

Milena Giulia Gonçalves

História natural da infecção por variantes genéticas de HPV-16 no canal anal de homens participantes do estudo internacional multicêntrico HIM
(HPV Infection in Men)

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

Programa de Oncologia

Orientadora: Profa. Dra. Laura Cristina Sichero Vettorazzo

Coorientador: Dr. Matthew Thomas Ferreira

São Paulo

2022

Milena Giulia Gonçalves

História natural da infecção por variantes genéticas de HPV-16 no canal anal de homens participantes do estudo internacional multicêntrico HIM
(*HPV Infection in Men*)

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

Programa de Oncologia

Orientadora: Profa. Dra. Laura Cristina Sichero Vettorazzo

Coorientador: Dr. Matthew Thomas Ferreira

São Paulo

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Gonçalves, Milena Giulia
História natural da infecção por variantes
genéticas de HPV-16 no canal anal de homens
participantes do estudo internacional multicêntrico
HIM (HPV Infection in Men) / Milena Giulia
Gonçalves. -- São Paulo, 2022.
Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Oncologia.
Orientadora: Laura Cristina Sichero Vettorazzo.
Coorientador: Matthew Thomas Ferreira.

Descritores: 1. Biologia molecular 2. Canal anal
3. Epidemiologia 4. Estudo HIM 5. Papilomavírus humano
16 6. Variantes genéticas de HPV-16

USP/FM/DBD-169/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico este trabalho a todos que sonham em ser cientistas e a todos os que apoiam os cientistas em seus sonhos.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer aos meus pais Silvana e Robespierre que me apoiaram incondicionalmente, sonharam junto comigo, fizeram tudo ser possível e sempre seguraram minha mão em todos os momentos. Ao meu irmão Casio, que me inspira amor e carinho todos os dias e me faz acreditar nos sonhos possíveis. A vocês minha sincera e imensa gratidão.

Às minhas amigas-irmãs, Mônica e Ana Clara que sempre seguraram minha mão e estiveram comigo em toda minha trajetória, me acompanharam no meu desenvolvimento pessoal e profissional e foram fundamentais para eu ser quem sou hoje. A vocês, todo meu amor e minha gratidão por ser quem vocês são, ser tão importantes para mim e pela parceria sincera de longos anos.

Ao meu companheiro de vida, Vitor, te agradeço por tanto. Você mais do que ninguém esteve presente de forma integral em todos os momentos, nas felicidades, nas angústias, nas dificuldades e, genuinamente e amorosamente, sempre esteve ali pronto para me confortar e celebrar as minhas conquistas. Você me inspira a ser melhor. Obrigada por todo amor, paciência e por me incentivar tanto nos meus sonhos.

Aos meus amigos do laboratório de Biologia Molecular do ICESP e especialmente às minhas amigas Amanda, Valéria e Aline que me ensinam todos os dias, me ajudam, me inspiram e fazem os meus dias mais leves. É muito gratificante poder compartilhar o dia a dia com vocês e eu não conseguiria pedir por pessoas melhores ao meu lado. Vocês são fundamentais para a concretização deste trabalho. Minha eterna gratidão e amor por todas vocês.

À minha orientadora, Profa. Dra. Laura Sichero, agradeço por ter acreditado em mim, no meu potencial e sempre ter me incentivado. Agradeço imensamente por ter me dado a oportunidade de iniciar a carreira dos meus sonhos e poder aprender com você todos os dias. Obrigada por todos os conselhos e palavras de carinho que você sempre tem para me oferecer. Muito obrigada pelo suporte emocional e profissional que você sempre carinhosamente doa. Obrigada por todas as oportunidades que você me incentiva.

Nenhuma palavra escrita será suficiente para demonstrar minha sincera gratidão, mas ainda assim, muito obrigada!

Ao meu coorientador, meus colegas do CTO e do grupo Inovação em Câncer pela convivência e todos os ensinamentos que vocês carinhosamente me proporcionam. Vocês têm uma contribuição muito especial e essencial para a realização desse trabalho.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e dedicação à leitura deste trabalho.

Aos colaboradores e participantes do estudo HIM, pelo trabalho impecável anterior ao meu que me proporcionaram a realização deste trabalho.

“Que nada nos limite, que nada nos defina, que nada nos sujeite. Que a liberdade seja nossa própria substância, já que viver é ser livre. Porque alguém disse e eu concordo que o tempo cura, que a mágoa passa, que decepção não mata. E que a vida sempre, sempre continua.”

Simone de Beauvoir

Normalização adotada

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

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

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

Lista de Tabelas

- Tabela 1** – Correspondência entre a nomenclatura das variantes de HPV-16 ao longo do tempo. Na coluna “Moderna” está descrita a classificação de acordo com as diferenças encontradas na sequência do genoma completo. Na coluna “Baseada na Geografia” está descrita a classificação baseada nas diferenças encontradas em um fragmento da LCR. ----- 10
- Tabela 2** – Pares de iniciadores senso e antissenso usados para amplificação da LCR de HPV-16. ----- 22
- Tabela 3** – Número das visitas do seguimento em que foi detectado DNA de HPV-16 nos espécimes de esfregaço do canal anal de homens participantes no estudo HIM, por país.----- 26
- Tabela 4** – Número total de visitas do seguimento em que foi detectado DNA de HPV-16 nos espécimes de esfregaço de canal anal de homens participantes do estudo HIM, por país.----- 27
- Tabela 5** – Características sociodemográficas dos homens incluídos neste estudo, por país.----- 28
- Tabela 6** – Características sociodemográficas dos homens cujas amostras de canal anal foram classificadas ou não em variantes genéticas de HPV-16 (análise de perdas).----- 30
- Conclusão Tabela 6** – Características sociodemográficas dos homens cujas amostras de canal anal foram classificadas ou não em variantes genéticas de HPV-16 (análise de perdas).----- 31
- Tabela 7** – Prevalência das linhagens e sublinhagens de variantes de HPV-16, por país.----- 32
- Tabela 8** – Amostras de canal anal provenientes de cinco homens do Brasil incluídos no estudo em que foi detectado DNA de variantes de diferentes sublinhagens de HPV-16 durante as visitas de seguimento.----- 32
- Tabela 9** – Características sociodemográficas dos homens incluídos neste estudo estratificados pelas diferentes linhagens de variantes de HPV-16 detectadas nas amostras de canal anal.----- 34
- Conclusão Tabela 9** – Características sociodemográficas dos homens incluídos neste estudo estratificados pelas diferentes linhagens de variantes de HPV-16 detectadas nas amostras de canal anal.----- 35
- Tabela 10** – Persistência e transiência das infecções por variantes das linhagens de HPV-16 no canal anal dos homens participantes do estudo HIM, por país, etnia, idade e orientação sexual. ----- 37

Lista de Figuras

- Figura 1** – Estrutura e organização do genoma de HPV-16. **A.** Microscopia eletrônica das partículas virais de HPV. **B.** Organização genômica de HPV-16. Nas setas estão localizados os promotores precoce (P97) e tardio (P670). As ORFs dos genes *early* estão destacadas em verde (*E1, E2, E4 e E5*) e em vermelho (*E6 e E7*), e dos genes *late* estão destacadas em amarelo (*L1 e L2*). A LCR responsável pelo controle da transcrição e onde se ligam diferentes fatores de transcrição está localizada entre os genes *L1 e E6*. As proteínas destacadas com * são necessárias para a replicação e montagem da partícula viral e as proteínas destacadas com † são importantes para a alteração do ciclo celular e evasão imune.-----2
- Figura 2** – Modelo de carcinogênese da cérvix uterina. Infecção por HR-HPV em células da camada basal do epitélio, e o desenvolvimento da infecção produtiva até o surgimento do tumor.-----3
- Figura 3** – Modelo da história natural da infecção por HR-HPV e o desenvolvimento de câncer na cérvix uterina. Os passos da tumorigênese associada ao HPV no colo de útero estão em destaque nas diferentes cores: infecção por HPV em verde, desenvolvimento de lesões precursoras em azul e desenvolvimento de câncer em laranja. No gráfico estão dispostas as prevalências de HPV na população feminina de acordo com a idade.-----7
- Figura 4** – Taxonomia de HPV-16 e suas variantes genéticas. A classificação de HPV-16 está disposta nos quadrados vermelhos e a classificação das variantes de HPV-16 nos quadrados em azul. Nos quadrados correspondentes estão indicadas as porcentagens de diferenças nucleotídicas utilizada para distinguir cada unidade taxonômica. ----- 10
- Figura 5** – Distribuição de variantes das diferentes linhagens/sublinhagens de HPV-16 no mundo. **A.** Prevalência de variantes das diferentes linhagens/sublinhagens na cérvix uterina em mulheres tanto com citologia normal quanto com lesões intraepiteliais e câncer nos diferentes países. **B.** Frequência das variantes detectadas por região geográfica. ----- 13
- Figura 6** – Polimorfismos encontrados nas diferentes posições nucleotídicas no fragmento de 364 pb da LCR de HPV-16 utilizado para classificação das variantes. Em amarelo estão indicados os padrões de SNPs que distinguem as variantes das diferentes linhagens e sublinhagens. Foi utilizado para comparação a sequência protótipo que está incluída na sublinhagem A1 de HPV-16 (GenBankK02718.1) destacado em vermelho, na segunda linha da figura.----- 24
- Figura 7** – Fluxograma da análise das amostras de canal anal dos participantes do estudo HIM incluídos neste estudo para caracterização de variantes genéticas de HPV-16.----- 29

RESUMO

Gonçalves MG. *História natural da infecção por variantes genéticas de HPV-16 no canal anal de homens participantes do estudo internacional multicêntrico HIM (HPV Infection in Men)* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

Infecções persistentes por HPVs (papilomavírus humano) de alto risco estão associadas ao desenvolvimento de múltiplos tipos de cânceres como vulva, vagina e colo de útero em mulheres, pênis em homens, e canal anal e orofaringe em ambos os sexos. O HPV-16 está relacionado com quase a totalidade dos tumores de sítios anatômicos extra-cervicais e causa aproximadamente 90% dos cânceres de canal anal em todo o mundo. Além disso, as variantes genéticas de HPV-16 estão relacionadas com diferentes riscos no desenvolvimento de lesões precursoras e tumores na cérvix uterina. Estudos sobre as variantes de HPV-16 no canal anal ainda são escassos, especialmente em homens. Com isso, este estudo teve como objetivo avaliar a prevalência e persistência das variantes genéticas de HPV-16 no canal anal de homens de três países distintos (Brasil, México e Estados Unidos) e ainda identificar fatores sociodemográficos e comportamentais associados a essas infecções. Os participantes do estudo prospectivo multicêntrico HIM (*HPV Infection in Men*) foram incluídos quando foi detectado DNA de HPV-16 em pelo menos uma amostra de canal anal. Foi realizada a PCR (reação em cadeia da polimerase) com pares de iniciadores específicos a fim de amplificar uma região da LCR (região longa de controle), seguido de sequenciamento das amostras amplificadas para classificação em linhagens e sublinhagens de variantes de HPV-16. Foi observada maior prevalência de variantes da linhagem A, principalmente da sublinhagem A1, nas amostras de todos os países. Variantes das linhagens Não-A foram mais comumente detectadas em homens do Brasil, onde também foi observada maior diversidade de sublinhagens de variantes de HPV-16. Em cinco homens do Brasil, mudança de variante das sublinhagens de HPV-16 foram identificadas durante as visitas de seguimento. Em comparação com os homens em que foram detectadas variantes das linhagens Não-A de HPV-16, os homens infectados com variantes da linhagem A relataram um número maior de parceiras sexuais femininas ao longo da vida. Finalmente, foi observada maior prevalência de variantes das linhagens Não-A em MSM (homens que fazem sexo com homens) com infecção transiente por HPV-16 no canal anal ($p=0,033$). Não foram observadas diferenças significativas em

relação à detecção de variantes das linhagens de HPV-16 e o status de persistência quando os homens foram estratificados por país, etnia autorreferida ou idade. Os dados observados neste trabalho estendem estudos anteriores que indicam que as variantes genéticas de HPV-16 são distribuídas de forma desigual no mundo, e contribuem ainda mais para estudos da história natural das infecções por HPV do canal anal em homens.

Descritores: Biologia molecular; Canal anal; Epidemiologia; Estudo HIM; Papilomavírus humano 16; Variantes genéticas de HPV-16.

ABSTRACT

Gonçalves MG. *Natural history of infections by HPV-16 genetic variants in the anal canal of men participating in the international multicenter HIM study (HPV Infection in Men)* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

High-risk HPV persistent infections are associated with the development of multiple types of cancers such as vulva, vagina, and cervix in women, penis in men, and anal canal and oropharynx in both genders. HPV-16 is related to almost all tumors at extra cervical anatomical sites and causes approximately 90% of anal canal cancer worldwide. In addition, HPV-16 genetic variants are related to different risks of the development of precursor lesions and tumors in the cervix. Studies on HPV-16 variants in the anal canal are still scarce, especially in men. Thus, this study aimed to assess the prevalence and persistence of HPV-16 genetic variants in the anal canal of men from three countries (Brazil, Mexico, and the United States) and to identify sociodemographic and behavioral factors associated with these infections. Participants from the prospective multicenter HIM (HPV Infection in Men) study who had at least one anal canal sample positive for HPV-16 DNA were included. PCR was performed with specific sets of primers to amplify a fragment of the LCR region, followed by sequencing of the amplified samples to classify them into HPV-16 variant lineages and sublineages. We observed a higher prevalence of lineage A variants, mainly from the A1 sublineage, in all countries. Variants of Non-A lineages were more commonly detected in men from Brazil, where a greater diversity of sublineages was detected. In five men from Brazil, a change in the HPV-16 infecting variant sublineages was identified during visits. Compared with men detected with Non-A lineage variants, men infected with A lineages reported a higher lifetime number of female sexual partners. Finally, a significantly higher prevalence of variants of Non-A lineages was observed among MSM (men who have sex with men) with a transient HPV-16 anal canal infection ($p=0.033$). No significant differences regarding the detection of HPV-16 variant lineages and persistence status were observed when men were stratified by country, self-reported ethnicity, or age. Our data extend previous studies which indicate that HPV-16 variants are unevenly distributed worldwide, and further contribute to studies of the natural history of anal canal HPV infections in men.

Descriptors: Molecular biology; Anal canal; Epidemiology; HIM study; Human papillomavirus 16; Genetic variants in HPV-16.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)	1
1.2 CÂNCERES ASSOCIADOS AO HPV.....	5
1.3 VARIANTES GENÉTICAS DE HPV-16	9
1.3.1 Variantes genéticas de HPV-16 em mulheres	11
1.3.2 Variantes genéticas de HPV-16 em homens.....	15
2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA	17
3 MÉTODOS	18
3.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	18
3.2 TIPAGEM DE HPV	19
3.3 ANÁLISE DAS VARIANTES DE HPV-16 EM AMOSTRAS DE CANAL ANAL	20
3.3.1 Extração de DNA.....	20
3.3.2 Reação em cadeia da polimerase - PCR.....	21
3.3.3 Sequenciamento de DNA	22
3.4 CLASSIFICAÇÃO DAS VARIANTES DE HPV-16	23
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
4 RESULTADOS	26
4.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO	26
4.2 PREVALÊNCIA DAS VARIANTES DE HPV-16	29
4.3 PERSISTÊNCIA DAS VARIANTES DE HPV-16	35
5 DISCUSSÃO	39
6 CONCLUSÃO	46
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*	47
APÊNDICES	

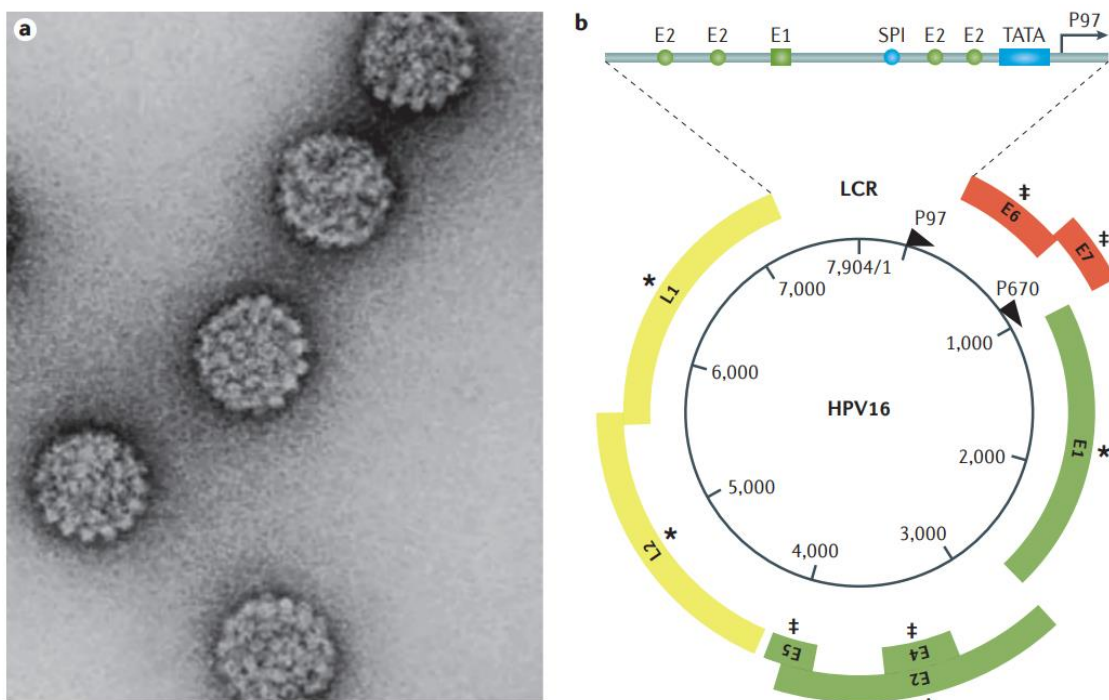
1 INTRODUÇÃO

1.1 PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

Os papilomavírus humano (*Human papillomavirus* – HPV) pertencem à família *Papillomavidae* e são distribuídos em cinco gêneros: *Alpha*, *Beta*, *Gamma*, *Nu* e *Mu*. O HPV-16 por sua vez está classificado no gênero *Alpha*. HPVs são vírus que possuem capsídeo icosaédrico não envelopado de cerca de 50 nm de diâmetro composto por proteínas codificadas pelos genes *L1* e *L2* (Buck et al., 2008; Doorbar et al., 2012) que envolvem um DNA dupla-fita circular de aproximadamente 8 kb (Bernard, 2005). Os HPVs são classificados quanto ao risco oncogênico em HPVs de alto risco (*high risk HR* – HPV) e de baixo risco (*low risk LR* – HPV). São vírus que coevoluíram com seus hospedeiros e podem infectar tanto as mucosa quanto a pele (Van Doorslaer, 2013). Existem mais de 200 tipos de HPVs já classificados e estes compartilham a mesma organização do genoma (Van Doorslaer, 2013; 2017).

Os genomas de HPV são constituídos, em média, por oito a nove *open reading frames* (ORFs) que codificam as proteínas que são expressas diferencialmente ao longo do ciclo de vida viral. Este genoma também é dividido em três regiões de acordo com a expressão das proteínas: região *early* (E), *late* (L) e a região longa de controle (*long control region* – LCR). Em relação à região *early*, as proteínas codificadas pelos genes *E1* e *E2* possuem um papel importante na regulação da transcrição e replicação do DNA viral (Van Doorslaer; McBride, 2016), enquanto os genes *E4*, *E5*, *E6*, *E7* e *E10* codificam proteínas envolvidas nos processos de desregulação do ciclo celular, evasão das respostas do sistema imunológico, e recrutamento de fatores celulares do hospedeiro para a replicação viral (Doorbar et al., 2015). O gene *L1* da região *late* é um dos mais conservados entre os diferentes tipos virais e codifica a proteína L1 que em conjunto com a proteína L2, codificada pelo gene *L2*, constituem as proteínas primária e secundária do capsídeo, respectivamente. Por fim, a LCR é uma região não codificante do genoma que fica entre os genes *L1* e *E6* que compreende aproximadamente 10% do genoma viral, e é

uma região que possui sítios de ligação para fatores de transcrição (FTs) celulares e virais (Figura 1).

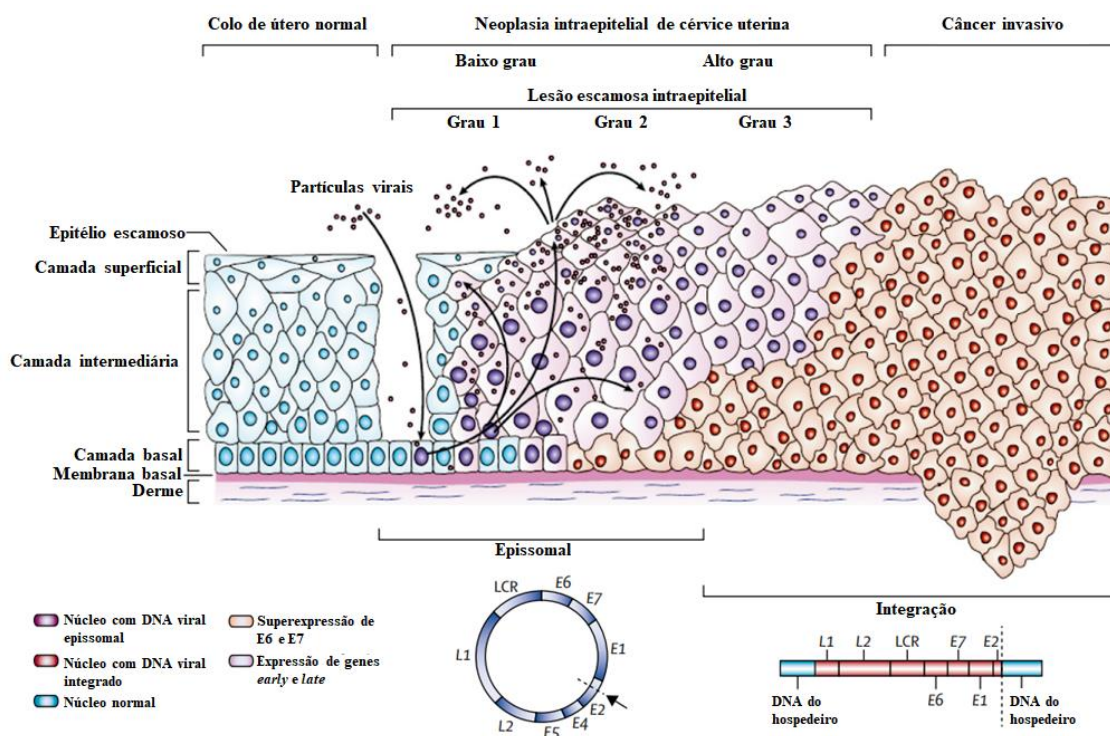


FONTE: Adaptado de Schiffman, 2016.

Figura 1 – Estrutura e organização do genoma de HPV-16. **A.** Microscopia eletrônica das partículas virais de HPV. **B.** Organização genômica de HPV-16. Nas setas estão localizados os promotores precoce (P97) e tardio (P670). As ORFs dos genes *early* estão destacadas em verde (*E1*, *E2*, *E4* e *E5*) e em vermelho (*E6* e *E7*), e dos genes *late* estão destacadas em amarelo (*L1* e *L2*). A LCR responsável pelo controle da transcrição e onde se ligam diferentes fatores de transcrição está localizada entre os genes *L1* e *E6*. As proteínas destacadas com * são necessárias para a replicação e montagem da partícula viral e as proteínas destacadas com † são importantes para a alteração do ciclo celular e evasão imune.

O desenvolvimento de alterações clínicas malignas associadas à infecção por HPV como as lesões precursoras e os tumores, se deve às infecções persistentes e produtivas por HR-HPV. Para que ocorra a infecção é necessário que as barreiras protetoras do

epitélio tenham sido comprometidas e isso pode ocorrer durante a relação sexual, uma vez que o atrito da pele gera microfissuras no epitélio que permitem a infecção pelo vírus nas células da camada basal. Nestas células, os genomas virais são estabelecidos como episômos no núcleo celular, geralmente em baixo número de cópias, e as proteínas precoces são expressas em baixos níveis (Doorbar et al., 2015). A replicação viral e a expressão das proteínas em níveis mais elevados ocorrem apenas nas camadas epiteliais suprabasais. Por fim, ocorre a indução da síntese das proteínas tardias, empacotamento do genoma viral e formação dos vírions nas camadas mais superficiais e diferenciadas do epitélio (Ozbun; Meyers, 1997) (Figura 2).



FONTE: Adaptado de Cohen, 2019.

Figura 2 – Modelo de carcinogênese da cérvix uterina. Infecção por HR-HPV em células da camada basal do epitélio, e o desenvolvimento da infecção produtiva até o surgimento do tumor.

O desenvolvimento de lesões associadas às infecções por HPV se deve principalmente à atividade das oncoproteínas virais E6 e E7 que agem sinergicamente

para desregular a apoptose e o ciclo celular da célula infectada devido à interação destas com diferentes proteínas celulares. A proteína viral E6 de HR-HPV se liga à proteína supressora tumoral p53 induzindo sua degradação pela via de proteólise dependente de ubiquitina (Scheffner et al., 1993). Ademais, a proteína E6 de HR-HPV interage com diversas outras proteínas celulares incluindo (1) co-ativadores transcricionais como MYC (Gross-Mesilaty et al., 1998); (2) proteínas envolvidas na polaridade e motilidade celular como MUPP1 (*multiple PD2 protein 1*) (Lee et al., 2000); (3) indutores de apoptose como BAK (Thomas; Banks, 1999), (4) fatores de replicação e reparo de DNA como XRCC1 (Iftner et al., 2002); além de (5) indutores da atividade de telomerase (Veldman et al., 2001). A proteína E7 de HR-HPV se liga à forma hipofosforilada de pRb (Wang et al., 2001), o que resulta na liberação de proteínas da família de FTs E2F que antes estavam associadas em complexos com pRb. E7 também pode se ligar e formar complexos com as ciclinas impedindo a ativação dos inibidores de quinase dependente de ciclina p21 e p27. Essas interações de E7 resultam na progressão do ciclo celular (Dyson et al., 1989). Além disso, E7 interage com os centrossomos, induzindo defeitos mitóticos e instabilidade genômica (Duensing; Münger, 2003).

