INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
LABORATÓRIO DE INVESTIGAÇÃO MÉDICA EM DERMATOLOGIA
E IMUNODEFICIÊNCIAS – LIM 56

Infecção do Papilomavírus Humano no fluído oral em homens infectados pelo HIV: prevalência da infecção e sua relação com os fatores de risco.

Proponente: Karen Eliane de Oliveira Gaester

Orientador: Prof. Dr. Jorge Casseb

São Paulo

2014

Karen Eliane de Oliveira Gaester

Infecção do Papilomavírus Humano no fluído oral em homens infectados pelo HIV: prevalência da infecção e sua relação com os fatores de risco.

Dissertação apresentada ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: Prof. Dr. Jorge Simão do Rosário Casseb

Ficha catalográfica

Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo

Gaester, Karen Eliane de Oliveira

Infecção do papilomavírus humano no fluído oral em homens infectados pelo HIV : prevalência da infecção e sua relação com os fatores de risco / Karen Eliane de Oliveira Gaester. – São Paulo, 2014.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: Jorge Simão do Rosário Casseb

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me deu forças e sabedoria para fazer esse trabalho. Que me ajudou a não desistir nos momentos de desespero e que me deu serenidade e calma para finalizar essa pesquisa.

Aos meus pais, Rosana e Lázaro, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando em todas as minhas decisões. Vocês são meu alicerce e minha inspiração. Tenho muito orgulho de fazer parte de vocês.

Ao Robert, meu amigo, marido e companheiro, que suportou todas as minhas crises, mau humor, desespero e tantas outras emoções que passamos quando estamos construindo uma dissertação de mestrado. Amo você mais que tudo e obrigada por sempre estar do meu lado.

Obrigada a todos os amigos e pesquisadores do LIM56 que aprendi a admirar e respeitar. Agradeço por toda ajuda e torcida para que esse trabalho chegasse ao fim. A todos vocês, Tatiane, Adriele, Fernando, Maria, Éricka, Fabrícia, Samara, Mariana, Bosco, um muito obrigado por caminharem juntos nessa jornada e por sempre acreditarem que tudo iria dar certo.

Ao professor Doutor Jorge Casseb, meu orientador, que sempre acreditou em mim e me confiou esse projeto de pesquisa. Obrigada professor por toda paciência e dedicação. E agradeço ao Professor Alberto Duarte, por ter aberto as portas do laboratório – LIM56.

Agradeço a colaboração do Hospital das Clínicas e do Instituto de Infectologia Emílio Ribas e aos pacientes os quais foram indispensáveis para a realização deste trabalho.

E por fim, agradeço a FAPESP e Capes pelo apoio financeiro à essa pesquisa.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Dados sócios comportamentais dos participantes infectados pelo HIV.
- Tabela 2. Dados sócios comportamentais dos participantes infectados pelo HIV coinfectados pelo HPV.
- Tabela 3. Tipos de HPV entre os pacientes HPV positivo.
- Tabela 4. Distribuição dos fatores de risco em relação à prática sexual entre os 283 pacientes infectados pelo HIV de acordo com seu resultado para a detecção do HPV oral.
- Tabela 5. Distribuição dos fatores risco em relação aos hábitos sociais e dados laboratoriais entre os 283 pacientes HIV positivo, de acordo com seu resultado para a detecção do HPV oral.
- Tabela 6. Fatores associados ao HPV oral enterados na análise de regressão logística multivariada.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Modelo anatômico do capsídeo do Papilomavírus Humano (Modis, 2002).
- Figura 2 Representação do genoma do HPV composto pelas regiões de tradução E e L e seus respectivos genes e pela região não codificante – LCR. Modelo do HPV-18, mostrando o DNA circular com 8000 pb. (Desaintes & Demeret, 1996).
- Figura 3 Progressão de câncer cervical mediado pelo HPV (Woodman, 2007).
- Figura 4 Frequência da detecção do HPV em regiões diferentes na mucosa oral.

LISTA DE ABREVIATURAS

CDC – Centro de Controle e Prevenção de Doenças Norte-Americano

DNA – Ácido desoxiribonucleico

DNase – enzima que hidrolisa DNA

DNTP – desoxinucleotídeo trifosfato

E – região precoce

HAART – terapia antirretroviral

HC/FMUSP – hospital das clínicas/ faculdade de medicina/ universidade de São Paulo

HIV – vírus da imunodeficiência humana

HIV-1 – vírus da imunodeficiência humana tipo 1

HPV – Papilomavírus Humano

HSH – homens que fazem sexo com homens

IIER-SP – Instituto de Infectologia “Emílio Ribas” de São Paulo

L – região tardia

L1 – gene produzido na região tardia do genoma do HPV

LCR – região longa de controle

MgCL₂ – cloreto de magnésio

MY09 – oligonucleotídeo externo que amplifica a região L1 do HPV

MY11 – oligonucleotídeo externo que amplifica a região L1 do HPV

OMS – Organização Mundial da Saúde

OpenEpi – programa estatístico epidemiológico aberto para saúde pública

ORF – Open Reading Frame

P53 – proteína citoplasmática de massa molecular 53 kDa

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PRb – proteína do retinoblastoma

Pb – pares de base

SPSS – Statistical Package for the Social Sciences

Taq DNA – polimerase termoestável que amplifica fragmentos de DNA

TBE – solução tampão Tris/ borato/EDTA

TCD4+ - Linfócito T CD4+

TCD8+ - Linfócito TCD8+

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

U – unidade de medida

Ul - microlitro

RESUMO

Gaester KEO. Infecção do Papilomavírus Humano no fluído oral em homens infectados pelo HIV: prevalência da infecção e sua relação com os fatores de risco. São Paulo: Instituto de medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, 2014.

Introdução: O Papilomavírus Humano é uma das infecções sexualmente transmissíveis mais comuns no mundo. A história natural da infecção oral pelo HPV não é bem esclarecida e seus fatores de risco não são bem explorados. Pessoas imunocomprometidas, como pacientes infectados pelo HIV, apresentam maior risco para a infecção pelo HPV. **Objetivo:** determinar a prevalência do HPV no fluído oral de homens infectados pelo HIV e sua relação com os fatores de risco. **Casuística:** Um total de 283 amostras de lavado oral foram analisadas. Todas as amostras passaram por processos de lavagem, extração de DNA, amplificação do DNA por PCR convencional (MY09/11), eletroforese em gel de agarose e as amostras positivas para HPV DNA foram submetidas à genotipagem do HPV por meio de hibridização. **Resultados:** A genotipagem do HPV identificou a presença dos tipos 06, 16, 44, 51, 56, 58, 62, 66, 67, 69, 72, 83 e 84. O tipo mais prevalente no grupo de alto risco foi HPV-66 e no grupo de baixo risco HPV-6 e 83. Em relação aos fatores de risco, o tabagismo foi o único fator considerado significativo [OR (CI) = 10,04 (1,98 – 50,92), $p > 0,01$] para a infecção do HPV oral em homens infectados pelo HIV em São Paulo, Brasil. **Discussão:** A prevalência do HPV oral é altamente variável em decorrência de fatores como método de coleta e análises das amostras. Apesar de dados sobre a infecção pelo HPV em homens serem escassos, estudos mostram que grande parte dos homens brasileiros são infectados pelo vírus. O fator de risco principal é a exposição sexual de risco, porém, outros fatores são considerados como possíveis para aquisição do HPV como o tabagismo, consumo excessivo de álcool e a infecção pelo HIV. **Conclusão:** A prevalência do HPV oral nos indivíduos estudados foi de 3,5%, e dentre os tipos encontrados, a maioria não são encontrados na vacina do HPV comercialmente disponível.

Palavra chave: HPV, fluído oral, HIV-1, Brasil

ABSTRACT

Gaester KEO. Human Papillomavirus infection in the oral fluid of HIV-infected men: Prevalence and relation with risk factors. São Paulo: Instituto de medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, 2014.

Introduction: Human Papillomavirus is one of the most common sexually transmitted infection worldwide. The natural history of oral HPV infection is unclear and its risk factors have not been explored. Immunocompromised people, as exemplified by HIV patients, are at high risk for HPV-infection. **Objectives:** To determine the prevalence of HPV in the oral tract of HIV-1-positive male subjects and its association with risk factors. **Case series:** A total of 283 oral wash samples were analyzed. All samples were processed by washing processes, DNA extraction, DNA amplification by conventional PCR (MY 09/11), agarose gel electrophoresis and HPV DNA positive samples were submitted to HPV genotyping by hybridization. **Results:** HPV genotyping revealed of types 06, 16, 44, 51, 56, 58, 62, 66, 67, 72, 83 and 84; major high risk HPV type identified was HPV-66 and low risk types were HPV-6 and 83. Regarding risk factors, smoking was the only risk factor considered significant [OR (CI) = 10,04 (1,98 – 50,92), $p > 0,01$] for the oral HPV-infection in HIV-1-infected subjects in São Paulo, Brazil. **Discussion:** The prevalence of oral HPV is highly variable due to factors such as method of collection and analysis. Although data on HPV infection in men are scarce, studies show that most Brazilian men are infected by the virus. The main risk factors are unprotected sexual intercourse, but other factors for this infection have been described elsewhere including smoking, alcohol consumption and HIV-positive serostatus. **Conclusion:** the prevalence of oral HPV in the individuals studied was 3.5% and among the types analyzed, most are not found in HPV vaccine commercially available.

Keys Words: HPV, oral fluid, HIV-1, Brazil

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	II
LISTA DE FIGURAS.....	IV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IV
RESUMO.....	VI
I	
ABSTRACT.....	VI
I	
SUMÁRIO.....	VIII
1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1 REVISÃO DA LITERATURA.....	1
1.2 CARCINOGENESE.....	3
1.3 CLASSIFICAÇÃO DO HPV E TRANSMISSÃO DA DOENÇA.....	4
1.4 EPIDEMIOLOGIA.....	5
1.5 FATORES DE RISCO NA INFECÇÃO PELO HPV ORAL.....	8
1.6 HPV NO HOMEM.....	8
1.7 RELAÇÃO DO HPV COM HIV.....	9
2. OBJETIVO.....	11
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
3. MÉTODOS.....	12
3.1 LOCAL E TIPO DE ESTUDO.....	12
3.2 POPULAÇÃO ALVO.....	12
3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	12
3.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	13
3.5 ALGORITMO DE DIAGNÓSTICO.....	13
3.6. COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS.....	13

3.6.1 EXTRAÇÃO DE DNA.....	14
3.6.2 PCR DO GENE L1 DO HPV.....	15
3.6.3 ELETROFORESE PARA VISUALIZAÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO.....	15
3.6.4 GENOTIPAGEM DO HPV.....	16
3.6.5 PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE ALBUMINA.....	18
3.6.6 CONTROLE DE QUALIDADE DOS DADOS.....	19
3.6.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	19
3.6.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	20
4. RESULTADOS.....	21
5. DISCUSSÃO.....	30
6. CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
ANEXO A.....	43
ANEXO B.....	48
ANEXO C.....	50
ANEXO D.....	58
ANEXO E.....	60

1. INTRODUÇÃO

1.1 REVISÃO DA LITERATURA

O Papilomavírus Humano (HPV) é um vírus pequeno da família *Papillomaviridae*. É considerado epiteliotrópico, e por essa razão, é capaz de induzir uma variedade de lesões proliferativas. Possui um genoma de DNA circular de fita dupla, com cerca de oito mil pares de base não envelopado, com capsídeo no formato icosaédrico e de aproximadamente 55 nm de diâmetro (Figura 1) (1,2).

