mais tardia, L1 e L2 codificam as proteínas do

capsídeo, a montagem dos vírios e o empacotamento do DNA ocorrem na camada superficial, a formação e a liberação das partículas virais completas são realizadas na superfície do epitélio sem lisar as células hospedeiras, caracterizando o ciclo produtivo da infecção (Figura 6) (FERNANDES et al., 2013; FERRAZ et al., 2012).

Figura 6 - Estágios do ciclo viral do Papilomavírus Humano em epitélio estratificado escamoso. Expressão das proteínas precoces e tardias

Fonte: Modificado de Doorbar et al., 2012.

Os processos de transformação celular por HPV, descritos anteriormente são observados em lesões não neoplásicas (MELO, 2015). O desenvolvimento das neoplasias está associado à perda da regulação do ciclo produtivo do HPV, evento observado em infecções persistentes pelos HPVs de alto risco, que tendem a integrar o seu genoma ao da célula hospedeira e onde há uma incapacidade do vírus em dar continuidade ao seu ciclo de vida: nesse cenário não haverá produção de novas partículas virais (FERRAZ et al., 2012).

2.10 Ação das proteínas do HPV no processo carcinogênico

A principal diferença entre os HPVs de alto e baixo risco é a capacidade que os HPVs de alto risco têm de se integrar ao genoma da célula hospedeira, além disso existem diferenças funcionais entre as proteínas E6 e E7, diferenças na localização e regulação de promotores, de modo que essas diferenças afetam a expressão dos genes E6 e E7 (DOORBAR et al., 2012; ZUR HAUSEN, 2002).

Nas lesões malignas, o DNA viral é integrado aos cromossomos das células do hospedeiro (LETO et al., 2011; RAMIREZ-SALAZAR et al., 2011). A integração do genoma

dos HPVs de alto risco é geralmente considerada um evento necessário na progressão do câncer cervical e câncer anogenital, para que a integração aconteça são necessárias quebras cromossômicas no DNA do hospedeiro e no genoma viral (WILLIAMS et al., 2011).

Durante o processo de integração, o genoma viral pode perder o gene E4 e parte do gene E2 (ZUR HAUSEN, 2002) que exerce função de controle de transcrição dos demais genes (DOORBAR et al., 2012; FERRAZ et al., 2012). Em consequência da perda de função de E2 (FERRAZ et al., 2012), haverá um aumento da expressão dos genes E6 e E7: isso acontece porque a expressão da proteína E2 tem como consequência a diminuição da expressão de E6 e E7, a atividade transcricional de ambos oncongenes, E6 e E7, está sob controle de um promotor comum, p97, o qual é reprimido principalmente pelo produto do gene viral E2 (DINIZ, 2009).

A principal atividade de transformação dos HPVs de alto risco é fornecida pelas proteínas E6 e E7, que agem de forma cooperativa no desenvolvimento de câncer induzido pelo HPV, interagindo com proteínas reguladoras do ciclo celular codificadas por genes supressores de tumor (FERRAZ et al., 2012; MOODY; LAIMINS, 2010). A proteína E6 efetivamente inibe a proteína P53, causando sua degradação via proteólise mediada pela ubiquitina, o que compromete a integridade do DNA, causando danos e acumulando alterações genéticas (BAVA et al., 2017). A proteína p53, é uma biomolécula de 53 kDa, supressora do crescimento celular, associada ao controle do ciclo celular, síntese do DNA, diferenciação celular e apoptose (KANODIA; FAHEY; KAST, 2007; LAM et al., 1995; ROSENBLATT et al., 2005). A proteína E6 recruta a proteína E6AP (Ubiquitina ligase- E3), formando um complexo E6-E6AP, que leva a degradação da P53. Os HPVs de baixo risco podem se associar a E6AP, mas essa associação não resulta na degradação da P53, sugerindo que outros fatores celulares podem ser alvo do complexo E6-E6AP nos HPVs de baixo risco (MOODY; LAIMINS, 2010). A infecção pelo HPV persiste por períodos de tempo, e a revogação da função da p53 permite o acúmulo de mutações que normalmente teriam sido reparadas.

E6 também medeia a imortalização das células através da interação com promotores da transcriptase reversa humana da telomerase (hTERT), uma proteína catalítica com atividade de transcriptase reversa, um dos componentes da telomerase, a telomerase é um complexo enzimático ribonucleoprotéico que sintetiza repetições teloméricas do DNA (BAVA et al., 2017; PERINI et al., 2008). A imortalização celular é uma característica marcante das células neoplásicas, percentuais elevados de telomerase já foram detectados em

alguns tipos de câncer como o carcinoma escamoso celular (CEC) oral, câncer de pulmão e câncer de mama (Figura 7) (PARSONS, 2003; VENTURI; CABRAL; LOURENÇO, 2004).

Figura 7 - Interação das oncoproteínas do Papilomavírus Humano

Legenda: A proteína E6 se liga a proteína E6AP formando um complexo, esse complexo leva a degradação da p53 via proteassomo. E6 também medeia a imortalização celular por se ligar a promotores da hTERT, um dos componentes da telomerase. A proteína E7 se liga a proteína pRB, liberando o fator de transcrição E2F, que atua na transcrição de genes necessários na síntese celular, além disso E7 também se liga a proteínas neutralizadoras de CDKs (p21 e p27).

Fonte: Modificado de Moody; Laimins, 2010; Grce et al., 2012.

A oncoproteína E7 possui uma região *motif* (LXCXE) e outras regiões que permitem sua ligação a proteínas celulares uma das interações dessa oncoproteína é com a proteína supressora tumoral pRb, uma proteína que controla a transição da fase G1 para fase S no ciclo celular: o modo de controlar essa transição é regulando a atividade de fatores de transcrição da família E2F, que consiste em pelo menos oito membros, onde alguns são ativadores transcripcionais e outros têm funções repressoras. Sítios de ligação para E2F são encontrados em promotores de genes que estão envolvidos na regulação e progressão do ciclo celular, mitose, apoptose e outros (MELO, 2015; MOODY; LAIMINS, 2010).

Em células normais a pRb reprime a transcrição de promotores dependentes de E2F, ligando-se diretamente a domínios em E2F, no final de G1 a pRb é fosforilada por Ciclinas Dependentes de Kinases (CDK), que resulta na dissociação de pRb de E2F levando a transcrição de genes específicos. A E7 liga-se a forma não fosforilada de pRb, liberando o fator de transcrição E2F, que anteriormente estava ligado à pRb, ocorrendo a transcrição de genes necessários à síntese celular (MOODY; LAIMINS, 2010). Dessa forma a inspeção do controle da transição da fase G1 para S é perdida e as células continuam a progredir no ciclo celular, levando a uma proliferação celular descontrolada (FERRARO et al., 2011). E7 também apresenta interação com inibidores CDKs, p21 e p27, ao ligar-se a p21 e p27. A E7

neutraliza eficientemente os efeitos inibitórios nas ciclinas A e E respectivamente (MOODY; LAIMINS, 2010) e, por sua vez a atividade de CDK continua alta, resultando no descontrole adicional do ciclo, por permitir mais liberação de fatores E2F (Figura 7) (MELO, 2015).

Apesar de E6 e E7 providenciarem as primeiras atividades de transformação dos HPVs de alto risco, a proteína E5 pode potencializar suas funções e contribuir para a progressão do tumor (MOODY; LAIMINS, 2010).

Porém, mesmo com a imortalização das células infectadas pelo HPV através da ação das proteínas E6 e E7, estas células ainda não são consideradas tumorigênicas. Para que esta condição se estabeleça é necessário que mutações adicionais ocorram nestas células para que possa haver a progressão maligna. Portanto, além da indução da carcinogênese pelas próprias proteínas do HPV que facilitam a aquisição das mutações, para acontecer a formação do tumor, se faz necessária a interação de fatores genéticos, epigenéticos, hormonais e imunológicos (CAVALCANTI; CARESTIATO, 2006).

2.10.1 Lesões causadas pelo HPV

As manifestações clínicas da infecção pelo HPV dependem de múltiplos fatores, incluindo o tipo viral, o genótipo do hospedeiro, o tipo de epitélio infectado, fatores ambientais como a imunidade do hospedeiro e fatores nutricionais (BRAVO; FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015). As verrugas são as manifestações clínicas mais comuns e características da infecção pelo vírus, podem acometer diversas localizações principalmente a pele, mucosa, região anogenital, mucosas oral e laríngea (LETO et al., 2011).

Como vimos anteriormente os HPVs são divididos em gêneros e tipos apresentando características diferentes no ciclo de vida, na associação a doenças e ao tipo de lesão que causam. Os HPVs que causam papilomas visíveis são geralmente os mais preocupantes para o indivíduo, especialmente quando acometem sítios orais ou genitais e são persistentes.

2.10.1.1 Lesões benignas associadas ao HPV

Entre algumas das lesões cutâneas benignas associadas ao HPV, estão a verruga vulgar, verruga plana, verruga filiforme e verruga pigmentada e epidermodisplasia verruciforme.

A verruga vulgar consiste em pápulas ou nódulos individualizados, com superfície áspera: as lesões podem ser únicas ou múltiplas, de tamanhos variados, e habitualmente são

assintomáticas. São mais comuns no dorso das mãos e dos dedos, os tipos de HPVs mais envolvidos na verruga vulgar são os HPV-2, HPV-27 e HPV-57, HPV-1, HPV-4 (Figura 8A) (LETO et al., 2011).

A verruga plana é levemente elevada, da cor da pele ou pigmentada (acastanhada), com superfície plana, lisa ou ligeiramente áspera, a face e o dorso da mão são as localizações mais comuns, os tipos de HPVs mais detectados nesse tipo de verruga são o HPV-3 e o HPV-10 (Figura 8B) (LETO et al., 2011).

O tipo de Verruga filiforme consiste em lesões pedunculadas, de crescimento perpendicular à superfície da pele. Apresenta-se com lesões isoladas ou múltiplas, acometendo principalmente a face e o pescoço. É uma variante da verruga vulgar, de forma que os tipos de HPVs são os mesmos, em especial o HPV-2 (Figura 8C) (LETO et al., 2011). A verruga pigmentada apresenta coloração que varia de cinza a castanho e os HPVs detectados nessas lesões são os HPV-4, HPV-60 e HPV-65 (Figura 8D) (LETO et al., 2011).

Figura 8 - Verrugas associadas a infecção pelo HPV

Legenda: **A:** Verruga vulgar; **B:** Verruga plana; **C:** Verruga filiforme; **D:** Verruga pigmentada.

Fonte: Modificado de Leto et al., 2011.

A Epidermosdisplasia Verruciforme (EV) é uma doença rara, hereditária, autossômica recessiva, caracterizada por verrugas planas, tumores na pele e uma susceptibilidade anormal para um grupo específico de HPVs (LETO et al., 2011; MATTOS et al., 2017). A transformação maligna das lesões EV ocorre em 30-50% dos pacientes, o HPV-5 é o mais prevalente nas lesões malignas, embora no Brasil, o HPV-25 é o tipo frequentemente mais associado com essa doença (MATTOS et al., 2017).

Entre as lesões mucosas benignas associadas com o HPV, estão o condiloma acuminado, papiloma escamoso oral, verruga vulgar e hiperplasia epitelial focal (ANTIENZO et al., 2015; FERRARO et al., 2011; ZONTA et al., 2012). Essas lesões têm em comum a origem epitelial, o crescimento acima da superfície, são assintomáticas e podem regredir espontaneamente ou apresentar recidivas.

A manifestação mais comum do HPV na genitália são as verrugas anogenitais ou condilomas acuminados. Essas lesões apresentam-se como pápulas, nódulos e pedunculadas. Podem apresentar crescimento exofítico semelhante à couve-flor e são, geralmente assintomáticos, os HPVs 6 e 11 são os mais detectados nesse tipo de lesão (BRAVO; FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015; LETO et al., 2011). Mundialmente estima-se 32 milhões de casos novos de verrugas genitais a cada ano, no Brasil estima-se em torno de 1,9 milhão por ano (FEDRIZZI, 2011).

O condiloma acuminado também pode se manifestar na mucosa oral, podendo ser transmitido por autoinoculação ou pela prática do sexo oral, manifestando-se como lesão única ou múltipla (Figura 9A) (FERRARO et al., 2011).

Figura 9 - Tipo de lesões mucosas benignas

Legenda: **A:** Condiloma acuminado na mucosa oral; **B:** Papiloma escamoso oral; **C:** Verruga vulgar; **D:** Hiperplasia epitelial focal.

Fonte: Modificado de Atienzo et al., 2015; Carvalho, 2016.

O papiloma escamoso oral é a lesão mais frequente e ocorre igualmente entre homens e mulheres, predominantemente na língua e no palato (Figura 9B) (FERRARO et al., 2011). A verruga vulgar também tem uma alta incidência nos lábios, podendo se localizar também na língua, palato mole e palato duro (CARVALHO, 2016) geralmente são lesões isoladas, mas

também podem se encontrar em múltiplas lesões. É sugerido que essas lesões podem surgir por autoinoculação, geralmente em pessoas que apresentam verrugas nas mãos e nos dedos (Figura 9C) (ANTIENZO et al., 2015). A hiperplasia epitelial focal, também conhecida como doença de Heck, é a que mais se distancia do padrão verrucoso (FERRARO et al., 2011), apresentando-se com pápulas ou nódulos, envolvendo muitas vezes a mucosa labial, ocorre predominantemente em crianças (ANTIENZO et al., 2015), essa lesão está associada com o HPV-13 e HPV-32 (Figura 9D) (CARVALHO, 2016; RATAUVA et al., 2011).

2.10.2 Lesões malignas associadas ao HPV

Em 1950 foi descoberto o potencial carcinogênico do Papilomavírus Humano, em pacientes com epidermodisplasia verruciforme (LETO et al., 2011). Desde então, muito tem sido pesquisado sobre o papel do HPV no desenvolvimento do câncer, sendo possível confirmar a associação desse vírus com alguns tipos de câncer, como o câncer cervical, câncer anal, câncer vulvar, câncer vaginal, câncer de pênis e câncer de cabeça e pescoço (BERTIOL et al., 2013).

2.10.2.1 Câncer cervical

Entre 1974 e 1976 pesquisadores começaram a postular e analisar um possível papel do HPV no câncer cervical (ZUR HAUSEN, 2002). Hoje em dia mais de 99% dos cânceres cervicais contêm a presença do HPV e a proporção associada com o tipo do vírus é diferente entre regiões, mostrando variações demográficas, étnicas e sócioeconômicas (CUBIE, 2013), podendo, dessa forma, afirmar que o HPV é um agente necessário para a doença (BAVA et al. 2017; HANG et al., 2016).

A infecção pelo HPV na cérvix é relativamente comum em mulheres sexualmente ativas: onde a maioria dessas infecções é transiente, com 70% a 90% das mulheres infectadas eliminando a infecção dentro de 12 a 30 meses (PASSMORE et al., 2006). Mulheres que não eliminam a infecção estão em maior risco de desenvolver as lesões intraepiteliais progressivas e o câncer cervical (PASSMORE et al., 2006).

O câncer cervical representa o segundo tipo de câncer mais comum entre as mulheres no mundo, podendo ser o tipo mais comum em países com baixo poder econômico (BAVA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2011). Além disso representa uma das principais causas de mortalidade em mulheres, sendo diagnosticados a cada ano aproximadamente 500.000 novos

casos, a maioria em países em desenvolvimento (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2014; SILVA, 2014).

De evolução lenta, a história natural do câncer do colo do útero é descrita por transformações intraepiteliais progressivas, que podem evoluir para um carcinoma invasivo, sua incidência aumenta progressivamente com o avanço da idade até ter seu pico na faixa de 45 a 50 anos de idade (OLIVEIRA et al., 2011; SILVA et al., 2014). O Ministério da Saúde recomenda o início do rastreamento para o câncer do colo uterino aos 25 anos de idade ou para mulheres que já tenham atividade sexual mesmo antes dessa faixa de idade. Esse rastreamento é realizado periodicamente através do exame citopatológico, sendo a estratégia preventiva mais adotada no Brasil e no mundo (AMORIM et al., 2015; SILVA, 2014).

O diagnóstico morfológico para lesões intraepiteliais de colo do útero é feito tanto em esfregaços celulares pela citologia, quanto em cortes de tecido pela histopatologia (Figura 10) (SOUZA; MELO; CASTRO, 2001).

Figura 10 - Lesões intraepiteliais do colo do útero diagnosticadas pela citologia e pela histologia

Nota: LSIL: Lesão intraepitelial de baixo grau E HSIL: Lesão intraepitelial de alto grau.
Fonte: Modificado de Cubie, 2013.

O termo Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) foi introduzido por Richart em 1968 para indicar uma ampla gama de atipias celulares limitadas do epitélio, baseados no grau de proliferação de células basais atípicas que perdem gradualmente as funções de controle do crescimento normal, não se diferenciam adequadamente e como consequência, há proliferação desordenada de células em toda a espessura do epitélio (BARROS, 2012).

A NIC foi dividida nos graus I, II e III (RICHART, 1967), onde NIC I apresenta proliferação de células em 1/3 do epitélio e as células contêm atípias variáveis que podem incluir o efeito citopático decorrente da infecção por HPV, o coilócito (BARROS, 2012; LAX, 2011), em NIC II, a proliferação de células está presente em até a metade do epitélio e a atipia nuclear se torna bem evidente, e em NIC III a proliferação de células está confinada ao terço superior do epitélio, as anormalidades nucleares estão presentes na maioria ou em toda a espessura do epitélio (BARROS, 2012; LAX, 2011; TAVASSOLI; DEVILLE, 2003), há uma grande possibilidade que as NICs regredam ou permaneçam estáveis por tempo indeterminado (GARCIA; SHUTZ; COLLAÇO, 2012).

O Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos realizou um simpósio para propor um novo esquema de registro de resultados da citologia cervical, estas recomendações ficaram conhecidas como Sistema Bethesda (TBS). A característica principal deste sistema foi a criação do termo lesão intraepitelial escamosa (SIL) e um esquema de dois graus que compreendia lesões de baixo grau (LSIL) e alto grau (HSIL) (MORROW et al., 1991). A classificação de TBS combina alterações condilomatosas (HPV) planas, alterações citológicas como o coilócito (LAX, 2011) e NIC I (baixo grau) em LSIL, enquanto a HSIL compreende as NIC II e NIC III que são graus mais avançados. A correlação entre a terminologia dos graus de NIC e do Sistema Bethesda, são apresentados no quadro 1.

Quadro 1 - Correlação entre a terminologia dos graus de NIC e do Sistema Bethesda

Terminologia da NIC	Terminologia do Sistema Bethesda
Normal	Dentro dos limites de normalidade; Alterações celular benignas (infecção ou reparação) ASCUS/ASGUS
NIC de baixo grau (NIC I)	LSIL
NIC de alto grau (NIC II)	HSIL
NIC de alto grau (NIC III)	HSIL
Carcinoma invasivo	Carcinoma invasivo

Legenda: **NIC**: Neoplasia intraepitelial cervical; **LSIL**: Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau; **HSIL**: Lesão intraepitelial escamosa de alto grau; **ASCUS**: Células escamosas atípicas de significado indeterminado; **ASGUS**: Células granulares atípicas de significado indeterminado.

Fonte: A autora, 2017.

As LSIL são geralmente associadas com HPVs de baixo risco, como o HPV-6 e HPV-11, enquanto as HSIL estão relacionadas com HPVs de alto risco, como o HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33 e HPV-45. Além das diferenças sobre o tipo do vírus a estão associadas, existem diferenças fundamentais em relação ao efeito a nível celular, LSIL é caracterizada

pela infecção em células diferenciadas, incapazes de se dividir, assim sendo as mudanças citológicas envolvem a camada mais superficial do epitélio. Por outro lado a infecção do HPV na HSIL envolve as células basais e parabasais que ainda são capazes de se dividir, levando a alterações morfológicas em quase todas as camadas do epitélio (LAX, 2011).

O câncer cervical origina-se de um processo ao longo de anos que tem início com uma infecção pelo HPV. Após adquirir a infecção, o que vai determinar um maior risco de desenvolver neoplasias cervicais é a persistência ou não dessa infecção (BARROS, 2012). A eliminação da infecção pode ocorrer, assim como a regressão das lesões pré-cancerosas, estando a eliminação da infecção relacionada com mecanismos imunológicos do hospedeiro. Além da imunidade do hospedeiro em eliminar a infecção pelo HPV, o tipo do HPV também está intimamente ligado com o desenvolvimento do câncer, as lesões intraepiteliais de alto grau estão intimamente ligadas ao HPVs de alto risco, sendo o HPV-16 o tipo mais detectado mundialmente (CUBIE, 2013; ILAHI et al., 2016; PASSMORE et al., 2006).

Um modelo funcional para o desenvolvimento do câncer cervical está demonstrado na figura 11.

Figura 11 - Modelo de progressão do câncer cervical

Fonte: Modificado de Zur Hausen; Villiers, 2015.

2.10.2.2 Câncer de cabeça e pescoço

O câncer de cabeça e pescoço é o 5º tumor mais comum (GUILY et al., 2011; FREITAS, 2016), e a 6ª maior causa de morte por neoplasias mundialmente (ZONTA et al., 2012), apresentando incidência de 650 mil novos casos por ano em todo o mundo (UKEN et al., 2016). É um tipo de câncer que compreende tumores de diversas origens, sendo

classificados de acordo com o sítio anatômico em que emergem (Figura 12) (BETIOL; VILLA; SICHERO, 2013).

Figura 12 - Diferentes sítios anatômicos que podem ser acometidos no câncer de cabeça e pescoço

Fonte: Modificado de Betiol; Villa; Sichero, 2013.

A maior incidência dessa doença origina-se em células escamosas do epitélio do trato digestório superior (cavidade oral, faringe e laringe) apresentando taxas de incidências variáveis em relação ao sítio de aparecimento do tumor em diversas regiões geográficas (BETIOL; VILLA; SICHERO, 2013; MIGALDI et al., 2012; ZONTA et al., 2012).

Em relação ao desenvolvimento na cavidade oral, o Brasil é o terceiro país no mundo com maior índice de câncer de boca, sendo o lábio inferior, a borda da língua e o assoalho bucal, os sítios mais acometidos pela doença (FREITAS, 2016). O risco para o desenvolvimento de câncer oral aumenta com o avançar da idade, a maioria dos casos ocorre em pessoas com idade igual ou superior a 50 anos. No entanto, cerca de 6% dos casos de câncer oral ocorrem em pessoas com idade inferior a 45 anos (FREITAS, 2016) e, nos países de alta incidência, alguns casos são relatados antes dos 40 anos (SCULLY, 2011).

De todos os tumores malignos que afetam a região oral, 94% correspondem ao Carcinoma de Células Escamosas Oral (CCEO), que se apresenta como uma neoplasia agressiva que acomete principalmente o sexo masculino na faixa etária entre 50 e 80 anos (FREITAS, 2016). Os principais fatores de risco associados ao desenvolvimento do carcinoma de cabeça e pescoço são o tabaco e a ingestão de álcool, com efeito sinérgico entre eles (BETIOL; VILLA; SICHERO, 2013; JEMAL; BRAY; FERLAY, 2011; MIGALDI et

al., 2012; UKEN et al., 2015). No entanto existem casos em que o acometimento do câncer de cabeça e pescoço não pode ser atribuído a esses fatores de risco: outros fatores de risco foram relatados por terem relevância no desenvolvimento do carcinoma de cabeça e pescoço, entre eles, está a infecção pelo HPV (MEDEIROS et al., 2005; MIGALDI et al., 2012).

Nos últimos anos houve um declínio constante (50%) no número de carcinoma escamoso celular oral na orofaringe (OSCC) associados ao tabagismo e ao etilismo (WOELBER et al., 2017) e um aumento de OSCC associado ao HPV (PYTYNIA et al., 2014; UKEN et al., 2015; WOELBER et al., 2017), principalmente em pacientes jovens, a incidência de OSCC positivos para o HPV elevou 225% entre 1998 e 2004 e hoje em dia 25% a 60% do OSCC são estimados tendo associação com a infecção pelo HPV de alto risco (WOELBER et al., 2017).

O envolvimento do HPV com o câncer oral foi proposto quando características celulares de infecção por HPV (coilocitose) foram encontradas por microscopia eletrônica em lesões orais (SYRJANEN et al., 1983).

Fortes evidências com base em estudos moleculares, demonstram que o HPV é uma importante causa etiológica para acometimento do câncer de cabeça e pescoço (BETIOL, 2013; GUILY et al., 2011), essas evidências são baseadas em alguns fatores, como: frequente detecção de sequências genômicas do HPV e transcritos de E6 e E7 em células tumorais, integração do HPV nessas células e existência de um número considerável de cópias de DNA viral nas lesões (BETIOL; VILLA; SICHERO, 2013; GUILY et al., 2011). Os HPV 16, 18 têm sido os tipos mais sugeridos na associação com o câncer de cabeça e pescoço (MIGALDI et al., 2012), além disso, já foram observadas alterações celulares malignas ou potencialmente malignas, com as mesmas características histopatológicas do câncer cervical uterino (TERRES et al., 2009).

Segundo Kopiej (2012) o HPV se manifesta principalmente nas regiões posteriores da boca, especialmente na base da língua e tonsilas. Os tumores sem a presença do HPV são mais encontrados na parte anterior da língua e palato. Os tumores positivos para o HPV ocorrem mais frequentemente em pessoas mais jovens, não fumantes e da raça branca (MORSHED et al., 2014).

É importante destacar que a maioria dos estudos tem investigado a incidência da infecção pelo HPV em pacientes já diagnosticados com lesões orais ou lesões em outros sítios também referentes ao câncer de cabeça e pescoço (BOUDA et al., 2000; ERHART et al., 2016; GUILY et al., 2011; JABOULI et al., 2015;), Assim as análises baseiam-se em identificar a presença e a frequência do vírus, entretanto, pouca informação é disponível sobre

a presença do HPV em indivíduos sem lesões, tornando-se importante avaliar a presença do vírus nesses indivíduos para ter uma visão geral da frequência, da incidência e do papel do HPV no sítio em questão.

2.11 Sítios de infecção do HPV

O HPV já foi detectado em diversas amostras biológicas e em vários locais do organismo: placenta, sêmen, mucosa oral, mucosa cervical e sangue periférico já foram descritos na literatura como sítios de infecção do vírus (BODAGHI et al., 2005; CECCATO JUNIOR; LOPES; NASCIMENTO, 2015; DEBUZ; OLIVEIRA; ALVES, 2010; FORESTA et al., 2013; FREITAS et al., 2013; TSENG et al., 1999).

2.11.1 Colo do útero

O colo do útero é composto pela ectocérvice e pela endocérvice. A ectocérvice é revestida por epitélio escamoso estratificado não queratinizado e a endocérvice pelo epitélio colunar simples mucossecretor (LIMA et al., 2012). O ponto de ligação entre os dois tipos de epitélio é chamado Junção Escamocolunar (JEC) (Figura 13).

Figura 13 - Porções do colo do útero e seus respectivos epitélios

Fonte: Modificado de Lima et al., 2012.

O epitélio escamoso estratificado não queratinizado, quando maduro (durante a fase reprodutiva da mulher), é representado por quatro diferentes camadas. A mais profunda,

situada logo acima da membrana basal, é constituída por células cuboidais pequenas, arredondadas, com elevada relação nucleocitoplásmica (camada basal). Esta é recoberta por várias camadas de células arredondadas maiores, com núcleo ocupando aproximadamente a metade do volume da célula (camada parabasal) (Figura 14A). A seguir, encontramos células poligonais bem maiores, com citoplasma abundante e núcleos com tamanho menor (camada intermediária) (Figura 14B). Próximo a superfície, o epitélio é representado por camadas de células planas com citoplasma abundante e núcleos picnóticos (camada superficial) (Figura 14C) (CARVALHO et al., 2010; LIMA et al., 2012).

As células basais são excepcionalmente vistas em esfregaços cervicovaginais de mulheres na pós-menopausa ou quando há ulceração da mucosa. As células parabasais são raras nos esfregaços de mulheres na fase reprodutiva, podendo ocorrer em distúrbios hormonais e em casos de ulceração da mucosa. As células intermediárias são as mais comuns nos esfregaços no período pós-ovulatório do ciclo menstrual durante a gravidez e no início da menopausa. As células superficiais correspondem às células mais comuns em esfregaços no período ovulatório do ciclo menstrual (LIMA et al., 2012).

O epitélio colunar simples mucossecretor reveste a endocérvice e as glândulas endocervicais. As células glandulares endocervicais podem ser observadas em grupamentos, o citoplasma é delicado e o núcleo é redondo ou oval com discreta variação de tamanho. Abaixo das células endocervicais, podem ser identificadas algumas células de reserva que apresentam duplo potencial de diferenciação: em direção às células endocervicais colunares ou alternativamente conduzindo ao epitélio escamoso através de um processo de metaplasia (Figura 14D) (LIMA et al., 2012).