Os HPVs podem ser transmitidos tanto de forma horizontal, isto é, por contato peniano-vaginal, pênis-canal anal, sexo oral e digital (Hernandez et al., 2008), como também de forma vertical que ocorre por contato pele-a-pele de mãe para filho, como por exemplo, no momento do parto. As infecções transientes são controladas pelo sistema imunológico, porém, a interação das proteínas virais E6 e E7 com as proteínas celulares do hospedeiro no caso de infecções persistentes por HR-HPV promovem alterações nas células infectadas que por consequência alteram a estrutura do epitélio onde estão essas células infectadas. Adicionalmente, ocorrem alterações nas vias de reconhecimento de antígenos, desta forma diminuindo as respostas do sistema imunológico (Egawa et al., 2015). Em conjunto, essas alterações promovem o aparecimento de lesões precursoras e se não identificadas e tratadas, essas lesões podem progredir para o desenvolvimento de tumores no local infectado. Alguns fatores virais e do hospedeiro influenciam no risco de infecções persistentes por HPV. Os fatores virais incluem os tipos virais, a carga viral e as variantes genéticas infectantes (Sichero; Villa, 2006). Fatores do hospedeiro, por sua vez, incluem a resposta do sistema imunológico e a coinfeção com outros vírus que

interferem na resposta imunológica, como exemplo, infecções por HIV (vírus da imunodeficiência humana – *human immunodeficiency virus*) (Schiffman et al., 2016).

1.2 CÂNCERES ASSOCIADOS AO HPV

Entre os HPVs que infectam as mucosas, os tipos amplamente correlacionados com o desenvolvimento de alterações clínicas incluem sete tipos de LR-HPV: 6, 11, 40, 42, 43, 44 e 54, e 14 tipos de HR-HPV: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68. Esses HR-HPV são atualmente classificados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como carcinógenos do tipo I devido à sua associação com o desenvolvimento de tumores na região anogenital e na orofaringe (IARC, 2012; Gargano et al., 2017).

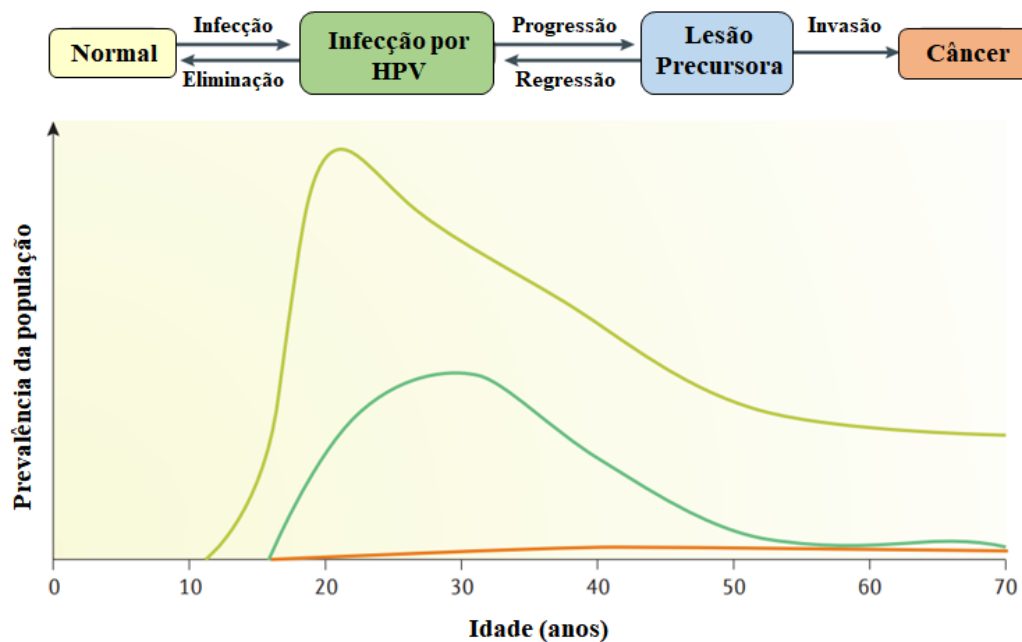
Infecções por LR-HPV estão associadas ao desenvolvimento de lesões hiperproliferativas benignas como a papilomatose respiratória recorrente e os condilomas anogenitais (Egawa; Doorbar, 2017). As proporções de cânceres atribuídos à infecção por HR-HPV nos diferentes sítios anatômicos são cerca de: 25% dos tumores de vulva, 75% dos tumores de vagina, 50% dos tumores de pênis, 5-80% dos tumores de orofaringe, e 100% dos tumores de cérvix uterina e de células escamosas de canal anal (de Martel et al., 2020). Mais especificamente, as infecções persistentes por HR-HPV 16 e 18 são responsáveis pelo desenvolvimento de aproximadamente 75% dos casos de tumores cervicais em todo o mundo. Ademais, é interessante ressaltar que o HPV-16 é detectado em quase a totalidade dos tumores HPV-induzidos nos sítios anatômicos extra-cervicais (de Martel et al., 2020).

Como as infecções por HPVs nas diferentes mucosas ocorrem essencialmente pelo contato sexual (Franco et al., 1995; Castellsagué et al., 1997; Burchell et al., 2006), as características relacionadas às práticas sexuais, tais como a idade precoce da primeira relação sexual, número alto de paridade e o elevado número de parceiros sexuais recentes ou durante a vida constituem fatores de risco importantes para a aquisição dessas infecções (Moscicki et al., 2001; Giuliano et al., 2008). Outros fatores comportamentais que também contribuem para o aumento do risco de infecção por HPV são hábitos tabagistas, uso prolongado de anticoncepcionais hormonais e a composição da microbiota (Schiffman et al., 2016). Ademais, foi observado que o comportamento sexual dos

parceiros masculinos influencia o risco das respectivas parceiras mulheres desenvolverem tumores na cérvix uterina (Agarwal et al., 1993; Castellsagué et al., 2002).

A história natural das infecções por HPV e o desenvolvimento de neoplasias foi primeiramente descrita sendo hoje bem caracterizada para tumores de cérvix uterina. Sabe-se que os passos da tumorigênese cervical são: infecção inicial por HR-HPV, persistência da infecção, progressão para lesões precursoras, desenvolvimento de carcinomas *in situ* e eventualmente invasão de tecidos adjacentes (Schiffman et al., 2016). Essas etapas da carcinogênese associada à infecção por HPV é sugerida ser semelhante nos demais sítios anatômicos, porém mais estudos acerca da história natural das infecções por HPV nas diferentes regiões extra-cervicais ainda são necessários.

A associação entre a infecção por HPV e o desenvolvimento de neoplasias de colo de útero foi inicialmente observada no início da década de 1970 (zur Hausen et al., 1974). O câncer de colo de útero é o quarto tipo de câncer mais incidente entre as mulheres em todo o mundo (Sung et al., 2021). De acordo com as estatísticas da OMS, cerca de 600.000 novos casos foram estimados no ano de 2020, dos quais a metade foram casos fatais. A maior parte das infecções são assintomáticas e eliminadas espontaneamente em um período de um ano, sendo as infecções persistentes associadas com o desenvolvimento das neoplasias malignas. Além disso, a alta prevalência de infecções por HPV na população feminina e a baixa taxa relativa de câncer cervical se correlaciona com os fatores virais e do hospedeiro mencionados (Figura 3).



FONTE: Adaptado de Schiffman, 2016.

Figura 3 – Modelo da história natural da infecção por HR-HPV e o desenvolvimento de câncer na cérvix uterina. Os passos da tumorigênese associada ao HPV no colo de útero estão em destaque nas diferentes cores: infecção por HPV em verde, desenvolvimento de lesões precursoras em azul e desenvolvimento de câncer em laranja. No gráfico estão dispostas as prevalências de HPV na população feminina de acordo com a idade.

Aproximadamente 90% dos diagnósticos de câncer de canal anal em ambos os sexos estão associados com infecções por HR-HPV e dentre esses, o HPV-16 é o tipo mais detectado (de Martel et al., 2020). Os tumores de canal anal são raros e correspondem a cerca de 3% dos diagnósticos de neoplasias do trato gastrointestinal, sendo os tipos histológicos mais comuns o carcinoma de células escamosas, seguido de adenocarcinomas (Hoff et al., 2017; Young et al., 2020). Estima-se que mundialmente 50.500 pessoas foram diagnosticadas com câncer anal em 2020, e que em torno de 20.000 pessoas morreram em decorrência deste tumor também no mesmo ano (IARC, 2020; Howlader et al., 2021). No Brasil, os tumores de canal anal correspondem a cerca de 1-2% dos diagnósticos de tumores colorretais e em 2014, estimou-se cerca de 1.100 novos casos, porém para essa doença os registros no país ainda são escassos (Libera et al., 2019).

Os fatores de risco associados ao desenvolvimento do câncer de canal anal também estão associados com o comportamento sexual que aumenta a chance de exposição ao HPV, como por exemplo, o início precoce de atividade sexual, múltiplos parceiros sexuais, relações sexuais penetrativas no canal anal e histórico de infecções sexualmente transmissíveis (ISTs), principalmente infecções concomitantes por HIV (Nelson; Benson, 2017). O diagnóstico tardio destes tumores resulta em abordagens terapêuticas intensas, e conseqüentemente no aumento de morbidade (Sarcher et al., 2018).

Os tratamentos para os tumores de canal anal diferem de acordo com o tipo histológico. Conforme os protocolos estabelecidos pelo Dr. Nigro na década de 70, a abordagem terapêutica padrão para carcinomas de células escamosas mudou de cirurgia com excisão local ou radical com ressecção abdominoperineal para quimiorradioterapia utilizando 5-fluorouracil e mitomicina com radiação de 45 a 60 Gy. Essa mudança terapêutica resultou no aumento de 70-90% nas taxas de sobrevida global em 5 anos. No entanto, a excisão cirúrgica ainda é oferecida quando os pacientes possuem tumores que podem ser excisados completamente, com menos de 3 mm de invasão da membrana basal e menos de 7 mm de invasão horizontal. Nos casos de recorrência após a cirurgia de excisão, recomenda-se a quimiorradioterapia e se, mesmo assim, o paciente for não responsivo ao tratamento, a ressecção abdominoperineal é considerada (Bartelink et al., 1997; Young et al., 2020).

Os mecanismos tumorigênicos que levam ao desenvolvimento de neoplasias no canal anal associadas à infecção de HPV ocorrem de forma semelhante ao previamente descrito nos tumores cervicais. Resumidamente, os HR-HPV infectam preferencialmente as células da camada basal localizada na zona de transformação entre as regiões da mucosa colunar distal do reto e a linha denteada (ou pectínea) até as junções escamocolunares (Palefsky; Rubin, 2009). Quando a infecção é produtiva, ocorre a interação entre as oncoproteínas virais E6 e E7 com as proteínas supressoras de tumor p53 e pRb do hospedeiro, respectivamente, de maneira a manter os sinais de proliferação das células infectadas, induzir a imortalização das células e transformação da histologia do tecido infectado como descrito anteriormente (Krzowska-Firych et al., 2019).

1.3 VARIANTES GENÉTICAS DE HPV-16

A variabilidade entre os tipos de HPV foi primeiramente reconhecida por ensaios de hibridização de DNA/RNA e o uso de endonucleases de restrição (Gissman; zur Hausen, 1976). Atualmente, a taxonomia de HPV está baseada na análise da variabilidade genômica encontrada na sequência do gene *L1*, visto que é um dos genes mais conservados (Figura 4). Assim, novos tipos de HPV são distinguidos quando existe menos de 90% de similaridade com qualquer outro tipo viral já descrito.

Além disso, as variantes genéticas ou moleculares são classificadas devido à variabilidade encontrada dentro de um mesmo tipo de HPV. Baseando-se em diferenças encontradas em um fragmento de 364 pb da LCR, as variantes genéticas de HPV-16 foram inicialmente classificadas em cinco diferentes ramos levando em consideração o parentesco filogenético e geográfico, sendo eles: Europeu (E), Asiático-Americano (AA), Asiático (As), Africano-1 (Af-1) e Africano 2 (Af-2) (Ho et al., 1993). Estudos conduzidos em diferentes populações revelaram que algumas dessas variantes estão distribuídas no mundo inteiro e outras, restritas a algumas regiões (Yamada et al., 1997; Cornet et al., 2012; Mirabello et al., 2018). Recentemente, a nomenclatura das variantes de HPV-16 foi revisada e estas passaram a ser classificadas de acordo com diferenças encontradas na sequência do genoma completo. Dessa maneira, as linhagens possuem cerca de 1-2% de diferença e são denominadas por letras (A, B, C e D), e as sublinhagens possuem de 0,5-1% de diferença no genoma completo e são denominadas por números (1, 2, 3 e 4). Como exemplo, A1 é uma variante de HPV-16 da linhagem A e da sublinhagem 1 (Smith et al., 2011) (Figura 4). A tabela 1 sumariza a correspondência entre a classificação das variantes de HPV-16 ao longo do tempo.

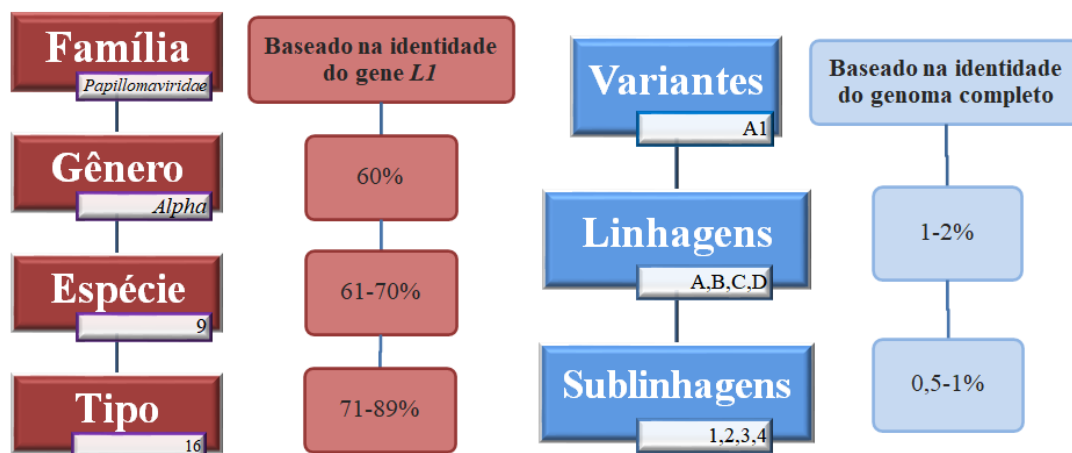


Figura 4 – Taxonomia de HPV-16 e suas variantes genéticas. A classificação de HPV-16 está disposta nos quadrados vermelhos e a classificação das variantes de HPV-16 nos quadrados em azul. Nos quadrados correspondentes estão indicadas as porcentagens de diferenças nucleotídicas utilizada para distinguir cada unidade taxonômica.

Tabela 1 – Correspondência entre a nomenclatura das variantes de HPV-16 ao longo do tempo. Na coluna “Moderna” está descrita a classificação de acordo com as diferenças encontradas na sequência do genoma completo. Na coluna “Baseada na Geografia” está descrita a classificação baseada nas diferenças encontradas em um fragmento da LCR.

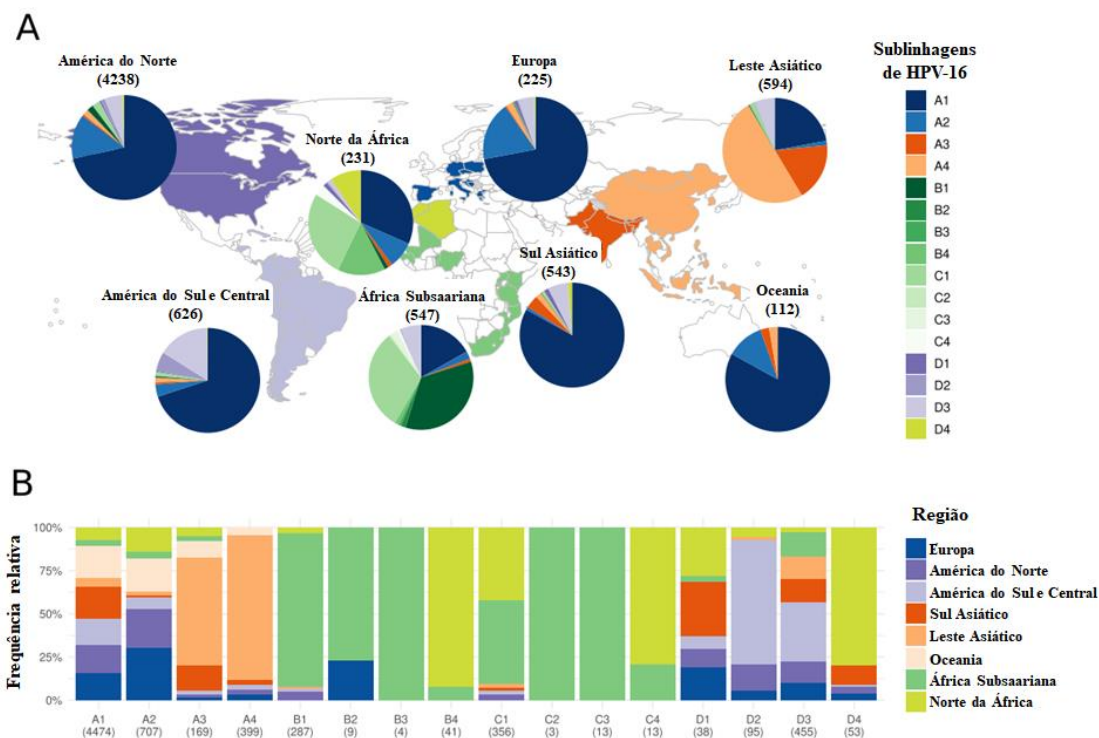
Nomenclatura			
Moderna	Baseada na Geografia	Moderna	Baseada na Geografia
A1	Protótipo-Europeu (E)	C1	Africano-2 (Af-2)
A2	Europeu (E)	C2	Africano-2 (Af-2)
A3	Europeu (E)	C3	Africano-2 (Af-2)
A4	Asiático (As)	C4	Africano-2 (Af-2)
B1	Africano-1 (Af-1)	D1	Asiático-Americano (AA)
B2	Africano-1 (Af-1)	D2	Asiático-Americano (AA)
B3	Africano-1 (Af-1)	D3	Asiático-Americano (AA)
B4	Africano-1 (Af-1)	D4	Norte-Americano (NA)

1.3.1 Variantes genéticas de HPV-16 em mulheres

Aproximadamente 2.500 mulheres foram incluídas e acompanhadas durante o período de cinco anos no estudo prospectivo Ludwig–McGill realizado na cidade de São Paulo. Neste estudo foram coletadas amostras de esfregaço da região da cérvice uterina realizadas a cada quatro meses no primeiro ano de seguimento e a cada seis meses nos anos seguintes (Schlecht et al., 2001). Foi avaliada a presença de DNA de HPV nestas amostras e adicionalmente, as variantes infectantes foram caracterizadas nas amostras HPV-16 positivas. Foi detectada nessa coorte alta prevalência de variante do ramo Europeu (E) (sublinhagens A1-3) de HPV-16 (74,8%, 140/187), seguido das variantes dos ramos Asiático-Americano (AA) (sublinhagens D1-3) (15,0%, 28/187), Africano (Af) (sublinhagens B1-4/C1-4) (8,0%, 15/187) e Asiático (As) (sublinhagem A4) (2,2%, 4/187). Além disso, foi observado que as mulheres infectadas por variantes não-Europeias (NE) de HPV-16, ou seja, As, Af e AA possuíam maior risco de desenvolvimento de lesões de alto grau na cérvice uterina em comparação com as mulheres com infecção por variantes Europeias (Villa et al., 2000; Sichero et al., 2007a).

Em outro estudo, conduzido nos Estados Unidos englobando 354 mulheres HPV-16 positivas em que foram detectadas alterações citológicas e/ou histológicas no colo de útero, foi observada maior prevalência de variantes Europeias de HPV-16 (86%, 303/354). Variantes não-Europeias (NE) foram detectadas em 14% (51/354) das mulheres, sendo que variantes do ramo AA foram detectadas em 31 de 51 (61%) destes casos. As mulheres em que foram detectadas variantes NE apresentaram maior risco de desenvolvimento de lesões precursoras e câncer em comparação com as mulheres infectadas com variantes Europeias. Além disso, todas as amostras em que foram detectadas variantes Asiáticas (As) foram provenientes de mulheres diagnosticadas com HSIL (lesão intraepitelial escamosa de alto grau) ou câncer (Zuna et al., 2009). Mais recentemente, foi realizado um estudo em que foi utilizada a técnica de sequenciamento de alto rendimento para análise da sequência nucleotídica do genoma completo de HPV-16 de 3.215 mulheres dos Estados Unidos infectadas por este tipo de HPV. Nesta população, foi observado que as mulheres infectadas com as variantes das sublinhagens A4, D2 e D3 foram associadas com maior risco de desenvolvimento de lesões precursoras de alto grau e câncer (Mirabello et al., 2016).

Adicionalmente, Clifford et al. (2019) utilizando-se das análises de sequenciamento de genoma completo de HPV-16 isolados tanto de amostras com citologia normal como de lesões intraepiteliais e câncer provenientes de 7.116 mulheres oriundas de 52 países, demonstrou que de maneira geral, variantes da linhagem A são as mais prevalentes no mundo (78,7%), seguida das variantes da linhagem D (9,2%), C (6,4%) e B (5,8%). Além disso, observou-se que variantes das diferentes linhagens/sublinhagens de HPV-16 se distribuem de forma desigual nos diferentes países (Figura 5). Ademais, foi observado que a associação entre a infecção por variantes das diferentes sublinhagens de HPV-16 e o risco de desenvolvimento de tumores varia geograficamente. Como exemplos, associação estatisticamente significativa foi observada entre o desenvolvimento de câncer de colo uterino e as variantes das sublinhagens A3 e A4 no Leste Asiático, ao passo que na América do Norte, o desenvolvimento de câncer de colo uterino foi associado com infecção por variantes das sublinhagens A4 e variantes da linhagem D.



FONTE: Adaptado de Clifford, 2019.

Figura 5 – Distribuição de variantes das diferentes linhagens/sublinhagens de HPV-16 no mundo. **A.** Prevalência de variantes das diferentes linhagens/sublinhagens na cérvix uterina em mulheres tanto com citologia normal quanto com lesões intraepiteliais e câncer nos diferentes países. **B.** Frequência das variantes detectadas por região geográfica.

O conhecimento acerca da prevalência e distribuição de variantes de HPV-16 em amostras obtidas do canal anal de mulheres ainda é escasso. Até o momento, somente quatro estudos descrevem a prevalência das diferentes variantes de HPV-16 detectadas no canal anal de mulheres dos quais apenas dois relatam os riscos de desenvolvimento de lesões e tumores atribuíveis a essas variantes. No primeiro estudo englobando 41 mulheres dos Estados Unidos participantes do estudo *Women's Interagency HIV Study*, observou-se maior prevalência de variantes Europeias (A1-3) de HPV-16 (60,0%, 25/41), seguida de variantes Africanas (B1-4/C1-4) (36,5%, 15/41) no canal anal de mulheres HIV+/HIV-. Ademais, foi observado um maior risco de desenvolvimento de neoplasias de alto grau no canal anal de mulheres HIV+/HPV+ associadas à detecção de variantes

de HPV-16 contendo alteração no nucleotídeo A131G (detectado em variantes dos ramos Europeus e Africanos) (Da Costa et al., 2002).

O segundo estudo incluindo 172 amostras obtidas do canal anal de homens e mulheres provenientes de diferentes regiões geográficas (Europa, Ásia e Américas do Sul e Central) reportou maior prevalência de variantes das sublinhagens A1-3 de HPV-16 na Europa (59,3%, 38/64), e Américas do Sul e Central (76,4%, 39/51). Assim como nas amostras de cérvix uterina, maior prevalência de variantes da sublinhagem A4 foi observada na Ásia em comparação com as demais regiões geográficas, e as variantes da linhagem D foram somente detectadas nas Américas do Sul e Central. Ademais, foi observado que mulheres com carcinoma de células escamosas em sítios anatômicos extra-cervicais e infectadas com variantes das sublinhagens A1-3 possuíam uma idade média maior quando comparadas com mulheres acometidas com carcinoma de cérvix uterina infectadas com essas mesmas variantes (Nicolás-Parraga et al., 2016).

O terceiro estudo englobou amostras de canal anal HPV-16 positivas obtidas tanto de citologia normal como de lesões intraepiteliais ou câncer provenientes de 58 participantes (46 homens e 12 mulheres) da Itália. Corroborando com os achados anteriores, foi observada maior prevalência de variantes Europeias (81%, 47/58) nestas amostras (Tanzi et al., 2009).

O último estudo e o mais recente, foi realizado com 386 amostras de canal anal provenientes de 289 homens e 97 de mulheres dos EUA com lesões intraepiteliais anais ou não. Tanto variantes das sublinhagens A1, A2, A4, e C1, quanto variantes da linhagem B de HPV-16 foram detectadas nas amostras de condilomas e de lesões de alto grau. Por outro lado, nas amostras de carcinomas de células escamosas de canal anal foram detectadas apenas variantes da linhagem B, e variantes das sublinhagens A1, A4 e D3. Além disso, análises de regressão logística demonstraram que indivíduos em que foram detectadas variantes da sublinhagem A4 e das linhagens B, C e D combinadas apresentavam maior risco de desenvolvimento de carcinoma de células escamosas quando comparado com outras lesões (condilomas e lesão de alto grau). Curiosamente quando detectadas somente variantes da linhagem B o risco de desenvolvimento de lesões e câncer foi semelhante ao observado nos grupos com detecção combinada de variantes de linhagens (Brim et al., 2021).

1.3.2 Variantes genéticas de HPV-16 em homens

Nas últimas duas décadas muitos foram os avanços no conhecimento da história natural das infecções por HPV em mulheres, porém pouco se conhecia em relação às infecções por HPV na região anogenital de homens. Com isso, no período de 2005 a 2009 foi conduzido um estudo epidemiológico prospectivo internacional multicêntrico incluindo homens participantes do Brasil, Estados Unidos e México com o objetivo de melhor compreender a história natural de infecções por HPV em homens (*The HIM study*) (Giuliano et al., 2008). Detalhes do desenho deste estudo estão apresentados nos Materiais e Métodos desta dissertação. Os pesquisadores coordenadores do estudo HIM são a Dra. Anna R. Giuliano (Pesquisadora Principal) do Centro de Pesquisa em Imunização e Infecção em Câncer, e do Departamento de Epidemiologia do Câncer, *H. Lee Moffitt Cancer Center and Research Institute* (Tampa, EUA), a Profa. Dra. Luisa L. Villa do Centro de Investigação Translacional de Pesquisa em Oncologia, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo-ICESP, Departamento de Radiologia e Oncologia, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo-HCFMUSP (São Paulo, Brasil), e o Dr. Eduardo Lazcano-Ponce do Centro de Pesquisa de Saúde Pública, Instituto Nacional de Saúde Pública, Instituto Mexicano del Seguro Social (Cuernavaca, Mexico). O estudo HIM contou com financiamento do Instituto Nacional do Câncer (*National Institutes of Health – NIH*, Maryland, EUA) e do Instituto Ludwig de Pesquisa em Câncer (Ludwig Institute for Cancer Research, São Paulo, Brasil).