O genoma do vírus encontra-se em unidades de tradução, divididas em região precoce (E) e tardia (L), nos quais se encontram os genes que codificam as proteínas virais. Além disso, existe uma região longa de controle (LCR) considerada uma região não codificante (Figura 2) (1).

Figura 1. Modelo anatômico do capsídeo do Papilomavírus Humano. Retirado de Modis (2002).

A região precoce é composta por sete genes, cada um apresentando uma função. As proteínas codificadas pelos genes E1 e E2 atuam no mecanismo de replicação viral. Além disso, são responsáveis pela manutenção do DNA viral durante as infecções inicial e latente na camada de células basais (3).

A proteína produzida pelo gene E4, encontrada nas camadas mais

diferenciadas do epitélio infectado, é responsável pela alteração da arquitetura celular facilitando a liberação de partículas virais (4-6).

As proteínas dos genes E5, E6 e E7 fazem o estímulo da proliferação e da transformação celular (6). A expressão dos genes E6 e E7 é responsável pela degradação da p53 e pRb (proteína do retinoblastoma) respectivamente, o que resulta em desregulação do ciclo celular e imortalização das células. Tanto a p53 quanto a pRb, são proteínas supressoras tumorais com a função de regular o ciclo celular (7-9).

Figura 2: Representação do genoma do HPV, composto pelas regiões de tradução E e L e seus respectivos genes e pela região não codificante – LCR. Modelo do HPV-18, mostrando o DNA circular com 8000 pb. Retirado de Desaintes & Demeret (1996).

A p53 é ativada em resposta aos sinais de estresse do DNA danificado, e como resposta, pode solicitar a parada do ciclo celular, senescência ou apoptose. A pRb faz o controle da proliferação celular e do fator de transcrição E2F (7,9).

Os genes L1 e L2, da região tardia, são responsáveis pela codificação das proteínas estruturais que compõem o capsídeo viral. A estrutura da região L1, quando desprovida do DNA viral é a base para a profilaxia das vacinas contra o

HPV. Além disso, a região L1 é considerada a mais conservada do capsídeo entre todos os tipos de HPV (3,6).

A LCR é considerada uma região não codificante, mas contém elementos considerados necessários para a replicação, transcrição e regulação do DNA viral (1).

1.2 CARCINOGENESE

Duas classes de genes são responsáveis pelo controle desse ciclo celular, os proto-oncogenes e os genes supressores que estimulam e inibem os processos de divisão celular respectivamente. Quando ocorre uma mutação, os genes adquirem uma nova função tendo um controle inadequado do ciclo celular e, conseqüentemente, tem-se o aumento da proliferação celular (10,11).

Além disso, algumas características podem ser consideradas nesse processo de proliferação anormal que caracteriza o crescimento maligno: o sinal do crescimento anômico, distúrbio no processo de apoptose, não percepção do crescimento anormal pelo organismo, replicação descontrolada, angiogênese, invasão e metástase (11).

Isso pode ser exemplificado com o ciclo viral do HPV, que durante a sua infecção as proteínas virais alteram o ciclo celular produzindo uma pro gene viral. (12,13).

O DNA do HPV quando integrado no DNA celular promove uma série de reações para que ocorra a replicação viral. Sendo que o evento principal é o aumento da expressão dos genes E6 e E7, levando ao aumento da proliferação anormal da célula infectada (11).

Ao mesmo tempo, a L2 interage com a proteína E2, facilitando o transporte da L1 para o núcleo da célula (7).

Figura 3: Progressão de câncer cervical mediado pelo HPV. Retirado de Woodman et al., 2007.

1.3 CLASSIFICAÇÃO DO HPV E TRANSMISSÃO DA DOENÇA

A infecção pelo HPV é uma das causas mais comuns de doença sexualmente transmissível no mundo (14). Mais de 180 genótipos foram identificados e classificados em diferentes subgrupos de acordo com seu potencial oncogênico, sendo que destes, 40 tipos estão localizados na mucosa genital humana (15,16).

Os tipos não oncogênicos são responsáveis por induzir lesões benignas e lesões intraepiteliais de baixo grau e, raramente, são encontrados em lesões cancerosas (17). Por outro lado, os tipos oncogênicos são considerados co-fatores para o desenvolvimento de lesões intraepiteliais de alto grau, especialmente os carcinomas (18,19).

Entre as alterações induzidas pelo HPV, as principais são as nucleares caracterizadas pelo aumento do volume, número, hipercromasia, disceratose e coloicitose, considerada patognômica da infecção pelo vírus quando comparada aos aspectos citológicos, colposcológicos e histopatológicos de lesões condilomatosas (20,21).

Dados de um estudo de metanálise conduzido pela Agência Internacional de Pesquisa no Câncer (IARC, 2007) considerou como grupo de baixo risco os tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e 89; como grupo de provável alto risco os tipos 26, 53, 66, 68, 73 e 82 e como grupo de alto risco os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59 (15,22).

A transmissão do HPV ocorre pelo contato direto entre mucosas ou pele que sofreram micro lesões. Isso servirá como porta de entrada do vírus na célula (23). O período de incubação do vírus pode variar de semanas a meses ou anos, e seu período de latência está relacionado com a quantidade de vírus presente no organismo (24).

Pode apresentar três formas de proliferação: potencialmente maligna, onde podem ser encontradas as alterações como leucoplasia, líquem rubem plano, líquem rubem erosivo e eritroleucoplasia; proliferação benigna, com os papilomas, verruga, hiperqueratose, hiperplasia e leucoplasia; e as lesões inflamatórias como a estomatite, ulceração, glossite, gengivite e reação liquenóide (24).

1.4 EPIDEMIOLOGIA

Estimativas indicam que o HPV, por ser um vírus sexualmente transmissível, irá infectar cerca de 50% dos indivíduos saudáveis, sexualmente ativos, em algum momento de suas vidas (25). Além disso, está diretamente relacionado com o

surgimento do câncer cervical, estando presente em 99,9% dos casos diagnosticados (14).

A organização mundial da saúde (OMS) mostrou que são registrados por ano 630 milhões de infectados pelo HPV entre homens e mulheres. Nos Estados Unidos cerca de 26.000 casos novos de câncer associados ao HPV são registrados a cada ano, sendo destes, 18.000 entre mulheres e 8.000 entre homens (26).

No Brasil, a infecção pelo HPV é considerada uma das mais comuns entre a população brasileira (27) com cerca de 10 milhões de indivíduos infectados pelo vírus e 700 mil novos casos por ano (28-30).

A história natural da infecção oral pelo HPV ainda não é bem esclarecida (31-33). Sua prevalência pode variar entre 0 e 70% na mucosa normal, 0 a 85% na mucosa com lesões potencialmente malignas e 0 a 100% em lesões malignas na região oral. Essa variabilidade pode ser explicada pela discrepância entre diferentes amostras utilizadas e também pela limitação de técnicas moleculares utilizadas em diferentes estudos (34).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) elaborou um guia de epidemiologia e diagnóstico de doenças da mucosa oral, para avaliar a detecção da presença do HPV em locais distintos da cavidade oral (35). Foi construído um guia topográfico, onde dividiu-se a região da cavidade oral em área bucal bilateral, área vestibular, área retrocomissural e área lingual e sublingual (Figura 4) (36).

Figura 4. Frequência da detecção do HPV em regiões diferentes na mucosa oral. A topografia da mucosa oral é codificada de acordo com o guia topográfico da OMS adaptado por Roed-Petersen e Roenstrup. Parte vermelha superior (13), inferior (14), comissura labial direita (15), esquerda (16), região labial superior (17), inferior (18), sulco labial superior (21), inferior (22), bochecha (mucosa bucal) direita (19), esquerda (20), sulco bucal superior direito (23), inferior (24), sulco bucal superior esquerdo (25), inferior (26), gengiva superior direita (31), gengiva anterior inferior (32), gengiva posterior superior direita (33), esquerda (34), gengiva posterior inferior direita (35), esquerda (36), gengiva anterior (37), e lingual (38), dorso da língua direita (39), esquerda (40), base da língua direita (41), esquerda (42), ponta da língua (43), margem direita da língua (44), esquerda (45), superfície direita da língua (46), esquerda (47), região frontal da boca (48), região lateral direita da boca (49), esquerda (50), palato duro direito (51), esquerdo (52), palato mole direito (53), esquerdo (54), tonsila anterior direita (55), esquerda (56); a escala de cor indica a frequência da positividade do HPV nos respectivos locais; para regiões com menos de três amostras analisadas, a frequência não foi calculada; regiões simétricas foram consideradas como uma para a análise. Doi: 10.1371/journal.pone.0069736.g001.

Cada região foi identificada por um código e pelo número de locais avaliados e foi inserida uma escala de cor para indicar a frequência de positividade do HPV nos respectivos locais (36). Mavrak-Stipetic e colaboradores, utilizaram o mapa topográfico adaptado para elucidar a associação do HPV com uma determinada doença em particular ou com o local da infecção na região da cavidade oral (36). Em seu estudo foram identificados os tipos HPV-6, 11, 16, 31, 33, 52 e 58.

1.5 FATORES DE RISCO NA INFECÇÃO PELO HPV ORAL

Pouco se sabe quais os fatores que contribuem para a infecção oral pelo HPV. Muitos estudos mostram que o número de parceiros sexuais, a frequência e início da atividade sexual e a prática de sexo oral aumentam a chance das pessoas se infectarem pelo HPV. Outros estudos também mostram que idade, raça, sexo e indivíduos imunocomprometidos também podem ser considerados fatores contribuintes para a infecção pelo HPV (24,37).

Além disso, o HPV foi descrito como fator que contribui para o desenvolvimento do câncer oral, além do consumo excessivo de álcool e o tabagismo (8,38). Mesmo não sendo um fator unânime entre os pesquisadores, por existirem dados que mostram que uma fração dos cânceres da cavidade oral não está associada a esses fatores, diferentes tipos do vírus tem sido detectados, principalmente aqueles com potencial oncogênico. (25,39,40). Os tipos 16 e 18 estão fortemente associados a lesões malignas do epitélio oral, e maioria dos carcinomas por HPV tem sido encontrada na região da orofaringe e tonsilas (41).

1.6 HPV NO HOMEM

Dados sobre a história natural da infecção genital pelo HPV em homens não são bem elucidados por serem difíceis de avaliação decorrente de algumas variações entre a localização anatômica, a amostra analisada, o método utilizado para a análise e o método de detecção do DNA do vírus (42-44).