Figura 14 - Células escamosas e células glandulares

Legenda: **A:** Células escamosas parabasais; **B:** Células escamosas intermediárias; **C:** Células escamosas superficiais; **D:** Células endocervicais de epitélio glandular.

Fonte: Modificado de Lima et al., 2012.

O processo de metaplasia escamosa é a transformação de um tecido em outro. Pode desenvolver-se a partir da exposição do epitélio glandular endocervical ao Ph da vagina, ocorrendo estímulo e proliferação das células glandulares de reserva (LIMA et al., 2012). De

forma que um novo epitélio substitui progressivamente o epitélio glandular endocervical, constituindo-se assim a Zona de Transformação (ZT), a qual é considerada crítica na origem do carcinoma de colo uterino e onde localizam-se mais de 90% das lesões que antecedem o câncer de colo de útero (GASPARIN et al., 2016). A ZT é localizada no limite entre o epitélio escamoso da ectocérvice e o epitélio colunar da endocérvice (FERNANDES et al., 2013). As células basais da ZT são mais susceptíveis a infecção do HPV, além de apresentarem a habilidade de se diferenciarem, uma propriedade requerida para o ciclo viral (FERNANDES et al., 2013).

O exame citológico, a colposcopia e a histologia fazem parte da associação de exames morfológicos e clínicos que podem diagnosticar as lesões precursoras do câncer cervical e a infecção pelo HPV.

A infecção pelo HPV provoca, geralmente, alterações morfológicas características, detectáveis em citologia de raspados cervicovaginais e biópsias (JORDÃO et al., 2003). As principais alterações indicativas da infecção pelo HPV são aumento do volume nuclear, bi ou multi nucleação hipercromasia (GARCIA; SHUTZ; COLLAÇO, 2012), disqueratose e principalmente, o coilócito, que é caracterizado pela presença de grandes vacúolos perinucleares e pela formação de um halo circunscrito à região nuclear (ANTUNES et al., 2004; SCULLY et al., 2001; KRAWCZYK et al., 2008), sendo o coilócito e a disqueratose os critérios clássicos para o diagnóstico citológico do HPV.

A literatura é unânime em apresentar o coilócito como critério patognomônico para o diagnóstico do HPV, mas autores destacam que este não é o critério mais frequentemente encontrado nos esfregaços cervicovaginais (AZOCAR et al., 1990; YOSHINOCHI et al., 1999). Em decorrência disso, tem-se estudado a introdução de novos critérios morfológicos denominados não clássicos ou secundários para o diagnóstico do HPV, o objetivo principal é de que, associados aos critérios clássicos morfológicos, seja ampliada a sensibilidade do método, aproximando-a da obtida por métodos diagnósticos mais sensíveis e específicos como a reação em cadeia da polimerase (PCR) (JORDÃO et al., 2003).

2.11.2 Cavidade oral

A estrutura que reveste a cavidade oral, uma cavidade úmida constantemente banhada pela saliva, é do tipo mucosa (KATCHBURIAN, 2004). A mucosa reveste as diversas regiões da cavidade oral, com exceção da coroa dos dentes, e é constituída por dois elementos: um epitélio e uma lâmina própria de tecido conjuntivo (KATCHBURIAN, 2004; SILVA et al.,

2016). As mais importantes variações entre a mucosa oral e as demais mucosas são a ceratinização, a presença e variedade de glândulas (SILVA et al., 2016).

A presença e o papel do HPV na oncogênese do câncer de cabeça e pescoço é bastante estudada e descrita na literatura (ANTIENZO et al., 2015; BYCHKOV et al., 2016; GUILY et al., 2011; OKAMI, 2016). Em relação a mucosa oral normal alguns trabalhos descrevem a presença do HPV nesse sítio (ADAMAPOULOU et al., 2013; JALOULI, et al., 2015; MIGALDI et al., 2012) por todo o potencial oncogênico que o HPV apresenta, qualquer sítio que seja acometido pelo vírus, faz-se necessário entender o papel do HPV nesse local. A questão fundamental da infecção oral pelo HPV é se ela foi desenvolvida a partir de uma infecção genital, se foi a partir do contato oro genital, por autoinoculação, como consequência de infecções na pele ou na região anogenital, (XAVIER et al., 2007), ou se pode ser considerada um evento independente (ADELSTEIN et al., 2009; MIGALDI et al., 2012; NAIR; PILLAI, 2005).

Segundo Migaldi et al. (2012), a análise do HPV na mucosa oral normal é mais informativa sobre o potencial de ação do vírus na carcinogênese oral do que a sua detecção em lesões neoplásicas, além disso os autores chamam atenção que a detecção do HPV na mucosa oral normal pode ser inserida em um programa de triagem para o diagnóstico do vírus , como acontece no câncer cervical, podendo assim, precocemente ser possível diagnosticar e avaliar as lesões causadas pelo vírus.

As lesões causadas pelo HPV na mucosa oral, também são caracterizadas por alterações citoplasmáticas conhecidas como coilócito, por núcleo aumentado, bi ou multinucleação, hipercromasia e aumento da queratinização do citoplasma (ZONTA et al., 2012). Em relação aos tipos virais na cavidade oral, os tipos de baixo risco HPV-6 e HPV-11 demonstram uma associação com lesões benignas e outros tipos, especialmente os HPVs 16, 18 e 33 foram associados com lesões malignas (KHOVIDHUNKIT; BUAJEEB; SANGUANSIN, 2008), além desses tipos, outros já foram descritos na mucosa oral (HPV-1, HPV-2, HPV-3, HPV-4, HPV-6, HPV-7, HPV-10, HPV-11, HPV-13, HPV-31, HPV-32, HPV-35, HPV-45, HPV-52, HPV-55, HPV-57, HPV-58, HPV-59, HPV-69, HPV-72, HPV-73) (OLIVEIRA et al., 2012).

Apesar da presença do HPV na cavidade oral e do reconhecimento da associação do vírus com malignidades na região oral, ainda não está claro até que ponto a infecção pelo HPV na cérvix pode ser translocada à cavidade oral, sendo um ponto chave não só para o entendimento do HPV nessa região, como em outras regiões que o vírus já foi detectado e que não estão diretamente ligados a rotas sexuais no organismo, como a presença do HPV no

epitélio do mamilo e na auréola e no pulmão (AOKI et al., 2009; CHENG et al., 2001; CHIOU et al., 2003).

2.11.3 Sangue periférico

O sangue é um tecido conjutivo circulante, constituído por uma massa heterogênea de células diferenciadas, onde os elementos figurados compõem de 40% a 50% do sangue, os quais estão suspensos na fase líquida chamada de plasma (SZULCZEWSKI, 2009). Os principais componentes do sangue são: glóbulos vermelhos responsáveis por transportar oxigênio dos pulmões aos tecidos periféricos (GUYTON, 2006), glóbulos brancos, células móveis especializadas na defesa do organismo, plaquetas, que participam do processo de coagulação sanguínea e plasma que é composto em grande parte por água, proteínas, sais inorgânicos (GUYTON, 2006; LI; QIAN, 2002).

A presença do Papilomavírus em sangue periférico tem sido objeto de estudos em humanos e em animais, particularmente, bovinos (BARON et al., 2015; CARVALHO et al., 2003; DINIZ et al., 2009; FREITAS et al., 2013; JABERIPOUR et al., 2011; LINDSEY et al., 2009; MELO et al., 2011). Os estudos procuravam detectar o HPV no sangue de pacientes com câncer cervical (ARIAS; CARRILLO; ARISTIZÁBAL, 2010; DONG et al., 2002; GUANAMONY et al., 2010; HO et al., 2005; SATHISH et al., 2004; TSENG et al., 1999), por acreditarem que essa detecção é proveniente de células metastáticas que estavam na circulação, além da presença do material genético viral na corrente sanguínea ser discutida como tendo valor prognóstico no câncer cervical (DONG et al., 2002; HO et al., 2005; PORNTANAKASEM et al., 2001).

A detecção do HPV em amostras de sangue sem relação com o câncer, já foi realizada e foi possível identificar a presença do DNA do HPV em Células Mononucleares do Sangue Periférico (pbMCs) (CHENG et al., 2009), demonstrando que essa detecção não está só vinculada a células metastáticas, e trazendo indagações sobre como o HPV pode estar presente no sangue e se ele pode estar agindo como um disseminador do vírus no organismo. Além disso a detecção do HPV no tecido prostático, sêmen (FORESTA et al., 2013), no pulmão (CHEN et al., 2001) e no tecido mamário (LAWSON et al., 2015) levantam questões sobre como o HPV poderia ser identificado nesses locais, dada a falta de infecção direta e a presunção de que a viremia do HPV e disseminação hematogênica não ocorrem.

Acredita-se que alguns vírus possam tirar proveito da absorção do ferro pela célula, para infectá-la, através da ligação com o Receptor de Transferrina (TfR), a Transferina (Tf) é

uma glicoproteína, altamente conservada e conhecida por sua capacidade de transportar o ferro, circulando por todo o organismo (SZULCZEWSKI, 2009), o TfR é altamente expresso em células normais, células neoplásicas e demais tecidos, dessa forma talvez o HPV possa utilizar a via endocítica do ferro para infectar células hospedeiras do sangue periférico e alcançaria o epitélio de outros sítios através da circulação. Outro dado relevante que corrobora a presença do HPV no sangue, é que o receptor para a entrada do HPV na célula hospedeira, o sulfato de heparina, é expresso em linfócitos.

Segundo Bodaghi et al. (2005), uma vez que pbMCs migram para locais de inflamação nos tecidos e também podem reter microorganismos dos tecidos ou da corrente sanguínea, acredita-se que pbMCs executam essa função na infecção pelo HPV, contribuindo para disseminação do vírus. Dessa forma torna-se importante identificar a presença do vírus no sangue de indivíduos sem relação com o câncer, procurando entender a possível disseminação do HPV no organismo.

2.12 Transmissão do HPV

A infecção pelo HPV é predominantemente mas não exclusivamente transmitida sexualmente (FERNANDES et al., 2013), sendo possível o HPV ser transmitido por rotas não sexuais (FREITAS et al., 2016; ROMBALDI et al., 2008) a detecção do HPV em recém nascidos, em crianças e em indivíduos que nunca tiveram relações sexuais (FREITAS et al., 2016) corrobora esse tipo de transmissão. As possíveis rotas não sexuais incluem a transmissão vertical ou horizontal e a autoinoculação (SYRJÄNEN, 2010).

A transmissão vertical pode ser dividida em três categorias (i): transmissão peri-conceptual (em torno da fertilização), (ii): prenatal (durante a gravidez) e (iii): perinatal (durante o nascimento e imediatamente após) (Syrjänen, 2010). A transmissão peri-conceptual pode teoricamente ocorrer através do oócito infectado (CAMPOS et al., 2016) ou espermatozoide (SYRJÄNEN, 2010), o DNA do HPV já foi detectado no sêmen (FORESTA et al., 2010), endométrio e ovários (LAI et al., 1992), sugerindo que essa transmissão pode ocorrer durante a fertilização ou imediatamente após (FREITAS et al., 2015).

A transmissão prenatal é baseada na observação de recém nascidos com sinais de lesões induzidas pelo HPV no nascimento, como lesões na laringe e anogenitais (FREITAS et al., 2015), a presença do DNA do HPV no fluido amniótico (ARMBRUSTER-MORAES et al., 1994), placenta e cordão umbilical (ROMBALDI et al., 2009), reforçam esse tipo de

transmissão, além disso segundo Armbruster-Moraes et al. (1994), essa via de transmissão foi considerada quando foi notório que a cesárea não era eficaz em proteger crianças da transmissão do HPV de mãe para o feto. Outra possibilidade para essa transmissão poderia ser uma infecção ascendente do HPV a partir do trato genital materno, através das membranas fetais ou do sangue através da placenta (CAMPOS et al., 2016), onde já foi descrita uma correlação positiva entre o grau das lesões cervicais e a presença do HPV no líquido amniótico, sugerindo a infecção ascendente (AMBRUSTER-MORAES et al., 1994).

A transmissão perinatal é o resultado do contato do feto com células infectadas na vagina e do colo do útero durante o nascimento (FREITAS et al., 2013), ocorrendo durante o parto com transmissão direta da mãe para o recém nascido (CAMPOS et al., 2016). Quando o recém nascido é contaminado, o HPV estimula a proliferação nas vias aéreas superiores, acometendo as regiões laríngea e respiratória (KUI; XIU; NING, 2003), causando a papilomatose respiratória recorrente (PRR), caracterizada pelo crescimento de múltiplas lesões na laringe, podendo ocorrer ao longo de todo aparelho respiratório (TEIXEIRA et al., 2015; VIEGAS et al., 2011).

Estudos sugerem que infecções orais do HPV em crianças, que as mães são HPV negativos podem ser explicadas pela transmissão horizontal (CASON et al., 1995; PURANEN et al., 1996, 1997). Adicionalmente crianças podem adquirir a infecção pelo HPV do leite materno durante a amamentação (SARKOLA et al., 2008).

A autoinoculação tem sido considerada um caminho potencialmente importante para infecções orais e cervicais (BROUWER; MEZA; EISENBERG, 2015), a relação biológica entre esses dois sítios pode ser complexa, mas a maior prevalência em amostras orais entre mulheres positivas para HPV na cérvix, indica que tais infecções provavelmente não são independentes uma da outra (STEINAU et al., 2014). A transmissão por autoinoculação pode ocorrer por arranhões de um sítio do corpo para outro sítio (SYRJÄNEN, 2010), o HPV-2 é frequentemente detectado em lesões da mucosa oral, e pode ser adquirido pelo contato de verrugas comuns presentes na mão (SYRJÄNEN; PURANEN, 2000). Hernandez et al. (2011) observaram que a autoinoculação é comum em homens e incluía a transmissão da infecção subclínica do HPV entre diferentes sítios genitais e entre sítios genitais e outros locais do corpo, como as mãos.

2.13 Disseminação do HPV entre sítios em um mesmo indivíduo

O aspecto sobre o câncer de cabeça e pescoço mudou drasticamente nos últimos trinta anos, antigamente era visto com uma maior incidência em adultos com idade mais avançada, com o acometimento associado ao consumo de tabaco e álcool (YOUNG et al., 2015). Por uma mudança no estilo de vida, as pessoas têm procurado hábitos mais saudáveis, assim sendo o câncer de cabeça e pescoço associado com o tabagismo, tem diminuído. Por outro lado o câncer na região da orofaringe vem aumentando consideravelmente (DESCHLER et al., 2014), sendo diagnosticado em pessoas mais jovens e que nunca tiveram o hábito de fumar, e a razão dessa mudança é a infecção pelo HPV (CHATUVERDI et al., 2011; DESCHLER et al., 2014; WOELBER et al., 2017). Assim torna-se cada vez mais importante a análise e o entendimento do vírus na mucosa oral.

A disseminação do HPV em um mesmo indivíduo tem sido investigada com o intuito de esclarecer se a infecção genital por esse vírus poderia ser um fator predisponente para a infecção em outros locais, como a cavidade oral (CASTRO et al., 2009). De forma que a história natural do vírus ainda está em construção e os mecanismos de manutenção dele no organismo hospedeiro são pouco compreendidos, entendemos que a detecção do vírus em sítios extragenitais poderá ajudar na compreensão da cadeia disseminadora do HPV.

Estudos que analisaram a infecção genital e oral têm relatado dados contraditórios quanto a prevalência do vírus e a concordância entre diferentes tipos de HPV nos sítios anatômicos, além disso é exposto uma falta de esclarecimento quanto a via de transmissão para a mucosa oral, assim sendo ainda não foi possível afirmar se indivíduos com HPV na mucosa cervical estão mais predispostos a serem acometidos pela infecção viral na mucosa oral (ADAMAPOLOU et al., 2013; CAÑADAS et al., 2004; CASTRO et al., 2009; GIRALDO et al., 2006; TERMINE et al., 2011).

Termine et al. (2011), tendo como base os resultados encontrados no seu estudo, levantaram questões sobre a necessidade da investigação do HPV na mucosa oral em mulheres que apresentam HPV na mucosa cervical, e que outros dados precisam ser analisados para uma maior compreensão da transmissão para sítio oral.

Ademais, se o modelo da carcinogênese amplamente aceito para a patogênese do câncer cervical é aplicável para a carcinogênese oral mediada pelo HPV, então a mucosa saudável é o passo inicial na cavidade oral, com isso a prevalência e a dinâmica da infecção oral pelo HPV torna-se um tópico significativo para ser abordado para elucidar o papel do HPV na carcinogênese oral (TATÁR et al., 2015).

Um dado altamente relevante é que até o momento, os estudos realizados para correlacionar a infecção nas mucosas cervical e oral no mesmo indivíduo não levaram em consideração a detecção do HPV no sangue. Alguns citam uma provável disseminação do vírus no organismo, mas não levantam questionamentos sobre quais seriam as possíveis vias de disseminação e não relatam o sangue como um possível agente disseminador no organismo (MARQUES et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2016; SAINI et al., 2010; TATÁR et al., 2015; VIDOTI et al., 2014).

Neste contexto, a presença do HPV deve ser avaliada a fim de esclarecer se a infecção genital por este vírus pode ser um fator predisponente para a infecção em outros locais, sendo disseminada para outros sítios em um mesmo indivíduo e se o sangue tem relação como uma possível via de disseminação. Dessa forma, o nosso trabalho tem como foco a avaliação comparativa da presença e da atividade exercida pelo HPV nos diferentes sítios de infecção e a relação dos fatores que são descritos como fatores de risco para o acometimento da infecção pelo HPV.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização do estudo

As coletas das amostras foram realizadas no Centro Integrado de Saúde Amaury de Medeiros (CISAM) da Universidade de Pernambuco (UPE). Todas as análises moleculares desse trabalho, foram realizadas no setor de Biologia Molecular do Centro de Oncohematologia Pediátrica-CEONHPE, localizado no Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC), enquanto as análises citológicas foram realizadas no Centro Integrado de Anatomia Patologia (CIAP), também localizado no HUOC.

3.2 Seleção de pacientes

O nosso grupo amostral foi composto por 50 pacientes do sexo feminino, que estavam em atendimento no CISAM. As pacientes foram selecionadas aleatoriamente, seguindo a demanda espontânea do local. Todas as 50 pacientes apresentavam alguma lesão na cérvix ou alguma patologia clínica. Foram coletadas amostras da mucosa cervical, mucosa oral e sangue periférico destas pacientes.

3.3 Coleta de material biológico

3.3.1 Coleta de sangue periférico

A coleta de 4 mL de sangue das pacientes foi realizada por punção periférica, utilizando-se tubos a vácuo (vacuette[®]) contendo o anticoagulante EDTA. As amostras de sangue foram utilizadas para análises moleculares (extração de DNA e RNA).

3.3.2 Coleta de células da mucosa cervical para extração de DNA e RNA

As células da mucosa cervical foram coletadas por meio de esfoliação com escova citológica (cytobrush[®]). Foram coletadas quatro escovas por paciente, sendo duas acondicionadas em tubos falcon de 15 mL contendo solução de lise de membrana para extração de DNA e Trizol para a extração de Ácido Ribonucléico (RNA) e duas

acondicionadas em tubos falcon de 15 mL, um tubo contendo pbS e o outro contendo RNA “later”, os tubos para extração de DNA foram armazenados na geladeira, os tubos para extração de RNA e para possível reextração de DNA foram armazenados em -80 °C.

3.3.3 Coleta de células da mucosa cervical e confecção do esfregaço nas lâminas

A coleta de células da mucosa cervical iniciou-se pela ectocérvice com a utilização da espátula de “Ayres”, onde foi realizada uma raspagem na mucosa com movimento rotativo de 360°, em torno de todo o orifício externo do colo. Posteriormente o material ectocervical foi estendido, sendo disposto no sentido horizontal, ocupando metade da lâmina em movimento de sentido único da direita para esquerda. Já a coleta da endocérvice foi realizada fazendo um giro de 360° no canal cervical com a escova citológica (cytobrush®) e, posteriormente, o material foi estendido rolando a escova de cima para baixo na metade restante da lâmina. Ao final o material foi fixado com spray (Adlin Diagnóstico®) de propilenoglicol e álcool absoluto.

3.3.4 Coleta de células da mucosa oral para extração de DNA e RNA

As células da mucosa oral foram coletadas por meio de esfoliação com escova citológica (cytobrush®). Foram utilizadas quatro escovas por pacientes, sendo duas acondicionadas em tubos falcon de 15 mL contendo solução de lise de membrana para extração de DNA e Trizol para a extração de RNA e duas acondicionadas em tubos falcon de 15 ml contendo pbS e RNA “later”, os tubos para extração de DNA foram armazenados na geladeira, os tubos para extração de RNA e para possível reextração de DNA foram armazenados em -80 °C.

3.3.5 Coleta de células da mucosa oral e confecção do esfregaço na lâmina

As células da mucosa oral foram coletadas fazendo uma esfoliação na mucosa oral com uma escova citológica (cytobrush®) fazendo de 30 a 40 giros de 360°. Posteriormente foram dispostas nas lâminas rolando a escova de cima para baixo e fixadas com spray de propilenoglicol e álcool absoluto.

3.4 Análise Molecular do DNA

3.4.1 Extração de DNA de sangue

De cada paciente foram utilizados 200 µL de amostra de sangue, a extração foi realizada com a utilização do kit *ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System* (Promega®), de acordo com as instruções do fabricante. O produto final foi eluído em 50µL de nuclease “free water” que acompanha o kit e mantido a -20 °C.

3.4.2 Extração de DNA das mucosas cervical e oral

O protocolo precisou ser adaptado para as extrações de DNA das amostras cervicais e orais. Os tubos falcon provenientes das coletas das pacientes, foram centrifugados por 5 minutos a 5.000 rpm, o sobrenadante foi removido e foi adicionado 200µL de pbS, em seguida foi realizada a extração com a utilização do kit *ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System* (Promega®), de acordo com as instruções do fabricante. O produto final foi eluído em 50 µL de nuclease “free water” que acompanha o kit e mantido a -20 °C.

3.4.3 Quantificação do DNA

O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000), onde foi realizada a leitura de uma alíquota de 1,5 µL das respectivas amostras, calculando a concentração ng/uL. Uma concentração de no mínimo 200 ng/uL de cada amostra foi utilizada nas reações de PCR.

3.4.4 Avaliação da qualidade do DNA extraído

Após a quantificação do DNA, foi realizada a amplificação por PCR empregando-se iniciadores específicos para o gene da β -actina humana. As reações de amplificação tiveram um volume final de 12,5 µL, utilizando-se 6,25 µL do Kit GoTaq® Green Master Mix 2X (Promega®), 10 pmol/µL de cada iniciador (*Forward* e *Reverse*), H₂O nuclease “free water” e 200 ng/µL de DNA. Foi realizado um controle negativo que não continha material genético. As amplificações foram realizadas no termociclador Veriti® Thermo Cycler (Applied Biosystem). As sequências dos iniciadores, bem como a ciclagem utilizada na amplificação

por PCR estão demonstradas no quadro 2 a seguir. Os produtos da amplificação foram separados por corrida eletroforética em gel de agarose 2,0%, tendo sido aplicado o marcador de 100 bp, 50 bp ou 1 Kb DNA ladder. O gel foi corado com Brometo de etídio, visualizado e fotografado através do equipamento de captura de imagens L.Pix Transilluminator (Loccus Biotecnologia).

A detecção da β -actina humana é realizada como controle de qualidade e integridade do material extraído.

3.4.5 Detecção por PCR convencional com os iniciadores genéricos MY e GP+

As amostras positivas para o gene da β -actina foram submetidas à amplificação por PCR com iniciadores genéricos MY09/MY11 e GP5+/GP6+. As reações de amplificação tiveram um volume final de 12,5 μ L, utilizando-se 6,25 μ L do Kit GoTaq[®] Green Master Mix 2 X (Promega[®]), 10 pmol/ μ L de cada iniciador (*Forward* e *Reverse*), H₂O nuclease “free water” e 200 ng/ μ L de DNA. Foi realizado controle negativo, que não continha material genético, e positivo, contendo amostra de DNA viral previamente inserido em vetor e clonado (plasmídeos). As amplificações foram realizadas no termociclador Veriti[®] Thermo Cycler (Applied Biosystem).

As sequências dos iniciadores, bem como a ciclagem utilizada na amplificação por PCR estão demonstradas no quadro 2 a seguir.

Os produtos de amplificação foram separados por corrida eletroforética em gel de agarose 2,0% tendo sido aplicado o marcador de 100 bp, 50 bp ou 1 Kb DNA ladder. O gel foi corado com Brometo de etídio, visualizados e fotografado através do equipamento L.Pix Transilluminator (Loccus Biotecnologia).

Quadro 2 - Iniciadores utilizados na análise da qualidade do DNA e na detecção do HPV, suas sequências, ciclagens para amplificação e os tamanhos esperados dos fragmentos amplificados

Iniciadores	Sequência	Ciclagem	Tamanho esperado do fragmento	Gene alvo
BAF/BAR	BAF: 5'TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAC 3' BAR: 5'TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG 3'	94 °C por 4' 94 °C por 30'' 51,5 °C por 30'' 72 °C por 30'' 35 X	350 pb	β-actina humana
MY09/MY11	MY09: 5' CGTCCMAARGGAWACTGATC 3' MY11: 5' GCMCAGGGWCATAAYAATGG 3'	72 °C por 7'	450 pb	L1
GP5+/GP6+	GP5+: 5' TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC 3' GP6+: 5' GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC 3'	95°C por 10' 94 °C por 60'' 42 °C por 60'' 72 °C por 45'' 40 X 72°C por 4'	150 pb	L1

Fonte: Giovanelli et al., 2004; Qu et al., 1997; Schiffman et al., 1991.

3.4.6 Detecção específica com iniciadores para HPV-16 e HPV-18

Todas as amostras foram submetidas à detecção específica com a utilização dos iniciadores para HPV-16 e -18. O quadro 3 demonstra as sequências destes iniciadores e a ciclagem a qual foram submetidas na amplificação por PCR. As reações de amplificação tiveram um volume final de 12,5 µL, utilizando-se 6,25 µL do Kit GoTaq® Green Master Mix 2 X (Promega®), 10 pmol/µL de cada iniciador (*Forward* e *Reverse*), H₂O nuclease “free water” e 200 ng/µL de DNA. Foram realizados controle negativo, que não continha material genético, e positivo, que continha amostra de DNA viral. As amplificações foram realizadas no termociclador Veriti® Thermo Cyclor (Applied Biosystem).

Os produtos da amplificação foram separados por corrida eletroforética em gel de agarose 2,0%, tendo sido aplicado o marcador de 100 bp, 50 bp ou 1 Kb DNA ladder. O gel foi corado com Brometo de etídio, visualizado e fotografado através do equipamento L.Pix Transilluminator (Loccus Biotecnologia).

Quadro 3 - Iniciadores específicos utilizados na tipificação do HPV para HPV-16 e HPV-18

Iniciadores	Sequência	Ciclagem	Tamanho esperado do fragmento	Gene alvo
HPV-16	<i>Forward:</i> 5' TCAAAAGCCACTGTGTCCTGA 3' <i>Reverse:</i> 5' CGTGTTCCTTGATGATCTGCAA 3'	94 °C por 5' 95 °C por 30" 58 °C por 30" 72 °C por 60" 72 °C por 10' <div style="position: absolute; left: 150px; top: 0px;">} 35 X</div>	119 pb	E6
HPV-18	<i>Forward:</i> 5' CCGAGCACGACAGGAACGACT 3' <i>Reverse:</i> 5' TCGTTTCTTCCTCTGAGTCGCTT 3'	94 °C por 5' 95 °C por 30" 55 °C por 30" 72 °C por 60" 72 °C por 10' <div style="position: absolute; left: 150px; top: 0px;">} 35 X</div>	172 pb	E7

Fonte: Karlsen et al., 1996, suas sequências, ciclagens para amplificação e os tamanhos esperados dos fragmentos amplificados.

3.4.7 Detecção específica com iniciadores para HPV-31 e HPV-33

Todas as amostras foram submetidas à detecção específica com a utilização dos iniciadores para HPV-31 e -33. O quadro 4 demonstra as sequências destes iniciadores e a ciclagem a qual foram submetidas na amplificação por PCR. As reações de amplificação tiveram um volume final de 12,5 µL, utilizando-se 6,25 µL do Kit GoTaq® Green Master Mix 2 X (Promega®), 10 pmol/ µL de cada iniciador (*Forward* e *Reverse*), H₂O nuclease “free water” e 200 ng/µL de DNA. Foram realizados controle negativo, que não continha material genético, e positivo, que continha amostra de DNA viral. As amplificações foram realizadas no termociclador Veriti® Thermo Cycler (Applied Biosystem). Os produtos da amplificação foram separados por corrida eletroforética em gel de agarose 2,0%, tendo sido aplicado o marcador de 100 bp, 50 bp ou 1 Kb DNA ladder. O gel foi corado com Brometo de etídio, visualizado e fotografado através do equipamento L.Pix Transilluminator (Loccus Biotecnologia).