A grande importância desse estudo se reflete na publicação de mais de 86 manuscritos até o momento. Entre outros achados, este estudo revelou que (1) a prevalência do DNA de HPV é maior que 50% na região genital de homens, (2) os homens possuem maior prevalência de infecção por LR-HPV (20,7%) do que HR-HPV (12,0%), (3) em homens a prevalência de infecção por HPV é constante ao longo da vida ao contrário do observado em mulheres em que altas taxas de infecção são observadas em mulheres mais jovens e declinam com o avanço da idade, (4) a incidência de qualquer tipo de HPV é maior em homens que fazem sexo com homens (*men who have sex with men – MSM*) do que em homens que fazem sexo com mulheres (*men who have sex with women – MSW*), e (5) a prevalência e persistência de HPV-16 também são maiores em

MSM quando comparado com MSW (Giuliano et al., 2008; Nyitray et al., 2011; Sichero et al., 2019).

Em relação aos estudos de variantes genéticas de HPV-16 nos diferentes sítios anatômicos de homens pouco ainda se sabe acerca da prevalência, persistência e associação com riscos de desenvolvimento de lesões e câncer. Em decorrência disso, nós conduzimos uma revisão sistemática seguida de meta-análise publicada em março de 2021 sobre o que havia relacionado a esse tema disponível na literatura até agosto de 2020. Resumidamente, foram incluídos 14 artigos de diferentes países que tiveram como objetivo analisar variantes moleculares de HPV-16 em amostras obtidas de três sítios anatômicos: cabeça e pescoço, canal anal e região genital (Ferreira et al., 2021).

No que concerne à região genital, 268 amostras de diferentes regiões geográficas foram analisadas no contexto de oito estudos distintos. Em sete destes, variantes de HPV-16 da linhagem A foram frequentemente detectadas (85,8%, 230/268), seguida das variantes das linhagens D (11,1%, 30/268) e B (3,1%, 8/268). Em um único estudo conduzido em Uganda somente variantes da linhagem B foram detectadas. Apenas três estudos realizaram análise de variantes moleculares de HPV-16 em amostras obtidas de tumores de cabeça e pescoço, em um total de 46 amostras provenientes tanto de citologia normal quanto de carcinomas. De maneira geral, foi observado alta prevalência de variantes da linhagem A (91,3%, 42/46), seguida das variantes da linhagem D (8,7%, 4/46).

Finalmente, cinco estudos totalizando 131 amostras provenientes de citologia normal e câncer analisaram a prevalência de variantes de HPV-16 no canal anal de homens. Variantes de todas as linhagens foram detectadas considerando-se todos os estudos, e variantes da linhagem A foram as mais prevalentes (90,2%, 118/131), seguida das variantes das linhagens D (6,8%, 9/131), B (1,5%, 2/131) e C (1,5%, 2/131). Em comparação com os demais sítios anatômicos (cabeça e pescoço e região genital), foi observada maior diversidade de variantes de linhagens de HPV-16 nas amostras de canal anal (Ferreira et al., 2021).

2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

O impacto da variabilidade genética de HPV-16 tem sido extensivamente descrito no que concerne à persistência da infecção e o desenvolvimento das neoplasias associadas na cérvix uterina. Porém ainda existe uma lacuna no conhecimento acerca do impacto da infecção por diferentes variantes de HPV-16 em relação ao prognóstico e o desenvolvimento de tumores em diferentes regiões anatômicas de homens. Esse conhecimento é fundamental para melhor compreender a dinâmica das infecções por HPV, e para definir condutas clínica e de manejo dos pacientes infectados e acometidos pelas doenças associadas.

Pelo exposto, esse estudo teve como objetivo principal analisar a prevalência e distribuição das variantes genéticas de HPV-16 no canal anal de homens participantes do estudo HIM. Mais especificamente, objetivou-se: (1) analisar a prevalência das variantes de HPV-16 no canal anal de homens participantes do estudo HIM do Brasil, Estados Unidos e México, (2) analisar a persistência dessas infecções, e por fim (3) identificar variáveis sociodemográficas e de comportamento associadas ou não com a prevalência e persistência dessas infecções na população do estudo.

3 MÉTODOS

3.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Este projeto utilizou amostras provenientes do estudo epidemiológico prospectivo HIM (*HPV Infection in Men*). A coorte deste estudo incluiu cerca de 4.500 homens, com idades entre 18 e 70 anos, moradores de São Paulo, Brasil; Cuernavaca, México; ou Tampa, Estados Unidos. Os participantes foram acompanhados de julho de 2005 a junho de 2009, com visitas realizadas a cada seis meses. A cada visita os homens responderam um questionário extenso com aproximadamente 88 questões relativas à variáveis sociodemográficas e comportamentais. Adicionalmente, nessas ocasiões foram coletadas amostras de esfregaço do canal anal e região genital, além de enxágue bucal.

Os profissionais treinados e qualificados em cada localidade examinaram os participantes para detecção de ISTs e três *Dacron swabs* (Digene, Maryland, EUA) umidificados com solução salina foram utilizados para coletar as células epiteliais do pênis e escroto. Um quarto *Dacron swab* foi utilizado para coletar células do epitélio do canal anal entre a borda anal e a linha denteada. Após as coletas, os *swabs* foram dispostos em meio padrão de transporte e armazenados a -80 °C. As amostras de cavidade oral foram coletadas após gargarejo com 15 mL de enxaguante bucal *Scope* (Protector & Gamble, Ohio, Estados Unidos) e processadas em até 24h após a coleta. Os participantes foram instruídos a realizar uma lavagem vigorosa da cavidade oral com bochechos, incluindo a garganta durante 15 segundos e cuspir no tubo de coleta que foi armazenado a 20 °C até o processamento (Nyitray et al., 2011; Bettampadi et al., 2020).

Os critérios de inclusão no estudo HIM foram: (1) não ter diagnóstico anterior de verrugas ou câncer na região anogenital; (2) não ter participado de estudos de vacinas contra HPV; (3) não ter diagnóstico anterior de infecção por HIV; (4) não estar em tratamento de doenças sexualmente transmissíveis; e (5) não ter histórico de sistema carcerário, morador de rua ou ter realizado tratamento para dependência química nos seis meses anteriores à visita de admissão. O estudo HIM foi aprovado pelos comitês de ética institucionais da Universidade do Sul da Flórida (Tampa, Flórida, EUA), do Centro de

Referência e Treinamento em DST/AIDS (São Paulo, São Paulo, Brasil) e do Instituto Nacional de Saúde Pública (Cuernavaca, Morelos, México). Todos os participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Giuliano et al., 2008).

Os homens participantes do estudo HIM foram recrutados em diferentes grupos populacionais a fim de se obter uma amostragem abrangente da população e por consequência incluir grupos com diferentes riscos de infecção por HPV. Em resumo, os participantes foram recrutados de clínica de cuidados urogenitais (Centro de Referência e Treinamento em DST/AIDS) e por propagandas em diferentes mídias no Brasil; trabalhadores de fábricas, funcionários e beneficiários do Instituto Mexicano de Seguro Social, e membros do exército no México; e por fim, nos Estados Unidos, foram recrutados na Universidade do Sul da Flórida e na área metropolitana de Tampa.

3.2 TIPAGEM DE HPV

Para a detecção e genotipagem de HPV, inicialmente foi realizada a extração de DNA de uma parcela do esfregaço de canal anal utilizando o *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen, Califórnia, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Em resumo, 200 μ L das amostras foram digeridas pela incubação das mesmas com 20 μ L de solução de proteinase K (0,4 mg/ μ L) (Qiagen, Califórnia, EUA) por 1 hora a 65 °C. Em seguida, foi realizada a reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* – PCR) empregando-se os iniciadores consenso PGMY09/11 (Gravitt et al., 2000) com o objetivo de amplificar um fragmento de aproximadamente 450 pb do gene *L1* de uma ampla gama de tipos de HPV. As amostras que foram positivas na PCR, foram genotipadas empregando-se a tecnologia de hibridização reversa *Linear Array HPV Genotyping Test* (Roche Molecular Diagnostics, Califórnia, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Neste teste também estão incluídos iniciadores capazes de amplificar um fragmento do gene da β -Globina, utilizado como controle interno da qualidade do DNA extraído. Com essa metodologia é possível identificar 37 tipos de HPV, dentre eles 13 HR-HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 66) e 24 LR-HPV (6, 11, 26, 40, 42, 44, 53, 54, 61, 62, 64, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, IS39 e CP6108).

3.3 ANÁLISE DAS VARIANTES DE HPV-16 EM AMOSTRAS DE CANAL ANAL

Cerca de 86% dos participantes do estudo HIM concordaram em ceder amostras do canal anal, porém, até o momento, nem todas as amostras colhidas foram genotipadas para HPV (Sudenga et al., 2017). Para este estudo, dispôs-se de 227 amostras de canal anal provenientes de 124 participantes do estudo HIM, sendo 142 amostras do Brasil, 43 dos Estados Unidos e 42 do México. As amostras de canal anal foram armazenadas na temperatura de -80 °C no laboratório da Profa. Dra. Anna R. Giuliano no H. Lee Moffit Cancer Center and Research Institute na Flórida e foram enviadas ao Brasil para análise de variantes de HPV-16 em janeiro de 2020. Foram enviadas de 212 amostras, 100 µL de solução contendo as células de esfregaço do canal anal, e de 15 amostras, 10 µL de DNA extraído conforme item 3.2 desta dissertação.

3.3.1. Extração de DNA

A extração de DNA dos esfregaços de canal anal das 212 amostras enviadas foi realizada usando o protocolo de extração orgânica que emprega fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (Green; Sambrook, 2012). Em resumo, 50 µL das amostras foram digeridas pela incubação das mesmas com 200 µL de solução de lise (10 mM Tris-HCl pH=8; 1 mM EDTA pH=8; 1 mg/mL proteinase K; 1% SDS) por 24 horas a 55 °C, com agitação de 300 rpm. Após esse tempo, foi avaliado se todo material celular havia sido completamente digerido, então foram adicionados 200 µL da solução de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico nas proporções 25:24:1 (Invitrogen, Califórnia, EUA) em cada amostra, que foram, em seguida, misturadas vigorosamente no vórtex por 1 minuto, sendo em seguida centrifugadas durante 15 minutos a 13.362 g (equivalente à 12.000 rpm) em temperatura ambiente a fim de separar as fases aquosa e lipofílica.

A fase aquosa foi transferida a um novo tubo para seguir com a etapa de precipitação do DNA. Para isso, foram adicionados em cada amostra 20 µL de acetato de amônio 3 M (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) e 600 µL de etanol 100% (Merck, Nova Jersey, EUA), sendo em seguida incubadas a -80 °C por duas horas. Depois desse período, os tubos com a solução e com o DNA precipitado foram centrifugados por 15 minutos a 13.362 g a 4 °C. Os sobrenadantes foram descartados, os *pellets* lavados com 500 µL de etanol 70% (Merck, Nova Jersey, EUA) e então as amostras foram centrifugadas por 15

minutos a 13.362 g a 4 °C, repetindo esse último passo por mais uma vez. A fim de eliminar os resíduos de álcool das amostras, os tubos foram colocados em banho seco por 10 minutos a 60 °C. Finalmente, os DNAs extraídos foram ressuspensos em 30 µL de água deionizada e destilada e a qualidade dos mesmos mensurada por espectrofotometria usando o equipamento *NanoDrop*® (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). Finalmente, os DNAs extraídos foram armazenados a -20 °C.

3.3.2 Reação em cadeia da polimerase – PCR

Foram utilizados 2 µL dos DNAs extraídos nas reações de PCR usando pares de iniciadores capazes de amplificar um fragmento de 364 pb da LCR de HPV-16 (Ho et al., 1993) (Tabela 2). Para as amostras em que não foi possível amplificar o fragmento de 364 pb, foram desenhados novos pares de iniciadores a fim de dividir a região de interesse da LCR em dois fragmentos menores, sendo o primeiro par de iniciadores (A) capaz de amplificar um fragmento de 296 pb, e o segundo (B) um fragmento de 250 pb da LCR de HPV-16. Para as reações foram utilizados 0,8 U/µL da enzima polimerase *AmpliTaq Gold*® (Applied Biosystems, Nova Iorque, EUA), 2mM MgCl₂ (Applied Biosystems, Nova Iorque, EUA), 2 µL de *Buffer 10X* (Applied Biosystems, Nova Iorque, EUA), 200 mM de cada dNTP (*deoxyribonucleotide triphosphate* - desoxirribonucleotídeos trifosfatados) (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), 50 pmol de iniciadores senso e antissenso, 10,24 µL de água livre de DNase e RNase, e 2 µL de DNA extraído, sendo 20 µL o volume final da reação. Foram realizados 40 ciclos de amplificação sendo que cada ciclo incluiu 1 minuto de desnaturação a 95 °C, 1 minuto de anelamento a 55 °C e 1 minuto de extensão a 72 °C. Os ciclos foram precedidos por um ciclo de 3 minutos a 95 °C e no último ciclo, a extensão foi de 5 minutos a 72 °C. Foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com *Gel Red* (Biotium, Freemont, Canadá) 5 µL dos produtos de PCR e 2 µL de tampão contendo glicerol. O marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen, Califórnia, EUA) foi aplicado em cada gel. Foram incluídos como controles positivos e negativos o plasmídeo contendo o genoma completo de HPV-16 e um tubo contendo apenas a mistura dos reagentes de PCR sem DNA, respectivamente.

Tabela 2 – Pares de iniciadores senso e antissenso usados para amplificação da LCR de HPV-16.

Fragmento	Iniciadores	Sequência	Tamanho do fragmento	Tm*
Completo	F (5'>3')	TCG GTT GCA TGC TTT TTG GC	364 pb	60,6 °C
	R (3'>5')	CGG TTT GCA CAC ACC CAT GT		61,7 °C
A	F (5'>3')	ACA CCT ACT AAT TGT GTT GTG G	296 pb	56,3 °C
	R (3'>5')	CAG TAG TTG CAC ATA GTG CAG		57,0 °C
B	F (5'>3')	CTG CAC TAT GTG CAA CTA CTG	250 pb	57,0 °C
	R (3'>5')	CGG TTT GCA CAC ACC CAT GT		61,0 °C

*Tm: Temperatura de *melting*

F: *Forward* (Senso). R: *Reverse* (Antissenso)

3.3.3 Sequenciamento de DNA

As amostras em que foram observadas à amplificação do fragmento de 364 pb ou dos fragmentos menores de 296 e 250 pb foram purificadas usando 5 µL dos produtos de PCR e 2 µL da enzima *illustraExoProStar 1-Step* (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). Essa solução foi incubada a 37 °C por 15 minutos, seguida de uma fase desnaturante para inativação da enzima a 80 °C por 15 minutos. Após essa etapa de purificação, as amostras foram sequenciadas usando o kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, Nova Iorque, EUA). Para o sequenciamento foi utilizado 0,25 µM de iniciador, 1 µL de *BigDye®*, 4,5 µL de água deionizada e destilada, 1,5 µL de tampão fornecido no kit, além de 2 µL dos produtos de PCR purificados, totalizando uma reação com volume final de 10 µL. Foram realizados 35 ciclos de amplificação, sendo que cada ciclo foi composto de 15 segundos de desnaturação a 96 °C, 15 segundos de anelamento a 50 °C e 4 minutos de extensão a 60 °C. Os ciclos foram precedidos por um ciclo de 1 minuto a 96 °C. Posteriormente, os produtos do sequenciamento foram precipitados com 30 µL de etanol 100% (Merck, Nova Jersey, EUA) e 1,6 mM EDTA, seguido de incubação por 15 minutos no escuro em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2.000 g por 30 minutos a 22 °C. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 30 µL de etanol 70% (Merck, Nova Jersey, EUA) seguido de uma nova centrifugação por 15 minutos a 1.650 g a 22 °C. O sobrenadante foi novamente descartado e os tubos mantidos abertos durante 3 minutos a 60 °C para eliminar os resíduos de álcool. Por fim, as amostras foram entregues ao serviço

de sequenciamento do ICESP para sequenciamento no ABI 3130XL *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Nova Iorque, EUA).

3.4 CLASSIFICAÇÃO DAS VARIANTES DE HPV-16

Para identificação das linhagens e sublinhagens de HPV-16 foi utilizado o software *BioEdit* (versão 7.1) disponível online que é uma importante ferramenta nos estudos de biologia molecular para realizar alinhamentos de sequências de DNA. Inicialmente, todas as sequências de HPV-16 (67 genomas) depositadas no banco de dados online Papillomavirus Episteme (PaVE) (<http://pave.niaid.nih.gov/#home> database) foram alinhadas com a sequência protótipo de HPV-16 (GenBank K02718.1). Após examinar todo o genoma do HPV-16, observou-se que todas as linhagens de HPV-16 podem ser distinguidas apenas pelo padrão de SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único – *single nucleotide polymorphisms*) contidos no fragmento de 364 pb da LCR. Em seguida, sequências de variantes representativas incluindo todos os SNP de cada sublinhagem foram selecionadas como padrões e uma tabela com a comparação das sequências deste fragmento da LCR foi criada (Figura 6).

As sequências de DNA obtidas do sequenciamento das 217 amostras foram pareadas com a sequência protótipo de referência de HPV-16 e, em seguida, com as outras sequências descritas na Figura 6, a fim de classificar as amostras em linhagens (A, B, C e D) e sublinhagens (A1-4; B1-4; C1-4; and D1-4) de HPV-16. Cabe ressaltar, que a variante protótipo é denominada referência apenas por ser o primeiro isolado de HPV-16 a ser completamente sequenciado (Seedorf et al., 1985). Este genoma foi isolado de um tumor de colo de útero de uma paciente na Alemanha e pertence à sublinhagem A1 de HPV-16.

V d e a r r i a n t i l e s	V d e r i a n t i l e s	V d e r i a n t i l e s	7 4 8 2	7 4 8 6	7 4 9 2	7 5 0 4	7 5 1 8	7 5 4 3	7 5 6 7	7 6 0 8	7 6 4 9	7 6 6 6	7 6 6 7	7 6 8 5	7 6 8 6	7 7 0 0	7 7 1 1	7 7 1 7	7 7 2 6	7 7 2 7	7 7 4 0	7 7 6 1	7 7 6 5	7 7 7 8	7 7 8 1	7 7 8 3	7 7 9 6	7 8 2 3	7 8 2 6	7 8 3 1	7 8 3 4	7 8 3 6	7 8 3 9			
Protótipo	Tipo de HPV-16 usado como referência	K02718.1	A	G	T	A	G	T	T	A	T	C	A	A	C	G	T	T	G	A	A	T	C	G	T	C	C	G	G	C	G	A	A	G		
A1	QV11687	HQ644268	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
A1	QV16936	AY686580	-	-	G	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
A1	QV17286	HQ644272	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-		
A1	Z032	HQ644297	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
A2	W0122	AF536179	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
A3	AS411	HQ644236	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
A4	AS310	HQ644235	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	
A4	IN151168	HQ644248	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	
A4	QV2706	HQ644261	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	
B1	BF215	HQ644238	-	A	-	-	A	-	-	G	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
B1	RW768	HQ644290	-	A	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
B1	W0236	AF536180	-	A	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
B1	Z122	HQ644299	-	A	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
B2	IARC1100685NI	HQ644298.1	-	A	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
B3	Z109	HQ644298	-	A	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
B4	IARC907912AL	KU083914	-	A	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
C1	BF039	HQ644237	C	A	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
C1	BF236	HQ644239	C	A	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
C1	IN221688	HQ644249	C	A	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
C1	IN272998	HQ644250	C	A	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
C2	IARC240211GU	KU083920	C	A	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
C3	IARC040105BE	KU083925	C	A	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
C4	IARC304612MO	HQ644257	C	A	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D1	QV00512	HQ644257	C	A	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D2	QV00124	HQ644254	C	A	-	-	G	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D2	QV13791	HQ644270	C	A	-	-	G	A	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D2	QV15321	AY686579	C	A	-	-	G	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D2	QV18351	AY686582	C	A	-	-	G	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D2	QV22478	HQ644277	C	A	-	-	G	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D3	IN000078	HQ644247	C	A	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D3	QV00079	HQ644253	C	A	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D4	IARC903812AL	KU083931	C	A	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Figura 6 – Polimorfismos encontrados nas diferentes posições nucleotídicas no fragmento de 364 pb da LCR de HPV-16 utilizado para classificação das variantes. Em amarelo estão indicados os padrões de SNPs que distinguem as variantes das diferentes linhagens e sublinhagens. Foi utilizado para comparação a sequência protótipo que está incluída na sublinhagem A1 de HPV-16 (GenBankK02718.1) destacado em vermelho, na segunda linha da figura.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os homens foram classificados arbitrariamente como MSW, MSM, MSMW (homens que fazem sexo com homens e mulheres) ou homens que não fazem sexo baseado nas respostas a 17 perguntas do questionário acerca do comportamento sexual penetrativo (sexo vaginal, anal e oral) recente (nos últimos 3 ou 6 meses) e ao longo da vida (Nyitray et al., 2011). Como exemplo, se um participante relatou a prática de sexo anal ou oral com outros homens nos últimos seis meses (recente), ou relatou a prática de sexo anal com ≥ 3 homens durante a vida, ele foi classificado com MSM.

As prevalências das variantes de HPV-16 foram expressas como frequências. As análises de associação entre os fatores sociodemográficos e comportamentais, e as diferentes variantes genéticas de HPV-16 foram realizadas utilizando o teste exato de Fisher. Vale ressaltar que o número total da população nestas análises é de 120 homens ao invés de 115, uma vez que em cinco homens do Brasil foi detectada mais de uma

sublinhagem de variante e dessa forma, estes participantes foram contabilizados duas vezes. Ademais, na análise de prevalência das variantes de sublinhagem de HPV-16 o número total da população é de 112 ao invés de 120 uma vez que não foi possível classificar ao nível de sublinhagem amostras de oito participantes, e dessa forma, estes homens foram incluídos somente nas análises ao nível de linhagem.

Em relação à distribuição das diferentes variantes de HPV-16, as variantes das linhagens B e C foram agrupadas uma vez que estas eram classificadas anteriormente como variantes dos ramos Africanos 1 e 2 (Af1 e Af2), respectivamente. Adicionalmente, nas análises epidemiológicas, as variantes das linhagens B, C e D de HPV-16 foram agrupadas na categoria nominada de Não-A. Os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney foram usados para a análise comparativa entre as medianas de duas e três variáveis, respectivamente.

Infecções persistentes foram definidas como os casos em que a mesma variante de HPV-16 foi detectada em duas ou mais visitas consecutivas (≥ 6 meses) do mesmo participante. Os cinco homens do Brasil que foi observado a detecção de diferentes variantes de HPV-16 ao longo das visitas de seguimento foram contabilizados duas vezes nas análises de persistência/transiência. Como exemplo, um participante foi incluído como caso de infecção transiente pela variante da sublinhagem A1 e caso de infecção persistente pela variante da sublinhagem D3, uma vez que variantes destas linhagens foram detectadas independentemente em visitas distintas. A distribuição das variantes das linhagens de HPV-16 em relação às infecções persistentes e transientes foram analisadas utilizando os testes de Fisher e Qui-quadrado. Todos os testes estatísticos tiveram significância em $\alpha=0,05$ e foram realizadas utilizando a versão do Stata/MP para *Windows*.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO

Foram incluídas neste estudo 227 amostras de canal anal provenientes de 124 participantes do estudo HIM. Dentre estas, 43, 142 e 42 amostras foram obtidas de 34, 65 e 25 homens dos Estados Unidos, Brasil e México, respectivamente. Todos os indivíduos incluídos tiveram pelo menos uma amostra de canal anal na qual foi detectado o DNA de HPV-16. Dentre estes indivíduos, 79 homens (63,8%) tiveram infecção transiente por HPV-16 no canal anal, ou seja, apenas com 1 visita de seguimento em que foi detectado DNA de HPV-16. Dentre os homens com infecção persistente por HPV-16, em um indivíduo foi detectado esse tipo viral em 8 visitas de seguimento (Tabela 3). Cabe ressaltar que amostras HPV-16 positivas da visita 2 foram excluídas nos casos em que o HPV-16 foi detectado também na visita 1, visto que as visitas 1 e 2 foram realizadas com apenas 15 dias de intervalo entre elas. Foi observado também que a visita 1 (visita de admissão) incluiu maior número de amostras de canal anal em que foi detectado DNA de HPV-16 (Tabela 4).

Tabela 3 – Número das visitas do seguimento em que foi detectado DNA de HPV-16 nos espécimes de esfregaço do canal anal de homens participantes no estudo HIM, por país.

Visita	EUA (N = 34)	BRA (N = 65)	MEX (N = 25)	TOTAL (N = 124)
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
# 1	28 (82,4)	34 (52,4)	17 (68,0)	79 (63,8)
# 2	3 (8,8)	10 (15,4)	4 (16,0)	17 (13,8)
# 3	3 (8,8)	9 (13,8)	1 (4,0)	13 (10,4)
# 4	0 (0,0)	5 (7,7)	1 (4,0)	6 (4,8)
# 5	0 (0,0)	4 (6,2)	2 (8,0)	6 (4,8)
# 6	0 (0,0)	1 (1,5)	0 (0,0)	1 (0,8)
# 7	0 (0,0)	1 (1,5)	0 (0,0)	1 (0,8)
# 8	0 (0,0)	1 (1,5)	0 (0,0)	1 (0,8)

Tabela 4 – Número total de visitas do seguimento em que foi detectado DNA de HPV-16 nos espécimes de esfregaço de canal anal de homens participantes do estudo HIM, por país.

Número de visitas	EUA (N = 43)	BRA (N = 142)	MEX (N = 42)	TOTAL (N = 227)
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
# 1	24 (55,8)	17 (12,0)	7 (16,7)	48 (21,1)
# 2	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
# 3	5 (11,6)	18 (12,7)	13 (31,0)	36 (15,9)
# 4	4 (9,3)	22 (15,5)	6 (14,3)	32 (14,1)
# 5	4 (9,3)	25 (17,6)	6 (14,3)	35 (15,4)
# 6	4 (9,3)	19 (13,4)	7 (16,7)	30 (13,2)
# 7	1 (2,3)	14 (9,9)	2 (4,8)	17 (7,5)
# 8	0 (0,0)	9 (6,3)	1 (2,4)	10 (4,4)
# 9	0 (0,0)	6 (4,2)	0 (0,0)	6 (2,6)
# 10	1 (2,3)	6 (4,2)	0 (0,0)	7 (3,1)
# 11	0 (0,0)	4 (2,8)	0 (0,0)	4 (1,8)
# 12	0 (0,0)	2 (1,4)	0 (0,0)	2 (0,9)

A maioria dos homens incluídos neste estudo eram jovens (≤ 30 anos), solteiros, com ≥ 12 anos de escolaridade e que reportaram ser não tabagistas (Tabela 5). Enquanto nos Estados Unidos e Brasil observou-se o predomínio de homens autodeclarados brancos e não-Hispânicos, os homens do México eram, em sua totalidade, Mexicanos e Hispânicos ($p < 0,001$). A média de parceiras sexuais femininas ao longo da vida reportada pelos homens do México foi menor em comparação com os homens oriundos dos demais países ($p = 0,017$). Além disso, os homens do Brasil reportaram a maior média de parceiros sexuais masculinos ao longo da vida em comparação com os homens dos outros dois países ($p < 0,001$). Ademais, foi observado que 64,7% e 56,0% dos participantes dos Estados Unidos e México, respectivamente, eram MSW em contraste com o que foi observado no Brasil, onde 87,6% eram MSM ou MSMW (Tabela 5).