Inicialmente a infecção pelo HPV tinha sua associação com o desenvolvimento de câncer na região anogenital na população homossexual (45).

Estudos indicavam que em homens que fazem sexo com homens e infectados pelo HIV, eram considerados grupos de maior vulnerabilidade para aquisição de doenças sexualmente transmissíveis como o HPV (46).

Recentemente, estudos mostraram a importância clínica e as consequências da infecção pelo HPV também na população heterossexual focando na transmissão do vírus para mulheres (45). Esses estudos sugeriram que a persistência do tipo oncogênico do vírus, também poderia ser decorrentes de outros fatores como o tabagismo, o número de parceiros sexuais e idade (47-49).

Mesmo que o aumento na prevalência da infecção pelo HPV em homens é particularmente visto na região anogenital (50), a prevalência da infecção pelo vírus na região da cabeça e pescoço vem aumentando na população masculina (26).

1.7 RELAÇÃO DO HPV COM HIV

O sistema imunológico tem um papel importante no controle da infecção por HPV. Entretanto, os mecanismos que controlam essa resposta contra o vírus não são bem esclarecidos. A persistência da infecção decorrente de uma resposta ineficiente pode implicar no desenvolvimento de lesões neoplásicas (37,38).

O HPV evita o seu reconhecimento pelo sistema imunológico por não causar lise celular e não induzir uma inflamação local. Em seu ciclo infeccioso não há viremia, uma quantidade muito baixa de proteína viral é expressa e o vírus não é citolítico. Dessa forma, não ocorre uma sinalização do sistema imunológico para ativar a resposta inata, tendo um atraso na resposta adaptativa (24).

Com base nisso, diversos estudos estabeleceram um aumento da prevalência do HPV em indivíduos infectados pelo HIV (51), como também o aumento de

lesões associadas ao vírus, alta taxa de infecção, um número maior de recidiva após o tratamento contra o HPV e desenvolvimento acelerado de câncer associado ao vírus (3,52).

E mesmo que a infecção pelo HIV possa influenciar na história natural da infecção pelo HPV, a relação entre os dois vírus não é bem estabelecida. O que se sabe é que em mulheres pode aumentar as chances do desenvolvimento do câncer cervical e nos homens, as manifestações ano-genitais passam a ser mais agressivas com maior número de recidivas, tendo uma prevalência significativa para o desenvolvimento do câncer anal (52,53).

Pouco se sabe sobre a infecção oral pelo HPV em homens, principalmente nos infectados pelo HIV e que fatores poderiam contribuir para a infecção pelo vírus. Com base nisso, esse trabalho de mestrado buscou identificar o grau de exposição dessa população específica ao HPV e quais seriam os possíveis fatores considerados de risco para a aquisição ao HPV.

2. OBJETIVO

Determinar a prevalência do HPV oral proveniente do fluído oral de homens infectados pelo HIV.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Detectar genotipos de HPV encontrados na mucosa oral de homens.
- 2- Correlacionar as variáveis epidemiológicas consideradas de risco para aquisição do HPV.

3. MÉTODOS

3.1 LOCAL E TIPO DE ESTUDO

O estudo foi transversal realizado no Serviço de Ambulatório de Imunodeficiências Secundárias Adeo 3002, do HC/FMUSP e no Instituto de Infectologia Emílio Ribas – São Paulo.

3.2 POPULAÇÃO ALVO

No total, 283 voluntários portadores de HIV do sexo masculino foram convidados a participar da pesquisa. Todos os pacientes estavam em acompanhamento no ambulatório de Imunodeficiências Secundárias Adeo 3002, do HC/FMUSP (n=218) e no ambulatório do HIV do Instituto Emílio Ribas (IIER-SP), (n=65). O recrutamento foi realizado no período de Outubro de 2012 a dezembro de 2013.

3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Somente indivíduos adultos, maiores de 18 anos, do sexo masculino com sorologia positiva para HIV-1.

3.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Portadores de insuficiência renal ou hepática, neoplasias, doenças autoimunes, coinfectados com Hepatite C e que não assinaram o termo de consentimento (TCLE) e não responderam ao questionário.

3.5 ALGORÍTMO DE DIAGNÓSTICO

Rotineiramente, realizaram-se os testes sorológicos para o diagnóstico do HIV, em todos os participantes que frequentam o laboratório clínico do Hospital das Clínicas e do Hospital Emílio Ribas.

3.6 COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS

Realizou-se a coleta do lavado oral em um coletor universal contendo 10 ml de solução salina (0,9% cloreto de sódio- Baxter International), no qual o participante foi orientado a realizar um bochecho por aproximadamente um minuto e depois devolver o conteúdo para o coletor. Não houve um preparo para a coleta como orientar os participantes a não fumar, mascar chiclete, beber ou comer, pelo fato de que essas ações exigiria uma espera de 30 minutos para a coleta do material.

Um processo de lavagem simples com solução salina para para todas as amostras foi realizado, e essas amostras foram submetidas a um processo de centrifugação a 11000 xg por 1 minuto para a retirada do sobrenadante e isolamento das células. Posteriormente armazenaram-se as células -20°C para posterior análise.

Rigorosos procedimentos foram seguidos para evitar reações falso-positivas por conta de prováveis contaminações. A manipulação das amostras, extração de

DNA, preparação de reagentes e adição de amostras de DNA foram realizadas separadamente e em seus respectivos setores, cada um com seu respectivo equipamento.

Em cada teste realizado, foi incluído um controle negativo contendo água destilada sem amostra de DNA e um controle positivo - HeLA. Todas as superfícies de trabalho foram descontaminadas com hipoclorito de sódio e álcool 70% antes de iniciar as análises e ao término de cada uma seguindo o protocolo de limpeza do laboratório.

3.6.1 EXTRAÇÃO DE DNA

Realizou-se o processo de extração de DNA por meio do reagente comercialmente disponível pelo *Illustra Tissue and Cells GenomicPrep Mini Spin Kit* (Easton Turnpike, Fairfield, EUA) e de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, agitaram-se as células mecanicamente e as mesmas foram homogeneizadas por pipetagem. Foram acrescentados 100ul de tampão de lise seguido de vortex por 14 segundos e 10ul de proteinase K para degradar a proteína e expor o DNA alvo deixando o material por 15 minutos a 56°C seguidos de dois minutos a 70°C.

Em seguida, adicionou-se 500ul de tampão de lise tipo quatro, e uma incubação por 10 minutos foi realizada. O conteúdo foi transferido para colunas e o processo de lavagem iniciou com 500ul de tampão de lise tipo quatro, seguidos de 500ul de tampão de lavagem. A coluna foi transferida para um microtubo estéril de 1.5ml DNase free e foram acrescentados 200ul de tampão de eluição seguido de

incubação por 1 minuto a temperatura ambiente. Após a centrifugação de 1 minuto a 11.000 X g o DNA genômico foi armazenado em freezer a -80°C.

3.6.2 PCR DO GENE L1 DO HPV

O processo de amplificação das amostras de DNA foi obtido pela PCR convencional, empregando-se os oligonucleotídeos MY09 e MY11(Gravitt et al, 2000) que são primers degenerados em algumas posições, permitindo assim o anelamento a mais de um tipo de nucleotídeo, permitindo uma amplificação de grande espectro de HPV.

Para 50ul da reação na PCR convencional, utilizaram-se as seguintes concentrações finais de cada reagente: uma mistura equimolar de quatro pmol dos primers MY09/MY11, 0.05 U/ul de Taq DNA polimerase, 4mM de MgCL₂, 0.4mM de cada dNTP presentes no PCR Master Mix (*Thermo Scientific*), água ultrapura e 5ul DNA. Um passo inicial de 4 minutos a 95°C para desnaturação seguida de 45 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 95°C, 1 minuto de anelamento a 58°C e 1 minuto a 72°C para a extensão seguida de um último passo de 7 minutos a 72°C para a extensão final. Ao final da reação realizou-se uma corrida em gel de agarose para visualização do produto amplificado.

3.6.3 ELETROFORESE PARA VISUALIZAÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO

A presença do HPV DNA foi confirmada por meio de eletroforese. Realizou-se uma corrida em gel de agarose a 2% com a utilização do tampão TBE 1X(Ultra Pure) para dissolver o gel. Depois de o gel ter sido dissolvido foram acrescentados 3.5ul de brometo de etídeo e após a homogeneização, adicionou-se o gel na forma

previamente preparada, para a sua consolidação.

Após esse processo, o pente e as laterais foram retirados, e a forma colocada dentro da cuba. Utilizou-se um marcador de peso molecular de 100pb e em cada amostra foi acrescentado um ul de *loading blue juice* 6X.

Em seguida, completou-se a cuba com tampão de corrida TBE1X e a corrida se iniciou a 74volts por 60 minutos. Para a visualização do produto amplificado, o gel foi inserido no aparelho transluminador (Multidoco-It Digital Imaging System UVP, Upland - CA) onde a imagem obtida foi transferida para o computador, através do programa Biodicit para formatação e armazenamento no banco de dados.

3.6.4 GENOTIPAGEM DO HPV

Para a determinação dos tipos de HPV, utilizou-se uma metodologia disponibilizada comercialmente e que se baseia na técnica de hibridização (kit *Papillomastrip Alto + baixo risco – Operon immuno & molecular diagnostics – Cuarte de Huerva/ Zaragoza - Spain*). O Papillomastrip é um teste baseado na técnica de blot reversa que permite a genotipagem do DNA sendo capaz de detectar 18 tipos de HPV de baixo risco HPV-6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 67, 70, 72, 74, 81, 83, 84 e 91 e 19 tipos de HPV de alto risco HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 59, 66, 68, 69, 73 e 82.

Inicialmente realizaram-se duas reações de PCR utilizando um *primer* para médio e alto risco e outro *primer* para baixo risco. Além disso, foram utilizados o pré mix e a enzima taq presentes no kit completando os reagentes necessários para a reação. Para uma reação de 50ul foram utilizadas as seguintes condições: um ciclo de

um minuto a 94°C seguido de 40 ciclos de um minuto a 94°C, um minuto a 58°C e um minuto a 72°C, finalizando com cinco minutos a 72°C, podendo a reação ficar em *over night* a 4°C.

Após esse processo, foram feitos o desenvolvimento e o preparo da fita e reagentes. Inicialmente prepararam-se os tampões de hibridização e de lavagem tipo um e dois a 42°C. Em seguida, utilizaram-se dois conjuntos de tiras para cada amostra, sendo uma tira para genotipagem do grupo de alto risco e a outra para o grupo de baixo risco. Essas tiras foram colocadas com o auxílio de uma pinça na placa de hibridização, sendo duas canaletas para cada amostra.

Foram acrescentados, sem entrar em contato com as fitas, 12,5ul do produto de PCR e 12,5ul de desnaturante homogeneizando suavemente com o auxílio da pipeta. A placa de hibridização foi colocada no termo shaker (ProBlot 12 S hybridization oven – Labnet, Edison, NJ-USA) e incubada por 10 minutos a 42°C. Foram acrescentados dois mililitros do tampão de hibridização e novamente a placa foi incubada por 30 minutos a 42°C e 450rpm.