Quadro 4 - Iniciadores específicos utilizados na tipificação do HPV para HPV-31 e HPV-33

Iniciadores	Sequência	Ciclagem	Tamanho esperado do fragmento	Gene alvo
HPV-31	<i>Forward:</i> 5'CTACAGTAAGCATTGTGCGTCCT 3' <i>Reverse:</i> 5' ACGTAATGGAGAGGTTGCAATAAC CC 3'	94 °C por 5' 95 °C por 30" } 58 °C por 30" } 35 X 72 °C por 60" 72 °C por 10'	153 pb	E6
HPV-33	<i>Forward:</i> 5' TTCAAACCTTTAGTGCAGTTTGGC 3' <i>Reverse:</i> 5' TTCCTTTAACGTTGGCTTGTGTCC 3'	94 °C por 60" 95 °C por 30" } 55 °C por 60" } 34 X 72 °C por 60" 72 °C por 10'	747 pb	E6

Fonte: Karlsen et al., 1996, suas sequências, ciclagens para amplificação e os tamanhos esperados dos fragmentos amplificados.

3.5 Análise molecular do RNA

3.5.1 Separação de células

A separação de células foi realizada para isolar células nucleadas do sangue, é uma técnica *in house* feita com a utilização de solução salina e Ficoll- paqueTM, um gradiente de concentração é formado, onde as células nucleadas do sangue ficam contidas em um anel interfacial, que é cuidadosamente removido. As células são preservadas em Trizol[®] e armazenadas em -80 °C.

3.5.2 Extração de RNA

Amostras da mucosa oral, mucosa cervical e sangue preservadas em Trizol[®] e mantidas em -80 °C foram descongeladas para extração de RNA. A extração do RNA foi realizada por uma técnica *in house* através do uso de clorofórmio, isopropanol e etanol.

Para eliminar a possibilidade de contaminação com DNA genômico, as amostras foram tratadas com DNAase I amplification grade 100 U-1U/μL (Invitrogen[®]) de acordo com as instruções do fabricante.

3.5.3 Construção do cDNA

A partir dos RNAs extraídos e tratados, foi realizada a síntese de cDNA com a utilização do *Kit ImProm-II Reverse Transcription System* (Promega®). Foram utilizados iniciadores oligoDT para a construção do cDNA, de acordo com as instruções do fabricante.

3.5.4 Amplificação dos transcritos virais de E6 do HPV-16 e de E6/E7 do HPV-18

As reações de RT-PCR utilizaram os mesmos iniciadores específicos para HPV-16 e HPV-18 descritos anteriormente. Foram utilizados 3 µL de cDNA, as reações de amplificação seguiram as mesmas condições daquelas descritas anteriormente para a análise de detecção viral específica por PCR convencional.

3.5.5 Amplificação dos transcritos virais de L1

As reações de RT-PCR utilizaram os iniciadores genéricos GP5+/GP6+, descritos anteriormente. Foram utilizados 3 µL de cDNA, as reações de amplificação seguiram as mesmas condições daquelas descritas anteriormente para a análise da detecção viral por PCR convencional.

3.6 Coloração dos esfregaços com amostras citológicas

O protocolo de coloração usado foi a técnica de Papanicolau modificado, que consiste na aplicação de um corante nuclear, a hematoxilina, e dois corantes citoplasmáticos, o orange G6 e o EA (eosina, verde-luz ou verde-brilhante e pardo de Bismark). Após a coloração do esfregaço seguiu-se a etapa conhecida como clareamento, que promove a transparência celular, com a utilização de xilol.

3.7 Confeção das lâminas para citologia

Após a coloração a lâmina foi colocada em cima do papel filtro para secar e na montagem recebeu o bálsamo do Canadá e a lamínula foi colocada em cima do esfregaço. As lâminas foram visualizadas no microscópio OLYMPUS CX31 e fotografadas no microscópio AXIO Imager.M2m ZEISS.

3.8 Análise estatística

Para a análise descritiva foram construídos gráficos e tabelas. Os testes de associação utilizado foi o Teste do Qui-Quadrado de Pearson. Esse teste verifica a associação entre duas variáveis qualitativas, analisando se a distribuição contingenciada observada possui uma diferença estatisticamente significativa da distribuição aleatória esperada. Entretanto, quando algum cruzamento apresentou menos que uma ocorrência ou se mais de 20% dos cruzamentos apresentaram uma ocorrência esperada menor que cinco, foi utilizado como alternativa o Teste Exato de Fisher. Ambos os testes utilizaram um nível de significância de 5%. As análises foram realizadas com o auxílio dos programas Microsoft Excel[®] 2013 e SPSS 20[®].

3.9 Considerações éticas

As pacientes foram informadas sobre os objetivos da pesquisa, o protocolo e os procedimentos a serem realizados, bem como os riscos e os benefícios da sua participação no estudo, e convidadas a participar do mesmo. Todas as pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A) e foram entrevistadas seguindo a ficha anamnética (APÊNDICE B). A anamnese inclui informações sobre residência, histórico clínico, escolaridade, tabagismo, etilismo, entre outros. Informações dos prontuários foram obtidas de todas as pacientes.

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e pesquisa em Seres Humanos do Complexo Hospitalar HUOC/PROCAPE, sob número CAAE: 31815914.2.0000.5192.

4 RESULTADOS

As análises deste trabalho incluíram 50 pacientes do sexo feminino, com amostras da mucosa cervical, mucosa oral e sangue periférico de todas as pacientes, perfazendo um total amostral de 150 sítios.

4.1 Perfil das pacientes: dados demográficos, biológicos, comportamentais e clínicos

No momento do atendimento foram coletadas informações sobre as pacientes com a ficha anamnética e o prontuário. Os dados sociodemográficos e biológicos estão descritos no gráfico 1. Pode-se observar um maior número de mulheres incluídas na faixa etária entre 18-35 anos (64,00%), que se auto declaram pardas (44%), solteiras (56,00%), com educação básica (50,00%), residentes na zona urbana (84%) e com um ou dois filhos (64%).

Gráfico 1 - Distribuição percentual das variáveis sociodemográficas e biológicas das pacientes

Fonte: A autora, 2017.

Os dados comportamentais e clínicos estão descritos no gráfico 2. Em relação ao comportamento das pacientes, 66% das mulheres tiveram entre 1 e 4 parceiros sexuais, em relação ao sexo oral, 64% das pacientes do nosso estudo, afirmaram a prática do sexo oral, 56% das pacientes fazem uso de anticoncepcional e 96% são HIV negativas. Sobre o tabagismo e o etilismo, 82% das pacientes não possuem o hábito de fumar e 44% das pacientes possuem o hábito do consumo de bebidas alcoólicas. A lesão intraepitelial de alto

grau (HSIL) está presente em 72% das pacientes e em relação ao início da atividade sexual, 72% tiveram o início da prática sexual entre 15 e 18 anos.

Gráfico 2 - Distribuição percentual das variáveis comportamentais e clínicas das pacientes

Fonte: A autora, 2017.

4.2 Avaliação da qualidade do DNA extraído a partir das amostras coletadas

Após a extração do DNA, todas as amostras foram submetidas à amplificação do gene da β -actina para verificar a qualidade do DNA. Todas as amostras foram positivas, apresentando o fragmento de 350 pb, o que confirma a viabilidade do DNA para a utilização nas próximas reações. A figura 15 demonstra uma corrida em gel de agarose com produtos amplificados para a β -actina.

Figura 15 - Corrida eletroforética em gel de agarose 2% com os produtos da PCR para o gene da β -actina

Legenda: **M**: Marcador molecular de 100 pb (Promega®). **B**: Controle negativo; 1-4: amostras da mucosa oral; 5-8: amostras da mucosa cervical e 9-12: amostras do sangue periférico.

Fonte: A autora, 2017.

4.3 Detecção das sequências de DNA de HPV em amostras de sangue periférico, mucosas oral e cervical utilizando os iniciadores genéricos MY e GP

A detecção da região L1 com os iniciadores genéricos MY09/MY11 e GP5+/GP6+ pode ser visualizada na figura 16.

Figura 16 - Corrida eletroforética em gel de agarose 2% com produtos da PCR com os iniciadores MY e GP+ para o gene L1 do HPV

Legenda: 16A: Produtos de PCR amplificados com par de iniciadores MY09/MY11; M: Marcador molecular de 250 pb (Promega®); 1-4: amostras da mucosa oral negativas para HPV; 5-7: amostras da mucosa cervical negativas para HPV; 8: amostra da mucosa cervical positiva para HPV. 16B: Produtos de PCR amplificados com par de iniciadores GP5+/GP6+; M: Marcador molecular de 50 pb (Promega®); B: Controle negativo; C+: controle positivo; 2: amostra do sangue periférico negativa para HPV; 3: amostra do sangue periférico positiva para HPV; 4: amostras do sangue periférico negativa para HPV; 5-7: amostras da mucosa oral negativas para HPV; 8 e 9: amostras da mucosa oral positivas para HPV.

Fonte: A autora, 2017.

Na tabela 1 temos a detecção do HPV na região L1 com os iniciadores genéricos MY e GP nos três sítios de infecção

Tabela 1 - Detecção do HPV na região L1 com os iniciadores genéricos

Sítio de Infecção	Detecção do HPV			
	Iniciadores Genéricos MY09/MY11		Iniciadores Genéricos GP5+/GP6+	
	Positivo n= 27 (%)	Negativo n= 123 (%)	Positivo n= 75 (%)	Negativo n= 75 (%)
Mucosa Cervical	16 (61,54%)	34 (38,46%)	36 (48,00%)	14 (52,00%)
Mucosa Oral	05 (19,23%)	45 (80,77%)	27 (36,00%)	23 (64,00%)
Sangue Periférico	05 (19,23%)	44 (80,77%)	12 (16,00%)	38 (84,00%)

Fonte: A autora, 2017.

A mucosa cervical e o sangue foram os sítios que apresentaram a maior e menor detecção do vírus com os dois iniciadores, respectivamente. O iniciador GP+ foi mais sensível em detectar o vírus nos três sítios, isso se deve ao fato deste iniciador amplificar um região menor do genoma do HPV, do que a região amplificada pelo MY.

No gráfico 3 a distribuição percentual dos iniciadores MY e GP nos três sítios pode ser visualizada.

Gráfico 3 - Distribuição percentual dos iniciadores genéricos nos três sítios de infecção

Fonte: A autora, 2017.

A maior detecção com esses iniciadores, foi realizada na mucosa cervical com o GP, onde 72% das pacientes foram positivas para o vírus, e a menor detecção foi realizada no sangue periférico e na mucosa oral com o iniciador MY, onde 90% das pacientes foram negativas para a detecção viral em ambos os sítios.

4.4 Identificação do HPV-16, HPV-18, HPV-31 e HPV-33 em amostras de sangue periférico, mucosas oral e cervical que foram positivas e negativas para os iniciadores genéricos

A detecção com os iniciadores específicos para os tipos HPV-16 e HPV-18, HPV-31 e HPV-33 pode ser visualizada nas figuras 17 e 18 respectivamente.

Figura 17 - Corrida eletroforética em gel de agarose 2% com produtos da PCR para detecção do HPV-16 (A) e HPV-18 (B)

Legenda: M: Marcador molecular de 50 bp (Promega®); B: Controle negativo ; C+: controle positivo. **A:** Produtos de PCR amplificados para o HPV-16; 1-4 amostras da mucosa oral positivas para HPV; 5 e 8 amostras da mucosa cervical negativas para HPV; 6, 7 e 9 amostras da mucosa cervical positivas para HPV. **B:** Produtos de PCR amplificados para HPV-18; 1 e 2 amostras do sangue periférico negativas para HPV; 3-6 amostras do sangue periférico positivas para HPV.

Fonte: A autora, 2017.

Figura 18 - Corrida eletroforética em gel de agarose 2% com produtos da PCR para detecção do HPV-31 (A) e HPV-33 (B)

Legenda: M: Marcador molecular de 100 bp (Promega®) na figura 4A e M: Marcador molecular de 1 Kb (Promega®) na figura 4B; B: Controle negativo ; C+: controle positivo. **21 A:** Produtos de PCR amplificados para o HPV-31; 1-2 amostras da mucosa oral positivas para HPV; 3 e 4 amostras da mucosa oral negativas para HPV; 5, 6 e 7 amostras da mucosa cervical positivas para HPV; 8 amostra da mucosa cervical positiva para HPV; 9 e 11 amostras do sangue periférico negativas para HPV; 10 amostra do sangue periférico positiva pra HPV. **21 B:** Produtos de PCR amplificados para HPV-33; 1-3 amostras da mucosa oral negativas para HPV; 4 amostra da mucosa cervical negativa para HPV; 5 amostra da mucosa cervical positiva para HPV; 6 amostra do sangue periférico positiva para HPV; 7 amostra negativa do sangue periférico positiva para HPV.

Fonte: A autora, 2017.

Na tabela 2 temos o detalhamento da detecção dos quatro tipos virais nos três sítios analisados. As análises para os tipos específicos do vírus, foram feitas em todas as amostras, incluindo as amostras que foram negativas para a detecção com os iniciadores genéricos. Os iniciadores específicos amplificam genes diferentes do gene identificado pelos iniciadores

genéricos, onde os iniciadores do HPV-16, HPV-31 e HPV-33 detectam a região E6 do genoma do vírus e os iniciadores do HPV-18, a região E6/E7, aumentando assim a abrangência da identificação do HPV nos sítios analisados.

Tabela 2 - Detecção do HPV-16, HPV-18, HPV-31 e HPV-33 nos três sítios de infecção

Sítio de Infecção	Detecção do HPV							
	Iniciadores Específicos HPV-16		Iniciadores Específicos HPV-18		Iniciadores Específicos HPV-31		Iniciadores Específicos HPV-33	
	Positivo n= 128 (%)	Negativo n= 22 (%)	Positivo n= 73 (%)	Negativo n= 77 (%)	Positivo n= 56 (%)	Negativo n= 94 (%)	Positivo n= 78 (%)	Negativo n= 72 (%)
Mucosa Cervical	46 (35,94%)	04 (18,18%)	28 (38,36%)	22 (28,57%)	19 (33,93%)	31 (32,97%)	25 (32,05%)	25 (34,72%)
Mucosa Oral	42 (32,81%)	08 (36,36%)	28 (38,36%)	22 (28,57%)	28 (50,00%)	22 (23,40)	26 (33,33%)	24 (33,33%)
Sangue Periférico	40 (31,25%)	10 (45,46%)	17 (23,28%)	33 (42,86%)	09 (16,07%)	41 (43,63%)	27 (34,62%)	23 (31,95%)

Fonte: A autora, 2017.

O HPV-16 foi o tipo viral mais detectado nos três sítios, com valores muito elevados em relação aos outros tipos, a mucosa cervical foi o sítio mais acometido por esse vírus, onde das 50 pacientes, 46 foram positivas para o HPV-16 na cérvix. O HPV-18 teve o mesmo número de detecções nas mucosas oral e cervical, o HPV-31 teve uma maior prevalência na mucosa oral e o HPV-33 teve sua maior detecção no sangue.

Nenhuma paciente foi negativa nos três sítios, simultaneamente, para os quatro tipos virais.

É importante observar que a mucosa cervical não foi o sítio com a maior detecção para os quatro tipos do vírus, demonstrando uma predileção por sítios diferentes entre os tipos virais analisados.

No gráfico 4 a distribuição percentual dos quatro tipos virais nos três sítios de infecção pode ser visualizada.

Gráfico 4 - Distribuição percentual do HPV-16, HPV-18, HPV-31 nos três sítios de infecção

Fonte: A autora, 2017.

Fazendo uma análise da distribuição geral dos quatro tipos virais, podemos identificar que o HPV-16 teve o maior percentual de distribuição nos três sítios, sendo o maior percentual na mucosa cervical, onde 92% das pacientes foram positivas para esse tipo viral. O menor percentual de distribuição foi do HPV-31 no sangue periférico, onde apenas 18% das pacientes foram positivas para esse tipo viral nesse sítio.

4.5 Comparação da detecção com os iniciadores genéricos e específicos

Nós fizemos uma análise com todos os iniciadores utilizados para a detecção do HPV nos três sítios de infecção, essa análise pode ser visualizada no gráfico 5.

Gráfico 5 - Detecção do HPV com iniciadores genéricos e específicos nos três sítios de infecção

Fonte: A autora, 2017.

Analisando todos os iniciadores usados para a detecção do HPV, podemos explicar que o HPV-16 foi o mais sensível em detectar o vírus, nos três sítios de infecção. O iniciador MY teve a menor sensibilidade na detecção, com números muito divergentes em relação aos outros iniciadores.

Nenhuma paciente foi negativa em todos os sítios, simultaneamente, para todos os iniciadores utilizados.

Analisamos os sítios que foram negativos com os iniciadores genéricos, e fizemos uma comparação com a detecção com os iniciadores específicos, os resultados estão descritos no gráfico 6.

Gráfico 6 - Comparação dos sítios negativos com os iniciadores genéricos (MY e GP) e com os iniciadores específicos (HPV-16, HPV-18, HPV-31 e HPV-33)

Fonte: A autora, 2017.

Em 69 sítios não foi possível detectar o HPV pelos iniciadores genéricos, como já foi mencionado acima, iniciadores específicos que detectam outras regiões do genoma do vírus também foram utilizados. Dessa forma, no nosso trabalho a detecção com iniciadores específicos foi usada tanto para identificar qual o tipo do vírus detectado com os iniciadores genéricos, como para analisar de uma outra forma sítios que tinham sido negativos para a detecção com iniciadores genéricos.

Assim sendo, foi possível aumentar consideravelmente a detecção do HPV nas nossas amostras. Dessa maneira, apenas 7 sítios dos 150 analisados foram negativos para o HPV, com a detecção pelos iniciadores genéricos e iniciadores específicos.

4.6 Associação dos tipos virais (HPV-16, HPV-18, HPV-31 e HPV-33), presentes na mucosa cervical e oral com as características comportamentais, clínicas e biológicas

Os resultados da presença dos quatro tipos virais demonstraram que nenhuma paciente foi negativa para o HPV nos três sítios de infecção, simultaneamente, dessa forma não existe paciente negativa para o HPV no nosso grupo amostral. Assim, não foi possível relacionar estatisticamente, de uma forma geral, o perfil das pacientes com a presença dos tipos virais, com isso esta análise de associação foi realizada, especificamente para os sítios das mucosas oral e cervical, com o intuito de correlacionar a detecção viral com variáveis que, de acordo com a literatura, podem estar relacionadas com o acometimento da infecção no sítio em questão. Na tabela 3 estão descritas as características comportamentais, clínicas e biológicas com a infecção dos quatro tipos virais na mucosa cervical.

Tabela 3 - Análise das características comportamentais, clínicas e biológicas com a detecção do HPV-16, HPV-18, HPV-31 e HPV-33 na mucosa cervical

Continua

Características comportamentais, clínicas e biológicas		Tipo do HPV na mucosa cervical											
		HPV-16			HPV-18			HPV-31			HPV-33		
		Sim	Não	Valor-p	Sim	Não	Valor-p	Sim	Não	Valor-p	Sim	Não	Valor-p
Idade													
18-35	n	29	3	0.999 ^a	18	14	0.738 ^b	13	19	0.610 ^b	15	17	0.556 ^b
	%	90,6%	9,4%		56,3%	43,8%		40,6%	59,4%		46,9%	53,1%	
36-59	n	17	1		11	7		6	12		10	8	
	%	94,4%	5,6%		61,1%	38,9%		33,3%	66,7%		55,6%	44,4%	
Número de filhos													
Nenhum	n	4	1	0.237 ^a	1	4	0.237 ^a	1	4	0.127 ^a	2	3	0.002 ^a
	%	80,0%	20,0%		20,0%	80,0%		20,0%	80,0%		40,0%	60,0%	
1 -2	n	30	2	0.109 ^a	19	13	0.109 ^a	16	16	0.127 ^a	11	21	0.002 ^a
	%	93,8%	6,3%		59,4%	40,6%		50,0%	50,0%		34,4%	65,6%	
3-5	n	11	0		8	3		2	9		10	1	
	%	100,0%	0,0%		72,7%	27,3%		18,2%	81,8%		90,9%	9,1%	
Mais de 5	n	1	1		1	1		0	2		2	0	
	%	50,0%	50,0%		50,0%	50,0%		0,0%	100,0%		100,0%	0,0%	
Número de parceiros													
1-4	n	29	4	0.403 ^a	21	12	0.154 ^a	9	24	0.016 ^a	17	16	0.597 ^a
	%	87,9%	12,1%		63,6%	36,4%		27,3%	72,7%		51,5%	48,5%	
≥5	n	15	0		6	9		10	5		8	7	
	%	100,0%	0,0%		40,0%	60,0%		66,7%	33,3%		53,3%	46,7%	
Não sabe informar	n	2	0		2	0		0	2		0	2	
	%	100,0%	0,0%		100,0%	0,0%		0,0%	100,0%		0,0%	100,0%	

Tabela 3 - Análise das características comportamentais, clínicas e biológicas com a detecção do HPV-16, HPV-18, HPV-31 e HPV-33 na mucosa cervical

Continuação													
Características comportamentais, clínicas e biológicas		Tipo do HPV na mucosa cervical											
		HPV-16			HPV-18			HPV-31			HPV-33		
		Sim	Não	Valor-p	Sim	Não	Valor-p	Sim	Não	Valor-p	Sim	Não	Valor-p
Uso de método anticoncepcional													
Sim	n	26	2	0,616 ^a	16	12	0,059 ^a	8	20	0,319 ^a	16	12	0,578 ^a
	%	92,9%	7,1%		57,1%	42,9%		28,6%	71,4%		57,1%	42,9%	
Não	n	8	0		2	6		4	4		3	5	
	%	100,0%	0,0%		25,0%	75,0%		50,0%	50,0%		37,5%	62,5%	
Já fez uso	n	12	2	11	3	7	7	6	8				
	%	85,7%	14,3%	78,6%	21,4%	50,0%	50,0%	42,9%	57,1%				
HIV													
	Sim	n	2	0	2	0	0	2	1	1			
Não	%	100,0%	0,0%	0,999 ^a	100,0%	0,0%	0,503 ^a	0,0%	100,0%	0,519 ^a	50,0%	50,0%	0,999 ^a
	n	44	4	27	21	19	29	24	24				
	%	91,7%	8,3%	56,2%	43,8%	39,6%	60,4%	50,0%	50,0%				
Lesão intraepitelial													
LSIL	n	11	1	0,999 ^a	3	9	0,017 ^a	2	10	0,184 ^a	4	8	0,530 ^a
	%	91,7%	8,3%		25,00%	75,0%		16,7%	83,3%		33,3%	66,7%	
HSIL	n	33	3		24	12		16	20		20	16	
	%	91,7%	8,3%		66,70%	33,3%		44,4%	55,6%		55,6%	44,4%	
Outras	n	2	0	2	0	1	1	1	1				
	%	100,0%	0,0%	100,00%	0,0%	50,0%	50,0%	50,0%	50,0%				

Tabela 3 - Análise das características comportamentais, clínicas e biológicas com a detecção do HPV-16, HPV-18, HPV-31 e HPV-33 na mucosa cervical

Conclusão													
Características comportament ais, clínicas e biológicas	Tipo do HPV na mucosa cervical												
	HPV-16			HPV-18			HPV-31			HPV-33			
	Sim	Não	Valor-p	Sim	Não	Valor-p	Sim	Não	Valor-p	Sim	Não	Valor-p	
Iniciação sexual ≤12-14	n	6	0		2	4		4	2		4	2	
	%	100,0%	0,0%		33,30%	66,7%		66,7%	33,3%		66,7%	33,3%	
15-18	n	33	3	0,739 ^a	21	15	0,278 ^a	12	24	0,367 ^a	17	19	0,742 ^a
	%	91,7%	8,3%		58,30%	41,7%		33,3%	66,7%		47,2%	52,8%	
≥19	n	7	1		6	2		3	5		4	4	
	%	87,5%	12,5%		75,00%	25,0%		37,5%	62,5%		50,0%	50,0%	

Legenda: **a**- Teste Exato de Fisher; **b**- Teste do Qui-Quadrado de Pearson.

Fonte: A autora, 2017.

Na análise das características comportamentais, clínicas e biológicas com a detecção dos tipos virais na mucosa cervical, quatro características foram estatisticamente significativas com três tipos virais. O número de filhos teve uma associação significativa com o HPV-33 ($p=0,002$), demonstrando que um número maior de filhos foi um fator de risco para a infecção por esse tipo viral. O número de parceiros sexuais teve uma associação significativa com o HPV-31 ($p=0,016$), onde um maior número de parceiros sexuais está relacionado com uma maior chance de acometimento da infecção pelo HPV-31.

O HPV-18 teve uma associação estatisticamente significativa com o uso de anticoncepcional ($p=0,059$), onde a utilização do anticoncepcional foi um fator de risco para o acometimento da infecção por esse tipo viral. O tipo de lesão intraepitelial também teve uma associação estatisticamente significativa com o HPV-18 ($p=0,017$), demonstrando que a presença desse tipo viral teve uma maior incidência nas lesões de alto risco, do que nas lesões de baixo risco e que a sua presença está vinculada a lesões em estágios mais avançados. Em relação aos outros tipos virais, não foi encontrada uma associação estatisticamente significativa, mas é importante descrever que o HPV-16 e o HPV-33 também tiveram uma maior presença nas lesões de alto grau (HSIL), esses dados são relevantes, pelo fato que o nosso trabalho só analisa pacientes que não estão com câncer cervical, todos os tipos de HPV do nosso estudo são de alto risco, e uma infecção persistente por HPVs de alto risco é um fator importante para a progressão para câncer cervical.

Na tabela 4 a seguir, estão descritas as características comportamentais e biológicas com a infecção dos quatro tipos virais na mucosa oral.

Tabela 4 - Análise das características comportamentais e biológicas com a detecção do HPV-16, HPV-18, HPV-31 e HPV-33 na mucosa oral

Características comportamentais e biológicas			Tipo do HPV na mucosa oral											
			HPV-16			HPV-18			HPV-31			HPV-33		
			Sim	Não	Valor-p	Sim	Não	Valor-p	Sim	Não	Valor-p	Sim	Não	Valor-p
Idade														
	≥18-35	n	27	5		17	15		18	14		19	13	
		%	84,4%	15,6%	0,923 ^b	53,1%	46,9%	0,352 ^b	56,2%	43,8%	0,962 ^b	59,4%	40,6%	0,164 ^b
	≥36-59	n	15	3		12	6		10	8		7	11	
		%	83,3%	16,7%		66,7%	33,3%		55,6%	44,4%		38,9%	61,1%	
Etilista														
	Sim	n	18	4		16	6		12	10		11	11	
		%	81,8%	18,2%		72,7%	27,3%		54,5%	45,5%		50,0%	50,0%	
	Não	n	18	2	0,598 ^a	9	11	0,184 ^a	11	9	0,999 ^a	13	7	0,179 ^a
		%	90,0%	10,0%		45,0%	55,0%		55,0%	45,0%		65,0%	35,0%	
	Ex- etilista	n	6	2		4	4		5	3		2	6	
		%	75,0%	25,0%		50,0%	50,0%		62,5%	37,5%		25,0%	75,0%	
Tabagista														
	Sim	n	4	1		3	2		3	2		2	3	
		%	80,0%	20,0%		60,0%	40,0%		60,0%	40,0%		40,0%	60,0%	
	Não	n	36	5	0,089 ^a	23	18	0,864 ^a	23	18	0,999 ^a	23	18	0,489 ^a
		%	87,8%	12,2%		56,1%	43,9%		56,1%	43,9%		56,1%	43,9%	
	Ex- tabagista	n	2	2		3	1		2	2		1	3	
		%	50,0%	50,0%		75,0%	25,0%		50,0%	50,0%		25,0%	75,0%	
Sexo oral														
	Sim	n	26	6		21	11		21	11		16	16	
		%	81,2%	18,8%	0,479 ^b	65,6%	34,4%	0,145 ^b	65,6%	34,4%	0,068 ^b	50,0%	50,0%	0,706 ^b
	Não	n	16	2		8	10		7	11		10	8	
		%	88,9%	11,1%		44,4%	55,6%		38,9%	61,1%		55,6%	44,4%	

Legenda: a- Teste Exato de Fisher; b- Teste do Qui-Quadrado de Pearson.

Fonte: A autora, 2017.

Nenhuma das características comportamentais e biológicas analisadas teve uma associação estatisticamente significativa com os quatros tipos virais na mucosa oral. Mas é importante explicar que a infecção pelos HPVs foi mais incidente nas mulheres que realizavam a prática do sexo oral, que é descrito como um fator de risco, e é umas das formas de infecção pelo HPV. Em relação ao tabagismo a infecção pelos tipos virais foi mais incidente em mulheres que não tinham o hábito de fumar.

Levando em consideração o hábito de beber, a incidência do HPV-18 e HPV-31 foi mais prevalente em pessoas que tinham o hábito de consumir bebidas alcoólicas.