Tabela 5 – Características sociodemográficas dos homens incluídos neste estudo, por país.

Características	EUA (N = 34) n (%)	Brasil (N = 65) n (%)	México (N = 25) n (%)	valor p
Idade				
≤ 30 anos	19 (55,8)	35 (53,8)	14 (56,0)	0,946 ¹
31-44 anos	11 (32,4)	23 (35,4)	7 (28,0)	
≥ 45 anos	4 (11,8)	7 (10,8)	4 (16,0)	
Média (DP)	32,2 (11,2)	32,6 (9,6)	32,5 (10,1)	0,916 ³
Mediana (mín-máx)	28,5 (18-63)	30 (19-59)	29 (20-58)	
Raça				
Branços	21 (61,8)	46 (71,9)	2 (8,0)	<0,001 ²
Pretos/Mulatos	6 (17,7)	13 (20,3)	0 (0,0)	
Misto/Outras raças*	7 (20,5)	5 (7,8)	23 (92,0)	
Etnia				
Hispânicos	7 (21,9)	19 (29,2)	25 (100,0)	<0,001 ¹
Não-Hispânicos	25 (78,1)	46 (70,8)	0 (0,0)	
Estado civil				
Solteiros, nunca casados [§]	24 (70,5)	54 (83,0)	16 (64,0)	0,180 ¹
Casados/morando juntos	10 (29,5)	11 (17,0)	9 (36,0)	
Escolaridade				
< 12 anos	1 (2,9)	8 (12,4)	7 (28,0)	0,127 ²
≥ 12 anos	33 (97,1)	57 (87,6)	18 (72,0)	
Tabagista atual				
Sim	10 (29,5)	16 (24,6)	9 (36,0)	0,552 ¹
Não	24 (70,5)	49 (75,4)	16 (64,0)	
Parceiro(a) sexual estável				
Sim	18 (52,9)	33 (50,8)	15 (60,0)	0,734 ¹
Não	16 (47,1)	32 (49,2)	10 (40,0)	
Nº de parceiras sexuais femininas ao longo da vida				
Média (DP)	15,4 (18,9)	12,2 (29,4)	8,4 (9,3)	0,017 ³
Mediana (mín-máx)	7,0 (0-90)	2,5 (0-200)	4,0 (0-25)	
Nº de parceiros sexuais masculinos ao longo da vida				
Média (DP)	0,8 (1,3)	2,2 (1,2)	1 (1,3)	<0,001 ³
Mediana (mín-máx)	0 (0-4)	2 (0-4)	0 (0-3)	
Orientação sexual				
Sem sexo [¶]	0 (0,0)	1 (1,5)	1 (4,0)	<0,001 ²
MSW	22 (64,7)	7 (10,8)	14 (56,0)	
MSM	3 (8,8)	22 (33,8)	4 (16,0)	
MSMW	9 (26,5)	35 (53,8)	6 (24,0)	

DP: desvio padrão; Mín: valor mínimo; Máx: valor máximo.

¹ Teste de Qui-quadrado; ² Teste exato de Fisher; ³ Teste de Kruskal-Wallis.

* Homens autodeclarados como Asiáticos, Ameríndios ou Nativos do Alasca, Mexicanos ou outras raças não incluídas no questionário.

[§] Incluso divorciados/separados ou viúvos.

[¶] Homens que reportaram nenhuma atividade sexual penetrativa com homens ou mulheres.

MSW, homens que fazem sexo com mulheres; MSM, homens que fazem sexo com homens; MSMW, homens que fazem sexo com homens e mulheres.

4.2 PREVALÊNCIA DAS VARIANTES DE HPV-16

Em 10 amostras provenientes de nove homens não foi possível realizar a classificação das variantes genéticas de HPV-16 devido à ausência de amplificação dos fragmentos da LCR na PCR (Figura 7) e por isso, foi realizada a análise da perda dessas amostras que está apresentada na Tabela 6. Não foi identificado perdas significativas na maioria das características sociodemográficas dos homens que não tiveram amostras de canal classificadas em variantes de HPV-16. No entanto, foi observado que em relação à escolaridade, os nove homens possuíam ≥ 12 anos de estudo ($p < 0,001$) e relativo à orientação sexual 88,9% (8/9) dos homens que não foram incluídos no estudo eram MSW e 11,1% (1/9) MSM ($p = 0,005$).

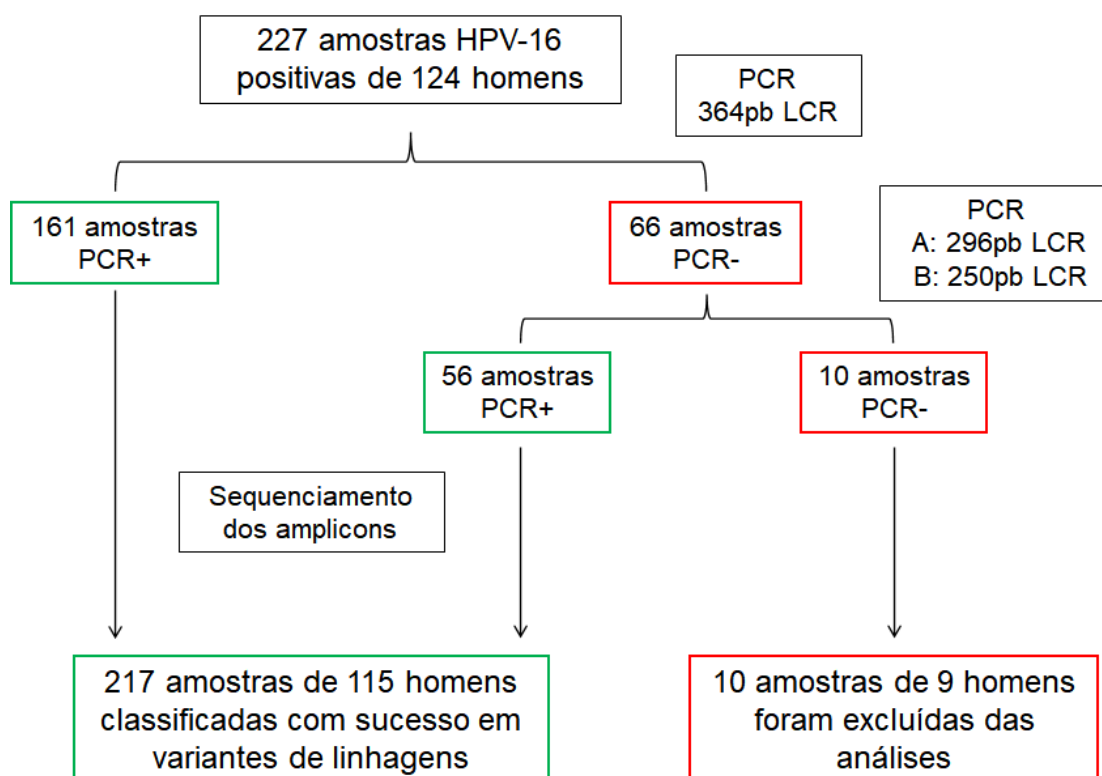


Figura 7 – Fluxograma da análise das amostras de canal anal dos participantes do estudo HIM incluídos neste estudo para caracterização de variantes genéticas de HPV-16.

Tabela 6 – Características sociodemográficas dos homens cujas amostras de canal anal foram classificadas ou não em variantes genéticas de HPV-16 (análise de perdas).

Características	Não classificado (N = 9) n (%)	Classificado (N = 115) n (%)	valor p
Idade			
≤ 30 anos	5 (55,6)	63 (54,8)	0,999 ¹
31-44 anos	3 (33,3)	38 (33,0)	
≥ 45 anos	1 (11,1)	14 (12,2)	
Média (DP)	33,3 (11,3)	32,4 (10,0)	0,736 ²
Mediana (mín-máx)	29 (19-55)	28 (18-63)	
País			
Brasil	2 (22,2)	63 (54,8)	0,146 ¹
México	3 (33,3)	22 (19,1)	
Estados Unidos	4 (44,4)	30 (26,1)	
Raça			
Branços	6 (66,7)	63 (55,3)	0,894 ¹
Pretos/Mulatos	1 (11,1)	18 (15,8)	
Misto/Outras raças*	2 (22,2)	33 (28,9)	
Etnia			
Hispanicos	4 (50,0)	47 (41,2)	0,718 ¹
Não-Hispanicos	4 (50,0)	67 (58,8)	
Estado civil			
Solteiros, nunca casados [§]	7 (77,8)	87 (75,7)	0,999 ¹
Casados/morando juntos	2 (22,2)	28 (24,3)	
Escolaridade			
< 12 anos	0 (0,0)	16 (13,9)	<0,001 ¹
≥ 12 anos	9 (100,0)	99 (86,1)	
Tabagista atual			
Sim	2 (22,2)	33 (28,7)	0,999 ¹
Não	7 (77,8)	82 (71,3)	
Orientação sexual			
Sem sexo [¶]	0 (0,0)	2 (1,7)	0,005 ¹
MSW	8 (88,9)	35 (30,4)	
MSM	1 (11,1)	28 (24,3)	
MSMW	0 (0,0)	50 (43,5)	

continua

Conclusão Tabela 6 – Características sociodemográficas dos homens cujas amostras de canal anal foram classificadas ou não em variantes genéticas de HPV-16 (análise de perdas).

Características	Não classificado (N = 9)		Classificado (N = 115)		valor p
		n (%)		n (%)	
Parceiro(a) sexual estável	Sim	4 (44,4)	62 (53,9)		0,733 ¹
	Não	5 (55,6)	53 (46,1)		
Nº de parceiras sexuais femininas ao longo da vida	Média (DP)	14,6 (15,4)	12,2 (24,4)		0,142 ²
	Mediana (mín-máx)	9 (0-50)	5 (0-200)		
Nº de parceiros sexuais masculinos ao longo da vida	Média (DP)	0,4 (1,3)	1,6 (1,4)		0,012 ²
	Mediana (mín-máx)	0 (0-4)	2 (0-4)		

DP: desvio padrão; Mín: valor mínimo; Máx: valor máximo.

¹ Teste de Qui-quadrado; ² Teste exato de Fisher.

* Homens autodeclarados como Asiáticos, Ameríndios ou Nativos do Alasca, Mexicanos ou outras raças não incluídas no questionário.

§ Incluso divorciados/separados ou viúvos.

[†] Homens que reportaram nenhuma atividade sexual penetrativa com homens ou mulheres.

MSW, homens que fazem sexo com mulheres; MSM, homens que fazem sexo com homens; MSMW, homens que fazem sexo com homens e mulheres.

Em relação aos 115 homens em que foi possível obter a amplificação dos fragmentos da PCR com sucesso, foi realizada a análise da prevalência das diferentes variantes de linhagens e sublinhagens de HPV-16 estratificadas por país (Tabela 7).

De modo geral, as variantes da linhagem A foram as mais prevalentes no canal anal dos homens dos três países (85,8%, 103/120), seguido pelas variantes das linhagens B/C (7,5%, 9/120) e D (6,7%, 8/120). Embora não tenham sido observadas diferenças estatisticamente significativas, a prevalência de variantes das linhagens Não-A (B, C e D) de HPV-16 foi maior nos homens do Brasil em comparação com as demais localidades. Variantes da sublinhagem A1 foram as mais prevalentes em todos os países (83,9%, 94/112), e foi observada uma maior diversidade de sublinhagens de HPV-16 no canal anal de homens do Brasil em comparação com o observado nos homens dos EUA e México (Tabela 7). Além disso, em cinco homens do Brasil foram detectadas diferentes variantes de sublinhagens de HPV-16 ao longo das visitas de seguimento como apresentado na Tabela 8.

Tabela 7 – Prevalência das linhagens e sublinhagens de variantes de HPV-16, por país.

	EUA (N = 30)	Brasil (N = 68)	México (N = 22)	Total (N = 120)	valor p
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Linhagens					
A	27 (90,0)	55 (80,8)	21 (95,5)	103 (85,8)	0,414 ¹
B/C	1 (3,3)	8 (11,8)	0 (0,0)	9 (7,5)	
D	2 (6,7)	5 (7,4)	1 (4,5)	8 (6,7)	
Linhagens					
A	27 (90,0)	55 (80,8)	21 (95,5)	103 (85,8)	0,196 ¹
Não-A	3 (10,0)	13 (19,2)	1 (4,5)	17 (14,2)	
	EUA (N = 27)	Brasil (N = 66)	México (N = 19)	Total (N = 112)	valor p
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Sublinhagens					
A1	23 (85,2)	52 (78,9)	19 (100,0)	94 (83,9)	0,721 ¹
A2	0 (0,0)	1 (1,5)	0 (0,0)	1 (0,9)	
A4	1 (3,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,9)	
B1	1 (3,7)	1 (1,5)	0 (0,0)	2 (1,8)	
C1	0 (0,0)	6 (9,1)	0 (0,0)	6 (5,4)	
C2	0 (0,0)	1 (1,5)	0 (0,0)	1 (0,9)	
D1	0 (0,0)	1 (1,5)	0 (0,0)	1 (0,9)	
D2	1 (3,7)	1 (1,5)	0 (0,0)	2 (1,8)	
D3	1 (3,7)	3 (4,5)	0 (0,0)	4 (3,5)	

¹ Teste exato de Fisher.

Tabela 8 – Amostras de canal anal provenientes de cinco homens do Brasil incluídos no estudo em que foi detectado DNA de variantes de diferentes sublinhagens de HPV-16 durante as visitas de seguimento.

Participante	v1	v3	v4	v5	v6	v7	v8
# 1		C2	C2	A1			
# 2	A1	D3	D3	D3	D3	D3	D3
# 3	A1		D3				
# 4		B1	B1		A1		
# 5				A1	D2		

Foram detectadas variantes de todas as linhagens de HPV-16 nos participantes com idade entre 18 e 44 anos, ao passo que nos homens com idade igual ou superior a 45 anos foram detectadas somente variantes das linhagens A e B/C. Maior prevalência de variantes das linhagens Não-A (22,3%, 4/18) foi observada entre os homens autodeclarados como Pretos/Mulatos em comparação com homens autodeclarados Brancos ou de outras raças, sendo a maioria por variantes das linhagens B/C (75%, 3/4).

As variantes das linhagens Não-A também foram predominantemente detectadas em homens solteiros (16,4%, 15/92), com escolaridade igual ou superior a 12 anos (14,6%, 15/103) e em homens que reportaram não ser tabagistas (17,3%, 15/87). Vale ressaltar que essas diferenças não atingiram significância estatística (Tabela 9).

Finalmente, em relação aos fatores relacionados ao comportamento sexual, os homens em que foram detectadas as variantes da linhagem A tiveram maior média de parceiras sexuais femininas ao longo da vida (média=12,9) em comparação com aqueles homens infectados com as variantes das linhagens Não-A (média=4,1) ($p=0,031$). Em contraste, homens com o maior número de parceiros sexuais masculinos ao longo da vida tiveram mais casos de infecção pelas variantes das linhagens Não-A (média=2,2). Além disso, apesar de não ter sido observado diferença estatística significativa, as variantes das linhagens Não-A foram detectadas com mais frequência do que as variantes da linhagem A em homens que reportaram não ter parceiros sexuais atuais, em MSM e MSMW (Tabela 9).

Tabela 9 – Características sociodemográficas dos homens incluídos neste estudo estratificados pelas diferentes linhagens de variantes de HPV-16 detectadas nas amostras de canal anal.

Características	Linhagens de HPV-16 [‡]			valor p	Linhagens de HPV-16 [‡]		valor p
	A (N=103) n (%)	B/C (N=9) n (%)	D (N=8) n (%)		A (N=103) n (%)	Não-A (N=17) n (%)	
Idade							
≤ 30 anos	57 (86,4)	5 (7,6)	4 (6,0)	0,867 ¹	57 (86,4)	9 (13,6)	0,695 ⁴
31-44 anos	33 (82,5)	3 (7,5)	4 (10,0)		33 (82,5)	7 (17,5)	
≥ 45 anos	13 (92,9)	1 (7,1)	0 (0,0)		13 (92,9)	1 (7,1)	
Média (DP)	32,3 (10,2)	33,3 (10,0)	32,3 (7,8)	0,926 ²	32,3 (10,2)	32,6 (8,8)	0,702 ³
Mediana (mín-máx)	29 (18-63)	28 (22-51)	31 (24-44)		29 (18-63)	28 (22-51)	
Raça							
Branços	57 (85,1)	6 (8,9)	4 (6,0)	0,296 ¹	57 (85,1)	10 (14,9)	0,469 ¹
Pretos/Mulatos	14 (77,7)	3 (16,6)	1 (5,7)		14 (77,7)	4 (22,3)	
Outras raças*	31 (91,2)	0 (0,0)	3 (8,8)		31 (91,2)	3 (8,8)	
Recusado	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)		1 (100,0)	0 (0,0)	
Etnia							
Hispânicos	43 (87,8)	3 (6,1)	3 (6,1)	0,935 ¹	43 (87,8)	6 (12,2)	0,821 ¹
Não-Hispânicos	59 (84,3)	6 (8,6)	5 (7,1)		59 (84,3)	11 (15,7)	
Recusado	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)		1 (100,0)	0 (0,0)	
Estado civil							
Solteiros, nunca casados [§]	77 (83,6)	8 (8,7)	7 (7,7)	0,654 ¹	77 (83,6)	15 (16,4)	0,184 ¹
Casados/morando juntos	26 (92,8)	1 (3,6)	1 (3,6)		26 (92,8)	2 (7,2)	
Escolaridade							
< 12 anos	15 (88,2)	2 (11,8)	0 (0,0)	0,449 ¹	15 (88,2)	2 (11,8)	0,554 ¹
≥ 12 anos	88 (85,4)	7 (6,7)	8 (7,9)		88 (85,4)	15 (14,6)	
Tabagista atual							
Sim	31 (93,9)	0 (0,0)	2 (6,1)	0,164 ¹	31 (93,9)	2 (6,1)	0,096 ¹
Não	72 (82,7)	9 (10,3)	6 (7,0)		72 (82,7)	15 (17,3)	
Parceiro(a) sexual estável							
Sim	57 (89,1)	4 (6,2)	3 (4,7)	0,579 ¹	57 (89,1)	7 (10,9)	0,205 ¹
Não	46 (82,2)	5 (8,9)	5 (8,9)		46 (82,2)	10 (17,8)	

continua

Conclusão Tabela 9 – Características sociodemográficas dos homens incluídos neste estudo estratificados pelas diferentes linhagens de variantes de HPV-16 detectadas nas amostras de canal anal.

Características	Linhagens de HPV-16 [‡]			valor p	Linhagens de HPV-16 [‡]			
	A (N = 103) n (%)	B/C (N = 9) n (%)	D (N = 8) n (%)		A (N = 103) n (%)	Não-A (N = 17) n (%)	valor p	
Nº de parceiras sexuais femininas ao longo da vida								
Média (DP)	12,9 (25,5)	2,6 (4,2)	5,5 (10,1)	0,087 ¹	12,9 (25,5)	4,1 (7,6)	0,031 ⁴	
Mediana (mín-máx)	5 (0-200)	1 (0-12)	2 (0-30)		5 (0-200)	1,5 (0-30)		
Nº de parceiros sexuais masculinos ao longo da vida								
Média (DP)	1,6 (1,4)	2,7 (0,5)	1,9 (1,6)	0,172 ²	1,6 (1,4)	2,2 (1,3)	0,119 ⁴	
Mediana (mín-máx)	2 (0-4)	3 (2-3)	2,5 (0-4)		2 (0-4)	3 (0-4)		
Orientação sexual								
Sem sexo [¶]	1 (50,0)	1 (50,0)	0 (0,0)	0,092 ¹	1 (50,0)	1 (50,0)	0,161 ¹	
MSW	32 (91,4)	0 (0,0)	3 (8,6)		32 (91,4)	3 (8,6)		
MSM	25 (78,1)	4 (12,5)	3 (9,4)		25 (78,1)	7 (21,9)		
MSMW	45 (88,2)	4 (7,8)	2 (4,0)		45 (88,2)	6 (11,8)		

DP: desvio padrão; Mín: valor mínimo; Máx: valor máximo.

¹ Teste exato de Fisher; ² Teste de Kruskal-Wallis; ³ Teste de Qui-quadrado; ⁴ Teste de Mann-Whitney.

[‡] Os cinco homens do Brasil em que foram detectadas diferentes variantes de HPV-16 ao longo das visitas de seguimento foram contabilizados duas vezes.

* Homens autodeclarados como Asiáticos, Ameríndios ou Nativos do Alasca, Mexicanos ou outras raças não incluídas no questionário.

[§] Incluso divorciados/separados ou viúvos.

[¶] Homens que reportaram nenhuma atividade sexual penetrativa com homens ou mulheres.

MSW, homens que fazem sexo com mulheres; MSM, homens que fazem sexo com homens; MSMW, homens que fazem sexo com homens e mulheres.

4.3 PERSISTÊNCIA DAS VARIANTES DE HPV-16

A distribuição das diferentes linhagens de variantes de HPV-16 foi semelhante entre os 43 e 77 casos de infecções persistentes e transientes, respectivamente. As variantes da linhagem A foram as mais prevalentemente detectadas em ambos os casos de infecção persistente e transiente (Tabela 10). Quando estratificadas por país de origem, todas as infecções persistentes no canal anal dos homens dos EUA e México eram casos de variantes da linhagem A, enquanto 13,7% e 7,0% das infecções persistentes em homens do Brasil foram por variantes das linhagens B/C e D, respectivamente.

No entanto, apesar de não terem sido observadas diferenças estatisticamente significativas em relação à frequência das diferentes linhagens de variantes de HPV-16

nas infecções persistentes e transientes quando a população foi estratificada por país, etnia ou idade, foi observada maior prevalência de infecções transientes por variantes das linhagens Não-A entre homens não-Hispânicos em comparação aos homens Hispânicos. Ademais, variantes das linhagens Não-A foram mais prevalentes entre homens mais jovens (≤ 30 anos) nos casos de infecções transientes. Em relação à orientação sexual, foi observado que variantes das linhagens Não-A (27,8%, 5/18) foram significativamente mais prevalentes em MSM com infecções transientes em comparação com MSW (10,7%, 3/28) e MSMW (9,7%, 2/30) ($p=0,033$) (Tabela 10).

Tabela 10 – Persistência e transiência das infecções por variantes das linhagens de HPV-16 no canal anal dos homens participantes do estudo HIM, por país, etnia, idade e orientação sexual.

	Persistente			Transiente			Persistente			Transiente	
	A (N = 103) n (%)	B/C (N = 9) n (%)	D (N = 8) n (%)	A (N = 103) n (%)	B/C (N = 9) n (%)	D (N = 8) n (%)	A (N = 103) n (%)	Não-A (N = 17) n (%)	A (N = 103) n (%)	Não-A (N = 17) n (%)	
TOTAL	37 (86,1)	4 (9,3)	2 (4,6)	66 (85,7)	5 (6,5)	6 (7,8)	37 (86,1)	6 (13,9)	66 (85,7)	11 (14,3)	
País											
Estados Unidos	6 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	21 (87,5)	1 (4,1)	2 (8,4)	6 (100,0)	0 (0,0)	21 (87,5)	3 (12,5)	
Brasil	23 (79,3)	4 (13,7)	2 (7,0)	32 (82,0)	4 (10,2)	3 (7,8)	23 (79,3)	6 (20,7)	32 (82,0)	7 (18,0)	
México	8 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	13 (92,8)	0 (0,0)	1 (7,2)	8 (100,0)	0 (0,0)	13 (92,8)	1 (7,2)	
Etnia											
Hispânicos	18 (85,7)	2 (9,5)	1 (4,8)	25 (89,2)	1 (3,6)	2 (7,2)	18 (85,7)	3 (14,3)	25 (89,2)	3 (10,8)	
Não-Hispânicos	19 (86,3)	2 (9,1)	1 (4,5)	40 (83,4)	4 (8,3)	4 (8,3)	19 (86,3)	3 (13,7)	40 (83,4)	8 (16,6)	
Idade											
≤ 30 anos	24 (92,3)	2 (7,7)	0 (0,0)	33 (82,5)	3 (7,5)	4 (10,0)	24 (92,3)	2 (7,7)	33 (82,5)	7 (17,5)	
31 – 44 anos	10 (71,4)	2 (14,3)	2 (14,3)	23 (88,5)	1 (3,8)	2 (7,7)	10 (71,4)	4 (28,6)	23 (88,5)	3 (11,5)	
≥ 45 anos	3 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	10 (90,9)	1 (9,1)	0 (0,0)	3 (100,0)	0 (0,0)	10 (90,9)	1 (9,1)	
Orientação sexual											
MSW	7 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	25 (89,3)	0 (0,0)	3 (10,7)	7 (100,0)	0 (0,0)	25 (89,3)	3 (10,7)	
MSM	12 (85,8)	1 (7,1)	1 (7,1)	13 (72,2)	3 (16,7)	2 (11,1)	12 (85,8)	2 (14,2)	13 (72,2)	5 (27,8)	
MSMW	17 (81,0)	3 (14,3)	1 (4,7)	28 (90,3)	1 (6,5)	1 (3,2)	17 (81,0)	4 (19,0)	28 (90,3)	2 (9,7)	
Sem sexo ¹	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	

Os valores p utilizando teste exato de Fisher ou teste de Qui-quadrado foram $P < 0,02$ para infecções transientes com linhagens A, B/C e D de HPV-16 estratificadas por orientação sexual; $P = 0,03$ para infecções transientes por variantes das linhagens A e Não-A de HPV-16 estratificadas por orientação sexual. Todos os outros valores de $P > 0,05$.

† Homens que reportaram nenhuma atividade sexual penetrativa com homens ou mulheres.

MSW, homens que fazem sexo com mulheres; MSM, homens que fazem sexo com homens; MSMW, homens que fazem sexo com homens e mulheres.