Após esse período retirou-se o tampão das canaletas e foram acrescentados dois mililitros de tampão de lavagem tipo um e realizou-se um processo de incubação por 10 minutos a 42°C e a 450rpm. Repetiu-se o processo por mais uma vez, e ao final retirou-se o tampão de lavagem das canaletas e foram acrescentados dois mililitros de conjugado que permaneceu em incubação por 30 minutos a 42°C e 450rpm. Retirou-se o conjugado e foram acrescentados dois mililitros de tampão de lavagem tipo dois e incubou-se por 5 minutos a 42°C e 450rpm. Repetiu-se o processo por mais duas vezes.

Retirou-se a placa do termo shaker e realizou-se um processo de lavagem por várias vezes com dois mililitros de água destilada. Retirou-se cada tira da canaleta cuidadosamente e transferiu-se para uma superfície com papel toalha, para que as tiras secassem em um local privado de luz. Colocou-se cada tira em um papel transparente e com a ajuda de uma fita modelo (uma para cada grupo, disponibilizada pelo kit) realizou-se a interpretação dos resultados.

3.6.5 PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE ALBUMINA

Como controle interno, realizou-se uma PCR convencional para a identificação do gene da albumina em todas as amostras de DNA extraídas, considerando a albumina, um gene constitutivo presente em todas as células e que confere a garantia da presença do DNA nessas células. Para essa reação foram empregados os primers forward e reverse da albumina, que amplificam uma região de 320pb. Para 50ul da reação, utilizaram-se as seguintes concentrações finais de cada reagente: uma mistura equimolar de 10 pmol dos primers, tampão 10X, MgCL₂ 50nM, DNTP's 10nM, 5u/ul de Taq DNA Polimerase, água e o DNA. Um passo inicial de 4 minutos a 94°C para desnaturação seguida de 34 ciclos de trinta segundos de desnaturação a 94°C, trinta segundos de anelamento a 55°C e trinta segundos a 72°C para a extensão seguida de um último passo de cinco minutos a 72°C para a extensão final. Ao final da reação, realizou-se uma corrida em gel de agarose a 2% a 90 V por 1 hora e 15 minutos para visualização do produto amplificado.

3.6.6 CONTROLE DE QUALIDADE DOS DADOS

Realizou-se a coleta das informações dos participantes bem como as respostas obtidas pelo questionário respondido por cada participante. O pesquisador principal, que se responsabilizou pela coleta inicial das informações e armazenamento das mesmas no banco de dados.

Tabulou-se todos os dados e resultados em planilhas elaboradas no Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Seattle, WA, EUA) e posteriormente exportados para o programa estatístico SPSS versão 20.0 (IBM).

3.6.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Realizaram-se as análises descritivas por meio do programa estatístico SPSS versão 20.0 e exibidas em tabelas de frequências e porcentagens. Para a análise bivariada, utilizou-se o programa estatístico epidemiológico aberto para saúde pública – OpenEpi versão 3.01 e por meio do teste Exato de Fisher, considerou-se como variável dependente para o HPV oral, a idade, tabagismo e consumo de álcool, e como variável independente o uso de preservativo nas relações sexuais, prática de sexo oral, carga viral do HIV, contagem de células TCD4+ e uso de terapia antirretroviral. As variáveis que atingiram um valor de p menor que 0.2 foram inseridas num modelo de regressão logística multivariada de forma gradual e para frente. Realizou-se a análise multivariada com o auxílio do programa estatístico STATA (StataCorp. 4905 Lakeway Drive, College Station, TX).

3.6.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este trabalho foi aprovado pela Cappesq N° 120.853 e pelo CEP do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo IMT-USP CPE-IMT 2012/108, sendo que somente os pacientes que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), fizeram parte desta pesquisa.

4. RESULTADOS

As características laboratoriais e os dados sócios comportamentais de todos os 283 pacientes foram analisados (Tabela 1). Todos os pacientes que participaram do estudo eram do sexo masculino e portadores do HIV-1. A média de idade foi de 43,81 anos (22 – 72 anos) com 83 % fazendo uso de Terapia Antirretroviral - HAART, 82,3% com contagem de células TCD4+ maior que 350 células/mm³ e 78,8% com carga viral do HIV indetectável (menor que 50 cópias/ml).

A maioria dos pacientes tinha curso superior completo (45,2%), com renda familiar menor que 10 salários (81,7%), solteiros (53,4%), da etnia branca (60,8%) e não eram usuários de drogas (62,5%). O consumo de álcool e o tabagismo também foram avaliados. De todos os pacientes, 54,8% faziam uso de bebida alcoólica e 30,4% eram fumantes, sendo que destes, 3,9% disseram fumar por alguns meses e 26,5% por mais de anos (esses dados não constam na tabela).

Em relação à exposição sexual, 41% disseram ter relações sexuais somente com homens no último ano, 73,9% disseram fazer uso de preservativo em relações com parceiros eventuais e 53,4% disseram fazer sexo oral ativo. Além disso, 59,4% disseram praticar o sexo oral passivo e 52,6% disseram praticar o sexo anal como ativos. Cerca que 75,4% não apresentaram corrimento nos órgãos genitais, 80,2% disseram não ter verrugas nessa região ou presença de algum tipo de ferida (83%) (Tabela 2).

A presença do HPV DNA foi identificada em 10 das 283 amostras (3,5%). A média de idade entre esse grupo de pacientes coinfectados pelo HPV foi de 42 anos (26 – 56 anos), 70% estavam recebendo HAART e 80% eram solteiros.

Tabela 1. Dados sócios comportamentais dos pacientes infectados pelo HIV. Continua.

<i>Características (n=283 HIV+)</i>	<i>Frequência</i>	<i>Porcentagem</i>
<u>Media de idade dos pacientes: 43,81 anos</u>		
<u>Escolaridade</u>		
Primeiro Grau	56	19,8
Segundo Grau	98	34,6
Superior	128	45,2
Não Respondeu	01	0,4
<u>Renda Familiar</u>		
≤ 10 salários	231	81,7
≥ 10 salários	35	12,4
Não respondeu	17	06
<u>Situação Marital</u>		
Casado	91	32,2
Solteiro	151	53,4
Divorciado	22	7,8
Viúvo	16	5,7
Não Respondeu	03	1,1
<u>Etnia</u>		
Branca	172	60,8
Negra	19	6,7
Outras	89	31,5
Não Respondeu	03	1,1
<u>Relação Sexual no último ano</u>		
Não teve	42	14,9
Somente com mulheres	94	33,2
Somente com homens	116	41
Com homens e mulheres	21	7,4
Não Respondeu	10	3,5
<u>Uso de preservativo com parceiro eventual</u>		
Não tem parceiro eventual	57	20,1
Sim	209	73,9
Não	07	2,5
Não Respondeu	10	3,5

Tabela 1. Dados sócios comportamentais dos pacientes infectados pelo HIV. Continuação.

<i>Características</i>	<i>Frequência</i>	<i>Porcentagem</i>
<u>Uso de preservativo com parceiro fixo</u>		
Não tem parceiro fixo	67	23,7
Sim	185	65,4
Não	16	5,7
Não Respondeu	15	5,3
<u>Prática de sexo oral passivo</u>		
Sim	168	59,4
Não	112	39,6
Não respondeu	03	1,1
<u>Prática de sexo oral ativo</u>		
Sim	151	53,4
Não	129	45,6
Não Respondeu	03	1,1
<u>Prática de sexo anal passivo</u>		
Sim	107	37,9
Não	172	60,8
Não Respondeu	04	1,4
<u>Prática de sexo anal ativo</u>		
Sim	149	52,6
Não	129	45,6
Não Respondeu	05	1,8
<u>Consumo de álcool</u>		
Sim	155	54,8
Não	128	45,2
<u>Tabagismo</u>		
Sim	86	30,4
Não	197	69,6
<u>Uso de drogas</u>		
Sim	98	34,7
Não	177	62,5
Não Respondeu	08	2,8

Tabela 1. Dados sócios comportamentais dos pacientes infectados pelo HIV. Conclusão.

<i>Características</i>	<i>Frequência</i>	<i>Porcentagem</i>
<u>Presença de corrimento nos órgãos genitais</u>		
Sim	69	24,4
Não	214	75,4
<u>Presença de verrugas nos órgãos genitais</u>		
Sim	56	19,8
Não	227	80,2
<u>Presença de feridas nos órgãos genitais</u>		
Sim	48	17
Não	235	83
<u>Carga viral do HIV < 50 cópias</u>		
Sim	60	21,2
Não	223	78,8
<u>Contagem de linfócitos TCD4+ < 350 células/mm³</u>		
Sim	50	17,7
Não	233	82,3
<u>Uso de HAART</u>		
Sim	235	83
Não	48	17
<u>Genotipagem do HPV</u>		
Positivo	10	3,5
Negativo	273	96,5

Cerca de 80% apresentaram contagem de linfócito TDC4+ maior que 350 células/mm³, carga viral para o HIV indetectável, disseram não ter em seus órgãos genitais a presença de ferida e corrimento, disseram praticar sexo oral como ativo e eram fumantes, sendo que destes 60% disseram fumar por mais de uma vez ao dia.

De todos os participantes desse grupo, 50% haviam completado o segundo grau, eram da etnia branca, faziam uso de drogas e disseram usar preservativo nas relações sexuais com parceiro fixo; 90 % disseram não ter verrugas na região genital,

com uma renda familiar ≤ 10 salários. Todos os pacientes desse grupo tiveram relação sexual somente com homens no último ano, disseram fazer sexo anal como ativo e oral como passivo, além de usarem preservativo com parceiros eventuais. Dos 10 participantes, 40% disseram fazer sexo anal como passivo (Tabela 2).

Tabela 2. Dados sócios comportamentais dos pacientes infectados pelo HIV+ coinfectados pelo HPV.

<i>Características (n=10 HPV +)</i>	<i>Frequência</i>	<i>Porcentagem</i>
<u><i>Media de Idade: 42 anos (26 – 56 anos)</i></u>		
<u><i>Escolaridade (2º grau)</i></u>	5	50
<u><i>Renda familiar ≤ 10 salários</i></u>	9	90
<u><i>Situação marital: solteiro</i></u>	8	80
<u><i>Etniabranca</i></u>	5	50
<u><i>Uso de Tabagismo</i></u>	8	80
<u><i>Frequência no uso de tabagismo (+uma vez/dia)</i></u>	6	60
<u><i>Consumo de álcool</i></u>	6	60
<u><i>Frequência no consumo de álcool(uma vez/dia)</i></u>	6	60
<u><i>Uso de drogas</i></u>	5	50
<u><i>Contagem de TCD4+ maior 350 células/mm³</i></u>	8	80
<u><i>Carga Viral HIV indetectável</i></u>	8	80
<u><i>HAART</i></u>	7	70
<u><i>Ausência de corrimento nos órgãos genitais</i></u>	8	80
<u><i>Ausência de verrugas nos órgãos genitais</i></u>	9	90
<u><i>Ausência de feridas nos órgãos genitais</i></u>	8	80
<u><i>Relação sexual com homens no ultimo ano</i></u>	10	100
<u><i>Uso de preservativo com parceiros eventual</i></u>	10	100
<u><i>Uso de preservativo com parceiros fixo</i></u>	5	50
<u><i>Prática de sexo anal ativo</i></u>	10	100
<u><i>Prática de sexo anal passive</i></u>	4	40
<u><i>Prática de sexo oral ativo</i></u>	8	80
<u><i>Prática de sexo oral passive</i></u>	10	100

As amostras positivas para HPV DNA foram submetidas à genotipagem para a identificação e classificação dos subtipos presentes em cada amostra.