4.7 Lesão intraepitelial x detecção dos quatro tipos do HPV na mucosa oral e sangue periférico

Foram analisados os dados sobre o tipo da lesão das pacientes e a detecção dos quatro tipos virais na mucosa oral e no sangue periférico, buscando uma possível correlação entre o grau da lesão, com o acometimento da infecção em outros sítios, esses resultados estão dispostos na tabela 5.

Tabela 5 - Detecção dos tipos virais na mucosa oral e no sangue periférico em relação as lesões intraepiteliais na mucosa cervical

Tipos virais na mucosa oral													
Lesão intraepitelial		HPV-16		Valor- p	HPV-18		Valor-p	HPV-31		Valor- p	HPV-33		Valor- p
		Sim	Não		Sim	Não		Sim	Não		Sim	Não	
LSIL	n	10	2		4	8		7	5		5	7	
	%	83,30%	16,70%		33,30%	66,70%		58,30%	41,70%		41,70%	58,30%	
HSIL	n	31	5	0.415 ^a	24	12	0.108a	21	15	0.392a	20	16	0.750a
	%	86,10%	13,90%		66,70%	33,30%		58,30%	41,70%		55,60%	44,40%	
Outras	n	1	1		1	1		0	2		1	1	
	%	50,00%	50,00%		50,00%	50,00%		0,00%	100,00%		50,00%	50,00%	
Tipos virais no sangue periférico													
Lesão intraepitelial		HPV-16		Valor-p	HPV-18		Valor-p	HPV-31		Valor- p	HPV-33		Valor-p
		Sim	Não		Sim	Não		Sim	Não		Sim	Não	
LSIL	n	12	0		4	8		4	8		4	8	
	%	100,00%	0,00%		33,30%	66,70%		33,30%	66,70%		33,30%	66,70%	
HSIL	n	27	9	0.074 ^a	11	25	0.177a	5	31	0.283a	23	13	0.050a
	%	75,00%	25,00%		30,60%	69,40%		13,90%	86,10%		63,90%	36,10%	
Outras	n	1	1		2	0		0	2		0	2	
	%	50,00%	50,00%		100,00%	0,00%		0,00%	100,00%		0,00%	100,00%	

Fonte: A autora, 2017.

Encontramos uma associação estatisticamente significativa entre a lesão intraepitelial e a infecção pelo HPV-33 no sangue periférico ($p=0,050$), de modo que a infecção pelo HPV-33 no sangue foi mais incidente em pacientes com lesão de alto grau, do que em pacientes com outros tipos de lesão.

Em relação aos tipos virais na mucosa oral e o grau das lesões, não encontramos uma relação estatisticamente significativa, porém mais de 50% das pacientes com lesões intraepiteliais de alto grau foram positivas para os quatro tipos virais na mucosa oral.

4.8 Comparação da presença dos tipos virais nos três sítios de infecção

Um dos focos principais do trabalho é identificar a presença dos quatro tipos virais, simultaneamente, nas mucosas cervical, oral e no sangue periférico. Dessa forma, analisamos todas as pacientes que tiveram a identificação do vírus em mais de um sítio, os resultados estão descritos na tabela 6.

Tabela 6 - Descrição do HPV-16, HPV-18, HPV-31 e HPV-33 em mais de um sítio de infecção

Sítio de Infecção	Tipo do HPV			
	HPV-16 n= 46 (%)	HPV-18 n= 26 (%)	HPV-31 n= 18 (%)	HPV-33 n= 31 (%)
Mucosa cervical , Sangue e Mucosa oral	32 (69,56%)	08 (30,77%)	01 (5,55%)	10 (32,35%)
Mucosa cervical e Sangue	05 (10,87%)	05 (19,23%)	01 (5,55%)	09 (29,03%)
Mucosa oral e Sangue	03 (6,53%)	04 (15,38%)	07 (38,88%)	08 (25,80%)
Mucosa cervical e Mucosa oral	06 (13,04%)	09 (34,61%)	09 (50%)	04 (12,90%)

Fonte: A autora, 2017.

O HPV-16 foi o tipo viral com a maior prevalência nos três sítios simultaneamente, onde 32 pacientes apresentaram esse tipo na mucosa cervical, na mucosa oral e no sangue periférico.

O HPV-31 foi o tipo viral com o menor número de pacientes com a identificação nos três sítios, apenas 1 paciente apresentou essa relação, esse dado não é surpreendente pelo fato do HPV-31 ter sido o tipo viral menos frequente. O HPV-18 e o HPV-33 tiveram um perfil próximo de pacientes com a detecção nos três sítios para esses tipos virais.

Nas análises simultâneas para dois sítios de infecção, na mucosa cervical e no sangue periférico, o HPV-33 foi o tipo viral que apresentou o maior número de pacientes com esse

perfil, 9 pacientes tiveram a presença do HPV-33 simultaneamente nesses sítios. Em relação a mucosa oral e o sangue periférico, o HPV-33 também foi o tipo viral com a maior detecção nesses sítios, 8 pacientes apresentaram esse perfil.

Em relação a mucosa cervical e a mucosa oral, o HPV-18 e o HPV-31 tiveram o mesmo número de pacientes com a presença desses tipos virais nos dois sítios em questão, 9 pacientes apresentaram esse perfil de detecção.

Nenhuma paciente teve a detecção apenas no sangue periférico, todas as pacientes que apresentaram algum tipo viral no sangue, também apresentaram o mesmo tipo na mucosa cervical, na mucosa oral ou em ambas mucosas, demonstrando uma similaridade entre o tipo viral no sangue e em outro sítio de infecção. Dessa forma a presença dos quatro tipos virais no sangue periférico não foi uma detecção aleatória e sem embasamento, todos os tipos virais no sangue, também estavam presentes em outros sítios de infecção no mesmo indivíduo.

4.9 Correlação dos quatros tipos virais nos três sítios de infecção

As análises da correlação dos quatro tipos virais nos três sítios de infecção estão descritas na tabela 7 a seguir.

Tabela 7 - Correlação do HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33 nos três sítios de infecção

														Continua	
				HPV-16 Cérvix		Valor-p	HPV-18 Cérvix		Valor-p	HPV-31 Cérvix		Valor-p	HPV-33 Cérvix		Valor-p
				Sim	Não		Sim	Não		Sim	Não		Sim	Não	
HPV-16 Boca															
	Sim	n	38	4	0.999a	25	17	0.706a	14	28	0.232a	21	21	0.999a	
		%	90.5%	9.5%			59.5%		40.5%			33.3%	66.7%		
	Não	n	8	0		4	4		5	3		4	4		
		%	100.0%	0.0%			50.0%		50.0%			62.5%	37.5%		
HPV-18 Boca															
	Sim	n	28	1	0.297a	19	10	0.206b	10	19	0.547b	16	13	0.390b	
		%	96.6%	3.4%			65.5%		34.5%			34.5%	65.5%		
	Não	n	18	3		10	11		9	12		9	12		
		%	85.7%	14.3%			47.6%		52.4%			42.9%	57.1%		
HPV-31 Boca															
	Sim	n	26	2	0.999a	16	12	0.890b	10	18	0.707b	13	15	0.569b	
		%	92.9%	7.1%			57.1%		42.9%			35.7%	64.3%		
	Não	n	20	2		13	9		9	13		12	10		
		%	90.9%	9.1%			59.1%		40.9%			40.9%	59.1%		
HPV-33 Boca															
	Sim	n	23	3	0.611a	17	9	0.271b	11	15	0.514b	14	12	0.571b	
		%	88.5%	11.5%			65.4%		34.6%			42.3%	57.7%		
	Não	n	23	1		12	12		8	16		11	13		
		%	95.8%	4.2%			50.0%		50.0%			33.3%	66.7%		

Tabela 7 - Correlação do HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33 nos três sítios de infecção

														Continuação
			HPV-16 Cérvix		Valor-p	HPV-18 Cérvix		Valor-p	HPV-31 Cérvix		Valor-p	HPV-33 Cérvix		Valor-p
			Sim	Não		Sim	Não		Sim	Não		Sim	Não	
HPV-16 Sangue														
Sim	n	37	3	0.999a	23	17	0.886b	13	27	0.109b	20	20	0.999b	
	%	92.5%	7.5%		57.5%	42.5%		32.5%	67.5%		50.0%	50.0%		
Não	n	9	1		6	4		6	4		5	5		
	%	90.0%	10.0%		60.0%	40.0%		60.0%	40.0%		50.0%	50.0%		
HPV-18 Sangue														
Sim	n	15	2	0.597a	13	4	0.050b	9	8	0.118b	9	8	0.765b	
	%	88.2%	11.8%		76.5%	23.5%		52.9%	47.1%		52.9%	47.1%		
Não	n	31	2		16	17		10	23		16	17		
	%	93.9%	6.1%		48.5%	51.5%		30.3%	69.7%		48.5%	51.5%		
HPV-31 Sangue														
Sim	n	9	0	0.999a	3	6	0.098b	2	7	0.282b	3	6	0.463a	
	%	100.0%	0.0%		33.3%	66.7%		22.2%	77.8%		33.3%	66.7%		
Não	n	37	4		26	15		17	24		22	19		
	%	90.2%	9.8%		63.4%	36.6%		41.5%	58.5%		53.7%	46.3%		
HPV-33 Sangue														
Sim	n	26	1	0.322a	15	12	0.704b	9	18	0.461b	19	8	0.002b	
	%	96.3%	3.7%		55.6%	44.4%		33.3%	66.7%		70.4%	29.6%		
Não	n	20	3		14	9		10	13		6	17		
	%	87.0%	13.0%		60.9%	39.1%		43.5%	56.5%		26.1%	73.9%		

Tabela 7 - Correlação do HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33 nos três sítios de infecção

													Conclusão	
			HPV-16 Cérvice		Valor-p	HPV-18 Cérvice		Valor-p	HPV-31 Cérvice		Valor-p	HPV-33 Cérvice		Valor-p
			Sim	Não		Sim	Não		Sim	Não		Sim	Não	
HPV-16 Boca														
Sim	n	35	7	0.177b	13	29	0.297b	7	35	0.574b	23	19	0.999a	
	%	83.3%	16.7%		31.0%	69.0%		16.7%	83.3%		54.8%	45.2%		
Não	n	5	3		4	4		2	6		4	4		
	%	62.5%	37.5%		50.0%	50.0%		25.0%	75.0%		50.0%	50.0%		
HPV-18 Boca														
Sim	n	26	3	0.045b	13	16	0.050b	5	24	0.870b	19	10	0.050b	
	%	89.7%	10.3%		44.8%	55.2%		17.2%	82.8%		65.5%	34.5%		
Não	n	14	7		4	17		4	17		8	13		
	%	66.7%	33.3%		19.0%	81.0%		19.0%	81.0%		38.1%	61.9%		
HPV-31 Boca														
Sim	n	27	1	0.001b	11	17	0.373b	8	20	0.028b	18	10	0.100b	
	%	96.4%	3.6%		39.3%	60.7%		28.6%	71.4%		64.3%	35.7%		
Não	n	13	9		6	16		1	21		9	13		
	%	59.1%	40.9%		27.3%	72.7%		4.5%	95.5%		40.9%	59.1%		
HPV-33 Boca														
Sim	n	23	3	0.119b	13	13	0.013b	7	19	0.142a	18	8	0.025b	
	%	88.5%	11.5%		50.0%	50.0%		26.9%	73.1%		69.2%	30.8%		
Não	n	17	7		4	20		2	22		9	15		
	%	70.8%	29.2%		16.7%	83.3%		8.3%	91.7%		37.5%	62.5%		

Legenda: **a** – Teste Exato de Fisher; **b** – Teste do Qui-Quadrado de Pearson .

Fonte: A autora, 2017.

Para analisar a correlação dos quatro tipos virais nos três sítios de infecção, foram comparados todos os tipos virais em todos os sítios de infecção. Tivemos algumas associações estatisticamente significativas entre a presença do mesmo tipo viral em diferentes sítios de infecção: a presença do HPV-18 no sangue foi associada estatisticamente com a presença do HPV-18 na cérvix ($p=0.050$), a presença do HPV-33 no sangue foi associada estatisticamente com a presença do HPV-33 na cérvix ($p=0.002$), a presença do HPV-18 na mucosa oral foi associada estatisticamente com a presença do HPV-18 no sangue ($p=0.050$), a presença do HPV-31 na mucosa oral foi associada estatisticamente com a presença do HPV-31 no sangue ($p=0.028$) e a presença do HPV-33 na mucosa oral foi associada estatisticamente com a presença do HPV-33 no sangue ($p=0.025$).

Além da correlação da presença do mesmo tipo viral em diferentes sítios de infecção, também analisamos a presença de diferentes tipos virais em diferentes sítios de infecção e tivemos correlação estatisticamente significativa entre a presença do HPV-18 na mucosa oral e a presença do HPV-16 no sangue ($p=0.045$), entre a presença do HPV-18 na mucosa oral e a presença do HPV-33 no sangue ($p=0.050$), entre a presença do HPV-31 na mucosa oral e a presença do HPV-16 no sangue ($p=0.001$), entre a presença do HPV-33 na mucosa oral e a presença do HPV-18 no sangue ($p=0.013$).

4.10 Co-infecção dos quatro tipos virais nos três sítios de infecção

Foram feitas análises correlacionando a co-infecção por sítio de infecção, esses resultados estão dispostos no gráfico 7, a seguir.

Foram encontrados vários perfis de disposição dos quatro tipos virais em cada sítio de infecção. Na mucosa cervical o perfil mais encontrado foi a presença do HPV-16, HPV-18, HPV-33 em oito pacientes. Na mucosa oral tivemos dois perfis mais encontrados: a presença do HPV-16, HPV-18, HPV-31 em oito pacientes e a presença HPV-16, HPV-18, HPV-31 e HPV-33 em oito pacientes. No sangue periférico o perfil mais encontrado foi a presença do HPV-16 e HPV-33 em onze pacientes.

A mucosa cervical e a mucosa oral foram os sítios que apresentaram o maior número de combinações de co-infecção entre os quatro tipos virais, nove combinações foram encontradas.

Gráfico 7 - Co-infecção do HPV-16, HPV-18, HPV-31 e HPV-33 nos três sítios de infecção

Legenda: **25 A:** HPV-16, HPV-18, HPV-31 e HPV-33 na mucosa cervical; **25 B:** HPV-16, HPV-18, HPV-31 e HPV-33 na mucosa oral; **25 C:** HPV-16, HPV-18, HPV-31 e HPV-33 no sangue periférico.

Fonte: A autora, 2017

4.11 Correlação da co-infecção na mucosa cervical com as lesões intraepiteliais de alto e baixo grau

A co-infecção dos quatro tipos virais na mucosa cervical foi avaliada com o tipo de lesão intraepitelial das pacientes, esses resultados podem ser observados no gráfico 8.

Gráfico 8 - Correlação da co-infecção na mucosa cervical com o tipo de lesão intraepitelial das pacientes

Fonte: A autora, 2017.

A co-infecção foi mais presente nas pacientes que tinham lesões intraepiteliais de alto grau do que nas pacientes que tinham lesões intraepiteliais de baixo grau.

4.12 Identificação dos achados citológicos nos esfregaços celulares da mucosa cervical e mucosa oral

Os esfregaços celulares foram analisados a fim de identificar achados citológicos característicos da infecção pelo HPV. Foram detectados seis achados citológicos (coilócito, binucleação/multinucleação, disceratose, hiperplasia, irregularidade do contorno nuclear e aumento nuclear) em vinte e três pacientes na mucosa cervical, na figura 19 esses achados citológicos podem ser visualizados.

Os achados citológicos sugestivos da infecção pelo vírus também foram identificados na mucosa oral. Foram encontrados seis achados (coilócito binucleação/multinucleação, disceratose, hiperplasia, irregularidade do contorno nuclear e aumento nuclear) em vinte e quatro pacientes. A figura 20 retrata essa identificação.

De acordo com o Sistema Bethesda, o coilócito é a característica celular que confirma a infecção pelo HPV. Porém, quando identificados outros achados, mesmo sem a presença do coilócito, a possibilidade do diagnóstico da infecção viral pela citologia não deve ser descartado.

Figura 19 - Achados citológicos na mucosa cervical

Legenda: **A:** Células metaplásicas com disqueratose, bi ou multinucleação (seta vermelha) e aumento nuclear (seta preta) (aumento 40 x); **B:** Seta demonstra células intermediárias com irregularidade do contorno nuclear e disqueratose (aumento 40 x); **C:** Células com aumento nuclear, com alta relação núcleo citoplasma, disqueratose (seta vermelha), binucleação e multinucleação (seta preta) (aumento 40 x); **D:** Coilocito muito aparente na célula intermediária (seta vermelha), hiperchromasia, aumento nuclear e início da formação de outros coilocitos (setas pretas) (aumento 40 x). **E:** Visão mais ampla das células, identificação de vários coilocitos no esfregaço (setas vermelhas) e células com muita disqueratose (seta preta). **F:** Células intermediárias e células glandulares. Nas células glandulares é possível identificar aumento nuclear (setas pretas), irregularidade do contorno (seta vermelha) e disqueratose (seta amarela). Nas células intermediárias identificamos aumento nuclear (seta verde), disqueratose (seta azul) e formação do coilocito (seta laranja).

Fonte: A autora, 2017.

Figura 20 - Achados citológicos na mucosa oral

Legenda: **A:** Células escamosas superficiais e intermediárias, disqueratose bem acentuada (setas pretas), núcleo com tamanho aumentado e hiperqueratose (seta vermelha) (aumento 10 x); **B:** Coilocito (seta preta) e célula disqueratótica e núcleo aumentado (seta vermelha) (aumento 40 x); **C:** célula com binucleação (seta vermelha), disqueratose e irregularidade do contorno nuclear (seta preta) (aumento 40 x); **D:** Célula com disqueratose (seta verde), aumento nuclear (seta amarela), hiperqueratose, irregularidade do contorno (seta vermelha), pequena formação do vacúolo coilocitótico e aumento nuclear (seta preta) (aumento 40x); **E:** Célula com binucleação (seta vermelha), disqueratose e irregularidade do contorno (seta amarela) (aumento 40 x); **F:** Células com disqueratose (setas vermelhas) (aumento 10 x).

Fonte: A autora, 2017.

4.12.1 Achados citológicos e a detecção dos quatro tipos virais na mucosa cervical e mucosa oral

A partir da identificação dos achados citológicos nas mucosas cervical e mucosa oral das pacientes do nosso estudo, nós analisamos a presença dos achados citológicos com os tipos virais, buscando uma possível correlação entre o tipo do vírus e a presença dos achados nas mucosas, essa análise está descrita na tabela 8 a seguir.

Tabela 8 - Identificação dos achados citológicos nas mucosas cervical e oral e detecção do HPV-16, HPV-18, HPV-31 e HPV-33

Tipo do HPV na mucosa cervical													
Achados citológicos na Mucosa cervical	HPV-16			HPV-18			HPV-31			HPV-33			
			Valor-p			Valor-p			Valor-p			Valor-p	
		Sim	Não		Sim	Não		Sim	Não		Sim	Não	
Presente	n	21	2	0,999 ^a	14	9	0,704 ^b	10	13	0,461 ^b	13	10	0,395 ^b
	%	91.3%	8.7%		60.9%	39.1%		43.5%	56.5%		56.5%	43.5%	
Ausente	n	25	2		15	12		9	18		12	15	
	%	92.6%	7.4%		55.6%	44.4%		33.3%	66.7%		44.4%	55.6%	

Tipo do HPV na mucosa oral													
Achados citológicos na Mucosa oral	HPV-16			HPV-18			HPV-31			HPV-33			
			Valor-p			Valor-p			Valor-p			Valor-p	
		Sim	Não		Sim	Não		Sim	Não		Sim	Não	
Presente	n	19	5	0,456 ^a	13	11	0,598 ^b	15	9	0,374 ^b	14	10	0,389 ^b
	%	79.2%	20.8%		54.2%	45.8%		62.5%	37.5%		58.3%	41.7%	
Ausente	n	23	3		16	10		13	13		12	14	
	%	88.5%	11.5%		61.5%	38.5%		50.0%	50.0%		46.2%	53.8%	

Fonte: A autora, 2017.

Não foi possível encontrar nenhuma associação estatisticamente significativa que correlacionasse a presença dos achados citológicos com a detecção do tipo viral nas duas mucosas, mas é importante descrever que todos os quatro tipos virais tanto na mucosa cervical, quanto na mucosa oral estavam presentes em pacientes com a identificação dos achados citológicos.

Outro dado relevante é que tivemos a presença dos quatro tipos virais em pacientes que foram negativas para a identificação dos achados citológicos nos esfregaços celulares, isso pode ser justificado pela menor sensibilidade da citologia em identificar a infecção viral e pelo vírus estar em um estado físico que não acarrete mudanças possíveis de identificação nas células.

4.12.2 Descrição dos achados citológicos na mucosa cervical e na mucosa oral

Os tipos dos achados citológicos detectados nas mucosas cervical e oral das pacientes estão descritos no gráfico 9.

Gráfico 9 - Tipos dos achados citológicos detectados na mucosa cervical e na mucosa oral.

Fonte: A autora, 2017.

O achado citológico com a maior detecção na mucosa cervical e na mucosa oral foi a disceratose. Foi possível detectar a presença do colócito em ambas as mucosas.

4.13 Avaliação dos transcritos virais do HPV na mucosa cervical, na mucosa oral e no sangue periférico

Análises dos transcritos virais de E6 do HPV-16, E6/E7 do HPV-18 e L1 nas mucosas cervical, oral e no sangue periférico confirmaram a presença de transcritos dos genes de dois tipos virais oncogênicos e do gene L1 (Figura 21). As análises foram feitas apenas nos sítios que foram positivos para a detecção desses tipos virais e da região L1 pelos iniciadores genéricos GP5+/GP6+.

Figura 21 - Corrida eletroforética em gel de agarose 2% com produtos da RT-PCR para detecção dos transcritos virais de E6 de HPV-16

Legenda: (A), E6/E7 de HPV-18 (B) e L1 (C). M: Marcador molecular de 100bp (Promega®); B: Controle negativo ; C+: controle positivo. **A:** Produtos de PCR amplificados para E6 do HPV-16; 1-3 amostras da mucosa oral com detecção dos transcritos; 4-6 amostras da mucosa cervical com detecção dos transcritos; 7 e 9 amostras do sangue periférico com detecção dos transcritos; 8 amostra do sangue periférico sem detecção dos transcritos. **B:** Produtos de PCR amplificados para a região E6/E7 do HPV-18; 1,2 e 4 amostras da mucosa cervical com detecção dos transcritos; 3 amostra da mucosa cervical sem detecção de transcritos ; 5-8 amostras da mucosa oral com detecção dos transcritos; 9-11 amostras do sangue periférico com detecção dos transcritos. **C:** Produtos de PCR amplificados para a região L1; 1- amostra do sangue periférico sem detecção; 2- amostra do sangue periférico com detecção do transcrito; 3 e 4 amostras da mucosa oral com detecção dos transcritos; 5-amostra da mucosa cervical com detecção do transcrito; 6 e 7 amostras da mucosa cervical sem detecção dos transcritos.

Fonte: A autora, 2017.

O número de detecções dos transcritos virais foi diferente para cada sítio de infecção, os resultados dessa análise estão demonstrados no gráfico 10.

Gráfico 10 - Detecção dos transcritos virais de E6 , E6/E7 e L1 do HPV nos três sítios de infecção

Fonte: A autora, 2017.

A mucosa oral foi o sítio com a maior detecção dos transcritos virais de E6 e E6/E7 e a mucosa cervical foi o sítio com a maior detecção dos transcritos virais de L1. O sangue periférico teve a menor detecção dos transcritos pra todos os genes.

4.14 Correlação dos achados citológicos com a atividade viral nas mucosa oral

A detecção dos achados citológicos foi comparada com a atividade viral de E6, E6/E7 e L1, com a finalidade de estabelecer uma correlação entre essas variáveis, essa análise esta descrita na tabela 9 a seguir.

Não foi encontrada nenhuma associação estatisticamente significativa entre a presença dos achados citológicos e a detecção dos transcritos virais na mucosa oral, porém esses dados são relevantes, pelo fato que nenhuma paciente tinha lesão aparente na mucosa oral e os dados mostram uma alta presença dos quatro tipos virais, atividade viral e achados citológicos característicos da infecção viral na mucosa oral.

Tabela 9 - Detecção dos transcritos virais e dos achados citológicos

Transcritos virais			Achados citológicos na mucosa oral		Valor-p
			Presente	Ausente	
E6 (HPV-16)					0.098a
Sim	n	16	23		
	%	38.50%	61.50%		
Não	n	3	0		
	%	62.25%	37.50%		
E6/E7 (HPV-18)					0.542b
Sim	n	11	13		
	%	45.83%	54.16%		
Não	n	4	0		
	%	100%	0.00%		
L1					0.708a
Sim	n	5	14		
	%	26.31%	73.69%		
Não	n	6	2		
	%	75.00%	25.00%		

Legenda: a – Teste Exato de Fisher; b – Teste do Qui-Quadrado de Pearson.

Fonte: A autora, 2017.

5 DISCUSSÃO

5.1 Análise da população estudada

Embora a associação entre a persistência da infecção pelo HPV de alto risco e o carcinoma cervical já esteja bem estabelecida (BRUNO et al., 2014; KUKIMOTO et al., 2015; STOFER et al., 2011), rastrear a presença destes vírus em mulheres que ainda não foram acometidas pelo câncer cervical é fundamental para a detecção precoce de lesões pré-neoplásicas, bem como para a identificação de co-fatores que contribuam com o processo carcinogênico. Por esta razão, este estudo teve por objetivo correlacionar dados demográficos, biológicos, comportamentais e clínicos de pacientes com lesões cervicais intraepiteliais de alto e baixo grau com a infecção por diferentes tipos de HPV.

Os resultados desta análise mostraram que 64% das pacientes infectadas pelo HPV, possuíam entre 18-35 anos. Estes dados estão em consonância com a literatura, que aponta que a faixa etária de 20 e 40 anos é a mais susceptível a infecção pelo HPV (BHAR et al., 2015; GASPARET et al., 2015; SANTOS et al., 2015). A maior susceptibilidade à infecção pelo HPV nesta faixa etária pode ser atribuída a atividade sexual, já que o vírus é considerado uma DST. A idade da primeira relação sexual também é apontada como um fator de risco para a infecção, 72% das pacientes estudadas tiveram a primeira relação sexual entre 15-18 anos e 12% antes dos 14 anos. Eses dados indicam a carência de trabalhos de prevenção, aconselhamento e orientação sexual. Além do mais, segundo Bezerra et al. (2005) a iniciação sexual antes dos 18 anos é considerada precoce porque a cérvix não está completamente formada e os níveis hormonais não estão estabilizados, de forma que o surgimento de lesões intraepiteliais podem progredir mais rapidamente por causa da imaturidade da cérvix (BRITO; GALVÃO, 2010).

Com relação ao nível de formação, observou-se que 50% das pacientes possuíam ensino básico completo (fundamental). Porém, apenas 8% das pacientes tinham curso superior. Embora Kornya et al. (2008), tenha descrito uma maior prevalência da infecção pelo HPV em mulheres com menor escolaridade, os níveis de escolaridade não podem ser relacionados diretamente com a infecção pelo HPV. Porém, supõem-se que, mulheres com maior nível de escolaridade, em geral, se preocupam mais com a promoção da saúde, o que conta com visitas periódicas ao serviço de saúde. Supõem-se também que, tais mulheres possuam maiores informações acerca do HPV e dos métodos de prevenção de DSTs

Os dados referentes ao estado civil revelam que 56% das pacientes eram solteiras, embora parte destas pacientes residem com seus companheiros, não apresentam o estado civil de casadas. Dessa forma, não reflete o perfil de incidência do vírus referente a diferença de comportamento entre mulheres casadas e solteiras.

Outro parâmetro sóciodemográfico avaliado foi a etnia. Shields et al., (2004) observaram um aumento do risco da infecção do HPV em mulheres negras e hispânicas, atribuindo isso a uma característica sócio-econômica e não genética. Em nossa amostra 44% das mulheres eram pardas, 32% negras e 24% brancas, sugerindo uma distribuição bastante heterogênea. A compreensão de não avaliar estatisticamente é baseada em dados do IBGE, que retratam que a composição étnica da população Pernambucana é bastante heterogênea, sendo constituída por pardos (53,3%), brancos (40,4%), negros (4,9%) e índios (0,5%) (IBGE, 2010). Tal heterogeneidade pode ser atubuída a imigração de portugueses, espanhóis, holandeses, árabes, alemães, ingleses, italianos, além de fortes influências africanas e indígenas. Dessa forma entendemos que essa análise não seria fiel ao perfil que as pacientes auto declararam-se.

Os dados referentes a zona urbana e rural, mostraram que 84% das pacientes eram provenientes da cidade do Recife e 16% eram provenientes de cidades do interior de Pernambuco, isso é justificado pela ocorrência que o CISAM é um hospital referência no atendimento e na assistência à saúde da mulher em todo o estado, não ficando restrito a cidade do Recife.