5 DISCUSSÃO

Análises anteriores relativas à prevalência e incidência de HPV's no canal anal de 731, 665 e 634 homens participantes do estudo HIM do Brasil, México e Estados Unidos, respectivamente, revelaram que, embora a diferença não seja estatisticamente significativa, a prevalência de HPV-16 foi maior entre homens dos EUA (4,3%) e do Brasil (3,7%) em comparação com homens do México (1,4%) (Sudenga et al., 2017). Apesar de que maior prevalência e incidência de HPV-16 foram observadas em MSM/MSMW, esse tipo viral é ainda detectado em 10% dos MSW. Ainda mais, foi observado que em homens com detecção de DNA de HPV-16 na região genital tinham maior probabilidade de ter infecções por HPV-16 no canal anal (Pamnani et al., 2016). Esses relatos corroboram a hipótese de que a infecção por HPV pode ocorrer por autoinoculação, uma vez que o DNA de HPV foi detectado no canal anal de homens e mulheres que reportaram não realizar atividades sexuais penetrativas no canal anal. Visto que o HPV-16 é responsável pela maior parte dos tumores de canal anal (Marra et al., 2019; de Martel et al., 2020) e que as variantes genéticas de HPV-16 diferem no risco de desenvolvimento de lesões precursoras e tumores de colo de útero, o objetivo deste estudo foi analisar a prevalência, distribuição e persistência dessas variantes nos participantes do estudo HIM em que foi detectado DNA de HPV-16 nas amostras de canal anal. Até o momento, esse foi o primeiro estudo a avaliar a prevalência e persistência de variantes de HPV-16 no canal anal de homens de maneira prospectiva em uma coorte multicêntrica.

Até o momento, apenas oito estudos avaliaram a prevalência de variantes do HPV-16 no canal anal de homens, dos quais seis examinaram amostras não tumorais obtidas principalmente de MSM/MSMW HIV+, dois analisaram amostras provenientes de homens HIV- que apresentavam lesões no canal anal, e cinco foram realizados em população de homens dos EUA (Xi et al., 1993; 1998; da Costa et al., 2002; Tanzi et al., 2009; Steinau et al., 2010; Nicolas-Párraga et al., 2016; Méndez-Martínez et al., 2020; Brim et al., 2021). Apesar das diferentes características das coortes, os achados do presente estudo corroboram com os outros estudos citados, uma vez que neste estudo também foi observado que variantes da linhagem A de HPV-16, principalmente da

sublinhagem A1, foram as mais prevalentes nos três países. Entretanto, diferenças entre os estudos são observadas. Entre os homens do México deste estudo foram detectadas variantes da linhagem A (todas da sublinhagem A1) em quase a totalidade das amostras enquanto em um estudo anterior com amostras de canal anal de homens do México variantes das linhagens B e D foram detectadas respectivamente em 2,5% e 22,5% das amostras de canal anal positivas para HPV-16 (Méndez-Martinez et al., 2020). A detecção de diferentes proporções de variantes das linhagens de HPV-16 em populações de um mesmo país pode ser atribuída à composição da população analisada, uma vez que no presente estudo os homens eram MSM, MSMW ou MSW e todos declararam ser soronegativos para HIV, enquanto no estudo anterior os homens incluídos eram na totalidade MSM HIV positivos.

Em relação aos homens dos Estados Unidos, foram observadas prevalências semelhantes das variantes das linhagens Não-A (B, C e D) neste e em outros estudos, dos quais um englobando também amostras com citologia normal e outro com amostras de lesão de canal anal (da Costa et al., 2002; Brim et al., 2021). Nos três estudos remanescentes com diferentes populações de homens dos EUA, infelizmente não foi possível comparar a prevalência das diferentes variantes de HPV-16 uma vez que em dois deles as variantes foram classificadas como protótipo e não-protótipo baseado nos padrões eletroforéticos empregando-se a metodologia de SSCP (Polimorfismos de conformação de filamento único – *Single Strand Conformation Polymorphism*), e em outro estudo, não foi possível discriminar entre os dados obtidos em homens e mulheres (Xi et al., 1993, 1998; Steinau et al., 2010).

Em relação à prevalência das variantes de HPV-16 em amostras de canal anal de homens do Brasil, variantes de sublinhagens Não-A foram mais comumente detectadas (19,2%) quando comparadas com homens dos EUA (10,0%) e do México (4,5%), além de ter sido observada maior diversidade de variantes detectadas. Embora essa diferença não tenha atingido significância estatística, esse padrão foi semelhante ao observado entre mulheres de São Paulo na análise da prevalência e diversidade de variantes detectadas no colo de útero de mulheres com citologia normal (Sichero et al., 2007a), e até onde se sabe, este é o primeiro estudo que descreve a prevalência e distribuição de variantes de HPV-16 no canal anal de homens do Brasil.

Os fatores de risco para infecção por HPV no canal anal e demais sítios anatômicos são predominantemente associados ao comportamento sexual que aumentam a chance de exposição ao vírus. Os MSM e principalmente MSM HIV+ possuem alto risco de infecção por HR-HPV e persistência dessas infecções, logo, aumentando o risco de desenvolvimento de lesões precursoras e câncer no canal anal que são em sua maioria associadas à infecção persistente por HPV-16. Ademais, infecções por variantes das sublinhagens Não-A estão associadas com um maior risco de desenvolvimento de lesões de alto grau na cérvix uterina (Villa et al., 2000; Sichero et al., 2007a). No presente estudo, as variantes de linhagens Não-A de HPV-16 foram mais comumente detectadas em MSM (21,9%) em comparação com MSMW (11,8%) e MSW (8,6%), embora estes dados não sejam estatisticamente significativos. Esses achados podem ser atribuídos ao fato de que maior proporção de MSM (33,8%) foram recrutados no Brasil, em comparação aos Estados Unidos (8,8%) e México (16,0%) ($p < 0.001$). Interessantemente, variantes das linhagens Não-A foram mais comumente detectadas em homens que reportaram maior número de parceiros sexuais masculinos enquanto nos homens que reportaram maior número de parceiras sexuais femininas variantes da linhagem A de HPV-16 foram mais prevalentes.

Variantes da linhagem B de HPV-16 foram detectadas em maior proporção em mulheres norte-americanas com ancestralidade Africana em comparação às mulheres Brancas (Xi et al., 2006). Além disso, foi observado um alto risco de progressão de lesão precursora no colo de útero e câncer de canal anal quando a raça e/ou etnia do indivíduo correspondia à origem das variantes de HPV-16 detectada em homens e mulheres dos EUA (Xi et al., 2006; Brim et al., 2021). No entanto, em populações com ancestralidade mista como o Brasil e a Costa Rica, não foi possível observar a associação entre a prevalência de variantes de HPV-16 e a ancestralidade das mulheres, uma vez que para definir etnia com acurácia nestas populações miscigenadas são necessários ensaios genéticos de ancestralidade (Hildesheim et al., 2001; Sichero et al., 2007b; Junes-Gill et al., 2008). No presente estudo, foi observada maior prevalência de variantes das linhagens B/C no canal anal de homens autodeclarados Pretos/Mulatos (16,6%) em comparação com os homens autodeclarados Brancos (8,9%), embora essa diferença não foi estatisticamente significativa, foi semelhante ao observado em outros estudos que não identificaram correlação entre ancestralidade e a prevalência das diferentes variantes das linhagens de HPV-16 em amostras de canal anal (Xi et al., 1998; da Costa et al., 2002).

O processo carcinogênico no canal anal associado com a infecção por HR-HPV requer etapas semelhantes ao estabelecido para a tumorigênese da cérvix uterina. Assim, é necessário o estabelecimento da infecção persistente por HR-HPV, desenvolvimento de lesões precursoras, de neoplasia intraepitelial e, por fim, do carcinoma invasivo. Foi observado na coorte de homens do estudo HIM maior proporção de infecções transientes no canal anal por HPV-16 em MSW, ao contrário de MSM e MSMW que tiveram maior proporção de infecções persistentes por HPV-16 no canal anal (Nyitray et al., 2016). Nestes casos, ressalta-se a importância da análise intratípica de HPV-16 para distinguir entre infecções persistentes e transientes consecutivas por diferentes variantes genéticas. De fato, no presente estudo diferentes sublinhagens de variantes de HPV-16 foram detectadas em diferentes visitas de seguimento em cinco homens do Brasil (Tabela 8). Mudança da variante genética de HPV-16 no canal anal de homens também foi relatada em cinco homens HIV+ provenientes de um estudo dos Estados Unidos (Steinau et al., 2010). Vale ressaltar, entretanto, que em uma pequena parcela de casos a detecção de uma mesma variante ao longo do tempo não necessariamente designa a persistência da infecção, uma vez que pode ocorrer a reaquisição da mesma variante durante um novo evento de exposição em um mesmo indivíduo.

Neste estudo, observou-se que todas as infecções persistentes no canal anal de homens dos EUA e México foram casos de variantes da linhagem A, em comparação aos homens do Brasil onde 25,2% dos casos foram atribuídos as variantes das linhagens Não-A. Uma vez que estes dados não atingiram diferença estatisticamente significativa, essas diferenças poderiam apenas refletir que as variantes de linhagens Não-A foram mais comumente detectadas no canal anal dos homens do Brasil. Quando estratificados por orientação sexual, observou-se também alta prevalência de variantes das linhagens Não-A em MSM com infecções transientes por HPV-16 no canal anal. Outros estudos são necessários para compreender o significado desses achados e a relação destes com o desfecho clínico. Nenhuma outra diferença significativa foi observada em relação à detecção das diferentes variantes de linhagens de HPV-16 nos casos de infecções transientes e persistentes quando estratificados por país, etnia ou idade, corroborando os achados de Xi et al. (2006) que também não observaram diferenças na prevalência das variantes de HPV-16 nas infecções persistentes no canal anal em relação às variáveis sociodemográficas em homens dos Estados Unidos.

Ainda não foram estabelecidas políticas públicas de rastreamento de lesões precursoras ou câncer em estágio inicial no canal anal da população em geral, como é estabelecido para mulheres em relação ao rastreamento do câncer do colo do útero. Atualmente, no Brasil, o rastreamento do câncer de cérvix uterina é oferecido a mulheres ou qualquer pessoa que tenha colo do útero na faixa etária de 25 a 64 anos e/ou qualquer idade uma vez que já iniciada a atividade sexual (Brasil, 2016). A implementação dessa diretriz foi baseada nos estudos da história natural da doença associada à infecção por HPV. A metodologia de rastreio utilizada no Brasil é o exame citopatológico do colo de útero (teste de Papanicolaou), e segundo a OMS, reduz de 60 a 90% a incidência do câncer cervical invasivo quando ocorre a cobertura de, no mínimo, 80% da população alvo e é realizado o tratamento eficiente quando identificadas as lesões precursoras (WHO, 2021). Sabe-se que a maioria dos carcinomas de células escamosas do canal anal está associado à infecção por HPV e que a história natural do desenvolvimento desses tumores ocorre de forma semelhante ao observado na cérvix uterina (Young et al., 2020). Além disso, os tumores de canal anal se apresentam assintomáticos nos estágios iniciais e por isso, são diagnosticados tardiamente. Por consequência desse cenário se faz necessário abordagens terapêuticas mais intensas gerando um aumento de morbidade dos pacientes acometidos com essa doença. Sendo assim, mais estudos robustos acerca da história natural da infecção por HPV e a sua relação com desenvolvimento de tumores de canal anal são necessários para que o rastreamento seja implementado na população em geral e seja possível a identificação de lesões precursoras de forma precoce, aumentando a sobrevida destes pacientes.

Os estudos acerca das diferentes variantes genéticas de HPVs refletem importantes acréscimos no conhecimento da história natural da infecção e mecanismos biológicos que respaldam no status de infecção. Os primeiros relatos das variantes de HPV-16 indicaram a coevolução do HPV com seu hospedeiro, evolução e especiação de cada variante viral de acordo com a região geográfica. De fato, a classificação inicial de variantes de HPV-16 foi dividida em cinco ramos diferentes nomeados pela localização geográfica da origem da maior parte dos isolados contidos nestes ramos foram detectados. Com o avanço do sequenciamento das variantes genéticas de HPV em diferentes continentes e em populações maiores se constatou que de fato as variantes de HPV-16 refletem movimentos migratórios de populações ao longo dos séculos (Yamada et al., 1997; Villa et al., 2000; Bernard, 2005; Clifford et al., 2019). As diferentes variantes de

HPV-16 apresentam diferentes riscos no desenvolvimento de lesões precursoras e câncer na cérvix uterina e canal anal. De maneira geral, variantes das linhagens B, C e D estão associadas ao maior risco no desenvolvimento de alterações clínicas malignas e infecções com essas variantes possuem uma tendência maior de serem persistentes em comparação com infecções pelas variantes da linhagem A (Ferenczy; Franco, 2002). Dessa forma, os resultados deste estudo contribuem para o conhecimento da primeira etapa da história natural das infecções por variantes genéticas de HPV-16 no canal anal de homens.

Apesar deste ser um estudo com coorte multicêntrica e multinacional, do número amostral ser relativamente grande em comparação aos outros estudos previamente realizados e o tempo de acompanhamento ser longo, este estudo apresenta algumas limitações. A mais importante é em relação ao pequeno número de amostras que constitui uma limitação relevante na capacidade de detecção de associações significativas entre as variantes de HPV e as características sociodemográficas ou mesmo em relação ao status de infecção. Embora a análise de perdas tenha demonstrado que a exclusão de nove participantes do estudo não impactou significativamente a distribuição das variantes de linhagem de HPV-16 na maioria das características sociodemográficas, ainda sim foi observado que a exclusão destes participantes repercutiu na escolaridade e na orientação sexual. Especialmente em relação às perdas na categoria de orientação sexual, a exclusão de oito MSW pode ter influenciado nas análises posteriores de prevalência e persistência das diferentes variantes de HPV-16 em comparação com ao observado nos demais grupos (MSM e MSMW).

A segunda limitação se refere ao desenho do estudo HIM que excluiu homens que tinham histórico de lesões anogenitais, uma vez que verrugas anogenitais foram diagnosticadas somente em 6,3% dos MSM e 4,0% dos MSW (Nyitray et al., 2011). Entre esses casos, as verrugas perianais e na borda anal foram identificadas em menos de 1% de MSW e MSM, o que impossibilitou determinar se as variantes de HPV-16 estavam associadas a diferentes riscos de desenvolvimento de lesões. Até o momento, apenas três estudos conduzidos nos EUA relataram a associação entre variantes específicas de HPV-16 e o desenvolvimento de neoplasias no canal anal, porém os resultados divergem entre si. Sucintamente, enquanto o estudo de Xi et al. (1998) revelou que variantes não-protótipo (excluindo as variantes da sublinhagem A1-3 na nomenclatura moderna) estavam fortemente associadas ao desenvolvimento de carcinoma *in situ* no canal anal em

MSM HIV+, os achados de da Costa et al. (2002) indicaram um alto risco de desenvolvimento de neoplasias de alto grau no canal anal de homens e mulheres HIV+/HPV+ associados à detecção de variantes com mudança no nucleotídeo A131G (detectado em variantes das linhagens A e B). Ademais, em um estudo recente Brim et al. (2021) foi reportado a associação entre a infecção por variantes da linhagem B de HPV-16 e o aumento do risco de desenvolvimento de câncer do canal anal em indivíduos Afro-Americanos. Tais achados discrepantes podem ser atribuídos ao menos em parte, às características de confusão de cada coorte, algumas das quais são difíceis de mensurar.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos dados acrescentam consideravelmente aos relatos anteriores que indicam que globalmente as variantes de HPV-16 são distribuídas de forma desigual. Embora seja possível hipotetizar que, como observado no colo do útero das mulheres, variantes específicas de HPV-16 também poderiam estar associadas ao aumento do risco de neoplasia de canal anal em homens, na população estudada não foi observada associação significativa entre a detecção de linhagens de variantes de HPV-16 e a persistência da infecção, que constitui um passo anterior necessário para o desenvolvimento de lesões no canal anal associada ao HPV. Mais estudos são necessários para melhor compreender o impacto da variabilidade genética do HPV-16 no desenvolvimento desses tumores em homens.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Agarwal SS, Sehgal A, Sardana S, Kumar A, Luthra UK. Role of male behavior in cervical carcinogenesis among women with one lifetime sexual partner. *Cancer*. 1993;72(5):1666-1669.

Bartelink H, Roelofsen F, Eschwege F, et al. Concomitant radiotherapy and chemotherapy is superior to radiotherapy alone in the treatment of locally advanced anal cancer: results of a phase III randomized trial of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Radiotherapy and Gastrointestinal Cooperative Groups. *Journal of Clinical Oncology*. 1997;15:2040-9.

Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *Journal of Clinical Virology*. 2005;32 Suppl 1:S1-S6.

Bettampadi D, Sirak BA, Fulp WJ, Abrahamsen M, Villa LL, Lazcano-Ponce E, Salmeron J, Isaacs-Soriano KA, Baggio ML, Trenado MQ, Giuliano AR. Oral HPV prevalence assessment by Linear Array vs. SPF10 PCR-DEIA-LiPA25 system in the HPV Infection in Men (HIM) study. *Papillomavirus Research*. 2020;9:100199.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Divisão de Detecção Precoce e Apoio à Organização de Rede. Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero. – 2. ed. rev. atual. – Rio de Janeiro: INCA, 2016.

Brim H, Mirabello L, Bass S, Ford DH, Carethers JM, Ashktorab H. Association of Human Papillomavirus Genotype 16 Lineages With Anal Cancer Histologies Among African Americans. *Gastroenterology*. 2021;160(3):922-924.

Buck CB, Cheng N, Thompson CD, Lowy DR, Steven AC, Schiller JT, Trus BL. Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. *Journal of Virology*. 2008;82(11):5190-7.

Burchell AN, Winer RL, de Sanjosé S, Franco EL. Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine*. 2006;24 Suppl 3:S3/52-61.

Castellsagué X, Ghaffari A, Daniel RW, Bosch FX, Munoz N, Shah KV. Prevalence of penile human papillomavirus DNA in husbands of women with and without cervical neoplasia: a study in Spain and Colombia. *Journal of Infectious Disease*. 1997;176(2):353-361.

Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N, Meijer C, Shah KV, Sanjosé S, Eluf-Neto J, Ngelangel CA, Chichareon S, Smith JS, Herrero R, Moreno V, Franceschi S. Male circumcision, penile human papillomavirus infection, and cervical cancer in female partners. *The New England Journal of Medicine*. 2002;346(15):1105-1112.

Clifford GM, Tenet V, Georges D, Alemany L, Pavón MA, Chen Z, Yeager M, Cullen M, Boland JF, Bass S, Steinberg M, Raine-Bennett T, Lorey T, Wentzensen N, Walker J, Zuna R, Schiffman M, Mirabello L. Human papillomavirus 16 sub-lineage dispersal and cervical cancer risk worldwide: Whole viral genome sequences from 7116 HPV16-positive women. *Papillomavirus Research*. 2019;7:67-74.

Cohen PA, Jhingran A, Oaknin A, Denny L. Cervical cancer. *Lancet*. 2019;393(10167):169-182.

Cornet I, Bouvard V, Campo MS, Thomas M, Banks L, Gissmann L, Lamartine J, Sylla BS, Accardi R, Tommasino M. Comparative analysis of transforming properties of E6 and E7 from different beta human papillomavirus types. *Journal of Virology*. 2012;86(4):2366-2370.

Da Costa MM, Hogeboom CJ, Holly EA, Palefsky JM. Increased risk of high-grade anal neoplasia associated with a human papillomavirus type 16 E6 sequence variant. *Journal of Infectious Diseases*. 2002;185(9):1229-37.

de Martel C, Georges D, Bray F, Ferlay J, Clifford GM. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *Lancet Global Health*. 2020;8(2):e180-e190.

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

Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Reviews in Medical Virology*. 2015;25 Suppl 1:2-23.

Duensing S, Münger K. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein can induce abnormal centrosome duplication through a mechanism independent of inactivation of retinoblastoma protein family members. *Journal of Virology*. 2003;77:12331-12335.

Dyson N, Howley PM, Münger K, Harlow E. The human papillomavirus 16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*. 1989;243(4893):934-937.

Egawa N, Egawa K, Griffin H, Doorbar J. Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. *Viruses*. 2015;7(7):3863-90.

Egawa N, Doorbar J. The low-risk papillomaviruses. *Virus Research*. 2017;231:119-127.

Ferreira MT, Giulia Gonçalves M, Mendoza López RV, Sichero L. Genetic variants of HPV-16 and their geographical and anatomical distribution in men: A systematic review with meta-analysis. *Virology*. 2021;558:134-144.

Ferenczy A, Franco E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *The Lancet Oncology*. 2002;3(1):11-16.

Franco EL, Villa LL, Ruiz A, Costa MC. Transmission of cervical human papillomavirus infection by sexual activity: differences between low and high oncogenic risk types. *Journal of Infectious Diseases*. 1995;172(3):756-763.

Gargano, J., Meites, E., Watson, M., Unger, E., Markowitz, L., & Background, I. Manual for the surveillance of vaccine-preventable diseases. Chapter 5: Human Papillomavirus, 2017.

Gissman L, zur Hausen H. Human papillomaviruses: physical mapping and genetic heterogeneity. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 1976;73(4):1310-1313.

Giuliano AR, Lazcano-Ponce E, Villa LL, Flores R, Salmeron J, Lee JH, Papenfuss MR, Abrahamsen M, Jolles E, Nielson CM, Baggio ML, Silva R, Quiterio M. The human papillomavirus infection in men study: human papillomavirus prevalence and type distribution among men residing in Brazil, Mexico, and the United States. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2008;17(8):2036-2043.

Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlée F, Hildesheim A, Schiffman MH, Scott DR, Apple RJ. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000;38(1):357-61.

Green MR, Sambrook J. Molecular cloning. A Laboratory Manual 4th, 2012.

Gross-Mesilaty S, Reinstein E, Bercovich B, Tobias KE, Schwartz AL, Kahana C, Ciechanover A. Basal and human papillomavirus E6 oncoprotein-induced degradation of Myc proteins by the ubiquitin pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1998;95:8058-8063.

Hernandez BY, Wilkens LR, Zhu X, Thompson P, McDuffie K, Shvetsov YB, Kamemoto LE, Killeen J, Ning L, Goodman MT. Transmission of human papillomavirus in heterosexual couples. *Emerging Infectious Diseases*. 2008;14(6):888-894.

Hildesheim A, Schiffman M, Bromley C, Wacholder S, Herrero R, Rodriguez A, Bratti MC, Sherman ME, Scarpidis U, Lin QQ, Terai M, Bromley RL, Buetow K, Apple RJ, Burk RD. Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. *Journal of National Cancer Institute*. 2001;93(4):315-8.

Ho L, Chan SY, Burk RD, Das BC, Fujinaga K, Icenogle JP, Kahn T, Kiviat N, Lancaster W, Mavromara-Nazos P, Labropoulou V, Mitrani-Rosenbaum S, Norrild B, Pillai MR, Stoerker J, Syrjaenen K, Syrjaenen S, Tay S, Villa LL, Wheeler CM, Williamson AL, Bernard HU. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *Journal of Virology*. 1993;67(11):6413-6423.

Hoff PM, Coudry R, Moniz CM. Pathology of Anal Cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America*. 2017;1:57-71.

Howlander N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2022. Atlanta, Ga: American Cancer Society, 2021.

IARC Working Group. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, v.100B, 2012.

IARC World Health Organization. International Agency for Research on Cancer <<http://gco.iarc.fr>> acessado em dezembro de 2020.

Iftner T, Elbel M, Schopp B, Hiller T, Loizou JI, Caldecott KW, Stubenrauch F. Interference of papillomavirus E6 protein with single-strand break repair by interaction with XRCC1. *The EMBO Journal*. 2002;21:4741-4748.

Junes-Gill K, Sichero L, Maciag PC, Mello W, Noronha V, Villa LL. Human papillomavirus type 16 variants in cervical cancer from an admixed population in Brazil. *Journal of Medical Virology*. 2008;80(9):1639-45.

Krzowska-Firych J, Lucas G, Lucas C, Lucas N, Pietrzyk Ł. An overview of Human Papillomavirus (HPV) as an etiological factor of the anal cancer. *Journal of Infection and Public Health*. 2019;1:1-6.

Lee SS, Glaunsinger B, Mantovani F, Banks L, Javier RT. Multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cellular target for both adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus type 18 E6 oncoproteins. *Journal of Virology*. 2000;74:9680-9693.

Libera L, Almeida de Carvalho P, Enocencio Porto Ramos J, Oliveira Cabral A, de Cassia Goncalves de Alencar R, Villa LL, Alves RRF, Rabelo Santos SH, Aparecida Dos Santos Carneiro M, Saddi VA. Human Papillomavirus and Anal Cancer: Prevalence, Genotype Distribution, and Prognosis Aspects from Midwestern Region of Brazil. *Journal of Oncology*. 2019;18:6018269.

Marra E, Lin C, Clifford GM. Type-Specific Anal Human Papillomavirus Prevalence Among Men, According to Sexual Preference and HIV Status: A Systematic Literature Review and Meta-Analysis. *Journal of Infectious Diseases*. 2019;219(4):590-598.

Méndez-Martínez R, Maldonado-Frías S, Vázquez-Vega S, Caro-Vega Y, Rendón-Maldonado JG, Guido-Jiménez M, Crabtree-Ramírez B, Sierra-Madero JG, García-Carrancá A. High prevalent human papillomavirus infections of the oral cavity of asymptomatic HIV-positive men. *BMC Infectious Diseases*. 2020;20(1):27.

Mirabello L, Yeager M, Cullen M, Boland JF, Chen Z, Wentzensen N, Zhang X, Yu K, Yang Q, Mitchell J, Roberson D, Bass S, Xiao Y, Burdett L, Raine-Bennett T, Lorey T, Castle PE, Burk RD, Schiffman M. HPV16 Sublineage Associations With Histology-Specific Cancer Risk Using HPV Whole-Genome Sequences in 3200 Women. *Journal of the National Cancer Institute*. 2016;108(9):djw100.

Mirabello L, Clarke MA, Nelson CW, Dean M, Wentzensen N, Yeager M, Cullen M, Boland JF; NCI HPV Workshop, Schiffman M, Burk RD. The Intersection of HPV Epidemiology, Genomics and Mechanistic Studies of HPV-Mediated Carcinogenesis. *Viruses*. 2018;10(2):80.

Moscicki AB, Hills N, Shiboski S, Powel K, Jay N, Hanson E, Miller S, Clayton L, Farhat S, Broering J, Darragh T, Palefsky J. Risks for incident human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females. *JAMA*. 2001;285(23):2995-3002.

Nelson V, Benson A. Epidemiology of anal canal cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America*. 2017;26(1) 9-15.

Nicolás-Párraga S, Gandini C, Pimenoff VN, Alemany L, de Sanjosé S, Xavier Bosch F, Bravo IG; RIS HPV TT and HPV VVAP study groups. HPV16 variants distribution in invasive cancers of the cervix, vulva, vagina, penis, and anus. *Cancer Medicine*. 2016;5(10):2909-2919.

Nyitray AG, Carvalho da Silva RJ, Baggio ML, Smith D, Abrahamsen M, Papenfuss M, Lin HY, Quiterio M, Salmerón J, Lazcano-Ponce E, Villa LL, Giuliano AR. Six-month incidence, persistence, and factors associated with persistence of anal human papillomavirus in men: the HPV in men study. *Journal of Infectious Diseases*. 2011;204:1711-22.