Em relação ao grupo de alto risco, a maior prevalência foi do tipo HPV-66 (60%) seguido do tipo HPV-51 (40%). O subtipo HPV-58 foi encontrado em três (30%) amostras, e, os tipos HPV-16, 56 e 69 foram identificados uma vez, cada um em amostras diferentes. Da mesma forma, os subtipos de baixo risco foram detectados em duas amostras com tipo HPV-6 e 83 (20%) e cinco amostras mostraram resultado para os tipos HPV-44, 62, 67, 72, e 84 uma única vez, cada um em amostras diferentes. Três amostras apresentaram múltiplas infecções para o grupo de alto risco e duas amostras para o grupo de baixo risco (Tabela 3).

Tabela 3. Tipos de HPV* entre os dez pacientes HPV positivo.

<i>Amostras (ID)</i>	<i>HPV alto risco</i>	<i>HPV baixo risco</i>
01	66	62
02	16,66	06
03	51	----
04	56	44,83
05	51,66	72
06	58	----
07	51,58,66	84
08	51	06
09	66	----
10	58,66,69	67,83

*Os tipos foram identificados através do Kit Papillomastrip alto e baixo risco (Zaragoza, Espanha)

Todas as variáveis associadas à exposição sexual de risco, bem como os hábitos de consumo de bebida alcoólica e tabagismo e dados laboratoriais referentes à sorologia positiva para HIV, carga viral, contagem de linfócito TCD4+ e uso de HAART, foram considerados fatores que poderiam contribuir para a infecção oral pelo HPV.

Uma análise bivariada foi realizada para comparar e avaliar a distribuição dos fatores de risco em relação à prática sexual (Tabela 4), sociais e dados laboratoriais

(Tabela 5) entre o grupo de pacientes HIV+ coinfectados pelo HPV (grupo HPV+) e o grupo de pacientes com resultado negativo para essa coinfeção (grupo HPV -).

Tabela 4. Distribuição dos fatores de risco em relação à prática sexual entre os 283 pacientes infectados pelo HIV de acordo com seu resultado para a detecção do HPV oral.

<i>Características</i>	<i>HIV (N=283)</i>			
	<i>*NR (%)</i>	<i>HPV - (n=273) (%)</i>	<i>HPV + (n=10) (%)</i>	<i>*valor de p</i>
<u>Relação sexual no último ano</u>	10 (3,7)			
Não teve relação		42 (15,4)	0 (0)	
Com mulheres		94 (34,4)	0 (0)	
Com homens		106 (38,8)	10 (100)	0.0001
Com homens e mulheres		21 (7,7)	0 (0)	
<u>Preservativo com parceiro eventual</u>	10 (4,1)			
Sim		199 (72,9)	10 (100)	0.000001
Não		64 (23,4)	0 (0)	
<u>Preservativo com parceirofixo</u>	15 (5,5)			
Sim		197 (72,2)	04 (40)	0.302
Não		61 (22,3)	06 (60)	
<u>Sexo oral ativo</u>				
Sim		143 (52,4)	08 (80)	0.07
Não		130 (47,6)	02 (20)	
<u>Sexo oral passivo</u>				
Sim		158 (57,9)	10 (100)	0.004
Não		115 (42,1)	0 (0)	
<u>Sexo anal ativo</u>				
Sim		139 (50,9)	10 (100)	0.001
Não		134 (40,1)	0 (0)	
<u>Sexo anal passivo</u>				
Sim		103 (42,4)	04 (40)	0.563
Não		170 (62,3)	06 (60)	

*valor de p >0.05 e teste de exclusão por limites de confiança em 95% de 0 ou 1, como indicado.

*NR: não responderam.

Tabela 5. Distribuição dos fatores de risco em relação aos hábitos sociais e dados laboratoriais entre os 283 pacientes infectados pelo HIV de acordo com seu resultado para a detecção do HPV oral.

Características	HIV (N=283)			
	*NR (%)	HPV - (n=273) (%)	HPV + (n=10) (%)	*valor de p
<u>Carga viral HIV> 50 cópias</u>				
Sim		58 (21,2)	02 (20)	0.641
Não		215 (78,7)	08 (80)	
<u>Contagem de TDC4+<350 células</u>				
Sim		48 (17,6)	02 (20)	0.553
Não		225 (82,4)	08 (80)	
<u>Uso de HAART</u>				
Sim		228 (83,5)	07 (70)	0.230
Não		45 (16,5)	03 (30)	
<u>Consumo de álcool</u>				
Sim		149 (54,6)	06 (60)	0.498
Não		124 (45,4)	05 (40)	
<u>tabagismo</u>				
Sim		78 (28,6)	08 (80)	0.001
Não		195 (71,4)	02 (20)	
<u>Corrimentonosórgãosgenitais</u>				
Sim		66 (24,2)	03 (30)	0.456
Não		207 (75,8)	07 (70)	
<u>Verruganosórgãosgenitais</u>				
Sim		55 (20,1)	01 (10)	0.378
Não		218 (79,8)	9 (90)	
<u>Feridanosórgãosgenitais</u>				
Sim		46 (16,8)	02 ,02)	0.529
Não		227 (83,1)	08 (80)	
<u>Idade maior que 30 anos</u>				
Sim		233 (85,3%)	08 (80)	0.505
Não		40 (14,6%)	02 (20)	

*valor de p > 0.05 e teste de exclusão por limites de confiança em 95% de 0 ou 1, como indicado.

*NR: não responderam.

Entre as variáveis submetidas à análise bivariada, as que apresentaram valores de $p < 0,2$ foram inseridas na análise de regressão logística multivariada para controle de possíveis variáveis de confusão.

O uso de preservativo com parceiro eventual, sexo anal ativo, sexo oral ativo e sexo com homens no último ano, foram variáveis totalmente associadas ao desfecho (HPV+), fato que impossibilitou a inclusão das mesmas na análise multivariada. Dessa forma, dentre as variáveis incluídas o tabagismo se mostrou independentemente associado ao maior risco de aquisição do HPV oral [OR (IC 95%) = 10,04 (1,98 – 50,92), $p < 0,01$] (Tabela 6).

Tabela 6. Possíveis fatores associados ao HPV oral incluídos na análise de regressão logística multivariada.

<i>HPV oral</i>	<i>P</i>	<i>Odds Ratio</i>	<i>IC 95%</i>	
<u><i>Tabagismo</i></u>	<i><0,01</i>	<i>10,04</i>	<i>1,98</i>	<i>50,92</i>
<u><i>Sexo anal ativo.</i></u>	0.33	0.99	0.94	1.03
<u><i>Preservativo com parceiro eventual</i></u>	0.32	1.15	1.05	1.26
<u><i>Sexo com homem</i></u>	0.22	0.91	0.86	0.96
<u><i>Sexo oral passivo</i></u>	0.33	0.94	0.90	0.97

5. DISCUSSÃO

Pouco se sabe sobre a história natural da infecção pelo HPV oral (34). Estudos indicam que a prevalência do HPV oral em indivíduos saudáveis é altamente variável (54-57). E que essa variabilidade pode ser em decorrência de fatores como a diferença na imunidade da mucosa local, o fluxo de saliva e de imunoglobulinas presentes nessa região, diferentes métodos de coleta das amostras e análises, além de propensão a lesões por micro traumas (49,58).

Os indivíduos imuno comprometidos apresentam uma maior susceptibilidade a infecções oportunistas e cânceres induzidos por infecção viral (50,59). Dessa forma, estudos veem mostrando que em pacientes infectados pelo HIV-1, a infecção oral pelo HPV persiste por mais tempo quando comparado com a população saudável, aumentando o risco para o desenvolvimento de câncer. (51,60,61). Consequentemente, a prevalência e a incidência da infecção pelo HPV e de doenças associadas a ele, aumentam significativamente nessa população HIV positivo (62).

Um estudo comparativo entre pacientes infectados pelo HIV e pessoas saudáveis, mostrou em seus resultados que 25,3% dos pacientes HIV positivo apresentaram uma coinfeção do HPV na região do trato oral, comparado com 7,6% na população não infectada pelo HIV (63).

Da mesma forma, outro estudo incluindo homens e mulheres infectados pelo HIV, mostrou que 28% dessa população apresentou resultado positivo para a infecção pelo HPV, sendo que 11% apresentaram múltiplas infecções (64). Em uma revisão sistemática, foi mostrado que a prevalência do HPV em homens que fazem sexo com homens - HSH variou entre 1,3% e 72,9% enquanto na população de

homens heterossexuais essa variação gerou entre 3,5% e 45% (54). Em nosso estudo, dez pacientes apresentaram HPV no fluído oral. Portanto, a prevalência do HPV na saliva de 283 amostras de homens infectados pelo HIV foi de 3,5%.

Mesmo que dados sobre a infecção pelo HPV em homens seja escasso, um estudo epidemiológico mostrou que em grande parte dos homens brasileiros a prevalência de pelo menos um tipo de HPV na região anogenital, é de 86% e mais de um tipo de 39,5% (65).

Nossos resultados são importantes visto que tem sido observado que apesar da região anogenital ser considerada a mais acometida pelo HPV, dados mostram que a prevalência da infecção pelo vírus na região da cabeça e pescoço vem aumentando na população masculina. Segundo o CDC, por ano são relatados mais de 12,000 casos de câncer em homens, sendo o câncer de orofaringe o mais comum (66).

Cerca de 60% dos homens infectados pelo HPV apresentam lesões na cavidade oral ou câncer de orofaringe e o aumento desse tipo de afecção está associado à infecção pelo HPV (66). Mavrak-Stipetic, em seu estudo mostrou que lesões pelo HPV foram mais frequentes em homens na região da cavidade oral, com uma prevalência de 31.4% (36).

De acordo com um estudo multicêntrico feito no Brasil, Mexico e Estados Unidos, a prevalência do HPV oral em homens foi de 4% com diferenças significativas entre os países com 2,1%, 5,9% e 3,6% respectivamente (34). Portanto, nosso estudo apresenta resultado semelhante, apesar da relativa baixa prevalência.

Em relação aos tipos encontrados na região da cavidade oral, Cavenaghi et al mostraram em seu estudo, realizado com indivíduos saudáveis, que os tipos mais

encontrados foram HPV-55 e 58 (67). Mavrak-Stipetic encontrou os tipos HPV- 6, 11, 16, 31, 33, 52 e 58 em indivíduos com lesão na região oral (36).