5.2 Presença do HPV nos três sítios de infecção

A detecção do HPV foi realizada pela técnica de PCR, método bastante sensível que se baseia no diagnóstico molecular do vírus. Foram analisados 150 sítios de infecção, sendo 50 da mucosa cervical, 50 da mucosa oral e 50 do sangue periférico. Na primeira etapa foram utilizados os iniciadores degenerados MY09/MY11 e GP5+ e GP6+. Tais iniciadores são amplamente utilizados para a detecção do HPV em estudos clínicos e amplificam um amplo espectro de tipos do HPV (VENCESLAU et al., 2014).

Os iniciadores GP5+ e GP6+ foram mais sensíveis na detecção do vírus, quando comparados ao iniciadores MY09/MY11. Isso pode ser explicado pelo menor tamanho do fragmentado do DNA amplificado pelos iniciadores GP, demonstrando uma maior eficiência na detecção do vírus. A menor sensibilidade do MY se deve também a presença de bases

degeneradas na região 5', essas degenerações dificultam o anelamento dos iniciadores à sequências alvo, justificando a sensibilidade reduzida (Melo, 2015). Embora os iniciadores degenerados apresentem uma sensibilidade menor que os iniciadores específicos, eles permitem detectar todos os tipos virais (ARALDI, 2014).

A detecção com os iniciadores MY e GP não possibilitou a detecção do vírus em 69 sítios. Por esta razão, as amostras não amplificadas com esses iniciadores foram submetidas ao diagnóstico molecular usando os iniciadores específicos para detecção do HPV-16, HPV-18, HPV-31 e HPV-33. Tais iniciadores amplificam exclusivamente um único genótipo do HPV, é um método altamente sensível e que permite a caracterização dos tipos do HPV presentes nas amostras (MIRANDA, 2010). Assim, foi possível observar que 62 sítios anteriormente negativos para o HPV foram positivos para o vírus. Isso demonstra a importância de utilizar mais de uma técnica de detecção para o HPV, que já foi descrito em outros trabalhos (CARVALHO et al., 2010; MAFRA, 2012; VENCESLAU et al., 2014). Este resultado também indica a ausência de um iniciador “padrão-ouro” no diagnóstico viral, tal como já sugerido por Villiers et al., (2013). A discrepância em taxas de positividade em diferentes estudos pode ser devido a seleção dos iniciadores utilizados, o tipo do material estudado (tecido fresco, tecido parafinado, esfregaços celulares) (VENCESLAU et al., 2014), as condições da PCR, a qualidade e viabilidade do DNA (HO et al., 2005). Mojin et al., (2005) ainda relatam que o peso molecular do produto pode afetar a sensibilidade da reação, já que esta decresce com o aumento do peso molecular.

Os resultados demonstraram que nenhuma paciente foi negativa para o HPV na mucosa cervical, mucosa oral e sangue periférico simultaneamente.

Os métodos utilizados na detecção do HPV, empregaram diferentes conjuntos de iniciadores, tendo como alvo diferentes regiões do genoma do vírus. Os iniciadores MY e GP detectam a região L1 do genoma viral e os iniciadores específicos detectam a região E6 e E6/E7 do vírus. Tanto a região L1 quanto a E1 podem sofrer deleções durante o processo de integração do genoma do HPV (ZHANG et al., 2004), favorecendo resultados falso-negativos. Miller; Johnstone (2001), descreveram que o uso de iniciadores que amplificam a região precoce (E) é de duas a três vezes mais eficiente que iniciadores que detectam a região tardia (L). Estes dados estão de acordo com os resultados encontrados e também podem explicar o aumento da detecção nos sítios de infecção com iniciadores que identificam outras regiões do genoma do vírus.

O direcionamento para os tipos, 16,18,31 e 33 foi devido a elevada prevalência desses tipos virais. O HPV-16 é o vírus mais prevalente em todas as regiões (BRUNO et al., 2014;

OLIVEIRA et al., 2013; SANTOS et al., 2013). O HPV-18 é detectado com alta frequência na população (BRITO et al., 2002; PEREIRA et al., 2007; RABELO-SANTOS et al., 2003; SILVA et al., 2009). Considerando que os tipos virais HPV-31 e HPV-33 são bastante frequentes no Nordeste e Centro-Oeste (OLIVEIRA et al., 2013; RABELO-SANTOS et al., 2003; SANTOS et al., 2013), iniciadores para esses tipos também foram inseridos.

Os resultados mostram que o HPV-16 foi o tipo viral mais prevalente na mucosa cervical, mucosa oral e sangue periférico, o que já era esperado pela alta prevalência desse tipo viral, no Brasil e no mundo (ARIAS et al., 2010; BRUNO et al., 2014; ESMAEILI et al., 2008; JAREBIPOUR et al., 2011; MEJÍA et al., 2016). O segundo tipo mais frequente foi o HPV-33, seguido do HPV-18 e o menos frequente foi o HPV-31.

O HPV-18 já foi descrito como o segundo tipo mais frequente (BRUNI et al., 2015) e já esteve entre os tipos menos frequentes (BRUNO et al., 2014; CLIFFORD et al., 2005). Os resultados mostraram o HPV-18 como o terceiro tipo viral mais incidente, levando em consideração os três sítios de infecção. Ademais, o HPV-18 é significativamente mais representativo nas lesões glandulares e adenocarcinoma cervical do que nas lesões intraepiteliais cervicais (CLIFFORD; FRANCESCHI, 2008; SMITH et al., 2007; WOODMAN et al., 2007).

Os resultados mostraram uma predileção entre os tipos virais por diferentes sítios de infecção. O HPV-16 foi mais prevalente na mucosa cervical, o HPV-18 foi mais incidente nas mucosas cervical e oral, o HPV-31 foi mais presente na mucosa oral e o HPV-33 foi mais presente no sangue. Sabe-se que os mesmos tipos virais podem infectar a mucosa genital, mucosa oral e outros sítios (WOELBER et al., 2017), porém a predileção dos HPVs por diferentes sítios já foi descrita, o HPV-6 mostra uma maior incidência em sítios genitais e o HPV-11 é mais proeminente em sítios orais (DOORBAR et al., 2016; EGAWA et al., 2015). Os sítios anatômicos mais presentes no câncer de orofaringe com a presença de HPVs de alto risco, são as tonsilas e a base da língua (WOELBER et al., 2017). Os resultados não podem afirmar que a maior presença do HPV em determinados sítios, está implicada em uma maior atividade do vírus nesse local, porém sugerimos que existe uma relação entre a detecção e a atividade viral em determinados sítios, e isso é referente a predileção dos HPVs por certos locais no organismo. Além disso, não podemos negligenciar a possibilidade destes sítios terem sido infectados por outros sítios virais. Dessa forma, essa provável infecção de outros tipos virais no mesmo sítio, revela que esses tipos não estabeleceram uma infecção persistente. Não pode ser afirmado se isto estaria relacionado ao sistema imune do hospedeiro, mas o sistema imune atua da mesma maneira independente do tipo do HPV, e cada tipo

reflete de um modo ao sistema imune e ao estabelecimento da persistência viral, podendo isso também estar relacionado a predileção do vírus por determinados sítios de infecção.

5.3 Correlação das características comportamentais, clínicas e biológicas com os quatro tipos virais do HPV na mucosa cervical e mucosa oral

As análises em relação as características do nosso estudo foram realizadas especificamente nos sítios de infecção da mucosa cervical e mucosa oral para cada tipo viral, uma vez que não houve paciente negativa para o HPV nos três sítios simultaneamente.

As variáveis “idade”, “número de filhos”, “número de parceiros”, “uso de método anticoncepcional”, “HIV”, “lesão intraepitelial”, “idade da primeira relação sexual”, foram correlacionadas com a detecção do HPV-16, HPV-18, HPV-31 e HPV-33 na mucosa cervical.

O número de filhos teve uma associação estatisticamente significativa ($p=0.02$) com o HPV-33, segundo Freitas et al. (2013), durante a gravidez o canal uterino passa por mudanças anatômicas e imunológicas que podem aumentar a susceptibilidade de mulheres grávidas a infecção. Além disso acredita-se que a gravidez possa interferir com a infecção pelo HPV devido a alterações imunes e hormonais. Esses dados corroboram os nossos resultados, onde o número de filhos foi associado estatisticamente com o HPV. O HPV-16, HPV-18 e o HPV-31 não tiveram a mesma associação relevante, mas a presença do HPV-18 foi maior em pacientes com filhos do que em pacientes sem filhos ou com números menores de filhos. Chen et al. (2014), descrevem que a gravidez mantém a zona de transformação (ZT) da cérvix durante muitos anos, facilitando a exposição ao HPV e outros fatores de risco, além disso sabe-se que a ZT é uma zona crítica na origem do câncer cervical (GARCIA et al., 2014; GASPARIN et al., 2016), mudanças hormonais induzidas pela gravidez como o aumento no nível de estrógeno e progesterona, podem modular a resposta imune do HPV juntamente com a persistência do vírus (CHEN et al., 2014).

Os dados sobre o número de parceiros sexuais revelam que para 66% das pacientes, a faixa entre 1-4 parceiros sexuais foi a mais representativa, já a faixa mais de 5 parceiros sexuais teve uma prevalência menor, onde 30% das pacientes do nosso trabalho estavam nessa faixa. O HPV-31 teve uma associação estatisticamente significativa com o número de parceiros sexuais ($p=0.016$), onde o aumento do número de parceiros sexuais foi um fator relevante no aumento da detecção do HPV-31 nessas pacientes. Nielsen et al. (2009), também encontraram uma associação significativa entre o número de parceiros sexuais e a infecção cervical pelo HP, sugerindo que o número de parceiros é determinante no risco da infecção.

Segundo Chelimo et al. (2013), o número de parceiros sexuais é um dos fatores de risco mais importantes para a transmissão do vírus e a detecção do DNA do HPV tanto em homens, quanto em mulheres aumenta significativamente com o aumento do número de parceiros sexuais durante a vida.

O uso de anticoncepcional oral (ACO) foi descrito por 56% das pacientes e 28% das pacientes afirmaram já ter feito uso de ACO. O HPV-18 teve uma associação estatisticamente significativa com o uso de ACO ($p=0.059$), demonstrando que o uso está associado com a infecção pelo vírus. Segundo Murta et al., (2001) os contraceptivos orais causam alterações hormonais que levariam a imunomodulação com maior susceptibilidade à infecção pelo HPV. Outro questionamento a ser levado em consideração é se as mulheres que fazem uso de ACO poderiam ter uma menor prevalência ao uso da camisinha e uma maior liberdade sexual com um maior número de parceiros sexuais, influenciando diretamente no aumento da chance de contrair a infecção pelo HPV.

O estudo de Júnior et al., (2015) relata que, nas mulheres infectadas pelo vírus HIV, a prevalência da infecção pelo HPV é maior, e em outros trabalhos (LEVI et al., 2002; ZHANG et al., 2014) está bem documentado que mulheres positivas para o HIV não só possuem alta prevalência de infecção cervical pelo HPV, como também de lesão intraepitelial. Duas pacientes eram positivas para o vírus HIV, e também tiveram a detecção do HPV-16, HPV-18, ademais as duas foram negativas para HPV-31, uma foi positiva para o HPV-33 e as duas tinham diagnóstico para lesão intraepitelial de alto grau. Feola et al., (2013) relataram que mulheres infectadas com HIV com contagens baixas de CD4+ tiveram uma redução de 71% de ficarem livres da infecção pelo HPV comparadas com mulheres com contagens altas de CD4+, com isso os autores concluíram que a infecção pelo HIV reduz a probabilidade de ficar livre da infecção do HPV. Isso demonstra uma relação importante com o HPV de forma que o aparecimento das lesões intraepiteliais é geralmente associado com infecções persistentes do vírus. Além disso, Thaczuk et al. (2006), mostra que mulheres HIV positivas têm uma probabilidade maior de infecção por diferentes tipos de HPV, o que corrobora os achados do nosso trabalho e com os resultados de Mbulawa et al., (2014), que observaram uma maior prevalência de HPVs de alto risco em mulheres infectadas com HIV comparadas com mulheres que não tinham a infecção pelo HIV, os autores também descreveram que a imunossupressão causada pela infecção do HIV também resulta em uma maior susceptibilidade da aquisição de novas infecções por HPVs, resultando em uma maior prevalência de infecções múltiplas.

A lesão intraepitelial teve uma associação estatisticamente significativa com o HPV-18 ($p=0.017$), onde a presença desse tipo viral foi mais incidente nas lesões de alto grau do que nas lesões de baixo grau. Nos outros tipos virais não foi obtida nenhuma associação estatisticamente significativa, o HPV-16 foi altamente prevalente tanto nas lesões de baixo grau, quanto nas lesões de alto grau. O HPV-33 evidenciou uma maior presença nas lesões de alto grau. Esses dados são relevantes, pela conjuntura que o nosso trabalho analisa pacientes que não estão com câncer cervical, todos os tipos de HPV do nosso estudo são de alto risco, e uma infecção persistente por HPVs de alto risco é um fator bem estabelecido para a progressão para o câncer cervical.

As variáveis “idade”, “sexo oral”, “tabagismo” e “etilismo” foram comparadas com a detecção do HPV na mucosa oral, porém não foi possível encontrar uma associação significativa entre essas variáveis com a presença do vírus. Estudos concordam com os resultados encontrados em relação à ausência de associação entre a infecção do HPV e o hábito de fumar (BOUDA et al., 2000; CRUZ et al., 1996; FEDRIZZI et al., 2008; FOURET et al., 1995; RIETHDORF et al., 1997), mas ressaltam que o HPV e o tabagismo participam do processo de tumorigênese na mucosa oral (BOUDA et al., 2000; FOURET et al., 1995). Fedrizzi et al. (2008), descrevem que o tabagismo é considerado um dos mais importantes fatores de risco para o câncer cervical. De acordo com Geller e Campos (2008), isso se deve a alguns mecanismos, entre eles, estão a presença de metabólitos carcinogênicos do tabaco nas secreções cervicais e o dano genômico à célula por genotoxinas. Brito e Galvão (2010), descrevem que a nicotina facilita a persistência do HPV por induzir o aumento da atividade mitótica do epitélio cérvico-vaginal e também devido ao seu efeito depressor no sistema imunológico. Os dados referentes a associação entre a persistência do HPV e hábito de fumar, não são conclusivos (KADERLI; SCHNÜRIGER; BRÜGGER, 2014), mas já foram descritos trabalhos que encontraram uma associação entre o hábito de fumar e a persistência do HPV (MAUCORT-BOULCH et al., 2010; NYITRAY et al., 2011; SCHMEINCK et al., 2011). Pode ser que o hábito de fumar não seja um fator de risco para a aquisição da infecção pelo HPV, mas é disposto como um fator de risco para a persistência viral, que é um fator crucial para o carcinoma cervical (SCHMEINCK et al., 2011) carcinoma anal (KADERLI; SCHNÜRIGER; BRÜGGER, 2014; NYITRAY et al., 2011) podendo também ter relevância no carcinoma de cabeça e pescoço.

Em relação ao etilismo, Kumar et al. (2015), encontraram uma associação significativa entre o consumo de álcool e a infecção pelo HPV. Os autores ainda descreveram que o etilismo pode ajudar a evadir a resposta imune contra a infecção pelo vírus. O álcool modifica

a permeabilidade da mucosa bucal, impedindo que as células epiteliais organizem a barreira de permeabilidade composta principalmente de lipídeos que têm função de impedir a penetração de agentes externos (CARRARD et al., 2008). Os resultados do presente trabalho não demonstram uma associação significativa entre o hábito etilista e a infecção pelo HPV, mas a presença do HPV-18 e do HPV-31 foi mais prevalente nas pacientes que tinham o hábito de consumir bebidas alcoólicas.

5.4 Lesão intraepitelial e os quatro tipos virais na mucosa oral e no sangue periférico

O sistema Bethesda foi criado para uniformizar o sistema de terminologias do exame citopatológico do colo uterino, que é a principal estratégia de rastreamento do câncer cervical e das lesões precursoras (VENCESLAU et al., 2006). Foram introduzidos os termos citológicos de lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL) compreendendo as alterações sugestivas de infecção pelo HPV e neoplasia intraepitelial cervical grau I (NIC I) e lesão intraepitelial de alto grau (HSIL) compreendendo as neoplasias intraepiteliais cervicais II e III (NIC II e NIC III) (VENCESLAU et al., 2006).

Um dos objetivos do trabalho é avaliar alguns fatores relacionados a infecção do HPV, de maneira que era essencial que as pacientes não tivessem câncer cervical ou histórico de câncer. Desse modo todas as pacientes tinham apenas lesões intraepiteliais na cérvix de baixo ou alto grau, onde doze pacientes apresentavam diagnóstico para LSIL, trinta e seis pacientes apresentavam diagnóstico para HSIL e duas pacientes estavam sem o diagnóstico descrito no prontuário, e foram dispostas na categoria “outras. A importância da realização de exames periodicamente para a detecção precoce das lesões intraepiteliais cervicais está na redução da taxa progressão para câncer cervical, onde se as lesões iniciais são tratadas precocemente, a redução para a progressão do câncer cervical invasivo pode chegar a 90% (LIBERA et al., 2016; STOFER et al., 2011).

Na LSIL as alterações citológicas limitam-se ao terço do epitélio, na HSIL as alterações citológicas atingem mais de 50% do epitélio de revestimento do colo uterino (LIBERA et al., 2016; MACHALEK et al., 2016). É difícil analisar as taxas de regressão, persistência e progressão de LSIL devido a heterogeneidade de estudos (SILVEIRA et al., 2015). Taxas de regressão de 7% (CAMPION et al., 1986), 60% (QUINT et al., 2013) e 95% (CHUERY et al., 2008) já foram reportadas, para persistência de 4% (CHUERY et al., 2008), 30% (QUINT et al., 2013) e 67% (CAMPION et al., 1986) já foram atribuídas e para

progressão 0,15% (HAMMES, 2006), 1% (CHUERY et al., 2008) e 26% (CAMPION et al., 1986). A HSIL referente a NIC II é mais provável de regressão do que a HSIL referente a NIC III (MACHALEK et al., 2016).

Sabendo destas diferenças entre as lesões intraepiteliais cervicais de alto e baixo grau e que a progressão de LSIL para HSIL estão vinculadas a persistência da infecção pelo HPV. A detecção dos tipos virais na mucosa oral e no sangue periférico foi avaliada buscando identificar se o grau das lesões poderia estar associado com uma maior ou menor prevalência da infecção em outros sítios. Os resultados mostraram uma associação estatisticamente significativa entre a variável lesão intraepitelial e a presença do HPV-33 no sangue periférico ($p=0.050$), destacando que esse tipo viral esteve mais presente em pacientes com HSIL do que em pacientes com LSIL. Os tipos virais na mucosa oral não demonstraram nenhuma associação estatisticamente significativa, porém a presença dos quatro tipos virais foi identificada em mais de 50% das pacientes com HSIL, chegando em mais de 80% para HPV-16, demonstrando uma alta detecção dos tipos virais na mucosa oral de pacientes com lesões intraepiteliais de alto grau.

Sánchez-Vargas, Díaz-Hernández e Martinez-Martinez (2010), descreveram uma associação significativa entre a presença do HPV-16 na mucosa oral e a progressão da lesão intraepitelial, sugerindo que mulheres com infecção persistente e com lesões de alto grau apresentam um maior risco da detecção do HPV-16 na mucosa oral, sugerimos que esse risco possa ser estendido para outros sítios, como o sangue periférico, e que está relacionado com a maior atividade viral, a persistência da infecção e pode ser observado na presença de outros HPVs de alto risco, como mostraram os resultados do presente trabalho.

5.5 Presença dos quatro tipos virais nos sítios de infecção simultaneamente

Um dos principais objetivos deste estudo é correlacionar a detecção dos quatro tipos virais nos três sítios, simultaneamente, e poder descrever a existência de uma via de disseminação do vírus no organismo. Esse é o primeiro trabalho que detecta quatro tipos virais de alto risco e altamente prevalentes, na mucosa cervical, na mucosa oral e no sangue periférico de pacientes com lesões intraepiteliais de alto e baixo grau, avaliando a provável disseminação do vírus em um mesmo indivíduo.

Antes de analisarmos a detecção nos três sítios, é importante descrever que essa pesquisa foi fundamentada a partir do entendimento que os trabalhos que analisavam uma

possível correlação de tipos virais em um mesmo indivíduo, só realizavam a detecção do HPV na mucosa cervical e na mucosa oral (ADAMAPOLOU et al., 2013; CAÑADAS et al., 2004; CASTRO et al., 2009; GIRALDO et al., 2006; TERMINE et al., 2011).

De modo que os resultados desses estudos, se fundamentavam em supor uma possível disseminação, baseada na similaridade encontrada entre os tipos virais nas mucosas cervical e oral, mas não retratavam o sangue, como um possível disseminador no organismo ou outra via de disseminação.

Com isso é importante descrever que a disseminação do HPV em um mesmo indivíduo têm que ser investigada, não só com o intuito de correlacionar tipos virais em sítios de infecção de um mesmo paciente, mas também com a finalidade de esclarecer se a infecção genital por esse vírus poderia ser um fator predisponente para a infecção em outros locais, como a cavidade oral e se o esse vírus poderia então ser disseminado em um mesmo organismo (CASTRO et al., 2009).

Em relação aos resultados da detecção simultânea nos três sítios de infecção, o HPV-16 foi o tipo viral que apresentou o maior número de pacientes com esse perfil, trinta e duas pacientes tiveram a detecção simultânea para esse tipo viral e o HPV-31 foi o tipo viral que apresentou o menor número de pacientes com esse perfil, apenas uma paciente teve essa detecção nos três sítios.

Ademais os resultados do nosso estudo demonstraram que nenhuma paciente teve a detecção de qualquer um dos quatro tipos virais apenas no sangue periférico, todas as pacientes que apresentaram algum tipo viral no sangue, também apresentaram o mesmo tipo viral na mucosa cervical, na mucosa oral ou em ambas as mucosas, demonstrando uma similaridade entre o tipo viral no sangue e em outro sítio de infecção. Esses dados fundamentam uma provável via de disseminação em um mesmo indivíduo.

Arias et al., (2010), analisando a presença do HPV no plasma, em lesões intraepiteliais e câncer cervical, relataram que em nenhuma paciente foi detectado um tipo viral no plasma que não tenha sido previamente detectado na amostra da mucosa cervical, corroborando os resultados do nosso trabalho e demonstrando que a detecção do HPV no sangue não é uma detecção aleatória e sem embasamento, e que está vinculada a outros sítios de infecção.

Outro dado relevante é que no que se refere a detecção do HPV no sangue periférico, Ho et al. (2005), também detectaram o HPV no sangue, mas eles avaliaram mulheres com câncer cervical, sugerindo que o vírus circulante poderia ser um sinal de metástase e que a presença do HPV nesse sítio estaria vinculada a células cancerígenas na circulação. As pacientes analisadas no presente estudo não tinham câncer cervical, demonstrando que a

detecção do HPV no sangue não está só vinculada a pacientes com câncer, como também foi descrito nos trabalhos de Bodaghi et al. (2005) e Rombaldi et al. (2009), que chegaram a conclusão que o HPV detectado nas células do sangue de pacientes com câncer não eram só células metastáticas liberadas em um estágio mais avançado da doença, mas também estavam associadas a células mononucleares do sangue, corroborando os resultados do nosso trabalho.

Além disso, em relação a detecção dos tipos virais no sangue e nos outros sítios de infecção, tivemos associação estatisticamente significativa entre a presença do HPV-18 no sangue e o HPV-18 na mucosa cervical ($p=0.058$), entre a presença do HPV-33 no sangue e o HPV-33 na mucosa cervical ($p=0.002$), entre a presença do HPV-18 no sangue e o HPV-18 na mucosa oral ($p=0.050$), entre a presença do HPV-31 no sangue e o HPV-31 na mucosa oral ($p=0.028$) e entre a presença do HPV-33 no sangue e o HPV-33 e a mucosa oral ($p=0.025$), demonstrando que a presença desses tipos virais no sangue está associada com a presença do mesmo tipo viral em outros sítios de infecção, dados que corroboram a provável disseminação do vírus em um mesmo indivíduo.

A presença do HPV em locais do organismo que não estão ligados as rotas sexuais de transmissão do vírus reforça a provável disseminação viral pelo sangue periférico. Lawson et al. (2016), detectaram sequências do HPV em mulheres com lesões intraepiteliais cervicais e que posteriormente tiveram câncer de mama, as amostras também deram similaridade para o mesmo tipo do vírus, isso é compatível com a mesma infecção do vírus apresentando papel oncogênico na cérvix e no câncer de mama na mesma paciente. O HPV já foi relacionado com o câncer de pulmão, onde Cheng et al. (2001), sugeriram uma forte associação entre o HPV-16, HPV-18 com o desenvolvimento do câncer de pulmão em pacientes do sexo feminino não fumantes e não encontraram associação com pacientes do sexo masculino, apenas a detecção do vírus, segundo os autores essa observação pode ser relacionada ao fato que as pacientes têm histórico de lesões intraepiteliais cervicais e/ou infecção pelo HPV-16 e HPV-18 e refletem a possibilidade que a infecção pelo HPV em tecidos pulmonares pode ser originado na cérvix e seria mediado pela circulação.

A primeira descrição da possível associação do HPV e do CE foi proposta em 1982 (SYRJÄNEN, 2002), instaurando uma nova área de pesquisa para o HPV, desde então o HPV tem sido detectado em amostras de câncer de esôfago (CE) (GOMES; CARMO; FIGUEIREDO-ALVES, et al., 2014), e estudos reportaram uma variação na prevalência do DNA do HPV de 0 a 25% nas amostras analisadas (ANTONSSON et al., 2010; HERBSTER et al., 2012; HERRERA-GOEPFERT et al., 2009; KOSHIOL et al., 2010). Todas essas evidências e detecções do HPV em locais improváveis de uma infecção direta pelo vírus,

reafirmam a possível transmissão do HPV de um sítio de infecção para outro em um mesmo indivíduo.

Os resultados também demonstraram infecções na mucosa oral para os quatro tipos do HPV sem a presença desses tipos virais na mucosa cervical e a relação também acontece inversamente. A infecção pelos quatro tipos virais em ambas as mucosas sem a presença do HPV no sangue também foi encontrada.

Em relação a presença dos tipos virais na mucosa cervical, sem estarem presentes na mucosa oral, Gugliemo et al. (2012), descrevem a predileção viral, bem como a capacidade do sítio infectado em combater a infecção pelo vírus, podendo ocorrer de maneira independente e em intervalos diferentes de tempo entre os sítios infectados em um mesmo indivíduo, sugerindo que a infecção naquele sítio pelo mesmo tipo viral também pode ter ocorrido, os autores ainda sugerem que a diferença entre os sítios anatômicos pode ser devido a características na mucosa oral que não são encontradas na mucosa cervical, incluindo o tecido queratinizado da mucosa oral, que atua como uma barreira contra as infecções e também à agentes microbianos contidos na saliva, além da presença e da ação da IgA na mucosa oral (CAMPOS; FERREIRA; VITRAL, 2011; CASTRO et al., 2009; GUGLIEMO et al., 2012; SAINI et al., 2010). A IgA também é secretada no trato genital, porém a quantidade de imunoglobulinas presentes nas secreções cervicovaginais é fortemente regulada por hormônios, variando durante o ciclo menstrual (LIMA; ALVES, 2008), com uma acentuada diminuição nos níveis durante o período da ovulação (BEAGLEY; GOCKEL, 2003). O aumento e a diminuição da secreção de imunoglobulinas, durante certos períodos, permite que as mulheres fiquem mais susceptíveis a infecções.

Levando em consideração a presença dos tipos virais na mucosa oral sem estarem presentes na mucosa cervical, Dong et al. (2002), justificaram essa discrepância pela carga viral e pela eliminação da infecção pelo trato genital, essas possibilidades não podem ser descartadas, mas é importante ressaltar que esses resultados não invalidam uma via de disseminação no organismo, apenas externam outros meios de entrada do vírus no organismo, pela mucosa oral, podendo a prática de sexo oral ser uma via de infecção para o HPV nesse sítio, prática essa que foi descrita por 64% das pacientes do estudo.

Os resultados no que dizem respeito a similaridade dos tipos virais na mucosa oral e no sangue periférico, demonstram que se a infecção primária foi pela mucosa oral, além de outra via primária de infecção, também temos a disseminação da mucosa oral para o sangue periférico, caracterizando que não existe premissa básica para a disseminação, podendo ocorrer de ambas as mucosas para o sangue periférico.

Segundo Fakhry et al. (2006), a infecção oral pelo HPV é mais frequente em mulheres com infecção cervical, do que em relação a mulheres sem a presença do HPV na cérvix. Os resultados do presente trabalho são descritos para cada tipo viral, dessa forma a análise é baseada no tipo do vírus, o HPV-16 foi o tipo viral mais encontrado na mucosa cervical e na mucosa oral simultaneamente, trinta e oito pacientes tiveram a detecção desse perfil, o HPV-18 apresentou dezenove pacientes, o HPV-31 apresentou dez pacientes e o HPV-33 apresentou quatorze pacientes, comparando a detecção na mucosa oral sem a presença do mesmo tipo viral na cérvix, para o HPV-16 quatro pacientes apresentaram esse tipo viral na mucosa oral sem a presença do HPV-16 na cérvix, para o HPV-18 dez pacientes apresentaram esse perfil, para o HPV-31 dezoito pacientes apresentaram esse perfil e para o HPV-33 doze pacientes apresentaram esse perfil.