Nyitray AG, Carvalho da Silva RJ, Chang M, Baggio ML, Ingles DJ, Abrahamsen M, Papenfuss M, Lin HY, Salmerón J, Quiterio M, Lazcano-Ponce E, Villa LL, Giuliano AR. Incidence, Duration, Persistence, and Factors Associated With High-risk Anal Human Papillomavirus Persistence Among HIV-negative Men Who Have Sex With Men: A Multinational Study. *Clinical of Infectious Diseases*. 2016;62(11):1367-1374.

Ozbun MA, Meyers C. Characterization of late gene transcripts expressed during vegetative replication of human papillomavirus type 31b. *Journal of Virology*. 1997;71(7):5161-72.

Sarcher T, Dupont B, Alves A, Menahem B. Anterior resection syndrome: What should we tell practitioners and patients in 2018? *Journal of Visceral Surgery*. 2018;155:383-391.

Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*. 1993;75(3):495-505.

Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N, de Sanjosé S, Fakhry C, Monk BJ, Stanley MA, Franceschi S. Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nature Reviews Disease Primers*. 2016;2:16086.

Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, Ferreira S, Santos M, Miyamura RA, Duarte-Franco E, Rohan TE, Ferenczy A, Villa LL, Franco EL. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA*. 2001;286(24):3106-14.

Seedorf K, Krämmer G, Dürst M, Suhai S, Röwekamp WG. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology*. 1985;145(1):181-185.

Sichero L, Villa LL. Epidemiological and functional implications of molecular variants of human papillomavirus. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2006;39(6):707-717.

Sichero L, Ferreira S, Trottier H, Duarte-Franco E, Ferenczy A, Franco EL, Villa LL. High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18. *International Journal of Cancer*. 2007a;120(8):1763-1768.

Sichero L, Trottier H, Ferreira S, Duarte-Franco E, Franco EL, Villa LL. Re: Human papillomavirus type 16 and 18 variants: race-related distribution and persistence. *Journal of National Cancer Institute*. 2007b;99(8):653-654.

Sichero L, Giuliano AR, Villa LL. Human Papillomavirus and Genital Disease in Men: What We Have Learned from the HIM Study. *Acta Cytology*. 2019;63(2):109-117.

Smith B, Chen Z, Reimers L, van Doorslaer K, Schiffman M, Desalle R, Herrero R, Yu K, Wacholder S, Wang T, Burk RD. Sequence imputation of HPV16 genomes for genetic association studies. *PLoSOne*. 2011;6:e21375.

Steinau M, Swan DC, Onyekwulje JM, Brooks JT, Vellozzi C, Unger ER, The Sun Study Investigators. Differences and changes in human papillomavirus type 16 variant status in human immunodeficiency virus-positive adults are not uncommon. *Journal of General Virology*. 2010;91(Pt 8):2068-2072.

Sudenga SL, Nyitray AG, Torres BN, Silva R, Villa L, Lazcano-Ponce E, Abrahamsen M, Baggio ML, Salmeron J, Quiterio M, Giuliano AR. Comparison of anal HPV natural history among men by country of residence: Brazil, Mexico, and the United States. *Journal of Infection*. 2017;75:35-47.

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2021;71(3):209-249.

Tanzi E, Amendola A, Bianchi S, Fasolo MM, Beretta R, Pariani E, Zappa A, Frati E, Orlando G. Human papillomavirus genotypes and phylogenetic analysis of HPV-16 variants in HIV-1 infected subjects in Italy. *Vaccine*. 2009;27 Suppl 1:A17-23.

Thomas M, Banks L. Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *Journal of General Virology*. 1999;(80):1513-1517.

Palefsky JM, Rubin M. The epidemiology of anal human papillomavirus and related neoplasia. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*. 2009;36(1):187-200.

Pamnani SJ, Nyitray AG, Abrahamsen M, Rollison DE, Villa LL, Lazcano-Ponce E, Huang Y, Borenstein A, Giuliano AR. Sequential Acquisition of Anal Human Papillomavirus (HPV) Infection Following Genital Infection Among Men Who Have Sex With Women: The HPV Infection in Men (HIM) Study. *Journal of Infectious Diseases*. 2016;214(8):1180-7.

- Van Doorslaer K. Evolution of the papillomaviridae. *Virology*. 2013;445(1-2):11-20.
- Van Doorslaer K, McBride AA. Molecular archeological evidence in support of the repeated loss of a papillomavirus gene. *Scientific reports*.2016;6:33028.
- Van Doorslaer K, Li Z, Xirasagar S, Maes P, Kaminsky D, Liou D, Sun Q, Kaur R, Huyen Y, McBride AA. The Papillomavirus Episteme: a major update to the papillomavirus sequence database. *Nucleic Acids Research*. 2017;45(D1):D499-D506.
- Veldman T, Horikawa I, Barrett JC, Schlegel R. Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *Journal of Virology*. 2001;75:4467–4472.
- Villa LL, Sichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T, Franco EL. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *Journal of General Virology*. 2000;81(Pt 12):2959-2968.
- Xi LF, Demers W, Kiviat NB, Kuypers J, Beckmann AM, Galloway DA. Sequence variation in the noncoding region of human papillomavirus type 16 detected by single-strand conformation polymorphism analysis. *Journal of Infectious Diseases*. 1993;168(3):610-7.
- Xi LF, Critchlow CW, Wheeler CM, Koutsky LA, Galloway DA, Kuypers J, Hughes JP, Hawes SE, Surawicz C, Goldbaum G, Holmes KK, Kiviat NB. Risk of anal carcinoma in situ in relation to human papillomavirus type 16 variants. *Cancer Research*. 1998;58(17):3839-44.
- Xi LF, Kiviat NB, Hildesheim A, Galloway DA, Wheeler CM, Ho J, Koutsky LA. Human papillomavirus type 16 and 18 variants: race-related distribution and persistence. *Journal of the National Cancer Institute*. 2006;98(15):1045-52.
- Wang J, Sampath A, Raychaudhuri P, Bagchi S. Both Rb and E7 are regulated by the ubiquitin-proteasome pathway in HPV-containing cervical tumor cells. *Oncogene*.2001;20(34):4740-4749.
- World Health Organization (WHO). WHO guideline for screening and treatment of cervical pre-cancer lesions for cervical cancer prevention, second edition. Geneva: World Health Organization, 2021.

Yamada T, Manos M, Peto J, Greer CE, Muñoz N, Bosch X, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *Journal of Virology*. 1997;71(3):2463-2472.

Young AN, Jacob E, Willauer P, Smucker L, Monzon R, Ocegüera L. Anal Cancer. *Surgical Clinics of North America*. 2020;100:629-634.

Zuna RE, Moore WE, Shanesmith RP, Dunn ST, Wang SS, Schiffman M, Blakey GL, Teel T. Association of HPV16 E6 variants with diagnostic severity in cervical cytology samples of 354 women in a US population. *International Journal of Cancer*. 2009;125(11):2609-13.

zur Hausen H, Meinhof W, Scheiber W, Bornkamm GW. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Internal Journal of Cancer*. 1974;13(5):650-656.

* De acordo com:

Adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

APÊNDICE A

Súmula curricular – Milena Giulia Gonçalves

Milena Giulia Gonçalves (Gonçalves MG)

1-Formação.

2015-2019 - Graduação Ciências Biológicas, Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG.

2019-2022 - Pós Graduação - Mestrado Acadêmico, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo – ICESP, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP.

2- Histórico profissional, distinções acadêmicas e prêmios.

2.1. Histórico acadêmico

07/2015-07/2019: Estágios ao longo da graduação no Laboratório de Genética Humana e Médica, Universidade Federal de Alfenas, as atividades desenvolvidas tiveram como enfoque o aprimoramento de conceitos dentro da área de Genética Humana e Médica, desenvolvimento de pesquisa científica, realização de seminários e discussões de artigos científicos.

2018-2019: Iniciação científica, projeto intitulado “*Efeito da cisplatina e do ácido tetra-*o*-metil nordihidroguaiarético sobre a proliferação e capacidade clonogênica de linhagens de adenocarcinoma pulmonar de células não pequenas A549 e H1299*”, Laboratório de Genética Humana e Médica na UNIFAL-MG. Orientador: Dr. Angel Maurício Castro Gamero.

02/2019-03/2019: Estágio no Laboratório de Genômica Médica no Centro Internacional de Pesquisa (CIPE) no AC Camargo Cancer Center (ACCCC), São Paulo-SP, sob supervisão do Dr. Emmanuel Dias Neto, Dra. Maria Galli de Amorim e Dra. Thais Bartelli.

07/2019-08/2019: Estágio no Laboratório de Biologia Celular e Oncogenética na Universidade de São Paulo – USP, Ribeirão Preto, sob supervisão da Dra. Maria Sol Brassesco Annichini.

2019-2022: Bolsista durante mestrado acadêmico desenvolvendo o projeto intitulado “*História natural das infecções por variantes genéticas de HPV-16 no canal anal de homens participantes do estudo HIM (HPV infection in men)*” no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo – ICESP, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP.

2.2. Prêmios

Primeiro lugar na categoria *Mestrado Pré-qualificação*, pelo trabalho “*História natural da infecção por variantes genéticas de HPV-16 no canal anal de homens participantes do estudo HIM (HPV in men)*”, durante a XII Jornada da Pós-Graduação em Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP/ Instituto do Câncer do Estado de São Paulo – ICESP, 10/11 de dezembro, 2020.

Primeiro lugar na categoria *Epidemiologia* pelo trabalho “*Prevalence And Persistence Of HPV-16 Variants In The Anal Canal Of Men Participating In The HIM Study (HPV Infection In Men)*”, durante o Congresso Internacional “Next Frontiers to Cure Cancer”, 24-26 de junho, 2021.

Primeiro lugar na categoria *Mestrado Pós-qualificação*, pelo trabalho “*História natural da infecção por variantes genéticas de HPV-16 no canal anal de homens participantes do estudo HIM (HPV in men)*”, durante a XIII Jornada da Pós-Graduação em Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP/ Instituto do Câncer do Estado de São Paulo – ICESP, 24/25 de março, 2022.

3- Lista de até 10 resultados de pesquisa mais relevantes.

1- Gonçalves MG, Ferreira MT, Mendoza López RV, Ferreira S, Sirak B, Baggio ML, Lazcano-Ponce E, Nyitray AG, Giuliano AR, Villa LL, Sichero L. *Prevalence and persistence of HPV-16 molecular variants in the anal canal of men: The HIM Study*, Journal of Clinical Virology, 2022, <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2022.105128>. (FI=3,2).

2- Ferreira MT, Gonçalves MG, Mendoza López RV, Sichero L. *Genetic variants of HPV-16 and their geographical and anatomical distribution in men: A systematic review with meta-analysis*. Virology. 2021 Jun;558:134-144. doi: 10.1016/j.virol.2021.03.007. (FI=3,6; 1 citação).

3- Gonçalves MG; Vasconcellos R. Capítulo *Resistência às terapias* no livro “Oncologia: da molécula à clínica” publicado pela Editora dos Editores em janeiro, 2022.

4- Seleccionada para apresentação oral do trabalho “*Prevalence and persistence of HPV-16 variants in the anal canal of men participating in the HIM study (HPV infection in men)*” durante o Congresso Internacional de Papillomavírus (International Papillomavirus Conference- IPVC), realizado virtualmente de 15-19 de novembro, 2021.

5- Palestrante do tema “*Câncer de Cabeça e Pescoço*” a convite da Comissão Organizadora do 1º Simpósio Desafios em Oncologia Molecular realizado pelo Instituto do Câncer do Estado de São Paulo – ICESP em 06 de março, 2021.

6- Palestrante do tema “*Resistência às terapias*” a convite da Comissão Organizadora do VI Curso de Oncologia Molecular realizado pelo Instituto do Câncer do Estado de São Paulo – ICESP de 19-27 de julho, 2021.

4- Indicadores quantitativos.

4.1. capítulos de livros 1

4.2. publicações em periódicos 2

4.3. apresentação de trabalhos (congresso) 2

4.4. apresentação de trabalhos (simpósio) 5

4.5. participação em eventos (congresso) 11

4.6. participação em eventos (simpósio) 13

5- Link para a página ORCID, MyResearcherID (ISI) ou MyCitations (Google Scholar).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6318-9934>

MyResearcherID: AAG-7972-2022

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/9692308209516994>

6- Outras informações.

03/2016-06/2019: Bolsista da Liga Acadêmica de Oncologia (LAO) da Universidade Federal de Alfenas realizando a extensão de projetos acadêmicos voltados para a comunidade por meio de palestras e ações comunitárias a fim de difundir o conhecimento a pacientes oncológicos.

07/2019: Participação do *V Curso de Inverno de Oncologia Molecular*, no Hospital de Amor em Barretos, com apresentação na forma de painel do trabalho “*Análise fenotípica de linhagens de adenocarcinoma pulmonar e o impacto do tratamento com cisplatina na instabilidade cromossômica*”.

23-28/11/2020: Participação do *XXXI Congresso Brasileiro de Virologia & Encontro de Virologia do Mercosul* realizado online.

10-11/12/2020: Participação da Comissão Organizadora da *XII Jornada da Pós-Graduação em Oncologia* da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP/ Instituto do Câncer do Estado de São Paulo – ICESP, com apresentação oral do trabalho intitulado “*História natural da infecção por variantes genéticas de HPV-16 no canal anal de homens participantes do estudo HIM (HPV in men)*”.

15/09/2021: Participação do curso “*Understanding gene function using CRISPR screening*” realizado pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA).

08/10/2021: Participação do Treinamento *SCOPUS & WEB OF SCIENCE*: base de dados com ferramentas para análises métricas realizado pela Divisão de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP.

20/10/2021: Participação do IPVS Webinar: *HPV behavioral research and the 2030 targets/ Why HPV behavioral research and science matter - The unanswered questions* realizado pela *International Papillomavirus Society*.

21/10/2021: Participação do *Workshop “The BCN HPV Course”* organizado por *Fight AIDS and Infectious Diseases Foundation, through FLS-Science*.

20/11/2021: Participação do *V Workshop LIM 31/HC-FMUSP: Immuno-Onco-Hematology and Immunotherapy* realizado pelo Laboratory of Medical Investigation in Pathogenesis and target therapy in Onco-Immuno-Hematology (LIM/31), Departamento de Hematologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – HCFMUSP.

24-25/03/2022: Participação da Comissão Organizadora da *XIII Jornada da Pós-Graduação em Oncologia* da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP/ Instituto do Câncer do Estado de São Paulo – ICESP, com apresentação oral do trabalho intitulado “*História natural da infecção por variantes genéticas de HPV-16 no canal anal de homens participantes do estudo HIM (HPV in men)*”.

Milena Giulia Gonçalves, graduada em Ciências Biológicas - Bacharelado pela Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG (2019). Realizou iniciação científica desenvolvendo o trabalho intitulado “Efeito da cisplatina e do ácido tetra-*o*-metil nordihidroguaiarético sobre a proliferação e capacidade clonogênica de linhagens de adenocarcinoma pulmonar de células não pequenas” sob orientação do Prof. Dr. Angel Mauricio Castro Gamero. Os resultados deste trabalho foram apresentados na forma de pôster no III Workshop de Pós Graduação em Ciências Biológicas da UNIFAL-MG e no V Curso de Inverno de Oncologia Molecular no Hospital de Amor em Barretos.

Atualmente, é aluna de mestrado acadêmico no laboratório de Biologia Molecular no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo - ICESP pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMUSP desenvolvendo o trabalho intitulado “História natural das infecções por variantes genéticas de HPV-16 no canal anal de homens participantes do estudo HIM (HPV infection in men)” sob orientação da Prof^a. Dr^a. Laura Sicheo e coorientação do Dr. Matthew T. Ferreira. Este trabalho foi apresentado na forma de pôster no Congresso Internacional “Next Frontiers to Cure Cancer” e premiado como melhor trabalho na categoria Epidemiologia (2021). Além disso, foi apresentado oralmente e premiado na XII Jornada da Pós Graduação em Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMUSP/ ICESP (2020). Também foi apresentado oralmente na Conferência Internacional de Papilomavírus (International Papillomavirus Conference - IPVC) (2021).

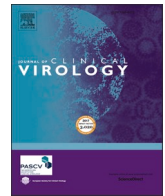
Além disso, durante o mestrado foi coautora da revisão sistemática “Genetic variants of HPV-16 and their geographical and anatomical distribution in men: A systematic review with meta-analysis” publicado no periódico *Virology* em junho de 2021. (<https://doi.org/10.1016/j.virol.2021.03.007>). Foi autora do capítulo “Resistência às terapias” do livro *Oncologia: da molécula à clínica* realizado pela comissão organizadora do VI Curso de Oncologia Molecular do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo – ICESP, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP, e publicado pela Editora dos Editores em janeiro de 2022. Também possui um manuscrito como primeira autora intitulado “Prevalence and persistence of HPV-16 molecular variants in the anal canal of men: The HIM Study” publicado *Journal of Clinical Virology* em março de 2022 (<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2022.105128>).

Ressalto também a participação em diversas atividades discentes, incluindo organização de XII e XIII edição da Jornada da Pós Graduação em Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMUSP/ ICESP em 2020 e 2022, respectivamente. Além de ter participado do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP sob supervisão da Profa. Dra. Lygia da Veiga Pereira Carramaschi.

APÊNDICE B

**Cópia do manuscrito referente ao trabalho desenvolvido no mestrado publicado
em 2022**

Journal of Clinical Virology. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2022.105128>



Prevalence and persistence of HPV-16 molecular variants in the anal canal of men: The HIM study

Milena Giulia Gonçalves^a, Matthew Thomas Ferreira^a, Rossana Veronica Mendoza López^a, Silvaneide Ferreira^a, Bradley Sirak^b, Maria Luiza Baggio^a, Eduardo Lazcano-Ponce^c, Alan G. Nyitray^{d,e}, Anna R. Giuliano^b, Luisa L. Villa^{a,f}, Laura Sichero^{a,*}, for the HIM Study group

^a Center for Translational Research in Oncology, Instituto do Cancer do Estado de São Paulo-ICESP, Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo-FMUSP HC, São Paulo, Brazil

^b Center for Immunization and Infection Research in Cancer, and Department of Cancer Epidemiology, H. Lee Moffitt Cancer Center and Research Institute, Tampa, FL, United States

^c Center for Population Health Research, Instituto Nacional de Salud Pública, Instituto Mexicano del Seguro Social, Cuernavaca, Mexico

^d Center for AIDS Intervention Research, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, Wisconsin, United States

^e Medical College of Wisconsin Cancer Center, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, Wisconsin, United States

^f Department of Radiology and Oncology, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo -FMUSP, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

HPV-16
Genetic variants
HIM study
Prevalence
Persistence
Anal canal

ABSTRACT

Background: HPV-16 causes approximately 90% of anal canal (AC) cancers worldwide. This study aimed to evaluate the prevalence and persistence of HPV-16 genetic variants in the AC of men from three different countries (Brazil, Mexico and United States) and to further identify sociodemographic and behavioral factors associated with these infections.

Methods: Participants from the multinational prospective HPV Infection in Men (HIM) Study who had at least one HPV-16 positive AC swab were included. Characterization into HPV-16 genetic variants was successfully performed by PCR-sequencing in 95.6% (217/227) samples and these were classified into HPV-16 lineages and sublineages.

Results: We observed higher prevalence of lineage A variants, mainly from A1 sublineage, in all countries. Non-A lineage variants were mostly detected in men from Brazil, where higher diversity of sublineage variants was detected during follow-up. Compare to men detected with Non-A HPV-16 lineage variants, men infected with lineage A reported a higher lifetime number of female sexual partners. Finally, a significantly higher prevalence of Non-A lineage variants was observed among men who have sex with men (MSM) with a transient HPV-16 AC infection ($p = 0.033$), but no significant differences regarding variants lineages and persistence status were observed when stratified by country, self-reported ethnicity or age.

Conclusions: Our data extend previous reports which indicate that globally HPV-16 variants are unevenly distributed, and contribute further to studies of the natural history of AC HPV infections in men.

1. Introduction

Anal canal (AC) cancer is a rare disease, but incidence and mortality rates are increasing globally [1,2]. About 90% of AC cancers are associated with human papillomavirus (HPV) infections, and HPV-16 is the most prevalent [3]. Risk factors for AC cancer are associated with sexual

behavior that increases exposure to HPVs including multiple lifetime sexual partners, ano-receptive sex, and early sexual debut [4].

Nucleotide variability was proven relevant for HPV-16 persistence and cervical neoplasms development [5]. HPV-16 variants were initially classified into five branches of geographical relatedness: European (E), Asian-American (AA), Asian (As), and Africans-1 and -2 (Af-1/Af-2)

* **Corresponding author at:** Center for Translational Research in Oncology - ICESP. Av. Dr. Arnaldo, 251, 8 andar, 01246-000, Cerqueira César - São Paulo, SP, Brazil.

E-mail address: laura.sichero@hc.fm.usp.br (L. Sichero).

<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2022.105128>

Received 16 December 2021; Received in revised form 7 March 2022;

Available online 9 March 2022

1386-6532/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

[6]. More recently, HPV variant nomenclature relies on divergence throughout the genome: where lineages (A-D) diverge by 1–2%, sublineages (1, 2, 3, and 4) vary between 0.5–1% [7]. Studies on cervical samples revealed that globally HPV-16 variant distribution is uneven and associates with the admixture level of each population [6]. Specifically, except for Africa where B/C lineages predominate, A1-A3 sublineages are the most prevalent worldwide. Furthermore, lineage D and sublineage A4 are more common in the Americas and Southeast Asia, respectively. We and others showed that women infected with HPV-16 sublineages A4 and D2/D3 variants are at a higher risk for cervical lesion [8,9]. However, regarding the prevalence of HPV-16 variants in the AC of men, few studies have been conducted [10].

There is an increasing interest in understanding the relationship between HPV infection and associated diseases in men. The HPV Infection in Men (HIM) Study has significantly contributed to understanding the natural history of male HPV infections [11–13]. This was a prospective multicenter study including men recruited in the United States, Brazil, and Mexico. Among 2030 men who had at least two study visits with AC swabs collected, HPV-16 prevalence was higher among men from the US (4.3%) compared to Brazil (3.7%) and Mexico (1.4%) [14]. Furthermore, although MSM/MSMW (men who have sex with men/men who have sex with men and women), had a higher HPV prevalence and incidence at the AC, infections were still detected among MSW (Men who have sex with women).

Herein, we widen our analysis to assess HPV-16 variants in men from the HIM study that tested HPV-16 positive in the AC in at least one study visit. We further evaluated sociodemographic and behavioral factors associated with detection and persistence of infections. This study is unique in investigating, prospectively within a multicenter cohort, HPV-16 variability in the AC of men.

2. Methods

2.1. Study population

The HIM Study cohort included ~4500 men aged 18–70 years, living in São Paulo, Brazil; Cuernavaca, Mexico; or Tampa, USA; enrolled from July 2005–June 2009. Follow-up visits occurred every 6 months for at least 4 years. Further details of study design are published [11]. The study was approved by ethical Institutional Boards at the University of South Florida (USA), the *Centro de Referência e Treinamento em DST/AIDS* (Brazil), and the *Instituto Nacional de Salud Pública* (Mexico). Informed consent was obtained from men. At study visits participants completed a computer-assisted self-interview and swabs from the genital and AC regions were collected. AC samples were collected using a Dacron swab to obtain 360° of the epithelium between the anal verge and dentate line [15]. 86.0% of HIM participants agreed to AC sampling, but not all AC specimens have been HPV genotyped [14]. In this study, we included HPV-16 positive AC samples from participants for which DNA or swab was available.

3. DNA extraction and HPV testing

The QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, CA, USA) was used to extract DNA following manufacture's instruction. All samples were analyzed at the H. Lee Moffitt Cancer Center (USA) for HPV DNA and β -globin using the Linear Array HPV Genotyping Test (Roche Molecular Diagnosis, CA, USA).

4. HPV-16 variant characterization

Overall, 227 HPV-16 AC samples were available. These were sent from H. Lee. Moffitt Cancer Center to ICESP (Brazil) either as extracted DNA ($n = 15$) or swab ($n = 212$). The DNA of swabs was extracted using a phenol:chloroform:isoamyl alcohol protocol [16]. DNAs were submitted to PCR aiming to amplify a 364 bp LCR fragment (nts

7482–7839) using AmpliTaq Gold® polymerase (Applied Biosystems, CA, USA) (Supplementary Table 1). This fragment contains sufficient single nucleotide polymorphisms (SNP) to discriminate all HPV-16 lineages/sublineages [7]. When no amplification was observed, two additional sets of primers that amplify 250 bp and 296 bp LCR fragments, were used to cover the same region (Supplementary Figure 1).

Amplicons were purified using illustra ExoProStar 1-Step (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), and sequenced using BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit and the ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer sequencer (Applied Biosystems, NY, USA). Sequences were compared to the HPV-16 prototype (sublineage A1) (Genbank K02718.1) and classified into lineages (A, B, C, and D) and sublineages (A1–4; B1–4; C1–4; and D1–4) [9] (Supplementary material).

4.1. Statistical analysis

Men were categorized as MSW, MSM, MSMW, or men who denied having any sex (no sex) based on their self-reported recent (prior 3–6 months) and lifetime penetrative sexual behavior as previously described [15].

The prevalence of HPV-16 variants is expressed as frequencies. Differences in sociodemographic and behavioral risk factors were evaluated using the Fisher's exact test. HPV-16 lineages B and C cases were grouped since both were previously classified into the African branch. In a separate analysis, B-, C-, and D-lineage cases were grouped into an HPV-16 Non-A lineage category. The Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were used to compare the range of medians between three and two variables, respectively.

Persistent infections were defined as cases with two or more consecutive positive visits (≥ 6 months) for the same HPV-16 variant. In persistence analyses, the five men from Brazil from whom different variants were detected during follow-up were counted twice (Supplementary Table 2). For instance, participant #2 was included both as a case of transient infection by sublineage A1, and persistent infection by sublineage D3. Differences in persistency status by HPV-16 lineages were evaluated using the Fisher's exact or Chi-squared tests. All statistical tests attained significance at $\alpha = 0.05$. Analyses were performed using Stata/MP version 10.0 for Windows.

5. Results

This study includes 227 samples obtained from 124 men. Among these, 43, 142, and 42 specimens were obtained from 34, 65, and 25 men from the US, Brazil, and Mexico, respectively. Most men were young (≤ 30 years), single, reported 12 or more years of education, and were not current smokers (Table 1). Whereas most men from the US and Brazil self-reported being white and non-Hispanic, all men from Mexico identified themselves as Mexicans and Hispanics ($p < 0.001$). The mean number of lifetime female sexual partners reported was lower among men from Mexico ($p = 0.017$). Furthermore, men from Brazil had a higher mean number of lifetime male sexual partners ($p < 0.001$). Finally, 64.7% and 56.0% men from the US and Mexico, respectively, were MSW, in contrast to Brazil where 87.6% were MSM or MSMW.