Além disso, a diversidade dos genótipos e a alta prevalência de múltiplas infecções serão vistas em maior número em indivíduos infectados pelo HIV, fato este que pode ser explicado pelos efeitos causados pela imunossupressão (68). Em nosso estudo, o tipo mais frequente foi HPV-66 com a maioria dos pacientes coinfectados com mais de um tipo de HPV.

A relação entre os fatores de risco e a infecção pelo HPV oral ainda não é bem explorada (69). Diversos autores concordam que vários estados fisiológicos de pacientes infectados pelo HPV podem ou não estar associados a fatores considerados predisponentes para a aquisição da infecção pelo vírus (70,71).

Existe uma forte associação entre o comportamento sexual e o risco de infecção pelo HPV (72). Porém outros fatores como a idade, sexo e raça também veem sendo considerados como fatores potenciais (73).

Estudos mostram que a frequência de sexo oral ou qualquer outro contato íntimo e número elevado de parceiros estão associados com a infecção oral pelo HPV (22). Bharti et al (2013), sugeriu em seu estudo, que a infecção oral pelo HPV está primariamente associada com a prática sexual, especialmente a prática de sexo oro-genital e que essa prática de risco, incluindo o número de parceiros e início precoce da vida sexual, contribui para o desenvolvimento da patogênese do HPV (39).

Em nosso estudo, não houve relação substancial entre o comportamento sexual e a infecção pelo HPV oral e a idade, pois diferente do que a literatura indica, a média de idade entre os pacientes infectados pelo HPV foi de 42 anos.

Outro fator considerado como possível para a aquisição do HPV, é a infecção pelo HIV. Estudos sugerem que indivíduos HIV positivo apresentam elevado risco de desenvolvimento de câncer de orofarínge como também de outros cânceres associados ao HPV (22,44,73). Porém o efeito da imunossupressão na história natural do HPV oral (69) ainda é desconhecido. Alguns estudos indicam que a terapia antirretroviral não reduz a prevalência do HPV oral e que uma contagem de linfócitos T CD4+ aumentam a incidência, persistência e progressão de lesões induzidas pelo HPV (51,63).

Em nosso estudo, não houve diferença substancial entre esses fatores na análise multivariada, uma vez que a maioria dos pacientes avaliados apresentaram carga viral para o HIV indetectável e TCD4+ maior que 350 células.

Em relação ao tabagismo, ainda não é bem elucidado se é considerado um fator dependente para o desenvolvimento de tumores de orofarínge induzidos pelo HPV, mas é considerado um impacto negativo na sobrevida de pacientes infectados pelo HPV (70,71).

Existe uma divergência de opiniões em relação a esses fatores e o câncer. Muitos estudos indicam que o consumo de álcool e o tabagismo são fatores associados ao desenvolvimento de câncer. Em contra partida, alguns pesquisadores mostram que uma fração dos cânceres da cavidade oral não está associada a esses fatores (74,75).

Essa divergência continua evidente, quando comparada a infecção pelo HPV, o tabagismo e o câncer. Gillison et al (2008) mostraram que não há correlação entre a presença do HPV, câncer de cabeça e pescoço e o tabagismo (79). Por outro lado, D'Souza et al (2009) indicaram que o consumo de cigarro foi significativamente

associado à detecção do HPV oral sendo considerado um forte fator para a aquisição do vírus (76). Proia et al (2006), acreditam que o tabagismo altera as funções imunológicas da cavidade oral podendo ser este o fator que permite o aumento da persistência do HPV nessa região (80). Em nosso estudo, comparamos esses fatores com o resultado para o HPV DNA entre os pacientes HIV positivo, sendo que o único fator associado significativamente com a aquisição do HPV oral foi o tabagismo.

6. CONCLUSÃO

1- Em nosso estudo, a prevalência do HPV oral em pacientes infectados pelo HIV foi de 3,5%. Resultado este que corrobora tanto com resultados anteriores como também com a variabilidade encontrada na prevalência.

2- Dentre as variáveis consideradas como possíveis para o risco de aquisição da infecção oral pelo HPV, somente o tabagismo foi considerado estatisticamente significativo.

3- Não podemos determinar se a infecção pelo HPV na cavidade oral dos pacientes avaliados nesse estudo causará qualquer afecção relacionada à aquisição do vírus.

4- Importante ressaltar que o grupo de pacientes infectados pelo HPV apresentou múltiplos tipos do vírus na região oral.

5- Dentre os tipos encontrados, 06, 16, 44, 51, 56, 58, 62, 66, 67, 69, 72, 83 e 84, a maioria não está presente nas vacinas comercialmente disponíveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomavirus in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004;68:368-372.
2. Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses *Clin Virol.* 2005;32(1):51-56.
3. Smith EM, Rubenstein LM, Holfman H, Havgen TH, Turek LP. Human papillomavirus p16 and p53 expression associated with survival of head and neck cancer. *Inf Agents and Cancer.* 2010;5(4):2-10.
4. Palefsky JM, Holly EA, Gonzales J, Berline J, Ahn DK, Greenspan TS. Detection of human papillomavirus DNA in anal intraepithelial neoplasia and anal cancer. *Cancer Res.* 1991;51:1014-1019.
5. Doobar J, Ely S, Sterling J, Mclean C, Crawford L. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of epithelial cell intermediate filament network. *Nature.* 1991;352:824-827.
6. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature.* 2002;2:342-350.
7. Fu L, Doorslaser KV, Chen Z, Ristriani T, Masson M, Travé G, et al. Degradation of p53 by human papillomavirus E6 proteins shows a stronger correlation with phylogeny than oncogenicity. *Plos One.* 2010;5(9):e12816.
8. Ghittoni R, Accardi R, Hasan U, Gheit T, Sylla B, Tommasino M. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes.* 2010; 40: 1-13.
9. Ciarra G, Ho T, Cobrinik D, Zacksenhaus E. Critical role of the Rb family in myoblast survival and fusion. *Plos One.* 2011;6(3):e17682.
10. Rivoire WA, Corleta HVE, Brum IS, Capp E. Biologia molecular do câncer cervical. *Ver Bras SAÚDE Matern Infant Recife.* 2006; 6(4):447-451.
11. Feller L, Wood NH, Khammissa RAG, Lemmer J. Human papillomavirus mediated carcinogenesis and HPV-associated oral and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. Part I: human papillomaviruses-mediated carcinogenesis. *Head & Face Med.* 2010;6:14.

- 12.Hebner CM, Lainis LA. Human papillomavirus: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol.* 2006; 16(2):83-97.
- 13.Knodia S, Fahey LM, Kast WM. Mechanisms used by human papillomavirus to escape the host immune response. *Curv Cancer Drug Targets.* 2007;7(1):79-89.
- 14.Reis AAS, Paula LB, Saddi VA. Infecção viral e os estudos moleculares dos carcinomas associados ao papilomavírus humano. *News Lab.* 2009. 92: 100-108.
- 15.Munõz N. Epidemiological classification of human papillomavirus types associates with cancer cervical. *The New Engl J Med.* 2003;348:518-527.
- 16.Zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers – a brief historical account. *Virol.*2009;384:260-265.
- 17.Schiffman M, Clifford G, Buonagero FM. Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline. *Infect Agent Cancer.* 2009; 4: 8; DOI: 10.1186/1750-9378-4-8.
- 18.Pyeon D, Lambert PF, Ahlquest P. Production of infectious human differentiation. *Proc Natl Acad Sci.* 2005; 102(26): 9311-930.
- 19.Betiol J, Villa LL, Sichero L. Impact of HPV infection on the development of head and neck cancer. *Braz J Med Biol Res.* 2013; 46(3): 217-26.
- 20.Meisels A, Fortin R, Roy M. Condylomatous lesions of the cervix. II Cytologic, colposcopy and histopathologic study. *Acta Cytol.* 1977;21(3):379-390.
- 21.Oriel JD. Genital human papillomavirus infection in: Holmes KK, Per-Anders M, Sparling PF, Wiesner PJ, editors. *Sex Trans Dis.* 1990;1:433-441.
- 22.International Agency for Research on Cancer. Human Papillomaviruses. *IARC monogr Eval Carcinog Risk Human.*2007; 90: 1-670.
- 23.De Pyeon SM, Pearce S, Lank M, Ahlquest P, Lambert PF. Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *Plos Pathogens.* 2009;5(2):e1000318.
- 24.Stanley M. HPV – Immune Response to Infection and Vaccination. *Infec Agents and Cancer.* 2010; 5(19): 1-6.

- 25.Vargas LOS, Hernández CD, Martinez AM. Detection of Human papillomavirus (HPV) in oral mucosa of women with cervical lesions and their relation to oral sex practices. *Infectious Agents and Cancer*.2010; 5:25.
- 26.CDC. Human papillomavirus (HPV)-associated cancer. Atlanta, GA: US department of health and human services, CDC; 2013. Disponível em <http://www.cdc.gov/cancer/hpv/statistics/cases.htm>.
- 27.Freire MP, Pires D, Forjaz R, Sato S, Cotrim I, Stiepcich M, et al. Genital prevalence of HPV types and co-infection in men. *Int Braz J Urol*. 2014; 40(1): 67-71.
- 28.Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. Globocan 2002 cancer incidence mortality and prevalence worldwide. *IARC cancer Base*.2004;5:123-129.
- 29.Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Muñoz N, Snijders PJ, Vaccarella S, 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*. 2005;366(9490):991-998.
- 30.Giraldo PC, Silva MJPM, Fedrizzi EM, Gonçalves AKS, Amaral RLG, Eleutério Jr J, et al. Prevenção da infecção por HPV e lesões associadas com o uso de vacinas. *J Bras Doenças Sex Trans*. 2008; 20(2):132-140.
- 31.Franceschi S, Munoz N, Bosh XF, Snijders PJ, Walboomers JM. Human Papillomavirus and cancers of the upper aerodigestive tract: a review of epidemiological and experimental evidence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1996; 5: 567-575.
- 32.Nureña CR, Brown B, Galea JT, Sánchez H, Blas MM. HPV and genital warts among Peruvian men who have sex with men and transgenders people: knowledge, attitudes and treatment experiences. *Plos One*. 2013; 8(3): e58684.
- 33.Videla S, Drawich I, Cañadas MP, Coll J, Piñol M, García-Cuyas F, et al. Natural history of Human Papillomavirus Infections involving anal, penile, and oral sites among HIV-infected men. *Sex Transm Dis*. 2013; 40(1): 3-10.
- 34.Kreimer AR, Bhatia RK, Messegue AL, González P, Herrero R, Giuliano AR. Oral Human Papillomavirus in healthy individuals: a systematic review of the literature. *Sex Trans Dis*.2010, 37: 386-391.

- 35.Kramer IR, Pindborg JJ, Bezroukov V, Infirri JS. Guide to epidemiology and diagnosis of oral mucosal diseases and conditions. World Health Organization. Community Dent Oral Epidemiol.1980; 8: 1-26.