Adamapolou et al. (2013), não encontraram a presença dos tipos virais na mucosa oral sem a presença da infecção simultânea na cérvix, mas as análises foram baseadas apenas na detecção com iniciadores de uma mesma região do genoma do vírus e a tipagem do HPV foi realizada pela técnica de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), de modo que outras regiões do vírus não foram analisadas, no nosso estudo tivemos o cuidado de analisar outras regiões do genoma do HPV e usar iniciadores específicos para tipar a detecção realizada com os iniciadores genéricos e para aumentar a abrangência da detecção, que demonstrou resultados satisfatórios.

O HPV-31 foi o único tipo viral em que a presença do vírus na mucosa oral não foi mais frequente em pacientes com a infecção cervical, esses resultados podem ser explicados por uma possível predileção do HPV-31 por outros sítios, visto que esse tipo viral foi mais frequente na mucosa oral do que na mucosa cervical, além de não estar mais presente em pacientes que tinham a infecção por esse tipo viral na cérvix. Segundo Serrano et al. (2015), o HPV-31 também teve uma detecção menos prevalente que o HPV-16 e HPV-18 e também apresentou uma maior relevância em outros sítios do que na mucosa cervical, como na vagina. Os resultados do trabalho de Kero et al. (2011), também descreveram diferença entre a detecção em diferentes sítios e só detectaram o HPV-31 na mucosa oral.

A relação biológica entre a mucosa cervical e a mucosa oral pode ser complexa, mas a maior prevalência em amostras orais entre mulheres positivas para HPV cervical indica que tais infecções não são susceptíveis de serem independentes entre si (STEINAU et al., 2014)., podemos afirmar que para três tipos virais a presença do HPV na mucosa oral foi mais prevalente em pacientes que apresentavam a infecção na mucosa cervical.

A discrepância entre a presença dos mesmos tipos virais nas duas mucosas, ou a falta de detecção do HPV na mucosa oral de indivíduos que apresentam a infecção na região anogenital, não são dados que possam confirmar a inexistência da transmissão viral de uma mucosa para a outra, como já foi descrito em alguns estudos (MARQUES et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2016), de maneira que a presença do HPV na mucosa oral, não pode ser vinculada apenas ao comportamento sexual, pela prática do sexo oral. A prática do sexo oral é um meio de infecção do HPV na mucosa oral, mas não é o único, outros pontos precisam ser elevados em consideração na falta de detecção em ambas as mucosas, como a predileção por sítios de infecção e o combate da infecção pelo sistema imune em intervalos de tempos diferentes.

5.6 Presença de diferentes tipos virais em diferentes sítios de infecção

O trabalho analisou quatro tipos virais em diferentes sítios de infecção, procurando avaliar a presença do tipo específico em cada sítio, analisando a disseminação viral referente a presença do mesmo tipo viral nos sítios de infecção, porém é importante destacar que independente dessa relação por tipo viral, é preciso analisar completamente a infecção do HPV nas pacientes.

Os resultado demonstraram relações importantes entre diferentes tipos virais em diferentes sítios de infecção, foram encontradas associações estatisticamente significativas entre a presença do HPV-18 na mucosa oral e a presença do HPV-16 no sangue ($p=0.045$), entre a presença do HPV-18 na mucosa oral e a presença do HPV-33 no sangue ($p=0.050$), entre a presença do HPV-31 na mucosa oral e o HPV-16 no sangue ($p=0.001$) e entre a presença do HPV-33 na mucosa oral e o HPV-18 no sangue ($p=0.013$). Discute-se à possibilidade que alguns tipos do HPV, principalmente aqueles pertencentes à mesma espécie, possam interagir e agir sinergicamente (MIRANDA, 2010), de modo que essa interação pode não estar só vinculada ao mesmo sítio de infecção e sim a sítios diferentes em um mesmo indivíduo, os resultados do presente estudo reforçam que possa existir uma interação entre diferentes tipos virais em diferentes sítios de infecção.

5.7 Co-infecção dos quatro tipos virais nos três sítios de infecção

Os mecanismos que determinam a regressão, persistência, bem como as lesões precursoras do câncer cervical são principalmente influenciados por aspectos relacionados a

própria infecção, tais como tipo viral, carga viral, infecção única e múltipla e também fatores diretamente relacionados ao hospedeiro, como imunidade, comportamento sexual e outros hábitos (ALMEIDA et al., 2015). A coinfeção com mais de um tipo do HPV é comum, especialmente em mulheres mais jovens (CHATUVERDI et al., 2011; MÉNDEZ et al., 2005; RIBEIRO, 2009; VACCARELLA et al., 2010; WOODMAN et al., 2007).

Estudos mostram um aumento no risco da aquisição de novos tipos do HPV em mulheres já infectadas, em comparação com aquelas que não têm a infecção pelo HPV (LIAW et al., 2001; ROUSSEAU et al., 2001).

Os resultados referentes a co-infecção por diferentes tipos virais nos três sítios de infecção foram bem relevantes: quarenta e duas pacientes (84%) tiveram a presença de dois, três ou dos quatro tipos virais na mucosa cervical e na mucosa oral, no sangue periférico trinta e três pacientes (66%) tiveram a presença de dois, três ou os quatro tipos virais nesse sítio. O perfil mais encontrado na mucosa cervical foi a detecção múltipla do HPV-16, HPV-18 e HPV-33, na mucosa oral dois perfis foram mais detectados a detecção múltipla do HPV-16, HPV-18, HPV-31 e a detecção múltipla do HPV-16, HPV-18, HPV-31 e HPV-33, no sangue periférico o perfil mais encontrado foi a detecção múltipla do HPV-16 e HPV-33.

Pelo nosso número amostral e por estarmos analisando quatro tipos do HPV, não é possível fazer afirmações sobre a ação da co-infecção nas nossas pacientes, mas a alta presença da co-infecção nos três sítios de infecção, são dados relevantes e importantes, principalmente quando é descrito na literatura que a co-infecção tem ação na progressão da lesão (KRIEK et al., 2016; MÉNDEZ et al., 2005; MUÑOZ et al., 2003; TROTTIER et al., 2006) e na persistência do HPV (ALMEIDA et al., 2015).

Correlacionamos a co-infecção dos tipos virais na mucosa cervical com o tipo da lesão intraepitelial das pacientes, a co-infecção foi mais presente nas pacientes com lesões intraepiteliais de alto grau do que nas lesões intraepiteliais de baixo grau. O nosso grupo amostral é pequeno para inferir que a co-infecção é um fator ligado a progressão da lesão, mas os resultados de Van der Graaf et al. (2002), demonstraram que a infecções múltiplas pode HPVs de alto risco, principalmente na presença do HPV-16 possuíram maior risco de progressão para as lesões intraepiteliais de alto grau e câncer cervical quando comparadas com as infecções simples de HPVs de alto risco.

Os resultados de Dickson et al. (2014), também demonstraram um aumento no risco de ter alterações na cérvix com a presença de infecções múltiplas do HPV comparado com mulheres com citologia normal. Neste estudo todas as pacientes tinham alterações na cérvix, dessa forma não foi um dos objetivos avaliar se as infecções múltiplas estão mais propensas a

ocorrer em mulheres com lesões ou com citologia normal, e sim avaliar se as infecções múltiplas ocorrem em maior ou menor propensão nas lesões de alto e baixo grau.

Rousseau et al. (2001), fizeram uma análise muito interessante sobre a co-infecção, eles realizaram um estudo longitudinal, analisando as infecções do HPV nas pacientes durante quatro anos, verificando a possível aquisição de novos tipos virais e a persistência do HPV ao longo dos anos. Foi descrito que a aquisição da infecção pelo HPV foi mais provável em mulheres que já tinham algum tipo do vírus no primeiro momento da consulta. A co-infecção foi mais presente em pacientes que tinham o HPV-16 e HPV-18 do que com a presença de outros tipos oncogênicos, dados que estão de acordo com o nosso estudo, onde não foi detectada a co-infecção sem a presença do HPV-16 e do HPV-18 nos três sítios analisados, a co-infecção do HPV-31 e do HPV-33 não foi detectada em nenhum dos três sítios, sem a presença dos outros tipos virais do nosso estudo.

5.8 Análises dos achados citológicos na mucosa cervical e mucosa oral

A prevenção ao câncer de colo uterino consiste no seu diagnóstico precoce. Os métodos diagnósticos das lesões induzidas por HPV são morfológicos, como a citologia, a colposcopia e a histologia (padrão-áureo), a associação entre eles é a mais eficiente conduta utilizada no combate das lesões (STOFER et al., 2011).

Todas as pacientes do nosso trabalho, tinham diagnóstico para lesões intraepiteliais de alto e baixo grau, dessa forma a análise citológica foi realizada com o intuito de detectar achados citológicos característicos e sugestivos da infecção pelo HPV, foram detectados achados citológicos na mucosa cervical de vinte e três pacientes e na mucosa oral de vinte e quatro pacientes. O exame citológico permitiu a detecção de seis achados citológicos: coilocito, disqueratose, bi/multinucleação, hipercromasia, irregularidade do contorno nuclear e aumento nuclear em ambas as mucosas.

Não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a presença dos achados citológicos nas mucosas cervical e oral e a detecção dos quatro tipos virais em ambas as mucosas, de modo que nenhum tipo do HPV teve uma maior relevância entre a presença dos achados citológicos nas duas mucosas. Tivemos a detecção dos quatro tipos virais na mucosa cervical e mucosa oral de pacientes, que não tiveram a presença dos achados citológicos em ambas as mucosas, isso pode ser explicado pela maior sensibilidade do método de detecção do HPV pela biologia molecular e pelo estado físico do vírus, de modo que o

vírus pode estar na forma latente, onde é possível a detecção por metodologias mais sensíveis, mas sem a presença de alterações morfológicas e pode estar integrado ao genoma do hospedeiro.

A latência viral pode ser definida de três maneiras: 1- uma infecção persistente a longo prazo, 2- reservatórios que não conseguem produzir vírus infecciosos, 3- capacidade de se reativar para repetir o ciclo de infecção, um processo conhecido como reversibilidade (LIEBERMAN, 2016). A latência poderia ser sugestiva na mucosa oral, visto que nenhuma paciente tinha lesão nesse sítio, de maneira que o HPV pode estar presente a níveis para detecção pela biologia molecular, mas em algumas pacientes não estaria causando infecção produtiva e consequentemente as alterações citológicas capazes de serem detectadas pela citologia.

Outro aspecto coerente é que não sabemos o tempo exato em que ocorreu a infecção do HPV na mucosa oral, existe um tempo médio de 1 a 5 anos após a infecção viral para o desenvolvimento de uma neoplasia benigna e de 15 a 30 anos para a malignização (COBO et al., 2012), talvez essa detecção na mucosa oral, esteja nesse tempo em que ainda não aconteceu o processo de desenvolvimento de uma neoplasia.

Em relação a mucosa cervical, todas as nossas pacientes tinham diagnóstico de lesões intraepiteliais de alto e baixo grau, onde a infecção do HPV também é associada com as lesões precursoras do câncer. Dessa forma, não seria sugestivo uma possível latência viral, de maneira que essas pacientes já apresentam lesões na cérvix causadas pelo HPV (CHEN et al., 2014; DERCHAIN et al., 2005; LAWSON et al., 2016; MEJÍA et al., 2016).

Nas lesões intraepiteliais de baixo grau a falta da integração é geralmente observada, enquanto que a integração é um importante fator para a progressão das lesões intraepiteliais para câncer invasivo e pode ser um marcador potencial para avaliação de risco de progressão das lesões intraepiteliais. Além disso, os baixos níveis de E6 e E7 codificados pela forma epissomal do HPV contribuem para a progressão da lesão de baixo grau (NIC I) para alto grau (NIC II). A integração do HPV possibilita o aumento da expressão de E6 e E7 que facilita a transição para lesão intraepitelial de alto grau (NIC III) e carcinoma invasivo (CHEN et al., 2014). A detecção dos achados citológicos é mais propensa a ser visualizada nas lesões intraepiteliais de baixo grau, onde o vírus apresenta o seu ciclo produtivo, nas lesões intraepiteliais de alto grau é mais difícil essa detecção, além de ser possível a integração do HPV, que é associada a perda da regulação do ciclo produtivo do vírus (FERRAZ et al., 2012). Não foi realizada nenhuma metodologia que pudesse confirmar a integração viral, mas

diante dessa diferença de detecção entre a citologia e a biologia molecular, essa possibilidade não pode ser descartada.

Em relação ao tipo do achado citológico mais encontrado nas pacientes do nosso estudo, na mucosa cervical a disqueratose foi o achado mais descrito nas vinte e três pacientes. Na mucosa oral, a disqueratose também foi o achado mais detectado e estava presente em vinte pacientes com achados neste sítio de infecção. A disqueratose apresenta o citoplasma fortemente eosinofílico (JORDÃO et al., 2003), também demonstra pleomorfismo celular e é definida como uma ceratinização anormal.

A literatura é unânime em apresentar o coilocito como critério patognomônico para o diagnóstico do HPV (AZOCAR et al., 1990; KRAWCZYK et al., 2008; YOSHINOUCI et al., 1999), além disso junto com a disqueratose são descritos como critérios clássicos para o diagnóstico da infecção do vírus (JORDÃO et al., 2003; KANESHIMA et al., 2005; SCULLY et al., 2001). Os achados hiperplasia, bi ou multinucleação, irregularidade do contorno e aumento nuclear são descritos como critérios não clássicos para o diagnóstico citológico do HPV (JORDÃO et al., 2003; KANESHIMA et al., 2005).

Porém o coilocito não é o achado mais frequentemente encontrado (AZOCAR et al., 1990; COLLAÇO; PINTO, 1994; KANESHIMA et al., 2005; YOSHINOUCI et al., 1999). Ademais há uma diferença na quantidade de coilocitos entre lesões intraepiteliais e baixo (NIC I) e alto grau (NIC III), onde quanto maior desorganização da estrutura do epitélio, há uma menor intensidade da expressão coilocítica (GARCIA et al., 2014).

Os critérios denominados não clássicos tiveram uma presença significativa nos esfregaços nas mucosas cervical e oral, sendo mais presentes que o coilocito (aumento nuclear, hiperplasia, bi ou multinucleação). Dessa forma, os resultados do nosso trabalho corroboram com os dados da literatura de que novos achados denominados não clássicos devem ser introduzidos para ampliar a sensibilidade do teste de Papanicolaou.

O objetivo principal é que eles sejam associados aos critérios clássicos morfológicos, ampliando a sensibilidade do método e aproximando-o aos resultados dos métodos diagnósticos mais sensíveis e específicos, como a detecção do DNA viral por captura híbrida ou reação em cadeia da polimerase, aumentando a confirmação da presença do HPV (JORDÃO et al., 2003).

A citologia oncológica vem sofrendo uma série de críticas devido aos índices de resultados falso-negativos, que variam de 5% a 70%, e de falso-positivos, 10% a 30% de acordo com Santos et al., (2003). Outros autores consideram que essa variação ocorre em torno de 15% a 50% para os resultados falso-negativos e, em média, 10% para falso-positivos

(ALTIOK, 2003; CAVALCANTI; CARESTIATO, 2006; FARTHING et al., 1994). No presente trabalho, a utilização da citologia teve como objetivo encontrar achados citológicos da infecção pelo HPV, não realizando a caracterização das pacientes quanto às lesões cervicais, pois todas já possuíam o diagnóstico descrito nos prontuários médicos. Dessa forma, analisou-se a citologia como método de identificação do HPV pela detecção dos achados citológicos e não em relação a caracterização de lesões na mucosa cervical.

A citologia foi capaz de detectar vinte e três pacientes com achados sugestivos para HPV na mucosa cervical, a biologia molecular conseguiu detectar DNA do HPV nas cinquenta pacientes, com isso podemos demonstrar que em vinte e sete pacientes não foi possível realizar o diagnóstico pela citologia. Em relação à mucosa oral, a biologia molecular conseguiu detectar DNA do HPV em cinquenta pacientes e a citologia foi capaz de detectar o vírus em vinte e quatro pacientes. Santos et al. (2003), relataram que existem várias limitações comprovadas na citologia oncológica, como a possibilidade de preparação inadequada dos esfregaços, a leitura incorreta das lâminas e a falta de controle de qualidade. No presente estudo, foi realizado um controle de qualidade desde a coleta das células até o preparo das lâminas e análises, sendo todas estas etapas executadas de forma adequada, foram preparadas mais de uma lâmina por paciente sendo lidas várias vezes para evitar erros na detecção dos achados citológicos. É importante ressaltar uma maior dificuldade para detectar os achados na mucosa oral, principalmente pela pouca quantidade de células em alguns esfregaços.

5.9 Transcritos virais nos sítios de infecção

A identificação do HPV em tecidos não epiteliais vem crescendo consideravelmente. Já foi possível realizar a detecção do vírus no sangue periférico (BODAGHI et al., 2005; TSENG et al., 1999;), placenta (FREITAS et al., 2013), sêmen (FORESTA et al., 2010), oócito (CAMPOS et al., 2016). Além do DNA do HPV, transcritos do vírus já foram detectados em outros sítios, incluindo o sangue periférico (DONG et al., 2002; PAO et al., 1997). Essas detecções trazem questionamentos sobre a possível infecção produtiva em locais anteriormente não reconhecidos como permissivos para a infecção produtiva devido a falta de diferenciação celular (ARALDI et al., 2017), considerando o paradigma do ciclo de replicação dos papilomavírus, onde são necessárias as diferentes camadas do epitélio.

A detecção dos transcritos virais de E6/E7 permite o monitoramento da atividade oncogênica do vírus, detectando a transcrição ativa do DNA viral (VALENÇA et al., 2016).

Foram detectados transcritos virais de E6 do HPV-16, E6/E7 de HPV-18 e L1 na mucosa cervical, mucosa oral e sangue periférico. A mucosa oral foi o sítio que apresentou a maior detecção dos transcritos de E6 e E6/E7, para os transcritos de L1 a mucosa cervical foi o sítio que apresentou a maior detecção.

Não houve uma concordância entre a detecção dos transcritos virais nas pacientes que tiveram detecção positiva para o HPV-16, HPV-18 e para região L1, a falta de detecção para amostras anteriormente positivas para o DNA do vírus, podem refletir níveis baixos de transcrição, não detectáveis (CATTANI et al., 2009), uma infecção latente (Molden et al., 2006) e também podem ser devido a presença de outros tipos virais (LIE et al., 2008), neste trabalho só foram analisados os transcritos de E6 e E6/E7 do HPV-16 e HPV-18, mas na detecção do DNA do vírus também realizamos a detecção do HPV-31 e HPV-33 de maneira que a falta da detecção dos transcritos em algumas pacientes, principalmente na mucosa cervical, poderia ser justificada por esse dado.

A detecção dos transcritos virais do HPV em sangue periférico de pacientes sem câncer cervical é bastante relevante, de modo que a detecção dos transcritos virais era vinculada somente a pacientes com câncer cervical (PAO et al., 1997; TSENG et al., 1999; WEISMANN et al., 2009), assim como a detecção do DNA do HPV, com isso os resultados do nosso trabalho demonstram que essa detecção também pode ser realizada em pacientes que não estão acometidos com o câncer e que o DNA e RNA do vírus no sangue, não são só referentes a células cancerígenas derivadas da cérvix.

Não foi objetivo do estudo demonstrar a possível infecção produtiva no sangue periférico, o nosso posicionamento em relação a detecção dos transcritos era comprovar a presença deles em outros sítios, além da mucosa cervical e comprovar que em pacientes sem câncer cervical, essa detecção também pode ser feita e é bastante relevante.

5.10 Ação viral do HPV na mucosa oral

O envolvimento do HPV com o desenvolvimento do câncer oral foi proposto quando características celulares da infecção por HPV (coilocito) foram encontradas por microscopia eletrônica em lesões orais (SYRJANEN et al., 1983), desde então a presença do HPV já foi descrita no câncer oral e de orofaringe (PYTYNIA et al., 2014; RATAUVA et al., 2011; YOUNG et al., 2015), mas essas análises basearam-se em estudos da presença do vírus em pacientes que já estão acometidos pela doença, sendo necessário estudos que tragam

resultados sobre a presença e ação do vírus na mucosa oral normal para entender como esse vírus se comporta nesse sítio.

Este trabalho avaliou a mucosa oral de pacientes que não tinham nenhum tipo de lesão e nenhum histórico de câncer nesse sítio. Além da detecção dos quatro tipos virais, também foi possível identificar achados citológicos característicos da infecção pelo HPV e transcritos virais do HPV, estes resultados demonstram a presença e a ação do vírus nesse sítio, mostrando que o HPV na mucosa oral normal não é apenas um habitante do epitélio.

A presença dos achados citológicos foi avaliada conjuntamente com a detecção dos transcritos virais, procurando correlacionar essas variáveis, não foi encontrada nenhuma disposição significativa, porém estaríamos novamente analisando técnicas diferentes com sensibilidades diferentes como já foi mencionado mais acima. De toda forma encontrar esses dados na mucosa oral normal é bastante relevante, principalmente pela diminuição do câncer oral associado aos fatores de risco clássico, como tabagismo, e pelo aumento do câncer de cabeça e pescoço associado ao HPV (CHATUVERDI et al., 2011; DESCHLER et al., 2014).

A detecção do HPV na mucosa oral normal precisa ser inserida em um programa de triagem para o diagnóstico do vírus, como acontece no câncer cervical, podendo assim, precocemente, ser possível diagnosticar e avaliar as lesões causadas pelo vírus, e dessa forma estar evitando o aparecimento de possíveis tumores associados a infecção pelo HPV (MIGALDI et al., 2012).

6 CONCLUSÕES

1. Através do exame anamnético foi possível identificar que o número de filhos, o número de parceiros sexuais, o uso de anticoncepcional e a lesão intraepitelial foram fatores de risco para o acometimento da infecção pelo HPV;
2. Foi possível detectar sequências de DNA do HPV com os iniciadores genéricos nos três sítios de infecção;
3. A presença do HPV-16, HPV-18, HPV-31 e HPV-33 foram identificadas nos três sítios de infecção, tanto nos sítios positivos para os iniciadores genéricos, quanto nos sítios negativos;
4. Nenhuma paciente foi negativa para os quatro tipos virais nos três sítios de infecção;
5. O HPV-33, HPV-31 foram associados com as características comportamentais número de filhos e número de parceiros sexuais na mucosa cervical, respectivamente, e o HPV-18 teve uma associação com o uso de anticoncepcional e a lesão intraepitelial na mucosa cervical;
6. Não foi possível correlacionar nenhuma característica comportamental e biológica como fator de risco para o acometimento da infecção na mucosa oral com os quatro tipos virais;
7. A presença dos quatro tipos virais foi detectada simultaneamente nos três sítios de infecção, sugerindo uma via de disseminação do HPV em um mesmo indivíduo;
8. Os três sítios de infecção tiveram a presença de co-infecção pelos quatro tipos virais, apresentando dois, três ou os quatro tipos simultaneamente;
9. A presença do HPV na mucosa oral para o HPV-16, HPV-18 e HPV-33 foi mais prevalente em pacientes que apresentavam a infecção na mucosa cervical;
10. O HPV-16 foi mais prevalente na mucosa cervical, o HPV-18 foi mais prevalente na mucosa cervical e mucosa oral, o HPV-31 foi mais prevalente na mucosa oral e

o HPV-33 foi mais prevalente no sangue periférico, demonstrando uma predileção por sítios entre os tipos virais;

- 11.** Foram identificados seis achados citológicos sugestivos da infecção pelo HPV na mucosa cervical e na mucosa oral;
- 12.** Os transcritos virais de E6, E6/E7 e L1 foram detectados nos três sítios de infecção, demonstrando a atividade viral nesses sítios;
- 13.** Os achados citológicos a detecção dos transcritos virais na mucosa oral não tiveram uma correlação, mas demonstram a ação do HPV na mucosa oral normal.

REFERÊNCIAS*

ADAMOPOULOU, M. et al. Prevalence of human papillomavirus in saliva and cervix of sexually active women. **Gynecologic Oncology**, New York, v. 129, n. 2, p. 395-400, ago. 2013.

ADELSTEIN, D. J. et al. Head and neck squamous cell cancer and the Human Papillomavirus: summary of a national cancer institute state of the Science meeting. **Head and Neck**, Totowa, v. 31, p. 1393-1422, nov. 2009.

ALMEIDA, A. P. M. et al. Infecção por múltiplos tipos de Papilomavírus humano em mulheres jovens sexualmente ativas. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 48, n. 6, p. 573-579, 2015.

ALTIOK, S. Molecular markers in cervical cytology. **Clinics in Laboratory Medicine**, Philadelphia, v. 23, p. 709-728, set. 2003.

ALVES, B. M. **HPV e câncer cervical**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Brasília, 2013. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicações/inca/brunna_alves_hpv_cancer.pdf>. Acesso em: 12 jun. 2016.

AMORIM, C. P. S. et al. Mulheres submetidas à conização de colo uterino: análise dos resultados citológico e histopatológico. **Revista de Medicina da UFC**, Fortaleza, v. 55, n. 1, p. 130-17, jun. 2015.

ANTIENZO, P. C. et al. Presencia del virus papiloma humano en la cavidad oral: revisión y actualización de la literatura. **International Journal of Odontostomatology**, Temuco, v. 9, n. 2, p. 233-238, ago. 2015.

ANTONSSON, A. et al. High-Risk Human Papillomavirus in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. **Cancer Epidemiology Biomarkers e Prevention**, Philadelphia, v. 19, p. 2080-2088, aug. 2010.

ANTUNES, A. A. et al. Prevalência de colicitose em biópsias penianas de parceiros de mulheres com lesões genitais induzidas pelo HPV. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Belo Horizonte, v. 26, n. 7, p. 557-562, ago. 2004.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

AOKI, M. N. et al. Virus: uma possível associação em câncer de mama virus: a possible association in breast cancer. **Biosaúde**, Londrina, v. 11, n. 2, p. 82-92, 2009.

ARALDI, R.; et al. Bovine papillomavirus isolation by ultracentrifugation. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 208, p. 119-124, nov. 2014.

_____. Bovine papillomavirus productive infection in cell cultures : first evidences. **Virology: Reserach & Reviews**, Hauppauge, v. 1, n. 2, p. 1-9, apr. 2017.

ARIAS, Y. R.; CARRILLO, E. F.; ARISTIZÁBAL, F. A. Human papillomavirus (HPV) detected in restored plasma DNA from women diagnosed with pre-invasive lesions and invasive cancer. **Colombia Médica**, Cali, v. 41, n. 2, p. 148-154, jan. 2010.

ARMBRUSTER-MORAES, E et al. Presence of human papillomavirus DNA in amniotic fluids of pregnant women with cervical lesions. **Gynecologic Oncology**, Seoul, v. 54, p. 152-158, ago. 1994.

ASHRAFI, G. H.; SALMAN, N. A. Pathogenesis of Human Papillomavirus - Immunological Responses to HPV Infection. **Intech**, Rijeka (HR), jul. 2016.

AYRES, A. R. G.; SILVA, G. A. E. Prevalência de infecção do colo do útero pelo HPV no Brasil: revisão sistemática. [Cervical HPV infection in Brazil: systematic review.]. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 44, n. 5, p. 963-974, 2010.

AZOCAR, J. et al. Prevalence of cervical dysplasia and HPV infection according to sexual behavior. **International Journal of Cancer**, New York, NY, v. 45, n. 4, p. 622-625, apr. 1990.

BALOGH, Z. et al. Ethnic and geographic variants in HPV prevalence and genotype distribution in North-Western Yunnan, China. **Journal of Medical Virology**, Bethesda, v. 88, p. 543-540, aug. 2015.

BARON, C. et al. Relationship between HPV 16, 18, 31, 33, 45 DNA detection and quantification and E6/E7 mRNA detection among a series of cervical specimens with various degrees of histological lesions. **Journal of Medical Virology**, New York, NY, v. 89, p. 1389-1396, apr. 2015.

BAVA, S. V. et al. Cervical cancer: a comprehensive approach towards extermination. **Annals of Medicine**, Helsinki, v. 48, n. 3, p. 149-161, fev. 2017.

BEAGLEY, K.W.; GOCKEL, C. M. Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone. **FEMS Immunology Medical Microbiology**, v.38, p. 13-22, 2003.

BERNARD, H. U. et al. Classification of Papillomaviruses (PVs) Based on 189 PV Types and Proposal of Taxonomic Amendments. **Virology**, New York, v. 401, n. 1, p. 70-79, may. 2010.