We were unable to classify into HPV-16 lineages 10 samples obtained from 9 men due to PCR amplification failure (Supplementary Table 3). The prevalence of different HPV-16 lineage and sublineage variants, by country, in the remaining men is depicted in Table 2 and Supplementary Table 4, respectively. Overall, HPV-16 lineage A variants were the most prevalent in the AC of men from all countries (85.8%), followed by variants of lineages B/C (7.5%) and D (6.7%). Although not statistically significant, men from Brazil were more likely to harbor Non-A lineage variants (B, C and D). Sublineage A1 variants were the most prevalent in all three countries and a higher diversity of sublineage variants was observed among men from Brazil.

HPV-16 variants of all lineages were detected among men aged 18–44 years, while in men ≥ 45 years old lineage D variants were not

Table 1
Sociodemographic characteristics of men, by country.

Characteristic	USA (N = 34) n (%)	Brazil (N = 65) n (%)	Mexico (N = 25) n (%)	p value
<i>Age</i>				
≤ 30 years	19 (55.8)	35 (53.8)	14 (56.0)	0.946 ¹
31–44 years	11 (32.4)	23 (35.4)	7 (28.0)	
≥ 45 years	4 (11.8)	7 (10.8)	4 (16.0)	
Mean (SD)	32.2 (11.2)	32.6 (9.6)	32.5 (10.1)	0.916 ³
Median (min-max)	28.5 (18–63)	30 (19–59)	29 (20–58)	
<i>Race</i>				
White	21 (61.8)	46 (71.9)	2 (8.0)	<0.001 ²
Black/Mulatto	6 (17.7)	13 (20.3)	0 (0.0)	
Other race*	7 (20.5)	5 (7.8)	23 (92.0)	
<i>Ethnicity</i>				
Hispanic	7 (21.9)	19 (29.2)	25 (100.0)	<0.001 ¹
Non-Hispanic	25 (78.1)	46 (70.8)	0 (0.0)	
<i>Marital status</i>				
Single, never married [§]	24 (70.5)	54 (83.0)	16 (64.0)	0.180 ¹
Married/living together	10 (29.5)	11 (17.0)	9 (36.0)	
<i>Years of school</i>				
< 12 years	1 (2.9)	8 (12.4)	7 (28.0)	0.127 ²
≥ 12 years	33 (97.1)	57 (87.6)	18 (72.0)	
<i>Current smoking</i>				
Yes	10 (29.5)	16 (24.6)	9 (36.0)	0.552 ¹
No	24 (70.5)	49 (75.4)	16 (64.0)	
<i>Steady sexual partner</i>				
Yes	18 (52.9)	33 (50.8)	15 (60.0)	0.734 ¹
No	16 (47.1)	32 (49.2)	10 (40.0)	
<i>Lifetime no. of female sex partners</i>				
Mean (SD)	15.4 (18.9)	12.2 (29.4)	8.4 (9.3)	0.017 ³
Median (min-max)	7.0 (0–90)	2.5 (0–200)	4.0 (0–25)	
<i>Lifetime no. of male sex partners</i>				
Mean (SD)	0.8 (1.3)	2.2 (1.2)	1 (1.3)	<0.001 ³
Median (min-max)	0 (0–4)	2 (0–4)	0 (0–3)	
<i>Sexual orientation</i>				
No sex [¶]	0 (0.0)	1 (1.5)	1 (4.0)	<0.001 ²
MSW	22 (64.7)	7 (10.8)	14 (56.0)	
MSM	3 (8.8)	22 (33.8)	4 (16.0)	
MSMW	9 (26.5)	35 (53.8)	6 (24.0)	

SD: standard deviation.

Min: minimum value; Max: maximum value.

¹ Chi-square test; ² Fisher exact test; ³ Kruskal-Wallis test.

* Men who self-reported as Asian, American Indian or Alaska Native, Mexican or other race not included in the questionnaire.

[§] Included divorced/separated or widowed.[¶] Men who reported no sexual penetrative intercourse with men or women.

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

Table 2
HPV-16 lineages prevalence in the anal canal of men participating in the HIM study, by country.

Lineages	USA (N = 30) n (%)	Brazil (N = 68)* n (%)	Mexico (N = 22) n (%)	Total (N = 120) n (%)	p value
<i>Lineages</i>					
A	27 (90.0)	55 (80.8)	21 (95.5)	103 (85.8)	0.414 ¹
B/C	1 (3.3)	8 (11.8)	0 (0.0)	9 (7.5)	
D	2 (6.7)	5 (7.4)	1 (4.5)	8 (6.7)	
<i>Lineages</i>					
A	27 (90.0)	55 (80.8)	21 (95.5)	103 (85.8)	0.196 ¹
Non-A	3 (10.0)	13 (19.2)	1 (4.5)	17 (14.2)	

¹ Fisher exact test.

* The five men from Brazil from whom different variants were detected during follow-up were counted twice.

Table 3
Sociodemographic characteristics of men, by different HPV 16 variant lineages.

Characteristic	HPV-16 lineages [‡]			p value	HPV-16 lineages		p value
	A (N = 103) n (%)	B/C (N = 9) n (%)	D (N = 8) n (%)		A (N = 103) n (%)	Non-A (N = 17) n (%)	
Age							
≤ 30 years	57 (86.4)	5 (7.6)	4 (6.0)	0.867 ¹	57 (86.4)	9 (13.6)	0.695 ⁴
31–44 years	33 (82.5)	3 (7.5)	4 (10.0)		33 (82.5)	7 (17.5)	
≥ 45 years	13 (92.9)	1 (7.1)	0 (0.0)		13 (92.9)	1 (7.1)	
Mean (SD)	32.3 (10.2)	33.3 (10.0)	32.3 (7.8)	0.926 ²	32.3 (10.2)	32.6 (8.8)	0.702 ³
Median (min-max)	29 (18–63)	28 (22–51)	31 (24–44)		29 (18–63)	28 (22–51)	
Race							
White	57 (85.1)	6 (8.9)	4 (6.0)	0.296 ¹	57 (85.1)	10 (14.9)	0.469 ¹
Black/Mulatto	14 (77.7)	3 (16.6)	1 (5.7)		14 (77.7)	4 (22.3)	
Other race*	31 (91.2)	0 (0.0)	3 (8.8)		31 (91.2)	3 (8.8)	
Refused	1 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)		1 (100.0)	0 (0.0)	
Ethnicity							
Hispanic	43 (87.8)	3 (6.1)	3 (6.1)	0.935 ¹	43 (87.8)	6 (12.2)	0.821 ¹
Non-Hispanic	59 (84.3)	6 (8.6)	5 (7.1)		59 (84.3)	11 (15.7)	
Refused	1 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)		1 (100.0)	0 (0.0)	
Marital status							
Single, never married [§]	77 (83.6)	8 (8.7)	7 (7.7)	0.654 ¹	77 (83.6)	15 (16.4)	0.184 ¹
Married/living together	26 (92.8)	1 (3.6)	1 (3.6)		26 (92.8)	2 (7.2)	
Years of school							
< 12 years	15 (88.2)	2 (11.8)	0 (0.0)	0.449 ¹	15 (88.2)	2 (11.8)	0.554 ¹
≥ 12 years	88 (85.4)	7 (6.7)	8 (7.9)		88 (85.4)	15 (14.6)	
Current smoking							
Yes	31 (93.9)	0 (0.0)	2 (6.1)	0.164 ¹	31 (93.9)	2 (6.1)	0.096 ¹
No	72 (82.7)	9 (10.3)	6 (7.0)		72 (82.7)	15 (17.3)	
Steady sexual partner							
Yes	57 (89.1)	4 (6.2)	3 (4.7)	0.579 ¹	57 (89.1)	7 (10.9)	0.205 ¹
No	46 (82.2)	5 (8.9)	5 (8.9)		46 (82.2)	10 (17.8)	
Lifetime no. of female sex partners							
Mean (SD)	12.9 (25.5)	2.6 (4.2)	5.5 (10.1)	0.087 ¹	12.9 (25.5)	4.1 (7.6)	0.031 ⁴
Median (min-max)	5 (0–200)	1 (0–12)	2 (0–30)		5 (0–200)	1.5 (0–30)	
Lifetime no. of male sex partners							
Mean (SD)	1.6 (1.4)	2.7 (0.5)	1.9 (1.6)	0.172 ²	1.6 (1.4)	2.2 (1.3)	0.119 ⁴
Median (min-max)	2 (0–4)	3 (2–3)	2.5 (0–4)		2 (0–4)	3 (0–4)	
Sexual orientation							
No sex [†]	1 (50.0)	1 (50.0)	0 (0.0)	0.092 ¹	1 (50.0)	1 (50.0)	0.161 ¹
MSW	32 (91.4)	0 (0.0)	3 (8.6)		32 (91.4)	3 (8.6)	
MSM	25 (78.1)	4 (12.5)	3 (9.4)		25 (78.1)	7 (21.9)	
MSMW	45 (88.2)	4 (7.8)	2 (4.0)		45 (88.2)	6 (11.8)	

SD: standard deviation.

Min: minimum value; Max: maximum value.

¹ Fisher exact test.² Kruskal-Wallis test;³ Chi-square test.⁴ Mann-Whitney test.[‡]The five men from Brazil from whom different variants were detected during follow-up were counted twice.

*Men who self-reported as Asian, American Indian or Alaska Native, Mexican or other race not included in the questionnaire.

[§]Included divorced/separated or widowed.[†]Men who reported no sexual penetrative intercourse with men or women.

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

detected (Table 3). Black men were more frequently detected with Non-A lineage variants (22.3%), mainly from B/C lineages (16.6%), compared to white (14.9%) or other race men (8.8%). Non-A lineage variants were more prevalent in single men (16.4%), with more than 12 years of education (14.6%), and who reported not currently smoking (17.3%).

Regarding sexual behavior, men detected with lineage A variants reported a higher lifetime number of female sexual partners (mean = 12.9) in comparison to those infected with Non-A lineage variants

(mean = 4.1) ($p = 0.031$). In contrast, men with a higher lifetime number of male sexual partners were more commonly detected with Non-A lineage variants ($p = 0.119$). Furthermore, although not statistically significant, Non-A lineage variants were more frequent than A lineage variants among men reporting no steady sexual partner, and among MSM and MSMW.

When stratified by country of origin, all persistent AC HPV-16 infections in men from the US and Mexico were lineage A variant cases. On the other hand, 13.7% and 7.0% of persistent infections among men

Table 4

Persistence and transience of HPV-16 variant lineages in the anal canal of men participating in the HIM study, by country, ethnicity, age or sexual orientation.

	Persistent			Transient			Persistent		Transient	
	A (N = 103) n (%)	B/C (N = 9) n (%)	D (N = 8) n (%)	A (N = 103) n (%)	B/C (N = 9) n (%)	D (N = 8) n (%)	A (N = 103) n (%)	Non-A (N = 17) n (%)	A (N = 103) n (%)	Non-A (N = 17) n (%)
Overall	37 (86.1)	4 (9.3)	2 (4.6)	66 (85.7)	5 (6.5)	6 (7.8)	37 (86.1)	6 (13.9)	66 (85.7)	11 (14.3)
<i>Country</i>										
United States	6 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	21 (87.5)	1 (4.1)	2 (8.4)	6 (100.0)	0 (0.0)	21 (87.5)	3 (12.5)
Brazil	23 (79.3)	4 (13.7)	2 (7.0)	32 (82.0)	4 (10.2)	3 (7.8)	23 (79.3)	6 (20.7)	32 (82.0)	7 (18.0)
Mexico	8 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	13 (92.8)	0 (0.0)	1 (7.2)	8 (100.0)	0 (0.0)	13 (92.8)	1 (7.2)
<i>Ethnicity</i>										
Hispanic	18 (85.7)	2 (9.5)	1 (4.8)	25 (89.2)	1 (3.6)	2 (7.2)	18 (85.7)	3 (14.3)	25 (89.2)	3 (10.8)
Non-Hispanic	19 (86.3)	2 (9.1)	1 (4.5)	40 (83.4)	4 (8.3)	4 (8.3)	19 (86.3)	3 (13.7)	40 (83.4)	8 (16.6)
<i>Age</i>										
≤ 30 years	24 (92.3)	2 (7.7)	0 (0.0)	33 (82.5)	3 (7.5)	4 (10.0)	24 (92.3)	2 (7.7)	33 (82.5)	7 (17.5)
31–44 years	10 (71.4)	2 (14.3)	2 (14.3)	23 (88.5)	1 (3.8)	2 (7.7)	10 (71.4)	4 (28.6)	23 (88.5)	3 (11.5)
≥ 45 years	3 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	10 (90.9)	1 (9.1)	0 (0.0)	3 (100.0)	0 (0.0)	10 (90.9)	1 (9.1)
<i>Sexual orientation</i>										
MSW	7 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	25 (89.3)	0 (0.0)	3 (10.7)	7 (100.0)	0 (0.0)	25 (89.3)	3 (10.7)
MSM	12 (85.8)	1 (7.1)	1 (7.1)	13 (72.2)	3 (16.7)	2 (11.1)	12 (85.8)	2 (14.2)	13 (72.2)	5 (27.8)
MSMW	17 (81.0)	3 (14.3)	1 (4.7)	28 (90.3)	1 (6.5)	1 (3.2)	17 (81.0)	4 (19.0)	28 (90.3)	2 (9.7)
No sex [†]	1 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (100.0)	0 (0.0)	1 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (100.0)

P values using Fisher exact test or Chi-square test were $P < 0.02$ for transient infections with HPV-16 lineages A, B/C and D stratified by sexual orientation; $P = 0.03$ for transient infections with HPV-16 lineages A and Non-A stratified by sexual orientation. All others P values > 0.05 .

[†] Men who reported no sexual penetrative intercourse with men and women.

from Brazil were cases of lineages B/C and D variants, respectively (Table 4). Nevertheless, no significant differences regarding distribution of the different HPV-16 variants among the 43 and 77 cases of persistent and transient infections, respectively, were observed when men were stratified by country, self-reported ethnicity, or age. Concerning sexual orientation, a significantly higher prevalence of Non-A lineage variants was observed among MSM with a transient HPV-16 AC infection ($p = 0.033$).

6. Discussion

This is the first study to prospectively evaluate the association between HPV-16 variants and viral persistence in male AC. Only eight prior studies analyzed the prevalence of HPV-16 variants in the AC of men, six of which examined non-tumoral samples mostly from HIV+ MSM/MSMW, two analyzed samples from HIV- men with AC lesions, and five were conducted in the US [17–20, 21, 22–24]. Consistent with these studies, we observed that HPV-16 lineage A variants, mostly from sublineage A1, were the most prevalent, independent of the country. Still, some differences among studies were observed. Whereas among men from Mexico, we exclusively detected the A1 sublineage variants, and in previous study, lineages B and D accounted for 2.5% and 22.5% of AC HPV-16 samples from this country, respectively [19]. This difference may be attributed to differences in the population analyzed; whereas the former study was restricted to HIV+ MSM, all men included here self-reported as HIV-. Among US men, similar prevalence of B/C and D lineages were observed by us and in two other studies that included normal or AC lesion specimens [17, 18]. Unfortunately, we are unable to compare our data with three other studies in the US; in one study HPV-16 variants were categorized as prototype or non-prototype-like based on single strand conformational polymorphism patterns, and in two other studies discriminating between data from women and men was not possible [21, 23, 24]. Finally, although not statistically significant, in comparison with the US (10.0%) and Mexico (4.5%), Non-A lineage variants were more prevalent in Brazil (19.2%) where we observed the highest diversity of HPV-16 variants. While similar

patterns of HPV-16 variants were reported by us at the cervix of women from São Paulo [8], this is the first study to report HPV-16 variants in the AC of men in Brazil.

Though not statistically significant, HPV-16 Non-A variants were more commonly detected among MSM (21.9%) compared to MSW (8.6%) or MSMW (11.8%). This may be related to the fact that compared to the US (8.8%) and Mexico (16.0%) most MSM included were from Brazil (33.8%) ($p < 0.001$) where Non-A lineage variants were more prevalent. Interestingly, higher number of female sexual partners was reported by men detected with lineage A variants.

In the US, higher proportion of HPV-16 lineage B variants was observed among women of African ancestry [25]. Further, among women and men from the US, an increased risk of cervical lesion progression and AC cancer was observed when an individual's race/ethnicity matched that of the HPV-16 infecting variant [17, 25]. However, in women of admixture ethnicity populations including Brazil and Costa Rica, these associations were not observed [26, 27, 28]. Here, while higher prevalence of lineages B/C was also observed in the AC of men self-declared as black (16.6%) compared to white men (8.9%), this difference did not reach statistical significance, corroborating studies in which no ethnic relatedness was observed with the infecting AC HPV-16 variant [18, 24].

Within the HIM Study, transient and persistent AC HPV-16 infections were more common among MSW and MSM/MSMW, respectively [12]. It was suggested that HPV-16 variation analysis is necessary to discriminate persistent infections from consecutive transient infections by different variants [29]. In five men from Brazil, we detected different HPV-16 sublineages during follow-up. A change in the HPV-16 variant over time was also previously reported in the AC of HIV+ US men [21]. Nevertheless, it is important to highlight that detection of the same variant does not unequivocally designate persistence, as reacquisition of the same variant during a new exposure event may occur.

In our study, all persistent AC infections in men from the US and Mexico were of lineage A, while 25.2% of persistent infections in Brazil were Non-A lineages. However, as this difference was not statistically significant, we hypothesize this may reflect that Non-A lineages were

also more common among men from Brazil. When stratified by sexual orientation, we observed a significantly higher prevalence of Non-A lineage variants among MSM with a transient HPV-16 AC infection. Future studies are warranted to better understand this finding. Nevertheless, no other significant difference in variant distribution, persistence and transience of infections were observed when men were stratified by country, ethnicity, or age corroborating the findings of Xi and col [25]. who also reported no differences in variant persistence in men AC samples from the US.

Despite the multi-country and prospective approaches, our study bears limitations. Most importantly, the small sample number could constitute a limitation in the ability of detecting significant associations between HPV variants and sociodemographic factors or infection status. Furthermore, due to the HIM study's nature that excluded men with history of anogenital lesions, anogenital warts were diagnosed only in 6.3% and 4.0% of MSW and MSM, respectively [15]. Among these, anal warts were identified in less than 1% of both MSW and MSM; a sample size too small to determine whether HPV-16 variant prevalences differed in lesions.

To date, three studies in the US reported the association of HPV-16 variants and AC neoplasias, however with inconsistent results. Briefly, Xi and col [24]. showed that non-prototype variants (mainly Non-A1–3 sublineages) were associated with anal carcinoma development among HIV+ MSM, whereas Da Costa and col [18]. reported higher risk of high-grade AC neoplasia among HIV+/HPV+ men and women harboring variants including the A131G variation (detected in some A and B lineage variants). More recently, Brim and col [17]. described the association of lineage B HPV-16 and increased AC cancer risk among African-American individuals. These conflicting findings may result from confounding factors, some which are difficult to measure.

In conclusion, our data considerably extend reports that indicate that globally HPV-16 variants are unevenly distributed. Although we hypothesize that similar to findings from studies of the cervix, specific variants may also be associated with increased AC neoplasia risk in men; in the population studied here we found no significant association between AC HPV-16 variants and persistence. Larger studies are necessary to better understand the impact of HPV-16 variability upon AC neoplasia development in men.

7. CRediT authorship contribution statement

Milena Giulia Gonçalves: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Data Curation, Writing – Original Draft, Writing-Review & Editing, Visualization. **Matthew Thomas Ferreira:** Methodology, Writing – Review & Editing. **Laura Sichero:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Resources, Writing – Original Draft, Writing – Review & Editing, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition. **Rossana Veronica Mendoza López:** Formal analysis. **Silvaneide Ferreira & Maria Luiza Baggio:** Resources. **Bradley Sirak:** Investigation. Data Curation. **Eduardo Lazcano-Ponce, Alan G. Nyitray, Anna R. Giuliano, Luisa L. Villa and Laura Sichero:** Project administration, Supervision, Funding acquisition, Writing – Review & Editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

8. Funding statement

This work was supported by #2017/23211–8, São Paulo Research Foundation (FAPESP) to LS, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [Grant numbers 306326/2015–9 to LLV, and 303431/2018–0 to LS]; Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (Capes) [to MGG]; and National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), National Institutes of Health (NIH) 5R21AI101417–3 [to AGN]. The infrastructure of the HIM Study cohort was supported through a grant from the National Cancer Institute (NCI), National Institutes of Health (NIH) [Grant number R01

CA098803 to ARG], by extramural funds from the Ludwig Institute for Cancer Research [to LLV], by #2008/57889–1, São Paulo Research Foundation (FAPESP) to LLV, and by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [Grant number 573799/2008–3 to LLV].

Declaration of Competing Interest

ARG (IISP39582) (IISP53280) is a current recipient of grant funding from Merck. ARG is a member of the Merck Advisory Board for HPV prophylactic vaccines. LLV is an occasional speaker for Merck's HPV prophylactic vaccines. No conflicts of interest are declared for any of the remaining authors.

Acknowledgements

The authors thank the HIM Study teams in the U.S. (Huiyi Lin, Jane Messina, Christine Pierce Campbell, Christine Gage, Donna J Ingles, Kim Isaacs, Kayoko Kennedy, Andrea Bobanic, Shams Rahman, Matthew Schabath, Alan Nyitray, and Julie Rathwell), Brazil (Lenice Galan de Paula, Roberto José Carvalho da Silva, Ricardo Cintra, Filomena Cernicchiaro, Graça Ribeiro, Rosária Otero, Roberta Bocalon, Juliana Antunes, Fernanda Silva, Rossana Terreri, and the CRT-DST/AIDS nursing team), and Mexico (Aurelio Cruz Valdez, René de Jesús Alvear Vásquez, Oscar Rojas Juárez, Rossana del Carmen González Sosa, Rosangel Ríos Vences, Martha Huerta Segura, Alicia Rodríguez Galván, Paula Román Rodríguez, Ana Laura Landa Vélez, Griselda Díaz García, Verónica Chávez Abarca, Gisela Flores Quevedo, María del Pilar Hernández Nevárez, Guillermina Sánchez Martínez, Adriana Ortiz Rojas, Carlos Omar Barrera Flores).

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.jcv.2022.105128](https://doi.org/10.1016/j.jcv.2022.105128).

References

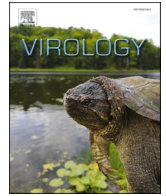
- [1] A.N. Young, E. Jacob, P. Willauer, et al., Anal cancer, *Surg. Clin. North Am* (100) (2020) 629–634.
- [2] IARC World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. Available: <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?mode=ranking> [Accessed 21 sept 2021].
- [3] L. Alemany, M. Saunier, I. Alvarado-Cabrero, et al., Human papillomavirus DNA prevalence and type distribution in anal carcinomas worldwide, *Int. J. Cancer* 136 (1) (2015) 98–107.
- [4] V.M. Nelson, A.B. Benson 3rd, Epidemiology of anal canal cancer, *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* (26) (2017) 9–15.
- [5] L. Sichero, L.L. Villa, Epidemiological and functional implications of molecular variants of human papillomavirus, *Braz. J. Med. Biol. Res.* (39) (2006) 707–717.
- [6] L. Ho, S.Y. Chan, R.D. Burk, et al., The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations, *J. Virol.* (67) (1993) 6413–6423.
- [7] B. Smith, Z. Chen, L. Reimers, et al., Sequence imputation of HPV16 genomes for genetic association studies, *PLoS ONE* (6) (2011) e21375.
- [8] L. Sichero, S. Ferreira, H. Trottier, et al., High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPV16 and 18, *Int. J. Cancer* (120) (2007) 1763–1768.
- [9] L. Mirabello, M. Yeager, M. Cullen, et al., HPV16 sublineage associations with histology-specific cancer risk using HPV whole-genome sequences in 3200 women, *J. Natl. Cancer Inst.* (108) (2016) djw100.
- [10] M.T. Ferreira, M. Giulia Gonçalves, R.V. Mendoza López, L. Sichero, Genetic variants of HPV-16 and their geographical and anatomical distribution in men: a systematic review with meta-analysis, *Virology* (558) (2021) 134–144.
- [11] A.R. Giuliano, E. Lazcano-Ponce, L.L. Villa, et al., The human papillomavirus infection in men study: human papillomavirus prevalence and type distribution among men residing in Brazil, Mexico, and the United States, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* (17) (2008) 2036–2043.
- [12] A.G. Nyitray, R.J. Carvalho da Silva, M. Chang, et al., Incidence, duration, persistence, and factors associated with high-risk anal human papillomavirus persistence among HIV-negative men who have sex with men: a multinational study, *Clin. Infect. Dis.* (62) (2016) 1367–1374.
- [13] L. Sichero, A.R. Giuliano, L.L. Villa, Human papillomavirus and genital disease in men: what we have learned from the HIM study, *Acta Cytol.* (63) (2019) 109–117.

- [14] S.L. Sudenga, A.G. Nyitray, B.N. Torres, et al., Comparison of anal HPV natural history among men by country of residence: Brazil, Mexico, and the United States, *J. Infect. Dis.* (75) (2017) 35–47.
- [15] A.G. Nyitray, R.J. Carvalho da Silva, M.L. Baggio, et al., Six-month incidence, persistence, and factors associated with persistence of anal human papillomavirus in men: the HPV in men study, *J. Infect. Dis.* (204) (2011) 1711–1722.
- [16] Green, M.R., & Sambrook, J. (2012). *Molecular cloning. A Laboratory Manual* 4th.
- [17] H. Brim, L. Mirabello, S. Bass, et al., Association of human papillomavirus genotype 16 lineages with anal cancer histologies among African Americans, *Gastroenterology* (160) (2021) 922–924.
- [18] M.M. Da Costa, C.J. Hogeboom, E.A. Holly, J.M. Palefsky, Increased risk of high-grade anal neoplasia associated with a human papillomavirus type 16 E6 sequence variant, *J. Infect. Dis.* (185) (2002) 1229–1237.
- [19] R. Méndez-Martínez, S. Maldonado-Frías, S. Vázquez-Vega, et al., High prevalent human papillomavirus infections of the oral cavity of asymptomatic HIV-positive men, *BMC Infect. Dis.* (20) (2020) 27.
- [20] S. Nicolás-Párraga, C. Gandini, V.N. Pimenoff, et al., HPV16 variants distribution in invasive cancers of the cervix, vulva, vagina, penis, and anus, *Cancer Med.* (5) (2016) 2909–2919.
- [21] M. Steinau, D.C. Swan, J.M. Onyekwulje, et al., Differences and changes in human papillomavirus type 16 variant status in human immunodeficiency virus-positive adults are not uncommon, *J. Gen. Virol.* (91) (2010) 2068–2072.
- [22] E. Tanzi, A. Amendola, S. Bianchi, et al., Human papillomavirus genotypes and phylogenetic analysis of HPV-16 variants in HIV-1 infected subjects in Italy, *Vaccine* (27) (2009) A17–A23.
- [23] L.F. Xi, W. Demers, N.B. Kiviat, et al., Sequence variation in the noncoding region of human papillomavirus type 16 detected by single-strand conformation polymorphism analysis, *J. Infect. Dis.* (168) (1993) 610–617.
- [24] L.F. Xi, C.W. Critchlow, C.M. Wheeler, et al., Risk of anal carcinoma in situ in relation to human papillomavirus type 16 variants, *Cancer Res.* (58) (1998) 3839–3844.
- [25] L.F. Xi, N.B. Kiviat, A. Hildesheim, et al., Human papillomavirus type 16 and 18 variants: race-related distribution and persistence, *J. Natl. Cancer Inst.* (98) (2006) 1045–1052.
- [26] A. Hildesheim, M. Schiffman, C. Bromley, et al., Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer, *J. Natl. Cancer Inst.* (93) (2001) 315–318.
- [27] K. Junes-Gill, L. Sichero, P.C. Maciag, W. Mello, V. Noronha, L.L. Villa, Human papillomavirus type 16 variants in cervical cancer from an admixed population in Brazil, *J. Med. Virol.* (80) (2008) 1639–1645.
- [28] L. Sichero, H. Trottier, S. Ferreira, E. Duarte-Franco, E.L. Franco, L.L. Villa, Re: human papillomavirus type 16 and 18 variants: race-related distribution and persistence, *J. Natl. Cancer Inst.* (99) (2007) 653–654, author reply 654–5.
- [29] E.L. Franco, L.L. Villa, P. Rahal, A. Ruiz, Molecular variant analysis as an epidemiological tool to study persistence of cervical human papillomavirus infection, *J. Natl. Cancer Inst.* (20) (1994) 1558–1559.