- 36.Mavrak-Stipetic M, Sabol I, Kranjcic J, Knezevic M, Grce M. Human Papillomavirus in the lesions of the oral mucosa according to topography. Plos One. 2013; 8(7): e69736.

- 37.Alves DB, Tozetti IA, Gatto FA, Cassandri F, Ferreira AMT, Fernandes CES, et al. Linfócitos CD4, CD8 e células NK no estroma da cérvix uterina de mulheres infectadas pelo papilomavírus humano. Ver Soc Bras Med Trop. 2010;43 (4): 425-429.

- 38.Feller L, Khammissa RAG, Wood NH, Lemmer J. Epithelial maturation and molecular biology of oral HPV. Infectious Agents and Cancer. 2009; 4 (16): 01-09.

- 39.Castellsague X, Quintana MJ, Martinez MC, Nieto A, Saez MJ, Juan A, et al. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. Int J Cancer. 2004;108:741-749.

- 40.Blot WJ, McLaughlin JK, Win DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. Cancer Res. 1988;48:3282-3287.

- 41.Zhao D, Xu QG, Chen XM, Fan MW. Human Papillomavirus as an independent prediction in oral squamous cell cancer. Int J Oral Sci. 2009;1 (3): 119-125.

- 42.Vargas LOS, Hernández CD, Martinez AM. Detection of Human papillomavirus (HPV) in oral mucosa of women with cervical lesions and their relation to oral sex practices. Infect Agents Cancer. 2010; 5:25.

- 43.Esquenazi D, Filho IB, Carvalho MdaC, Barros FS. The frequency of human papillomavirus findings in normal oral mucosa of healthy people by PCR. Braz J Otorhinolaryngol 2010; 76 (1): 78-84.

- 44.Dunne EF, Nielson CM, Stone KM, Markowitz LE, Guiliano AR. Prevalence of HPV infection among men: a systematic review of the literature. J Infect Dis. 2006;194(8):1044-1057.

- 45.Lau JT, Lin C, Hao C, Wu X, Gu J. Public Health challenges of the emerging HIV epidemic among men who have sex with men in China. *Public Health*.2011;125:260-265.
- 46.BackesDM, Bleeker MC, Meijer CJ. Male circumcision is associated with a lower prevalence of human papillomavirus-associated penile lesion among Kenyan men. *Int J Cancer*. 2012;130(8):1888-1897.
- 47.Guiliano AR, Lu B, Nielson CM. Age-specific prevalence, incidence and duration of human papillomavirus infection in a cohort of 290 US men. *J Infect Dis*.2008;198(6):827-835.
- 48.Flores R, Abalos AT, Nielson CM, Abrahamsen M, Harris RB, Giuliano AR. Reliability of sample collection and laboratory testing for HPV detection in men. *J Virol Meth*.2008;149:136-143.
- 49.Read TRH, Hocking JS, Vodstrcil LA, Tabrizi SN, McCullough MJ, Grulich AE, et al. Oral Human Papillomavirus in men having sex with men: Risk-factors and sampling. *Plos One*.2012; 7: e49324.
- 50.Kreuter A, Skrygan M, Gambichler T, Brockmeyer NH, Stücker M, Herzler C, et al. Human papillomavirus-associated induction of human beta-defensins in anal intraepithelial neoplasia. *Br J Dermatol*.2009; 160: 1197-205.
- 51.Low AJ, Clayton T, Konae, Nagot N, Ouedraogo A, Huet C, et al. Genital warts infection with human immunodeficiency virus in high-risk women in Burkina Faso: a longitudinal study. *BMC Infectious Diseases*. 2011. 11:20.
- 52.Burg SH, Palefsky JM. Human Immunodeficiency virus And Human Papilloma virus – why HPV-induced lesions do not spontaneously resolve and why therapeutic vaccination can be successful. *J Trans Med*. 2009; 7(108): 2-8.
- 53.Seifi S, Kermani IA, Dolatkah R, Kermani AA, Sakhinia E, Asgarzadeh M, et al. Prevalence of Oral Papilloma Virus in Healthy Individuals in East Azerbaijan Province of Iran. *Iranian J Publ Health*. 2013;42(1):79-85.
- 54.Castro TP, Bussoloti FI. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in oral cavity and oropharynx. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2006;72(2):272-82.

55. Kreimer AR, Alberg AJ, Daniel R. Oral human papillomaviruses infections in adults is associated with sexual behaviour and HIV serostatus. *J Infect Dis.* 2004;189:686-698.
56. Pickard RK, Xiao W, Broutilan TR, He X, Gillison ML. The prevalence and incidence of oral human papillomavirus infection among young men and women, aged 18-30 years. *Sex Transm Dis.* 2012;39:559-566.
57. Frisch M, Biggar RJ, Engels EA, Goedert JJ. Association of cancer with AIDS-related immunosuppression in adults. *JAMA.* 2001;285:1736-1745.
58. Hagensee ME, Cameron JE, Leight JE, Clark RA. Human papillomavirus infection and disease in HIV-infected individuals. *Am J Med Sci.* 2004;328:57-63.
59. Beachler DC, Weber KM, Margolick JB, Strickler HD, Cranston RD, Burk RD, et al. Risk factors for oral HPV infection among a high prevalence population of HIV-positive and at-risk HIV-negative adults. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2012;21:122-133.
60. Stuardo V, Agustí C, Godínez JM, Montolí A, Torné A, Tarrats A, et al. Human Papillomavirus Infection in HIV-1 infected women in Catalonia (Spain): Implications for prevention of cervical cancer. *Plos One.* 2012;7: e47755.
61. Amornthatree K, Sriplung H, Mitarnun W, Nittayananta W. Impacts of HIV infection and long-term use of antiretroviral therapy and the prevalence of oral human papillomavirus type 16. *J Oral Pathol Med.* 2012;4:309-314.
62. Beachler DC, D'Souza G, Sugar EA, Xicuo W, Gillison ML. Natural history of anal vs oral HPV infection in HIV-infected men and woman. *JID.* 2013;208:330-339.
63. Anic GM, Giuliano AR. Genital HPV infection and related lesions in men. *Prev Med.* 2011;53(1):536-541.
64. CDC. Human papillomavirus-associated cancer. United States, 2004-2008. *MMWR morb mortalwklly rep.* 2012;61:258-261.
65. Villa, L. L. Introduction of HPV prophylactic vaccines: a new challenge for public health in the 21st century. *Rev Bras Epidemiol.* 2008; 11: 505-25.
66. Gillison ML, Koch WM, Capone RB. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Nat Cancer Inst.* 2000;92(9):709-720.

- 67.Cavenaghi VB, Ghosn EJE, Cruz N, Rossi LM, Silva L, Costa HO, et al. Determination of HPV prevalence in oral/oropharyngeal mucosa samples in a rural district of São Paulo. BJORL. 2013; 79(5): 599-602.
- 68.Hansson BG, Rosenquist K, Antonsson A, Wennerberg J, Schildt EB, Bladström A, et al. Strong Association between infection with Human Papillomavirus and oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: A population-based case-control study in Southern Sweden. Acta Otolaryngol.2005; 125: 1334-1337.
- 69.Halfkamp HC, Manni JJ, Haesevoets A. Marked differences in survival rate between smokers and nonsmokers with HPV 16-associated tonsillar carcinomas. Int J Cancer. 2008;122(12):2626-2664.
- 70.D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. N Engl J Med. 2007;356:1944-56.
- 71.D'Souza G, Agrawal Y, Halpern J, Bodison S, Gillison ML. Oral sexual behaviours associated with prevalent oral human papillomavirus infection. J Infect Dis. 2009;199:1263-1269.
- 72.Bharti AH, Chotaliya K, Marfatia YS. An update on oral human papillomavirus infection. Indian J Sex Transm Dis. 2013; 34(2): 77-82.
- 73.Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinoma worldwide: a systematic review. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005; 14(2): 467-75.
- 74.Gillison ML. Oropharyngeal cancer: a potential consequence of concomitant HPV and HIV infection. Curr Opin Oncol. 2009;21:439-444.
- 75.Proia NK, Paszkiewicz GM, Nasca MA, Franke GE, Pauly JL. Smoking and smokeless tobacco-associated human buccal cell mutations and their association with oral cancer – a review.Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2006; 15: 1061-77.

ANEXO A

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL
LEGAL**

1. NOME:

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

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

ENDEREÇO Nº APTO: ..

BAIRRO:.....CIDADE.....

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

2. RESPONSÁVEL LEGAL.....

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

.....

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

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

ENDEREÇO:.....Nº APTO:

BAIRRO:.....CIDADE:.....

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

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **Infecção do Papilomavírus Humano na cavidade oral em homens infectados pelo HIV: prevalência da infecção e sua relação com os fatores de risco.**

2. PESQUISADOR : Jorge Casseb

CARGO/FUNÇÃO: Professor

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 67217

UNIDADE DO HCFMUSP: Ambulatório de Imunodeficiências Secundárias Adee3002, Dermatologia de São Paulo.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒ X RISCO MÉDIO ☐
 RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

Título Resumido do Estudo: Infecção do Papilomavírus Humano (HPV) no fluído oral em homens infectados pelo HIV.

INTRODUÇÃO

Você está sendo convidado a participar desta pesquisa porque está infectado com o vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), o vírus causador da AIDS. A presença das lesões pelo vírus do Papiloma Humano (HPV), vírus que causam verrugas a até câncer em mulheres é significativa entre pacientes infectados com o HIV. A principal dificuldade de se estudar a presença de HPV em homens é que tipo de amostra utilizar para a detecção do vírus. Assim, é importante comparar com outras amostras de outros possíveis locais que o vírus possa estar presente para um estudo mais detalhado da infecção por HPV. Existe também a necessidade de se estudar os fatores de risco relacionados ao vírus dos pacientes infectados com HIV e associar com o aparecimento de lesões. O médico responsável por este estudo neste local é o Dr. Jorge Casseb, médico infectologista. Antes que você decida se deseja participar, gostaríamos que conhecesse o estudo. Este é um termo de consentimento livre e esclarecido e contém informações sobre o estudo. A equipe do estudo conversará com você sobre estas informações. Sinta-se a vontade para fazer perguntas a qualquer momento. Caso concorde em participar, será solicitado que assine este termo de consentimento e você receberá uma cópia assinada deste documento.

POR QUE ESTÁ SENDO FEITO O ESTUDO?

O objetivo principal do nosso estudo é verificar a presença do vírus do Papiloma Humano (HPV-DNA) na saliva.

INFORMAÇÕES NA TRIAGEM

Informações Pessoais

Caso você aceite participar do estudo, serão solicitadas algumas informações de identificação pessoal e você deverá responder a um questionário. Após esta etapa irá realizar um bochecho com 20ml de solução salina para coleta de material da boca para a pesquisa do HPV. Além disso, passará por uma avaliação odontológica para a pesquisa de lesão na região

da cavidade oral. Também serão solicitadas mais duas coletas no período de seis meses e um ano, contados a partir da data da primeira coleta para verificação da persistência ou ausência do vírus nesse espaço de tempo.