BETIOL, J; VILLA, L.L; SICHERO, L. Impact of HPV infection on the development of head and neck cancer. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 46, p. 217-226, 2013.

BHAR, V. S. et al. Human papillomavirus (HPV) types 16 and 18 in liquid-based cervical cytology samples. **Virchows Archiv**, Chandigarh, v. 466, n. 6, p. 711–715, 2015.

BIENKOWSKA-HABA, M.; SAPP, M. The cytoskeleton in papillomavirus infection. **Viruses**, Basel, Switzerland, v. 3, n. 3, p. 260-271, mar. 2011.

BODAGHI, S. et al. Could Human Papillomaviruses Be Spread through Blood. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 13, n. 41, p. 5428- 5434, 2005.

BORZACCHIELLO, G.; ROPERTO, F. Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. **Veterinary Research**, Pulawy, p. 39-45, 2008.

BOUDA, M. et al. “High Risk” HPV types are frequently detected in potentially malignant and malignant oral lesions, but not in normal oral mucosa. **Modern Pathology**, Baltimore, MD, v. 13, n. 6, p. 644-653, 2000.

BRAVO, I. G.; FÉLEZ-SÁNCHEZ, M. Papillomaviruses. **Evolution, Medicine, and Public Health**, Oxford, v. 2015, n. 1, p. 32-51, jan. 2015.

BRITO, D. M. S.; GALVÃO, A. T. G. Fatores de risco para câncer de colo uterino em mulheres com HIV. **Revista da Rede de Enfermagem do Nordeste**, Fortaleza, v. 11, n. 1, p. 191–199, 2010.

BRITO, E. B.; MARTINS, S. J.; MENEZES, R. C. Human papillomaviruses in amerindian women from brazilian amazonia. **Epidemiology and Infection**, Cambridge Eng, v. 128, n. 3, p. 485-489, jun. 2002.

BROUWER, A. F.; MEZA, R.; EISENBERG, M. C. Transmission heterogeneity and autoinoculation in a multisite infection model of HPV. **Mathematical Biosciences**, New York, v. 270, p. 115-125, dec. 2015.

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

BRUNO, A. et al. Distribuição dos genótipos de papilomavírus humano em mulheres do estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Belo Horizonte, v. 36, n. 9, p. 416-422, 2014.

BYCHKOV, V. A. et al. Comprehensive meta-analytical summary on human papillomavirus association with head and neck cancer. **Experimental Oncology**, Kyiv, v. 38, p. 68-72, 2016.

BZHALAVA, D. et al. systematic review of the prevalence of mucosal and cutaneous human papillomavirus types. **Virology**, New York, v. 445, n. 1-2, p. 224-231, 2013.

CAMPION, M. J. et al. Progressive potential of mild cervical atypia: prospective cytological, colposcopic, and virological study. **The Lancet**, Amsterdam, v. 2, n. 8501, p. 237-240, 1986.

CAMPO, M. Papillomavirus and disease in humans and animals. **Veterinary and Comparative Oncology**, Oxford, v.1, n. 1, p. 3-14, 2003.

CAMPOS, M. J. S.; FERREIRA, A. P.; VITRAL, R. W. F. O papel da Imunoglobulina A Secretora no Mecanismo de Defesa da Mucosa Bucal. **Pesquisa Brasileira de Odontopediatria e Clínica Integrada**, João Pessoa, v.11, n.1, p. 139-143, jan./mar. 2011.

CAMPOS, R. S. P. et al. Gestação e Papilomavírus Humano (HPV): vias de transmissão e complicações. **Diagnósticos e Tratamentos**, São Paulo, v. 21, n. 3, p. 109-114, [abr.] 2016.

CAÑADAS, M. P. et al. Concordance of prevalence of human papillomavirus DNA in anogenital and oral infections in a high-risk population concordance of prevalence of human papillomavirus DNA in anogenital and oral infections in a high-risk population. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 3, p. 3-6, 2004.

CARRARD, V. C. et al. Álcool e Câncer bucal: Considerações sobre os mecanismos relacionados. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 54, n.1, p. 49-56, 2008.

CARVALHO, C. D. et al. Bovine papillomavirus type 2 in reproductive tract and gametes of slaughtered bovine females. **Brazilian Society of Infectious Diseases**, Salvador, v. 10, n. 5, p. 331-336, 2003.

CARVALHO, T. C. **O viroma oral**. 2016. 81 f. Dissertação (Mestrado)- Instituto Superior de Ciências e Saúde Egas Moniz, Almada, 2016.

CARVALHO, N. O. et al. Comparison of HPV genotyping by type-specific PCR and sequencing. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, p. 73-78, 2010.

CASON, J. et al. Perinatal infection and persistence of human papillomavirus types 16 and 18 in infants. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 47, n. 3, p. 209-218, 1995.

CASTRO, T. M. P. P. G. et al. D. Detecção de HPV na mucosa oral e genital pela técnica PCR em mulheres com diagnóstico histopatológico positivo para HPV genital. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, Sao Paulo, v. 75, n. 5, p. 167-171, 2009.

CATTANI, P. et al. RNA (E6 and E7) Assays versus DNA (E6 and E7) Assays for Risk Evaluation for Women Infected with Human Papillomavirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 7, p. 2136-2141, 2009.

CAVALCANTI, S. M. B.; CARESTIATO, F.N. Infecções causadas pelos papilomavírus humanos: atualização sobre aspectos virológicos, epidemiológicos e diagnóstico - review. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 1, p. 73-79, 2006.

CECCATO JUNIOR, B. P. V. et al. Prevalência de infecção cervical por papilomavírus humano e neoplasia intraepitelial cervical em mulheres HIV - positivas e negativas. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Belo Horizonte, v. 37, n.4, p. 178-185, mar. 2015.

CHATUVERDI, A. K. et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. **Journal of Clinical Oncology**, New York, v. 29, n. 32, p. 4294-4301, nov. 2011.

CHELIMO, C. et al. Risk factors for and prevention of human papillomaviruses (HPV), genital warts and cervical cancer. **Journal of Infection**, London, v. 66, n. 3, p. 207-217, mar. 2013. Elsevier Ltd.

CHEN, A. C. H. et al. Human Papillomavirus DNA detect in peripheral blood samples from healthy Australian male blood donos. **Journal of Medical Virology**, New York , v. 81, p. 1792-1796, 2009.

CHEN, Y. W. et al. The association of human papillomavirus 16/18 infection with lung cancer among nonsmoking Taiwanese women. **Cancer Research**, Baltimore, v. 61, n. 7, p. 2799-2803, 2001.

_____. Viral carcinogenesis: Factors inducing DNA damage and virus integration. **Cancer Research**, Baltimore, v. 6, n. 4, p. 2155-2186, 2014.

CHIOU, H. et al. The presence of human papillomavirus type 16/18 DNA in blood circulation may act as a risk marker of lung cancer in Taiwan. **Cancer**, New York, v. 97, n. 6, p. 1558-1563, 2003.

CHOI, Y. J.; PARK, J. S. Clinical significance of human papillomavirus genotyping. **Journal of Gynecologic Oncology**, Seoul, v. 27, n. 2, p. 1-12, 2016.

CHUERY, A. C. S. et al. Conduta expectante em mulheres com histopatológico com neoplasia intraepitelial de baixo grau. **Revista Brasileira de Genética**, v. 2, n. 3, p. 5-10. 2008.

CLIFFORD, G. M. et al. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. **Lancet**, London, v. 366, n. 9490, p. 991-998, set. 2005

CLIFFORD, G.; FRANCESCHI, S. Members of the human papillomavirus type 18 family (alpha-7 species) share a common association with adenocarcinoma of the cervix. **International Journal of Cancer** New York, v. 121, n. 3, p. 621-632, apr. 2008.

COBO, F. Natural history and transmission: anatomic distribution. **Human Papillomavirus Infections**, p. 27-36, 2012.

COLLAÇO, L. M; PINTO, A. P. Aspectos citológicos na coloração de Papanicolaou da Associação de HPV com displasia e carcinoma de colo uterino. **Jornal Brasileiro de Ginecologia**, Rio de Janeiro, v. 104, v. 11/12, p. 419-421, 1994.

CRAWFORD, L. V.; CRAWFORD, E. M. A comparative study of polyoma and papilloma viruses. **Virology**, New York, v. 21, n. 2, p. 258-263, 1963.

CRUZ, I. B. F. et al. Age-dependence of human papillomavirus DNA presence in oral squamous cell carcinomas. **European Journal of Cancer**, Oxford, v. 32, p. 55-62, jan. 1996.

CUBIE, H. A. Diseases associated with human papillomavirus infection. **Virology**, New York, v. 445, n. 1-2, p. 21-34, 2013.

DAY, P. M. et al. Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 39, p. 14252-1457, 2004.

_____. Neutralization of human papillomavirus with monoclonal antibodies reveals different mechanisms of inhibition. **Journal of Virology**, Washington, v. 81, n. 16, p. 8784-8792, 2007.

DAY, P. M.; LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. Papillomavirus infect cell via a clathrin dependent pathway. **Virology**, New York, v. 307, n.1, p. 1-11, 2009.

DAY, P. M.; SCHELHAAS, M. Concepts of papillomavirus entry into host cells. **Current Opinion in Virology**, New York, v. 4, p. 24-31, 2014.

DEBUZ, C. G. J.; OLIVEIRA, M. S.; ALVES, J. S. O. Vírus do Papiloma Humano (HPV) em cavidade oral: estudo de caso Safety. **Health and Environment World Congress**, p. 429-433, 2010.

DERCHAIN, S. F. M.; LONGATTO FILHO, A.; SYRJANEN, K. J. Neoplasia intra-epitelial cervical: diagnóstico e tratamento. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 7, p. 425-433, jul. 2005.

DESCHELER, D. G. et al. The “New” Head and Neck Cancer patient- Young, nonsmoker, nondrinker, and HPV positive: Evaluation. **Otolaryngology-Head and Neck Surgery**, Rochester, v.151, n.1, p. 375-380, sep. 2014.

DICKSON, E. L. et al. Cervical cytology and multiple type HPV infection: A study of 8182 women ages 31-65. **Gynecologic Oncology**, New York, v. 133, n. 3, p. 405-408, jun. 2014.

DINIZ, N. et al. Simultaneous presence of bovine papillomavirus in blood and in short term lymphocyte cultures from dairy cattle in Pernambuco. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirao Preto, v.8, n.4, p.1474-1480, 2009.

DONG, S. M. et al. Detection and quantitation of human papillomavirus DNA in the plasma of patients with cervical carcinoma. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**, Philadelphia, v. 11, p. 3-6, jan. 2002.

DOORBAR, J. et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. **Vaccine**, Guildford, Surrey, UK, v. 30, n. SUPPL. 5, nov. 2012.

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

_____. Human Papillomavirus molecular biology and disease association. **Reviews in Medical Virology**, England, v.25, p 2-23, mar. 2016.

DUNNE, E. F.; MARKOWITZ, L. E. Genital human papillomavirus infection. **Clinical Infectious Diseases**, New York, v. 43, p. 624-629, jan. 2006.

EBRAHIM, S. et al. High burden of human papillomavirus (HPV) infection among young women in KwaZulu-Natal, South Africa. **PLoS ONE**, San Francisco, CA, v. 11, n. 1, p. 1-10, jan. 2016.

EGAWA, N. et al. Human papillomaviruses: epithelial tropisms, and the development of neoplasia. **Viruses**, Basel, Switzerland, v. 7, n. 7, p. 3863-3890, jul. 2015.

ERHART, S. M. M. Comparative evaluation of the GP5+/6+, MY09/11 and PGMY09/11 primer sets for HPV detection by PCR in oral squamous cell carcinomas. **Experimental and Molecular Pathology**, New York, v. 100, n. 1, p. 13-16, feb. 2016.

ESMAEILI, M. et al. HPV typing in women with cervical precancerous and cancerous lesions in northwestern Iran. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, Basel, v. 66, p. 68-72, may. 2008.

FAKHRY, C. et al. Relationship between Prevalent Oral and Cervical Human Papillomavirus Infections in Human Immunodeficiency Virus-Positive and Negative Women. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.44, n.12, p. 4479-4485, 2006.

FARTHING, A. et al. Human papillomavirus detection by hybrid capture and its possible clinical use. **Journal of Clinical Pathology**, Rio de Janeiro, v. 47, p. 649-652, 1994.

FAY, A. et al. The positively charged termini of L2 minor capsid protein required for bovine papillomavirus infection function separately in nuclear import and DNA binding. **Journal of Virology**, Washington, v. 78, p.13447-13454, dec. 2004.

FEDRIZZI, E. N. Epidemiologia da infecção genital pelo HPV. **Revista Brasileira Patologia do Trato Genital Inferior**, Sergipe, v. 1, n. 1, p. 3-8, 2011.

FEDRIZZI, E. N. et al. Infecção pelo papilomavírus humano (HPV) em mulheres de Florianópolis, Santa Catarina. **Jornal Brasileiro Doenças Sexualmente Transmissíveis**, Santa Catarina, v. 20, n. 2, p. 73-79. 2008.

FELLER, L. et al. Epithelial maturation and molecular biology of oral HPV. **Infectious Agents and Cancer**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 1, p. 16, 2009.

FEOLA, T. D. et al. Prevalence of HPV in HIV-Infected Women in the Designated AIDS Center at Upstate Medical University and the Pontecial Benefit of Vaccination Regardless of Age. **Journal of the Association of Nurses in AIDS Care**, v. 24, n. 2, p. 176-179, 2013.

FERNANDES, J. V. et al. Biology and natural history of human papillomavirus infection. **Open Access Journal of Ophthalmology**, Troy, MI, v. 5, p. 1-12, jan. 2013.

FERRARO, C. T. L. et al. Infecção oral pelo HPV e lesões epiteliais proliferativas associadas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 4, p. 451-459, 2011.

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

FORESTA, C. et al. Human papillomavirus found in sperm head of young adult males affects the progressive motility. **Fertility and Sterility**, New York, v. 93, p. 802-806, 2010.

_____. Human papillomavirus proteins are found in peripheral blood and semen Cd20+ and Cd56+ cells during HPV-16 semen infection. **BMC Infectious Disease**, London, v. 13, n. 593, p. 2-10, dec. 2013.

FORMAN, D. et al. Global burden of human papillomavirus and related diseases. **Vaccine**, Guildford, Surrey, UK, v. 30, n. jan. p. F12-F23, 2012.

FOURET, P. et al. Human papillomavirus infection in the malignant and premalignant head and neck epithelium. **Diagnostic Molecular Pathology**, New York, n. 4, v. 2, p. 122-127, 1995.

FREITAS, A. C. et al. Human papillomavirus vertical transmission: review of current data. **Clinical Infectious Diseases**, New York, v. 56, n. 10, p. 1451-1456, 2013.

FREITAS, R. V. et al. Fatores de risco e principais alterações citopatológicas do câncer bucal: uma revisão de literatura. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v.48, n. 1, p. 13-18, 2016.

GALLOWAY, D. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses: shared and distinct pathways for pathogenesis. **Current Opinion in Virology**, Amsterdam, v. 14, p. 87-92, 2015.

GARCIA, A. C.; SHUTZ, M. T. B.; COLLAÇO, L. M. Avaliação histológica da expressão coloitica em diferentes graus de neoplasia intraepitelial cervical. **Cadernos da Escola de Saúde**, Paraná, v. 2, n. 8, 1979, 2012.

GASPAR, J.; QUINTANA, S. M.; REIS, R. K. Factores sociodemográficos y clínicos de mujeres con el VPH y su. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 74-81, 2015.

GASPARIN, V. A. et al. Fatores associados à representatividade da zona de transformação em exames citopatológicos do colo uterino. **Cogitare Enfermagem**, Curitiba, v. 21, n. 2, p. 1-9, 2016.

GELLER, M. A. E.; CAMPOS, C. D. Papilomavirus humano - fatores de risco, carcinogênese, resposta imune e tratamento. **Jornal Brasileiro de Medicina**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 3, p. 43-46, 2008.

GIRALDO, P. et al. Human papillomavirus in the oral mucosa of women with genital human papillomavirus lesions. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, Amsterdam, v. 126, n. 1, p. 104-106, may. 2006.

GOMES, O. V.; CARMO, S. N.; FIGUEIREDO-ALVES, R. R. Prevalência da infecção pelo HPV em cânceres não anogenitais: uma revisão sistemática. **Femina**, Goiânia, v.42, n. 6, p. 287-294, nov./dez. 2014.

GUGLIELMO, Z.; FERNANDES, A.; VENEGAS, C. Detección de VPH en boca y cérvix de pacientes con diagnóstico citológico sugestivo de infección genital. **Anales del Sistema Sanitario de Navarra**, Pamplona, v.35, n.3, p. 445-454, 2012.

GUILY, J. L. S. T. et al. Oropharyngeal cancer prognosis by tumour HPV status in France: The multicentric Papillophar study. **Oral Oncology**, Oxford, v. 67, p. 29-36, 2011.

GUYTON, A. C. **Tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

HAMMES, L. S. **Associação de biomarcadores a lesões intraepiteliais cervicais e risco de progressão**. 2006, 252 f. Tese (Doutorado)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

HANG, D. et al. Analysis of human papillomavirus 16 variants and risk for cervical cancer in Chinese population. **Virology**, New York, v. 488, p. 156-161, 2016.

HERBSTER, S. et al. HPV infection in Brazilian patients with esophageal squamous cell carcinoma : interpopulational differences , lack of correlation with surrogate markers and clinicopathological parameters. **Cancer Letters**, Virginia, v. 326, n. 1, p. 52-58, jul. 2012.

HERNANDEZ, B. Y. et al. Genital and extra-genital warts increase the risk of asymptomatic genital human papillomavirus infection in men. **Sexually Transmitted Infections**, London, v. 87, n. 5, p. 391-395, 2011.

HERRERA-GOEPFERT, R. et al. Human papilloma virus and esophageal carcinoma in a Latin-American region. **World Journal of Gastroenterology**, Pleasanton, v. 15, p. 3142-3147, jul. 2009.

HEWLETT, G.; SHEPHERD, P. S.; LUXTON, J. C. Human Papillomaviruses. **Viral Infections and Treatment**, Hazmieh, v. 30, p. 227, apr./jun. 2003.

HO, C. et al. Detection and quantification of human papillomavirus type 16, 18 and 52 DNA um the peripheral blood of cervical cancer patients. **Gynecol Oncology**, New York, v. 99, p. 615-621, dec. 2005.

HORVATH, C. A. et al. Mechanism of cell entry by human papillomaviruses: an overview. **Virology journal**, London, v. 20, n. 7, p. 7-11, jan. 2010.

HÜBBERS, C. U.; AKGÜL, B. HPV and cancer of the oral cavity. **Virulence**, Austin, Tex, v. 6, n. 3, p.244-248, 2015.

ILAHİ, N. E. et al. Retrospective analysis of HPV 16/18-related disease burden using archival clinical samples. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, Berlin, v. 142, n. 11, p. 2367-2373, nov. 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo demográfico 2010**. Brasília, v. 20, n. 3, p. 2012, 2010. Disponível em: <www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/>. Acesso em: 19 ago. 2017.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **IARC handbook of cancer prevention volume 10: cervix cancer screening**. France, 2014. Disponível em: <<http://www.iarc.fr/>> . Acesso em: 10 julho de 2015.

JABERIPOUR, M. et al. Elevation of HPV-18 and HPV-16 DNA in the plasma of Patients with Advanced Cervical Cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, Bangkok, v. 12, p.163-167, 2011.

JALOULI, M. M. et al. Association of Human Papillomavirus Infection in Healthy Oral Mucosa , Oral Dysplasia , and Oral Squamous Cell Carcinoma. **Journal of Oral Health and Dental Management**, v.14, n. 5 p. 12-18, 2015.

JEMAL, A.; BRAY, F.; FERLAY, J. **Global Cancer Statistics**, Hoboken, NJ, v. 61, n. 2, p. 69-90, mar./abr. 2011.

JORDÃO, A.V. et al. Importância da aplicação de critérios morfológicos não-clássicos para o diagnóstico citológico de papilomavírus humano. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 1, p. 81-89, jan./mar. 2003.

KADERLI, R.; SCHNÜRIGER, B.; BRÜGGER, L. E. The impact of smoking on HPV infection and the development of anogenital warts. **International Journal of Colorectal Disease**, Bern, v. 29, n. 8, p. 899-908, jun. 2014.

KANESHIMA, E. D. et al. Importância da aplicação de critérios morfológicos não clássicos para o diagnóstico citopatológico de Papilomavírus humano (HPV) previamente detectado por PCR. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, Buenos Aires, v. 39, n. 1, p. 61-68, 2005.

KANODIA, S.; FAHEY, L.M.; KAST, W. M. Mechanisms used by Human Papillomavirus to escape the host immune response. **Current Cancer Drug Targets**, Hilversum, v.79, p. 79-89, feb. 2007.

KATCHBURIAN, E. **Histologia e embriologia oral**. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004.

KERO, K. et al. Human Papillomavirus Genotypes in Male Genitalia and Their Concordance among Pregnant Spouses Participating in the Finnish Family HPV Study. **Journal of Sexual Medicine**, Malden, MA, v. 8, n. 9, p. 2522-2531, sep. 2011.

KHOVIDHUNKIT, S. P.; BUAJEEB, W.; SANGUANSIN, S. Detection of Human Papillomavirus in Oral Squamous Cell Carcinoma , Leukoplakia and Lichen Planus in Thai

Patients. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, Thailand , v. 9, p. 771-775, oct./dec. 2008.

KOPIEJ, D. Oral Cancer Associated with HPV. **Community Dental Health**, London, 2012.

KORNYA L. et al. The diagnostics and prevalence of genital Human papillomavirus (HPV) infection in Hungary. **European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology**, Limerick, v. 100, n. 2, p. 231-236, jan. 2002.

KOSHIOL, J. et al. No role for human papillomavirus in esophageal squamous cell carcinoma in China. **Infectious Journal of Cancer**, New York, v. 127, p. 93-100, jul. 2009.

KRAWCZYK, E. et al. Koilocytosis: a cooperative interaction between the human papillomavirus E5 and E6 oncoproteins. **The American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 173, n. 3, p. 682-688, sep. 2008.

KRIEK, J. M. et al. Female genital tract inflammation, HIV co-infection and persistent mucosal Human Papillomavirus (HPV) infections. **Virology**, Cape town, v. 493, p. 247-254, jun. 2016.

KUI, L. L.; XIU, H. Z.; NING, L. Y. Condyloma Acuminatum and Human papillomavirus in the Oral Mucosa of Children. **Pediatric Dentistry**, Researchgate, v. 25, n. 2, p. 149-153, nov. 2003.

KUKIMOTO, I.; MORI, S.; AOYAMA, S.; et al. Hypermutation in the E2 gene of human papillomavirus type 16 in cervical intraepithelial neoplasia. **Journal of Medical Virology**, New York , v. 87, p. 1754-1760, oct. 2015

KUMAR, R. et al. Alcohol and tobacco increases risk of high risk HPV infection in head and neck cancer patients: Study from north-east region of India. **PLoS ONE**, San Francisco, CA, v. 10, n. 10, p. 1-15, oct. 2015.

LAI, C.H. et al. Human papillomavirus in benign and malignant ovarian and endometrial tissues. **International journal of Gynecological Pathology**, v. 11, n. 3, p. 210-215, jul. 1992.

LAM, K.Y. et al. Expression of p53 and its relationship with human papillomavirus in penile carcinomas. **Journal Oncology**, New York, v. 21, p. 613-616, 1995.

LARSSON, G. L. et al. Prognostic impact of human papillomavirus (HPV) genotyping and HPV-16 subtyping in vaginal carcinoma. **Gynecologic Oncology**, Seoul, v. 129, n. 2, p. 406-411, may. 2013.

LAWSON, J. S. et al. Human papilloma virus identification in breast cancer patients with previous cervical neoplasia. **Frontiers in Oncology**, Lausanne , v. 5, p. 298, jan. 2016.

LAX, S. Histopathology of cervical precursor lesions and cancer. **Acta Dermatovenereologica Alpina, Pannonica et Adriatica**, v. 20, n. 3, p. 125-133, set. 2011.

LETO, M. G. P.; SANTOS JUNIOR, G. F.; TOMIMORI, A. M. P.; et al. Human papillomavirus infection: Etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v.86, n.2, p. 306-317, jan./mar. 2011.

LEVI, J. E. et al. High prevalence of human papillomavirus (HPV) infections and high frequency of multiple HPV genotypes in human immunodeficiency virus-infected women in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 9, p. 3341- 3345, 2002.

LI, H.; QIAN, Z. M. Transferrin/ transferrin receptor- mediated drug delivery. **Medicinal Research Reviews**, New York, v.22, p. 225-250, may. 2002.

LIAW, K. L. et al. A prospective study of human papillomavirus (HPV) type 16 DNA detection by polymerase chain reaction and its association with acquisition and persistence of other HPV types. **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 183, p. 8-15, jan. 2001.

LIBERA, L. S. D. et al. Exames citológicos sugestivos de infecção pelo Papilomavírus Humano. **Estudo Vida e Saúde**, Goiás, v. 43, n. 1, p. 34-40, 2016.

LIE AK, Kristensen G. Human papillomavirus E6/E7 mRNA testingas a predictive marker for cervical carcinoma. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, Abingdon, Oxford v. 8, n. 4, p. 405-415, jul. 2008.

LIEBERMAN, P. M. Epigenetics and genetics of viral latency. **Cell Host and Microbe**, Cambridge, v. 19, n. 5, p. 619-628, may. 2016.

LIMA, M. A. C.; CARVALHO, M. S.; SALES, M. J. T. **Caderno de referência 1:** citopatologia ginecológica. Brasília, DF: Ministério da Saúde; Rio de Janeiro: CEPESC, 2012.

LIMA, Y. A. R.; ALVES, M. F. C. O Sistema Imune da Mucosa do Trato Genital Feminino e o Impacto Das Doenças Sexualmente Transmissíveis. **Revista de Patologia Tropical**, Goiania, v. 37, n. 4, p. 295-309, out./dez. 2008.

LINDSEY, C. J. et al. Bovine papillomavirus DNA in milk, blood, urine, semen, and spermatozoa of bovine papillomavirus-infected animals. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirao Preto, v. 8, n. 1, p. 310-318, 2009.

LIU, C. Y. et al. Infection and integration of high-risk human papillomavirus in HPV-associated cancer cells. **Medical oncology**, v. 32, n. 109, 2015.

MACHALEK, D. A. et al. Prevalence and risk factors associated with high-grade anal squamous intraepithelial lesions (HSIL)-AIN2 and HSIL-AIN3 in homosexual men. **Papillomavirus Research**, v. 2, p. 97-105, 2016.

MAFRA, M. F. **Estudo da prevalência e de cofatores associados à infecção pelo Papilomavírus humano através da detecção e genotipagem de amostras clínicas de mulheres atendidas no sistema público de saúde de Pernambuco**. 2012. 130 f. Tese (Doutorado)-Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

MARQUES, A. E. M. et al. Low rate of oropharyngeal human papillomavirus infection of women with cervical lesions and their partners: new data from Brazilian population. **Journal of Oral Pathology & Medicine**: official publication of the international association of oral pathologists and the american academy of oral pathology, Oxford, v. 44, n. 6, p. 453-458, jul. 2015.

MATTOS, M. S. G.; OLIVEIRA, W. R.; SOTTO, M. N. Comparative study of p16 protein expression in squamous cell carcinomas from patients with epidermodysplasia verruciformis and patients without the disease. **Archives of Dermatological Research**, Berlin, v. 309, n. 6, p. 479-483, aug. 2017.

MAUCORT-BOULCH, D. et al. Predictors of human papillomavirus persistence among women with equivocal or mildly abnormal cytology. **International Journal of Cancer**, New York, NY, v. 126, n. 3, p. 684-691, 2010.

MBULAWA, Z. Z. A. et al. Increased alpha-9 human papillomavirus species viral load in human immunodeficiency virus positive women. **BMC Infectious Diseases**, Cape town, v. 14, n. 51, jan. 2014.

MEDEIROS, V. C. R. D. et al. Câncer de colo de útero: análise epidemiológica e citopatológica no estado do Rio Grande do Norte. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, n. 37, v. 4, p. 227-231, out./dez. 2005.

MEJÍA, L. et al. Prevalence of human papillomavirus types in cervical cancerous and precancerous lesions of Ecuadorian women. **Journal of Medical Virology**, New York, 88, p. 144-152, jan. 2016.

MELO, T. C. **Avaliação da interação entre o papilomavírus bovino e a célula hospedeira**. 2015. 226 f. Tese (Doutorado)-Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 2015.

MELO, T. C. Cytogenetic studies in peripheral blood of bovines afflicted by papillomatosis. **Veterinary and Comparative Oncology**, Oxford, UK, v. 9, n. 4, p. 269-274, dec. 2011.

MENDEZ, F. Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types and possible implications for the prevention of cervical cancer by HPV vaccines. **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 192, p. 1158-1165, oct. 2005.