QUAIS SÃO OS RISCOS DE PARTICIPAR DO ESTUDO?

Risco mínimo na coleta do fluído oral.

POR QUANTO TEMPO VOU PARTICIPAR DO ESTUDO?

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

QUE OUTRAS OPÇÕES EU TENHO ALÉM DESTES ESTUDOS?

Você tem direito a tratamento gratuito na rede pública de saúde. Caso você decida não participar do estudo, isto em nada afetará o seu direito de receber o tratamento na rede pública de saúde.

O QUE GARANTE A CONFIDENCIALIDADE?

Nós faremos tudo o que pudermos para proteger a sua privacidade. Além disso, seu nome ou quaisquer outros dados, que possam identificá-lo, não serão colocados em qualquer publicação ou comunicação sobre o estudo. Apenas poderão ter acesso aos dados do seu prontuário, pessoas que forem indicadas pelo comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas, pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), pelos coordenadores do estudo e pela equipe do estudo.

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

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

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

Caso tenha alguma dúvida ou questão sobre seus direitos como participante deste estudo, você poderá procurar o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas pelo telefone: (11) 3069-6442.

QUAIS SÃO OS MEUS DIREITOS COMO PARTICIPANTES DO ESTUDO?

Participar do estudo é um ato inteiramente voluntário. Você pode preferir não participar do estudo ou abandoná-lo a qualquer momento. Você será tratado da mesma forma, independentemente de sua decisão. Nós lhe comunicaremos sobre novas informações deste ou de outros estudos que possam afetar sua saúde, bem estar ou vontade de continuar participando deste estudo.

O QUE EU FAÇO CASO TENHA PERGUNTAS OU PROBLEMAS?

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

Coordenador do Estudo: Dr. Jorge Casseb – Laboratório de Dermatologia e Imunodeficiências – LIM56 – AV. Dr. Enéias de Carvalho Aguiar, 500, prédio IMT II, 3º andar CEP: 05403-000. Telefones: 3061-7194/ 7499/ 7457. FAX: (11) 3081-7190.

Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar. Telefones: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 e 20; FAX 3069-6442 ramal 26. E-mail: cappesq@hcnnet.usp.br

Título do Protocolo: Infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) no fluído oral em homens infectados pelo HIV: persistência da infecção e sua associação com os fatores de risco e lesão da cavidade oral.

Título resumido do Estudo: Infecção do Papilomavírus Humano (HPV) no fluído oral em homens infectados pelo HIV.

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

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

Meu consentimento em participar deste estudo é voluntário.

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

Assinatura do (a) voluntário (a)

data: _____

Nome do responsável executante pela pesquisa

Assinatura do responsável executante da pesquisa

data: _____

ANEXO B**HOSPITAL EMÍLIO RIBAS****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Resolução nº 196/96 – Conselho Nacional de Saúde

Protocolo nº.:

O (a) Sr(a) foi selecionado(a) e está sendo **CONVIDADO(A)** para participar da pesquisa intitulada: **Infecção do Papilomavírus Humano no fluido oral em homens infectados pelo HIV: prevalência da infecção e sua relação com os fatores de risco** no ambulatório do “**Instituto de Infectologia Emílio Ribas**”.

Esta pesquisa tem como objetivo: verificar a presença do vírus do Papiloma Humano (HPV-DNA) na saliva. A presença das lesões pelo vírus do Papiloma Humano (HPV), vírus que causam verrugas a até câncer em mulheres é significativa entre pacientes infectados com o HIV.

A principal dificuldade de se estudar a presença de HPV em homens é que tipo de amostra utilizar para a detecção do vírus. Assim, é importante comparar com outras amostras de outros possíveis locais que o vírus possa estar presente para um estudo mais detalhado da infecção por HPV. Existe também a necessidade de se estudar os fatores de risco relacionados ao vírus dos pacientes infectados com HIV e associar com o aparecimento de lesões.

O médico responsável por este estudo neste local é o Dr. Jorge Casseb, médico infectologista. Antes que você decida se deseja participar, gostaríamos que conhecesse o estudo. Este é um termo de consentimento livre e esclarecido e contém informações sobre o estudo. A equipe do estudo conversará com você sobre estas informações. Sinta-se a vontade para fazer perguntas a qualquer momento. Caso concorde em participar, será solicitado que assine este termo de consentimento.

A pesquisa terá duração de 2 anos, com o término previsto para dezembro de 2013.

Sua **participação** nesta pesquisa consistirá em responder as perguntas a serem realizadas sob a forma de questionário, onde perguntaremos sobre sua vida pessoal, por exemplo: seu estado civil, seu salário, seu comportamento em relação ao uso de drogas, sua vida sexual. A entrevista será respondida em questionário – que será guardado por cinco (05) anos e será destruído após esse período.

Suas respostas ao questionário serão tratadas de forma **anônima** e **confidencial**, isto é, em nenhum momento será divulgado o seu nome em qualquer fase do estudo. Quando for necessário exemplificar determinada situação, sua privacidade será assegurada uma vez que seu nome será substituído de forma aleatória. Os **dados coletados** serão utilizados apenas **NESTA** pesquisa e os resultados divulgados em eventos e/ou revistas científicas.

Após esta etapa será solicitado que o (a) Sr (a) realize um bochecho com 20 ml de solução salina para coleta de material da boca para a pesquisa do HPV. Também serão solicitadas mais duas coletas no período de seis meses e um ano, contados a partir da data da primeira coleta para verificação da persistência ou ausência do vírus nesse espaço de tempo.

Sua participação é **voluntária**, isto é, a qualquer momento você pode **recusar-se** a responder qualquer pergunta ou desistir de participar e **retirar seu consentimento**. Sua recusa ou desistência não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição que forneceu os seus dados, como também na que trabalha.

O (a) Sr(a) não terá nenhum **custo ou quaisquer compensações financeiras**. Não haverá nenhum **benefício** à sua participação, a não ser de aumentar o conhecimento científico para compreender a infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV).

Caso tenha alguma dúvida em relação a questões éticas da pesquisa o (a) Sr (a) pode entrar e contato com Comitê de Ética e Pesquisa do Instituto de Infectologia Emilio Ribas pelo telefone (11)3896-1406 ou pelo e-mail: comitedeetica-ier@ig.com.br .

O Sr(a) receberá uma cópia deste termo, caso tenha qualquer dúvida sobre a pesquisa pode entrar em contato com Karen Gaester ou Dr. Jorge Casseb pelo telefone (11) 3066-7194 ou pelo e-mail (karengaester@gmail.com; jorge_casseb@yahoo.com.br), podendo tirar as suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento. Desde já agradecemos!

Declaro estar ciente do inteiro teor deste TERMO DE CONSENTIMENTO.

Nome e assinatura do paciente

Data: ____/____/____

Etiqueta do Paciente :

Nome e assinatura de quem obteve o TCLE

DATA

ANEXO C

QUESTIONÁRIO DE PESQUISA: Infecção do Papilomavírus Humano na cavidade oral em homens infectados pelo HIV: prevalência da infecção e sua relação com os fatores de risco.

A-Dados Pessoais

Nome: _____

Telefone: _____

Data da entrevista_____/_____/_____

Data de Nascimento:_____/_____/_____

Escolaridade:

1() nenhuma.

2() de 1^a a 4^a série.

3() de 5^a a 8^a série.

4() 2^o grau.

5() superior.

6() não respondeu.

Renda familiar em salários mínimos:

1() < 2.

2() de 2 a 4.

3() de 5 a 10.

4() maior que 10.

5() não sabe.

6() não respondeu.

Situação marital:

1() casado/amigado

2() solteiro

3() separado

4() viúvo

5() não respondeu

Etnia (auto-referida) que você se considera:

1() branca

2() negra

3() amarela

4() parda

5() indígena

B – Hábitos de vida**Faz ingestão de bebida alcoólica?**

1() não

2() sim, as vezes

3() sim, uma vez por dia

4() sim, mais de uma vez por dia

Fuma?

1() não

2() sim as vezes

3() sim uma vez por dia

4() sim mais de uma vez por dia

Já fumou?

- 1() não
- 2() alguns meses
- 3() entre 1 e 5 anos
- 4() entre 5 e 10 anos
- 5() entre 10 e 15 anos
- 6() mais de 15 anos

Parou de fumar?

- 1() não parei
- 2() não fumo
- 3() nunca fumei
- 4() alguns dias
- 5() alguns meses
- 6() anos
- 7() não respondeu

C- Dados comportamentais

Idade da 1ª relação sexual:()

Relação sexual nos últimos 12 meses:

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

Usa preservativo com parceira (o) eventual:

1(☐) não tem parceira (o) eventual

2(☐) sempre

3(☐) às vezes usa

4(☐) nunca usa

5(☐) não respondeu

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

1(☐) não tem parceira fixa (o).

2(☐) sempre.

3(☐) às vezes usa.

4(☐) nunca usa.

5(☐) não respondeu.

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

1(☐) não pratico

2(☐) sim e sempre uso preservativo

3(☐) sim e, às vezes uso preservativo

4(☐) sim e nunca uso preservativo

5(☐) não respondeu

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

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

Pratica relação oral como ativo? (você fazendo em seu(sua) parceiro(a))

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

Pratica relação oral como passivo?(você recebendo de seu (sua) companheiro(a))

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

Número de mulheres com quem teve relações sexuais nos últimos 12 meses:

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

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

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

Já usou ou usa algumas das drogas abaixo:

- 1() maconha. 8 () nenhuma
- 2() cocaína. 9 () não respondeu
- 3() craque.
- 4() LSD.
- 5() ecstasy.
- 6() cola
- 7() mais de uma anterior.

Já teve nos órgãos genitais, alguma vez na vida:

Corrimento	verruga(s)	ferida(s)	vesícula(s)
1() sim	1() sim	1() sim	1() sim
2() não	2() não	2() não	2() não

D-Exames laboratoriais

DATA DO 1ª TESTE HIV: ____/____/____

Forma de contaminação:

1() prática HSM (homem faz sexo com mulher)

2() prática HSH (Homem que
faz sexo com homem)

3() UDI(usuário de drogas injetável)

4() Hemotransfusão

5() não sei

6() não respondeu

Dados Laboratoriais

Carga viral do HIV atual: _____

CD4 atual: _____

CD 8 atual: _____

Uso de medicação para HIV atualmente?

1() sim 2() não

Se sim, quais?_____

Tem queimação a urinar?

1() sim 2() não

E- Exame físico

Tem corrimento na uretra?

1() sim 2() não

Outras lesões na região genital?_____

ANEXO D

Resultado da genotipagem do HPV para as 10 amostras positivas. HR: alto risco; LR: baixo risco.

ANEXO E

Publicação do artigo intitulado ‘Human papillomavirus infection in oral fluid of HIV-1-positive men: prevalence and risk factors’ pela revista Scientific Reports do grupo NPG - Nature Publishing Group.