MIGALDI, M. et al. Low prevalence of human papillomavirus infection in the healthy oral mucosa of a Northern Italian population. **Journal of Oral Pathology & Medicine**: official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology, Oxford, v. 41, n. 1, p. 16-20, 2012.

MILLER, C. S.; JOHNSTONE, B. M. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a metaanalysis, 1982-1997. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, St. Louis, MO, v. 91, p. 622- 635, jun. 2001.

MIRANDA, P. M. **Deteção e tipagem do Papilomavírus Humano em mulheres no município de Ouro Preto, Minas Gerais**. 2010. 144 f. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2010.

MOLDEN, T. et al. Human papillomavirus E6/E7 mRNA expression in women younger than 30 years of age. **Gynecologic Oncology**, New York, v. 100, p. 95-100, jun. 2006.

MOODLEY, M. et al. The interaction between steroid hormones, human papillomavirus type 16, E6 oncogene expression and cervical cancer. **International Journal Gynecology Cancer**, v. 13, n. 6, p. 834-842, 2003.

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

MORROW, C. P. et al. Relationship between surgical-pathological risk factors and outcome in clinical stage I and II carcinoma of the endometrium : a gynecology oncology group study. **Gynecology Oncology**, New York , v. 40, n. 1, p. 55-65, jan. 1991.

MORSHED, K. et al. Human papillomavirus (HPV): structure, epidemiology and pathogenesis. **Otolaryngologia Polska**, Warszawa, v. 68, p. 213-219, sep./oct. 2014.

MUCHIRI, C. B. S. L. et al. The impact of human immunodeficiency virus and human papillomavirus co-infection on HPV genotype distribution and cervical lesion grade in a semi urban population in tigon, kenya. **African Journal of Pharmacology and Therapeutics**, v. 1, n. 3, p. 97-105, 2012.

MUNOZ, N. et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types Associated with Cervical Cancer. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 348, p. 518-527, feb. 2003.

MURTA, E. F. C. et al. Human papillomavirus infection in adolescents: relation to contraceptive method, pregnancy, smoking, and cytologic findings. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 4, p. 217-221, 2001.

NAIR, S.; PILLAI, M. R. Human papillomavirus and disease mechanisms: relevance to oral and cervical cancers. **Oral Diseases**, Houndmills, v. 11, n. 6, p. 350-359, nov. 2005.

NIELSON, C.M; HARRIS, R.B; FLORES, R; et al. Multiple-type human papillomavirus infection in male anogenital sites: prevalence and associated factors. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, Philadelphia, v. 18, p. 1077-1083, apr. 2009.

NYITRAY, A.G. et al. Six-month incidence, persistence, and factors associated with persistence of anal human papillomavirus in men: The HPV in men study. **Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 204, n. 11, p. 1711-1722, dec. 2011.

OKAMI, K. A new risk factor for head and neck squamous cell carcinoma: human papillomavirus. **International Journal of Clinical Oncology**, New York, v. 21, n. 5, p. 817-818, jul. 2016.

OLIVEIRA, G. R. et al. Fatores de risco e prevalência da infecção pelo HPV em pacientes de Unidades Básicas de Saúde e de um Hospital Universitário do Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Belo Horizonte , v. 35, n. 5, p. 226-232, 2013.

OLIVEIRA, L. H. et al. Human papillomavirus genotypes in asymptomatic young women from public schools in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 43, n. 1, p. 4-8, 2011.

_____. Papilomavirus infectious in the oral and genital mucosa of asymptomatic women. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 2016.

OLIVEIRA, P. S. et al. Conduta na lesão intraepitelial de alto grau em mulheres adultas. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 38, n. 4, p. 274-279, 2012.

PAO, C. et al. Detection of human papillomavirus mRNA and cervical cancer cells in peripheral blood of cervical cancer patients with metastasis. **Journal of Clinical Oncology**, New York, v. 15, n. 3, p. 1008-1012, 1997.

PARSON, H. A. Telômeros, Telomerase e Câncer. **Revista da Faculdade Ciências Médicas de Sorocaba**, São Paulo, v. 5, n. 1, p. 54-59, 2003.

PASSMORE, J. A. S. et al. Comparison of cervical and blood T-cell responses to human papillomavirus-16 in women with human papillomavirus-associated cervical intraepithelial neoplasia. **Immunology**, Oxford, v. 119, n. 4, p. 507-514, oct. 2006.

PELKMANS, L.; HELENIUS, A. Endocytosis via caveolae. **Traffic**, Oxford, v. 3, p. 311-320, may. 2002.

PEREIRA, C. R. N. et al. Human papillomavirus prevalence and predictors for cervical cancer among high-risk women from Rio de Janeiro, Brazil. **International Journal Gynecology Cancer**, v. 17, p. 651-660, 2007.

PORNTANAKASEM, W. et al. Human papillomavirus DNA in plasma of patients with cervical cancer. **BMC Cancer**, London, v. 1, p. 2, mar. 2001.

PURANEN, M. H. et al. Exposure of an infant to cervical human papillomavirus infection of the mother is common. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St. Louis, v. 176, n. 5, p. 1039-1045, 1997.

_____. Vertical transmission of human papillomavirus from infected mothers to their newborn babies and persistence of the virus in childhood. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St. Louis, v. 174, n. 2, p. 694-699, 1996.

PYTYNIA, K. B.; DAHLSTROM, K. R.; STURGIS, E. M. Epidemiology of HPV-associated oropharyngeal cancer. **Oral Oncology**, Oxford, v. 50, n. 5, p. 380-386, may. 2014.

QUINT, K. D. et al. Progression of cervical low grade squamous intraepithelial lesions: In search of prognostic biomarkers. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, Amsterdam, v. 170, n. 2, p. 501-506, feb. 2013.

RABELO-SANTOS, S. H. et al. Human papillomavirus prevalence among women with cervical intraepithelial neoplasia III and invasive cervical cancer from goiânia, Brazil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro v. 98, n. 2, p. 181-184, 2003.

RAGIN, C. et al. Oral HPV infection and sexuality: a cross- sectional study in women. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, Switzerland, v. 12, p. 3928- 3940, jun. 2011.

RAMIREZ-SALAZAR, E. R. et al. HPV 16 E2 could act as down-regulator in cellular genes implicated in apoptosis, proliferation and cell differentiation. **Virology**, New York, v. 8, p. 247-253, 2011.

RAUTAVA, J.; SYRJÄNEN, S. Human papillomavirus infections in the oral mucosa. **Journal of the American Dental Association**, Rome, v. 142, n. 8, p. 905-914, 2011.

RIBEIRO, A. A. **Prevalência de tipos específicos de Papilomavírus humano (HPV) e relação com a severidade da lesão cervical em mulheres com exame citopatológico anormal**. 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Goiás, Goiás, 2009.

RICHART, R. M. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, Philadelphia, v. 10, n. 4, p. 748-784, 1967.

RIETHDORF, S. et al. p53 gene mutations and HPV infection in primary head and neck squamous cell carcinomas do not correlate with overall survival: a long-term follow-up study. **Journal of Oral Pathology & Medicine**: official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology, Oxford, v. 26, n. 7, p. 315-321, aug. 1997.

ROMBALDI, R. L. et al. Perinatal transmission of human papillomavirus DNA. **Virology Journal**, London, v. 6, p. 83, 2009.

ROMBALDI, R. L. Transplacental transmission of Human Papillomavirus. **Virology Journal**, London, v. 5, p. 106, 2008.

ROSENBLATT, C. et al. **HPV na prática clínica**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005.

ROUSSEAU, M. C. al. Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types as a predictor of acquisition and persistence of HPV infection. **The Journal of infectious diseases**, Oxford, v. 184, n. 12, p. 1508-1517, dec. 2001.

SAINI, R. et al. High-risk human papillomavirus in the oral cavity of women with cervical cancer, and their children. **Virology Journal**, London, v. 7, p. 131, 2010.

SALVIA, P. N. et al. Correlation between histological criteria and human papillomavirus presence based on pcr assay in cervical biopsies. **International Journal Gynecology Cancer**, v. 14, n. 1, p. 126-132, 2004.

SÁNCHEZ-VARGAS, L. O.; DÍAZ-HERNÁNDEZ, C.; MARTINEZ-MARTINEZ, A. Detection of Human Papilloma Virus (HPV) in oral mucosa of women with cervical lesions and their relation to oral sex practices. **Infectious Agents and Cancer**, London, v. 5, n. 1, p. 25, dec. 2010.

SANTOS, C. A. et al. Incidência de HPV em clientes soropositivo para HIV- Uma revisão bibliográfica. **Revista Faculdade Montes Belo (FMB)**, Montes Belo, v. 9, n. 2 p. 17-27, 2016.

SANTOS, J. C. et al. Ocorrência de papilomavírus humano na cérvix uterina de mulheres da região ocidental da Amazônia Brasileira. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 43, n. 2, p. 185-190, jun. 2013.

_____. Papiloma Vírus Humano (HPV) entre mulheres com idade fértil em centro de saúde. **Revista Inderd**, v. 8, n. 2, p. 35-42, abr./jun. 2015.

SAPP, M.; BIENKOWSKA-HABA, M. Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus. **FEBS Journal**, Oxford, v. 276, n. 24, p. 7206-7216, dec. 2009.

SARKOLA, M. et al. Human papillomavirus dna detect in breast milk. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 27, n. 6, jun. 2008.

SATHISH, N. et al. HPV DNA in plasma of patients with cervical carcinoma. **Journal of Clinical Virology**, New York, v. 31, n. 3, p. 204-209, 2004.

SCHEURER, M. E.; TORTOLERO-LUNA, G.; ADLER-STORTHZ, K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology and prevention. **International Journal Gynecology Cancer**, v.15, n. 5, p. 727-746, 2005.

SCHILLER, J. T.; DAY, P. M.; KINES, R. C. Current understanding of the mechanism of HPV infection. **Gynecologic Oncology**, New York, v. 118, n. 1 SUPPL. 1, p. S12-S17, jun. 2010.

SCHMEINK, C. E. et al. Human papillomavirus persistence in young unscreened women, a prospective cohort study. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 11, p. 1-8, nov.2011.

SCULLY, C. Oral cancer aetiopathogenesis; past, present and future aspects. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, Madrid, v. 16, n. 3, p. e306-e311, mar. 2011

_____. Oral squamous cell carcinoma: from an hypothesis about a virus, to concern about possible sexual transmtion. **Oral Oncology**, Oxford, v. 38, n. 3, p. 227-234, 2001.

SERRANO, B. et al. Human papillomavirus genotype attribution for HPVs 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 and 58 in female anogenital lesions. **European Journal of Cancer**, Oxford, v. 51, n. 13, p. 1732-1741, sep. 2015.

SHIELDS, T. S. et al. A Case-control study of risk factors for invasive cervical cancer among U.S. women exposed to oncogenic types of Human papillomavirus. **Cancer epidemiology, Biomarkers & Prevention**: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, Philadelphia, v. 13, n. 10, p. 1574-1582, oct. 2004.

SHUKLA, S. et al. Infection of human papillomavirus in carcens of different human organ sites. **Indian Journal of Medical Research**, v. 130, p. 222-233, set. 2009.

SILVA, D. S. M. et al. Rastreamento do câncer do colo do útero no Estado do Maranhão, Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 4, p. 1163-1170, 2014.

SILVA, E. J. et al. Considerações relacionadas ao diagnóstico e tratamento do Papilomavírus Humano (HPV) em cavidade oral. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 117-125, 2016.

SILVA, M. F. P. T. B. et al. HPV31 and HPV33 incidence in cervical samples from women in recife, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirao Preto, SP, v. 8, n.4, p. 1437-1443, dec. 2009.

SILVEIRA, F. A. et al. The association of HPV genotype with the regression, persistence or progression of low-grade squamous intraepithelial lesions. **Experimental and Molecular Pathology**, New York, v. 99, n. 3, p. 702-706, 2015.

SMITH, J. S. et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. **International Journal of Cancer**, New York, v. 121, n. 3, p. 621-632, aug. 2007.

SOUTO, R.; FALHARI, J. P. B.; CRUZ, A. D. O Papilomavírus Humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 51, n. 2, p. 155-160, 2005.

SOUZA, N. C. G. **Identificação da prevalência de variantes de papilomavírus humano (HPV) no estado de Alagoas e desenvolvimento de “kit” de detecção e tipificação em amostra biológica.** 2016. 145 f. Tese (Doutorado)-Universidade Federal de Alagoas, Maceio, 2016.

SOUZA, N.; MELO, V.; CASTRO, L. Diagnóstico da infecção pelo HPV em lesões do colo do útero em mulheres HIV+. **Revista Brasileira de Ginecologia & Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 6, 2001.

STAUFFER, Y. et al. Infectious human papillomavirus type 18 pseudovirions. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v. 283, p. 529-536, oct. 1998.

STEINAU, M. et al. Prevalence of cervical and oral human papillomavirus infections among US women. **Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 209, n. 11, p. 1739-1743, jun. 2014.

STOFLER, M. E. C. W. et al. Avaliação do desempenho da citologia e colposcopia comparados com a histopatologia no rastreamento e diagnóstico das lesões do colo uterino. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, Santa Catarina, v. 40, n. 3, p. 30-36, 2011.

STRAUSS, M.; BUNTING, H.; MELNICK, J. Virus-like particles and inclusion bodies in skin papillomas. **The Journal of investigative dermatology**, Cambridge, v. 15, n. 6, p. 433-445, dec. 1950.

SYRJÄNEN, K. J. HPV infections and oesophageal cancer. **Journal of clinical pathology**, London, v. 55, n. 10, p. 721-728, oct. 2002.

SYRIANEN, K. J.; PYRHONEN, S.; SYRJANEN, S. M. Evidence suggesting human papillomavirus (HPV) etiology for the squamous cell papillomas of the paranasal sinus. **Arch Geschwulstforsch**, Dresden, v. 53, p. 77-82, 1983.

SYRJÄNEN, S. Current concepts on human papillomavirus infections in children. **APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 118, n. 6-7, p. 494-509, jun. 2010.

SYRJÄNEN, S.; PURANEN, M. Human papillomavirus infections in children: the potential role of maternal transmission. **Critical reviews in oral biology and medicine**: an official publication of the American Association of Oral Biologists, New York, v. 11, n. 2, p. 259-274, mar. 2000.

SZULCZEWSKI, V. **Estudo in vitro sobre a interação celular e vias endocíticas de papilomavírus humano (HPV) em leucócitos do sangue periférico**. 2009. 132 f. Dissertação (Mestrado em biotecnologia)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

TATÁR, T. Z. et al. Prevalence of human papillomaviruses in the healthy oral mucosa of women with high-grade squamous intra-epithelial lesion and of their partners as compared to healthy controls. **Journal of Oral Pathology & Medicine**: official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology, Oxford, v. 44, n. 9, p. 722-727, 2015.

TAVASSOLI, F. A; DEVILEE, P. **Pathology & genetics: tumours of the breast and female genital organs**. Lyon: IARC, 2003.

TEIXEIRA, L. O. et al. Frequência do Papilomavírus Humano na placenta, no colostro e no sangue do cordão umbilical TT - Frequency of Human Papillomavirus in the placenta, in the colostrum and in the umbilical cord blood. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Belo Horizonte, v. 37, p. 203-207, 2015.

TERMINE, N. et al. Oral human papillomavirus infection in women with cervical HPV infection: New data from an Italian cohort and a metanalysis of the literature. **Oral Oncology**, Oxford, v. 47, n. 4, p. 244-250, 2011.

TERRES, A. F. et al. Análise dos resultados de exames preventivos e de rastreamento de câncer de colo do útero realizados em uma clínica ginecológica particular no município de Curitiba, PR. **Estud Biologia**, Curitiba, v. 31, n. 73, p. 103-109, 2009.

THACZUK, D. HIV-positivewomen often infected with multiple HPV subtypes. **NAM**. dec. 2006.

TRINDADE, G. B. et al. Avaliação do rastreamento do câncer do colo do útero e sua periodicidade em um município de Santa Catarina. **Medicina (Ribeirao online)**, v. 50, n. 1, p. 1-10, 2014.

TRISTÃO, W. et al. Epidemiological study of HPV in oral mucosa through PCR. **Brazilian Journal Otorhinolaryngol**, v. 78, n. 4, p. 66-70, 2012.

TROTTIER, H. et al. Human Papillomavirus Infections with Multiple Types and Risk of Cervical Neoplasia. **Cancer Epidemiology and Biomarkers Prevention**, Philadelphia, v. 15, n. 7, p. 1274-1280, jul. 2006.

TSENG, C. et al. Detection of Human Papillomavirus Types 16 and 18 mRNA in Peripheral Blood of Advanced Cervical Cancer Patients and Its Association With Prognosis. **Journal of Clinical Oncology**, New York, v. 17, n. 5, p. 1391-1396, 1999.

UKEN, R. B. et al. Oral HPV prevalence in women positive for cervical HPV infection and their sexual partners: a German screening study. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, Heidelberg, v. 273, n. 7, p. 1933-1942, jul. 2016.

VACCARELLA, S. et al. Concurrent infection with multiple human papillomavirus types: Pooled analysis of the IARC HPV prevalence surveys. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, Philadelphia, v. 19, n. 2, p. 503-510, fev. 2010.

VALENÇA, J. E. C. et al. High risk HPV E6/E7 Oncoprotein Expression in Women with High Grade Squamous Intraepithelial Lesion. **Revista Brasileira Ginecol Obstet**. Rio de Janeiro, v. 38, p. 154-159, 2016.

VAN DER GRAAF, Y. et al. Human Papillomavirus and the Long-term Risk of Cervical Neoplasia. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v. 156, n. 2, p. 158-164, jul. 2002.

VAN DOORSLAER, K. Evolution of the Papillomaviridae. **Virology**, New York, v. 445, n. 1/2, p. 11-20, 2013.

VENCESLAU, E. M. et al. HPV detection using primers MY09/MY11 and GP5+/GP6+ in patients with cytologic and/or colposcopic changes. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 50, n. 4, p. 280-285, jul./aug. 2014.

VENTURI, B. R. M.; CABRAL, M. G.; LOURENÇO, S. Q. C. Oral squamous cell carcinoma contribution of oncogenic virus and some molecular markers in the development

and prognosis of the lesion: a review. **Revista Brasileira Otorrinolaringologia**, Rio de Janeiro, v.70, n. 3, p. 385-392, maio/jun. 2004.

VIDOTTI, L. R. et al. Association between oral DNA-HPV and genital DNA-HPV. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, Copenhagen, v. 43, n. 4, p. 289-292, apr. 2014.

VIEGAS, V. Papilomatose respiratória recorrente. **Acta Pediátrica Portuguesa**, v. 42, n. 5, p. 228-231, 2011.

VILLIERS, E. M. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. **Virology**, New York, v. 445, n. 1-2, p. 2-10, 2013.

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

WAGGONER, S. E. Cervical Cancer. **Lancet**, London, v. 361, p. 2217-2225, 2003.

WANG, J. W.; RODEN, R. B. S. L2, the minor capsid protein of papillomavirus. **Virology**, New York, v. 445, n. 1/2, p. 175-186, 2013.

WILLIAMS, V. M. et al. HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress. **Future Virology**, London, v. 6, n. 1, p. 45-57, jan. 2011.

WOELBER, L. et al. Oral human papillomavirus in women with high-grade cervical intraepithelial neoplasia. **Journal of Lower Genital Tract Disease**, Malden, v. 21, n. 3, p. 1, jul. 2017.

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

WRIGHT, T. C. et al. Chapter 30: HPV vaccines and screening in the prevention of cervical cancer ; conclusion from a 2006 workshop of international experts. **Vaccine**, Guildford, Surrey, UK, n. 24, n. 3, p. 251-261, 2006.

XAVIER, S. D. et al. Frequencia de aparecimento de Papilomavírus Humano (HPV) na mucosa oral de homens com HPV anogenital confirmado por biologia molecular. **Arquivos Internacionais de Otorrinolaringologia**, São Paulo, v. 11, n. 1, p. 36-44, 2007.

YOSHINOUCI, M. et al. Analysis by multiplex PCR of the physical status of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancers. **Journal of Clinical Microbiology**, Wiesbaden, v. 37, n. 11, p. 3514-3514, nov. 1999.

YOUNG, D. et al. Increase in head and neck cancer in younger patients due to human papillomavirus (HPV). **Oral Oncology**, Oxford v. 51, n. 8, p. 727-730, 2015.

ZENG, Z. et al. Prevalence and Genotype Distribution of HPV Infection in China: analysis of 51,345 HPV Genotyping Results from China's Largest CAP Certified Laboratory. **Journal of Cancer**, Wyoming, v. 7, n. 9, p. 1037-1043, may. 2016.

ZHANG, H. Y. et al. Human papillomavirus type 16 and 18 DNA in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Copenhagen, v. 33, p. 71-74, jan. 2004.

_____. The diversity of human papillomavirus infection among human immunodeficiency virus-infected women in Yunnan, China. **Virology Journal**, London, v. 11, n. 1, p. 202, dec. 2014.

ZONTA, M. A. et al. Infection by the human papilloma virus in women with cervical lesions at a prison in Sao Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, São Paulo, v. 78, n. 2, p. 66-72, 2012.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nature Reviews Cancer**, London, v. 2, n. 5, p. 342-350, may. 2002.

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO-TCLE “Atividade mucoso trópica do Papilomavírus Humano (HPV) no processo carcinogênico em diferentes sítios de infecção” HPV E CÂNCER CERVICAL

Prezada paciente _____

Convidamos você a participar de um projeto de pesquisa sobre o Papilomavírus Humano, também chamado de HPV, que pode causar câncer de colo uterino. Esse projeto será realizado no Centro Integrado de Saúde Amaury de Medeiros-CISAM e no Laboratório de Biologia Molecular localizado no Hospital Universitário Oswaldo Cruz, Recife/PE com início em agosto de 2014 e término previsto para 2017.

O objetivo deste estudo é investigar a presença de HPV na população e outros fatores que possam estar relacionados com o câncer do colo do útero.

Se você estiver interessado em participar, você responderá um questionário e no momento da sua consulta com o Dr. Stephan será feita uma esfoliação com a utilização de uma escova citológica denominada “*cytobrush*” para coletar uma amostra de material do colo uterino. Posteriormente será realizada uma punção venosa para retirada de amostras de sangue em tudo contendo EDTA e uma esfoliação com a utilização do “*cytobrush*” na mucosa oral para coleta das células orais. Todas as coletas desse projeto serão realizadas no Centro Integrado Amaury de Medeiros-CISAM por profissionais da área de saúde. Todo o material biológico coletado será acondicionado e levado para ser armazenado e processado no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Oncohematologia Pediátrica do Hospital Universitário Oswaldo Cruz, situado na Rua Arnóbio Marques, 310, Recife PE e será utilizado exclusivamente para os testes do nosso projeto.

Os procedimentos utilizados apresentam baixo risco, pois vão seguir sua rotina clínica, e os riscos são associados à retirada de sangue que gera desconforto (causado pela introdução da agulha) ou leve equimose (arroxado) onde a agulha foi inserida na veia. A equimose deve desaparecer dentro de poucos dias. Destacamos que não haverá desconforto e dor para os participantes na coleta da mucosa oral, tendo em vista que a citologia esfoliativa é um método não invasivo, que consiste na descamação de células da superfície, sendo realizado por profissionais da área de saúde. O procedimento da coleta cervical é realizado durante o exame ginecológico, utilizando o método que o médico já realiza na paciente durante o atendimento, dependendo do grau de lesão, pode haver um pouco de dor, desconforto e sangramento. Para minimizar esses possíveis riscos, as coletas só serão realizadas por profissionais capacitados e com experiência para esse procedimento.

Participando do estudo haverá o benefício de você ter um exame preventivo mais completo, pois serão realizadas as identificações da presença e tipos do HPV. A presença de alguns tipos do vírus é um fator de risco para a formação do câncer. Os seus resultados serão encaminhados ao médico que lhe acompanha no CISAM, onde você fez a coleta e, caso haja alguma alteração, você será informada e acompanhada pela equipe deste Centro.

Sua participação nesse projeto é voluntária. Você pode deixar o estudo em qualquer momento sem que isto lhe cause qualquer prejuízo. Todos os exames e consultas médicas realizados nesse projeto serão gratuitos, não apresentando nenhum custo para o participante.

A análise do seu material será realizada no Laboratório de Biologia Molecular localizado no Hospital Universitário Oswaldo Cruz e seguirá rigorosamente os critérios estabelecidos.

Todos os dados coletados serão mantidos em sigilo, cabendo apenas a você e ao médico responsável o conhecimento deles. O termo de Consentimento será confeccionado em duas vias de igual teor e você receberá uma cópia desse termo e poderá esclarecer qualquer dúvida com a Dra Maria Tereza Cartaxo Muniz pelo telefone (81) 3184-1200 r.160 ou com a Msc. Thalita Araújo Sant'Ana (81) 96776200. Caso haja alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos-Complexo hospitalar HUOC/Procape Rua Arnóbio Marques, 310 - Santo Amaro - 50100-130 - Recife-PE. Fone: (81) 3184.1460-Fone/Fax: (81) 3184.1271 - e-mail: cep_huoc.procape@yahoo.com.br

Desde já, agradecemos sua colaboração.

Eu, _____, acredito ter sido suficientemente informada a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **Atividade mucoso trópica do Papilomavírus Humano (HPV) no processo carcinogênico em diferentes sítios de infecção**". Eu discuti com o responsável pela pesquisa sobre a minha decisão em participar deste estudo. Ficaram claros para mim quais são os objetivos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

____/____/____

Assinatura da Paciente / Representante Legal

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura
Recife, ____ de _____ de ____

APÊNDICE B - FICHA ANAMNÉTICA

FICHA ANAMNÉTICA

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO OSWALDO CRUZ

HPV e Câncer cervical

Coleta de Sangue: Profissional responsável: _____ () EDTA	Coleta de biópsias: Profissional responsável: _____
---	---

Data: ____/____/____ **Telefone :** _____ **Local:** _____

Paciente: _____ **Registro n** _____

Etnia () Branco () Negro () Pardo () Amarelo

Data de Nascimento: ____/____/____ **Idade (anos):** _____

Estado Civil: () Solteira () Casada () viúva () Separada () Divorciada

Escolaridade:

Analfabeta (lê ou escreve mal) () Primário incompleto () Primário completo ()

Ginásio incompleto () Ginásio completo () Ensino médio incompleto ()

Ensino médio completo () Ensino superior ()

Profissão: _____ **Ocupação:** _____ **Tempo:** _____ **Número de**

filhos: total _____ Vivos _____ Mortos _____

Causa _____ idade _____

Causa _____ idade _____

Residência atual: Bairro ou Distrito: _____ Cidade: UF:

Tempo de residência: _____ anos Zona: Rural () Urbana ()

A residência fica nas proximidades de mineradoras ou centros industriais?

() Não () Sim

Há criação e manejo com bovinos? () Não () Sim

Nascimento: Cidade: UF: Zona: () Rural () Urbana

A residência se encontrava nas proximidades de mineradoras ou centros industriais?

() Não () Sim

Idade da 1ª Relação sexual: _____ **Número de parceiros:** Atualmente: _____ Total : _____

Sexo Oral () Sim Não ()

Utiliza método anticoncepcional? () Não () Sim Qual? _____ Quanto tempo? _____

Já utilizou método anticoncepcional? () Não () Sim Qual? _____ Quanto tempo ? _____

Período do ciclo menstrual (data da última menstruação): _____

Histórico Ginecológico: _____

Histórico Cirúrgico: _____

Histórico clínico: Algum mal-estar? () Não () Sim

Tontura () Fraqueza () Ataques () Náusea () Sonolência () Coceira ()

Dor () onde: _____

Apresenta alguma doença crônica? () Não () Sim Qual? _____

Portadora de HIV? () Não () Sim Desde quando está ciente? _____

Já foi diagnosticada com HPV () Não () Sim Desde quando esta ciente? _____

Utiliza algum(ns) medicamento(s) de uso contínuo? Não () Sim () Qual(is)? _____

Tabagismo: () Fuma () Nunca fumou () Não agora, mas já fumou () Fumante passiva

Tipo: () Cigarro palha () Cigarro c/ filtro () Cigarro s/ filtro () Charuto () Cachimbo

Idade em que Iniciou: _____ **Parou:** _____ **Nº de Anos:** _____

Quantidade: _____

Obs.: _____

Bebidas alcoólicas: () Não () Sim () Não agora, mas já consumiu

Tipo: Aguardente () Cerveja () Vinho () Outros () _____

Idade em que Iniciou: _____ **Parou:** _____ **Nº de Anos:** _____

Quantidade: _____

Obs.: _____

Ingestão de frutas e verduras (g/dia)

Fruta : _____

Verdura: _____

Há histórico de câncer na família?() Não () Sim

Em caso positivo: Tipo: _____ Grau de parentesco: _____

Ao questionador:

Como você julga o estado de atenção do entrevistado?

() Bastante disperso () Disperso () Atento () Bastante atento

Como você julga a compreensão do entrevistado sobre o que lhe é perguntado?

() Não compreende () Compreende com dificuldade () Compreende