APÊNDICE C

**Cópia do manuscrito referente à revisão sistemática e metaanálise publicada em
2021**

Virology. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2021.03.007>



Genetic variants of HPV-16 and their geographical and anatomical distribution in men: A systematic review with meta-analysis

Matthew Thomas Ferreira^{*}, Milena Giulia Gonçalves, Rossana Veronica Mendoza López, Laura Sichero

The Center for Translational Research in Oncology, Instituto do Cancer do Estado de Sao Paulo ICESP, Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo FMUSP HC, Sao Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

HPV-16
Prevalence
Men
Lineage
Genetic variations
Meta-analysis

ABSTRACT

Background: The prevalence of Human Papillomavirus type 16 (HPV-16) variants in men and the association with tumor development has not been fully investigated. We estimated the prevalence of genital, anal, and oral HPV-16 infections in men through a systematic review and meta-analysis.

Methods: Seven databases were searched and included studies that identified HPV-16 positive males, HPV-16 variants (lineages/sublineages), and indicated the sample's anatomical origin. This protocol is registered in PROSPERO (CRD42020178013).

Results: The database searches yielded 14 studies including 445 HPV-16 positive samples classified as lineage A (n = 390), lineage D (n = 43), lineage B (n = 10), and lineage C (n = 2) variants. Lineage A variants predominated among the anatomical sites and the diverse geographical regions.

Conclusions: HPV-16 lineages vary according to anatomical and geographical region. According to this preliminary evaluation of the current literature, we hypothesize that, similar to women, specific HPV-16 variants may also be associated to increased cancer risk in men.

1. Introduction

Cancer-associated human papillomavirus (HPV) infections have been studied for nearly 40 years (Durst et al., 1983). Mucosal HPVs infect the epithelial cells of the genital mucosa, potentially leading to carcinogenesis. Through epidemiological, molecular, and genetic analyses, mucosal HPV types within the alpha genus are divided into low risk and high risk of cervical cancer. One of the 13 high-risk types is HPV-16 (Doorbar et al., 2015). Although most HPV infections do not persist and do not result in cancer, high risk HPVs are more prone to persist and thus significantly increase the chance of cervical cancer development (Bouvard et al., 2009).

Initially, studies regarding the natural history of HPV infections and associated neoplasia mainly focused on women. Because HPV is mostly transmitted during sexual contact, over the past 15 years an increasing interest in further understanding the relationship between HPV and disease in men has emerged. It is noteworthy that HPV-16 DNA is detected in about 60.3% of cervical tumors and the majority of HPV-driven tumors at other anatomical regions is also attributed to HPV-16

(de Sanjosé et al., 2018).

Based on the nucleotide sequence of a fragment of the LCR (long control region), HPV-16 genetic variants were initially classified into five branches of geographical and phylogenetic relatedness: European (E), Asian-American (AA), Asian (As), African-1 (Af-1) and African 2 (Af-2) (Ho et al., 1993). More recently, the nomenclature of HPV-16 variants was revised, and these are now categorized into variant lineages (1–2% sequence difference) and sub-lineages (0.5–1% sequence difference) based on whole genome sequencing (Smith et al., 2011). Variant lineages are designated by letters (A, B, C, D) meanwhile sub-lineages are designated as numbers 1, 2, 3, 4 (ex. A1). [Supplementary Table 1](#) parallels the current nomenclature with the former nomenclature found in the literature to provide clarity.

Several studies have shown that HPV-16 lineage D variants are associated with a higher risk of infection persistence and cervical cancer development (Sichero et al., 2007; Xi et al., 2007; Mirabello et al., 2016) mostly within populations with a multiethnic composition. In addition, higher rates of integration are observed for lineage D variants compared to other HPV-16 variants (Lou et al., 2020). However, this relationship

^{*} Corresponding author. Center for Translational Research in Oncology - ICESP. Av. Dr. Arnaldo, 251, 8 andar, 01246-000, Cerqueira César, São Paulo, SP, Brazil.
E-mail address: matthew.t.ferreira@gmail.com (M.T. Ferreira).

in male-associated anogenital cancers is, by far, less reported. Considering the wide distribution and prevalence of HPV-16 infections in different anatomical regions of men, the aim of this systematic review was to identify the studies that have specifically examined HPV-16 lineages and sub-lineages in male populations and, through meta-analysis, attempt to determine the prevalence of these variants in different anatomical sites and geographical regions.

2. Methodology

To identify the overall prevalence of HPV-16 lineages and sub-lineages (referred to as “variants” in this paper) in the different anatomical regions in men, this systematic review with meta-analysis followed the protocol proposed and registered in the PROSPERO International Prospective Register of systematic reviews (<http://www.crd.york.ac.uk/PROSPERO>, registration number CRD42020178013), and was guided by the PRISMA checklist for systematic reviews (Supplementary Figure 1).

2.1. Search strategy

The seven databases searched on April 9, 2020 and again on August 31, 2020 were PUBMED, PUBMED Central, Virtual Health Library (VHL/BVS/BIREME), SCOPUS, EMBASE, Web of Science and Cochrane Library. A combination of the following MeSH terms, in the title or abstract or keywords, without restriction on the language of the articles were used: (“men” or “males”) and (“Human papillomavirus 16” or “HPV-16” or “HPV 16”) and (“prevalence” or “prevalences” or “genetic variation”). The exact search strategy is presented in Supplementary Table 2. Duplicate articles were removed.

2.2. Study selection

Using the Rayyan QCRI Programs (Ouzzani et al., 2016), MTF and MGG independently screened the titles, abstracts, and keywords of the articles for eligible studies based upon the inclusion and exclusion criteria. Inclusion criteria were studies that identified HPV-16 positive male subjects, HPV-16 variants (lineages), and must have indicated the anatomical region of sample collection. Exclusion criteria were case reports, conference proceedings, other reviews/meta-analyses, animal/in vitro studies, duplicate literature, and duplicate data (when multiple reports describing the same population were published, only the most recent or complete report were included). Also, samples that did not distinguish between male and female samples, or between two lineages were not included. Any conflicts were resolved with the participation of a third reviewer (LS). Once the articles were selected, these were read in their entirety by MTF and MGG and were further selected according to the inclusion and exclusion criteria. Any conflicts were resolved by a third reviewer (LS).

2.3. Data extraction/assessment of risk of bias

Relevant data concerning included studies’ populations, methodologies and findings were extracted. Study prevalence was pooled using a random-effects meta-analysis. The following data were extracted: author name, year of publication, study population, specimen collection method, anatomic region from which samples were obtained, HPV variant characterization methodology, genomic region used for variant assessment, number of specimens for which HPV-16 variant data was available, and HPV-16 variant lineages/sublineages detected. The methodological quality of the studies included was measured using an adapted version of the NIH ‘Quality Assessment Tool for Observational Cohort and Cross-Sectional Studies’ (Healthof. Quality Ass, 2014) and the Risk of Bias in Systematic Reviews (ROBIS) program (Whiting et al., 2016).

We found some variation in the nomenclature used for HPV-16

variant attribution across selected manuscripts, including genome region used for variant assignment. We manually standardize the nomenclature of the variants based on the complete genome sequences of the variants available in the Papillomavirus Episteme database (<https://pave.niaid.nih.gov/>). This was possible because HPV-16 variants display evolutionarily stable and conserved lineages, and lineage/sublineage-specific single nucleotide polymorphisms (SNPs) can be imputed with a high degree of accuracy from limited viral polymorphic positions (Smith et al., 2011).

2.4. Statistical analysis

Prevalence values and confidence intervals were calculated using the Wilson method for small samples. In the meta-analysis, the heterogeneity of the studies was assessed by the Cochran’s Q test under the null hypothesis that there is no heterogeneity within the studies. The I-square value (I^2) was also calculated, which describes the percentage of variation between studies due to heterogeneity. Statistical analyses were performed using the statistical software Stata/MP 14.0 for Windows.

3. Results

The process of the systematic review of articles concerning the identification and prevalence of HPV-16 lineages and sublineages in different anatomical region in men is summarized in Fig. 1. The initial search strategy produced 2138 articles after duplicates were removed. Next, 2096 articles were screened by reviewing their titles, abstracts and/or keywords. The remaining 42 articles were then read in their entirety, resulting in 14 eligible articles composed of 13 cross-sectional studies and one prospective study, of which variants at the baseline visit were used for our analyses. There was an overall low risk of bias among the studies.

Table 1 describes the data extracted from each study selected. Five studies included material from patient biopsies (confirmed or suspected of cancer), one study examined a population of husbands whose wives had abnormal Pap smears, two studies exclusively examined men who have sex with men (MSM), one study examined HIV + men, one study examined HIV + MSM/MSMW (men who have sex with men and women), and one was restricted to kidney transplant recipients. Concerning the sample types among the included articles, 6 studies used formalin fixed paraffin embedded (FFPE) tumor samples, 3 used frozen samples, 4 used swabs, and 1 used urine. All studies reported using polymerase chain reactions (PCR) followed by DNA sequencing using the Sanger method, with the exception of one study that employed a pyrosequencing method. In four studies, authors reported amplifying the LCR region exclusively (21.5%) and five studies amplified the E6 or E6/E7 region exclusively (35.7%) for determining the variants. Meanwhile only one study used the L1 region alone (7.1%) and five studies used some combination of these regions to determine the variants (35.7%). Finally, a total of 445 HPV-16 positive samples had been sequenced considering all the studies.

3.1. Overall prevalence

The overall prevalence of HPV-16 variants was determined independent of anatomical/geographical locations. Table 2 highlights the anatomical sites and their respective lineages/sub-lineages from the different studies. Lineage A variants were found in 390 samples from 13 studies. The overall prevalence of lineage A variants was 88.32% (95% CI = 82.51–94.12%; $I^2 = 67.6%$; $p < 0.0001$; Fig. 2), although high heterogeneity was observed across studies. The lineage B variants was identified in 10 samples from five studies with a homogenous distribution among the studies ($I^2 = 94.8%$; $p < 0.0001$) and a prevalence of 30.84% (95%CI = 4.89–56.79%; Fig. 3). Since the lineage C variant was distinctly identified in only 2 samples from one study (Tanzi et al., 2009), an analysis could not be performed. Lineage D variants were

PRISMA 2009 Flow Diagram

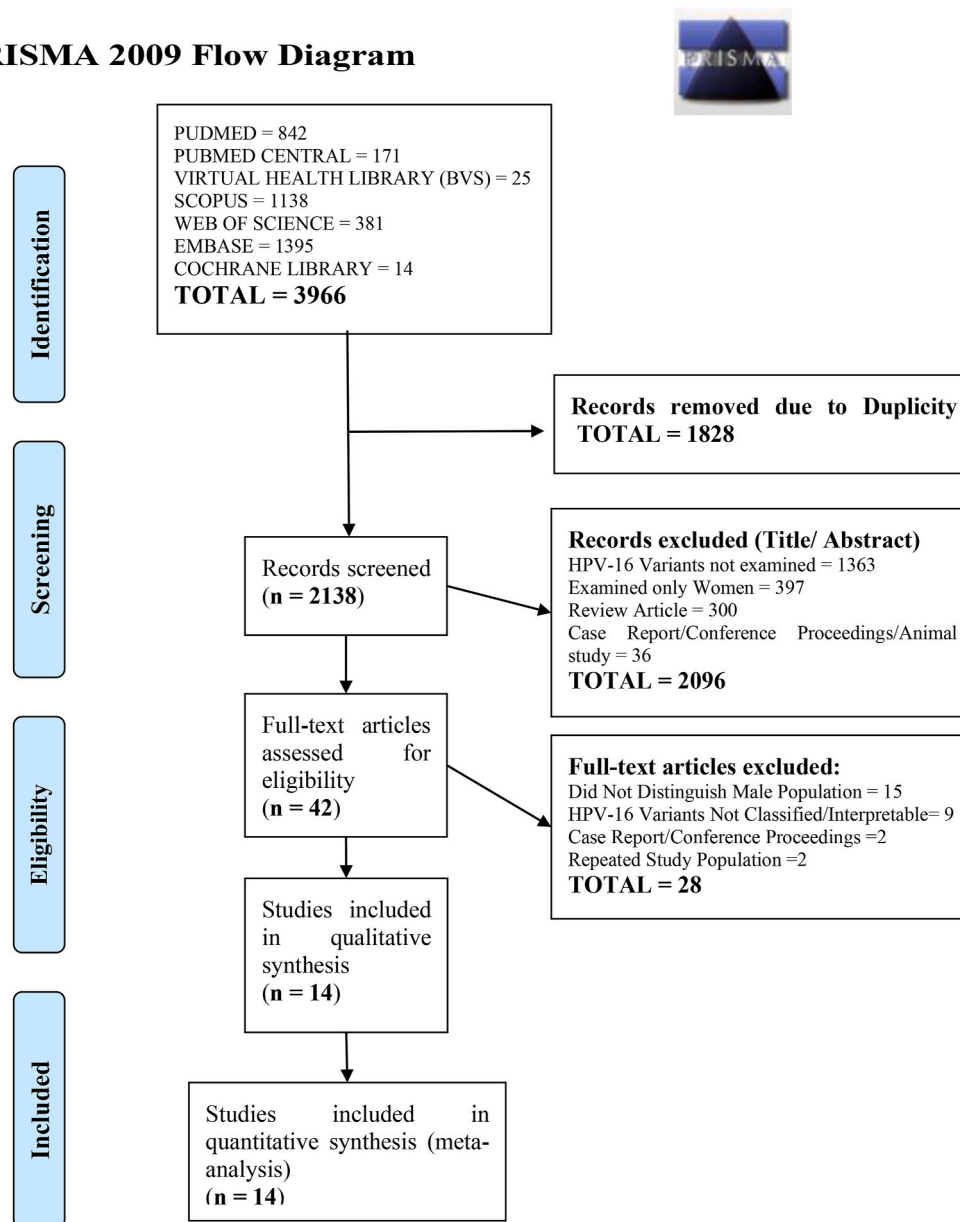


Fig. 1. PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) flow diagram of the literature search concerning the prevalence of HPV-16 variant lineages and sublineages in different anatomical region of men.

identified in 43 samples across 7 studies with a homogeneous distribution ($I^2 = 67.4\%$; $p = 0.005$) and a mean prevalence of 14.56% (95%CI = 7.51–21.60%; Fig. 4). In one study, reported sequence data precluded the distinction between lineages C or D variants among 9 samples, which we subsequently excluded (Kalantari et al., 2008).

3.2. Anatomical prevalence – lineage A

Lineage A variants were the most prevalent across all anatomical regions evaluated (Fig. 5A). Concerning all samples from the genital region ($n = 276$), data from 7 studies demonstrated a heterogeneous distribution of lineage A variants ($n = 230$) with an average prevalence of 81.83% (95%CI = 71.87–91.79%; $I^2 = 82.8\%$; $p < 0.0001$). Only the articles by Kalantari et al. (Kalantari et al., 2008) ($n = 8$) and Tornesello et al. (Tornesello et al., 2008) ($n = 17$) showed a prevalence of lineage A variants below 50%, which were 47.06% (95%CI = 26.17–69.04%) and 44.44% (95%CI = 24.56–66.28%), respectively. The prevalence of lineage A variants in the anal canal ($n = 118/131$) demonstrated a

heterogeneous distribution with a prevalence of 90.65% (95%CI = 80.33–100.97%; $I^2 = 77.7\%$; $p = 0.001$) between 5 studies. Only the study by Xi et al. (Xi et al., 1993) showed a prevalence of 50% (95%CI = 9.45–90.55%) of lineage A variants in the anal canal of men. Concerning the head and neck (H&N) region, 3 studies were analyzed ($n = 46$ samples), which showed an average heterogeneous distribution of the lineage A variants ($n = 42$) at 84.87% (95%CI = 59.46–110.27%; $I^2 = 67.9\%$; $p = 0.044$). Of these H&N samples, only the study by Joseph et al. (Joseph et al., 2013) found a 50% prevalence of this lineage among their population studied (95%CI = 15–85%).

3.3. Anatomical prevalence – lineage D

Lineage D variants were the second most prevalent HPV-16 lineage (Fig. 5B). In genital samples ($n = 276$), data analysis of 5 studies demonstrated a heterogeneous prevalence of lineage D variants ($n = 30$) at 13.29% (95%CI = 5.56–21.01%; $I^2 = 63.3\%$; $p = 0.028$). Anal canal samples positive for lineage D variants ($n = 9$) were obtained from only

Table 1
Characteristics of 14 studies selected according to the search criteria.

Author and Year	City Country	Population	Anatomical Region	Collection Method	Sample Type	Methodology Used	Genomic Region	N= HPV16+ seq'd	Lineages Detected	Sublineage Detected
Buonaguro FM. et al. (2000) (Buonaguro et al., 2000)	Kanpala, Uganda	Penile Cancer	Penis	Biopsy	Frozen	PCR/Sanger	E6/E7/L1/LCR	5	B = 5	B1 = 5
Ho L. et al. (1993) (Ho et al., 1993)	Singapore, Singapore	MSW	Penis	Smear/Punch Biopsy Resection	Frozen	PCR/Sanger	LCR	13	A = 12; D = 1	A1 = 11; A4 = 1; D3 = 1
Joseph AW. et al. (2013) (Joseph et al., 2013)	Baltimore, USA	HNC	H&N	Resection	FFPE	PCR	E6	4	A = 2; D = 2	A1 = 1; A2 = 1; D = N/R
Kalantari M. et al. (2008) (Kalantari et al., 2008)	São Paulo, Brazil	Penile Cancer	Penis	Resection	FFPE	PCR/Sanger	LCR	8	A = 8	N/R
López-Romero R. et al. (2013) (López-Romero et al., 2013)	Mexico City, MX	Penile Cancer	Penis	Resection	FFPE	PCR/Sanger	E6	57	A = 52; D = 5	N/R
Mendez-Martinez R. et al. (2020) (Méndez-Martínez et al., 2020)	Mexico City, MX	HIV + MSM	Anal Canal and H&N	Swab	Swab	PCR/Sanger	E6/LCR	Anal Canal: 40 H&N: 40	Anal Canal: A = 30; B = 1; D = 9 H&N: A = 38; D = 2	Anal Canal: A1 = 25; A2 = 2; A4 = 3; B1 = 1; D2 = 3; D3 = 6 H&N: A1 = 36; A4 = 2; D = N/R
Nicolás-Párraga S. et al. (2016) (Nicolás-Párraga et al., 2016)	16 different countries in Asia, Central and South America OR Europe	Penile and Anal Canal Cancer	Penis and Anal Canal	Resection	FFPE	PCR/Sanger	E6/L2/LCR	Penis: 115 Anal Canal: 38	Penis: A = 103; D = 12 Anal Canal: A = 38	Penis: A1-3 = 103; D = N/R Anal Canal: A1-3 = 38
Pham TTT. et al. (2018) (Pham et al., 2018)	Hanoi, Vietnam	Penile Cancer	Penis	Resection	Frozen	PCR/Sanger	E6/E7	29	A = 25; D = 4	A1-3 = 12; A4 = 13; D = N/R
Steinau M. et al. (2010) (Steinau et al., 2010)	(Multiple cities), USA	HIV + Men	Anal Canal	Swab	Swab	PCR/Pyrosequencing/Sanger	E6/E7	5	A = 5	A1 = 3; A2 = 2
Tanzi E. et al. (2009) (Tanzi et al., 2009)	Milan, Italy	HIV + MSM/MSMW	Anal Canal	Swab	Swab	PCR/Sanger	LCR	46	A = 44; C = 2	A1 = 44; C1 = 2
Tornesello ML. et al. (2008) (Tornesello et al., 2008)	Milan/Naples, Italy	Penile Cancer	Penis	Biopsy	FFPE	PCR/Sanger	E6/E7/LCR	18	A = 8; B = 2; D = 8	A1 = 8; B1 = 2; D3 = 8
Tornesello ML. et al. (2010) (Tornesello et al., 2010)	Naples, Italy	Renal Transplant Patients	Penis/Bladder	Urine	Urine	PCR/Sanger	L1	23	A = 22; B = 1	A1 = 22; B = N/R
Wu E. et al. (2020) (Wu et al., 2020)	Tong-Liao, Mongolia	HNC	H&N	Biopsy	FFPE	Nested PCR/Sanger	E6	2	A = 2	A4 = 2
Xi LF. et al. (1993) (Xi et al., 1993)	Seattle, USA	HIV + MSM	Anal Canal	Swab and Biopsy	Swab	PCR/Sanger	LCR	2	A = 1; B = 1	A1 = 1; B = N/R

MSM = Men who have sex with Men; MSW = Men who have sex with Women; MSWM = Men who have sex with Men and Women; H&N= Head and Neck; HNC= Head and Neck Cancer; HIV+= Positive for Human Immunodeficiency Virus; FFPE= Formalin-Fixed Paraffin-Embedded; LCR = Long Control Region; HPV16+ seq'd = HPV-16 Positive samples that were sequenced; N/R = Not reported.

one study (Mendez-Martinez et al. ([Méndez-Martínez et al., 2020](#))), where the prevalence was 22.50% (95%CI = 9.91–35.09%). Finally, H&N samples (n = 46) with lineage D variants (n = 4) had a heterogeneous prevalence at 24.12% (95%CI = –19.48–67.72%; $I^2 = 83.5\%$; $p = 0.014$). The analysis included 2 articles, and the study by Joseph et al. ([Joseph et al., 2013](#)) demonstrated a 50% (95%CI = 15–85%) prevalence, while the study by Mendez-Martinez et al. ([Méndez-Martínez et al., 2020](#)) was 5% (95%CI = 1.38–16.5%), yet the latter carried more weight in the analysis since the number of samples evaluated was much higher.

3.4. Variant analysis by geographical region

Another segment of the analyses was the relationship between the

HPV-16 lineages and their distribution in different geographic regions independent of the anatomical site examined ([Fig. 6](#)). Among the 14 included studies displayed in [Table 1](#), Africa ([Buonaguro et al., 2000](#)), Asia ([Ho et al., 1993](#); [Pham et al., 2018](#); [Wu et al., 2020](#)), North America ([Joseph et al., 2013](#); [López-Romero et al., 2013](#); [Méndez-Martínez et al., 2020](#); [Steinau et al., 2010](#); [Xi et al., 1993](#)), Central/South America ([Kalantari et al., 2008](#)), and Europe ([Tanzi et al., 2009](#); [Tornesello et al., 2008, 2010](#)) were represented. One study, by Nicolás-Párraga et al. ([Nicolás-Párraga et al., 2016](#)), was a multinational study that included samples from 16 countries in Asia, Central/South America, and Europe.

A distribution pattern was observed in 4 geographical regions: Asia, North America, South and Central America, and Europe for lineages A and D. The overall prevalence of lineage A variants ([Fig. 6A](#)) was heterogeneously distributed at 84.78% (95%CI = 78.23–91.34%; $I^2 =$

Table 2
Characteristics of 14 studies selected according to the search criteria.

Author and Year	Anatomical Region	Neoplasm	N= HPV16+ seq'd	Lineages Detected	Sublineage Detected
Buonaguro FM. et al. (2000) (Buonaguro et al., 2000)	Penis	Yes	5	B = 5	B1 = 5
Ho L. et al. (1993) (Ho et al., 1993)	Penis	No	13	A = 12; D = 1	A1 = 11; A4 = 1; D3 = 1
Joseph AW. et al. (2013) (Joseph et al., 2013)	H&N	Yes	4	A = 2; D = 2	A1 = 1; A2 = 1; D = N/R
Kalantari M. et al. (2008) (Kalantari et al., 2008)	Penis	No	8	A = 8	N/R
López-Romero R. et al. (2013) (López-Romero et al., 2013)	Penis	No	57	A = 52; D = 5	N/R
Mendez-Martinez R. et al. (2020) (Méndez-Martínez et al., 2020)	Anal Canal and H&N	Yes	Anal Canal: 40 H&N: 40	Anal Canal: A = 30; B = 1; D = 9 H&N: A = 38; D = 2	Anal Canal: A1 = 25; A2 = 2; A4 = 3; B1 = 1; D2 = 3; D3 = 6 H&N: A1 = 36; A4 = 2; D = N/R
Nicolás-Párraga S. et al. (2016) (Nicolás-Párraga et al., 2016)	Penis and Anal Canal	Yes	Penis: 115 Anal Canal: 38	Penis: A = 103; D = 12 Anal Canal: A = 38	Penis: A1-3 = 103; D = N/R Anal Canal: A1-3 = 38
Pham TTT. et al. (2018) (Pham et al., 2018)	Penis	Yes	29	A = 25; D = 4	A1-3 = 12; A4 = 13; D = N/R
Steinau M. et al. (2010) (Steinau et al., 2010)	Anal Canal	No	5	A = 5	A1 = 3; A2 = 2
Tanzi E. et al. (2009) (Tanzi et al., 2009)	Anal Canal	No	46	A = 44; C = 2	A1 = 44; C1 = 2
Tornesello ML. et al. (2008) (Tornesello et al., 2008)	Penis	Yes	18	A = 8; B = 2; D = 8	A1 = 8; B1 = 2; D3 = 8
Tornesello ML. et al. (2010) (Tornesello et al., 2010)	Penis/Bladder	No	23	A = 22; B = 1	A1 = 22; B = N/R
Wu E. et al. (2020) (Wu et al., 2020)	H&N	Yes	2	A = 2	A4 = 2
Xi LF. et al. (1993) (Xi et al., 1993)	Anal Canal	No	2	A = 1; B = 1	A1 = 1; B = N/R

HPV16+ seq'd = HPV-16 Positive samples that were sequenced; N/R = Not reported.

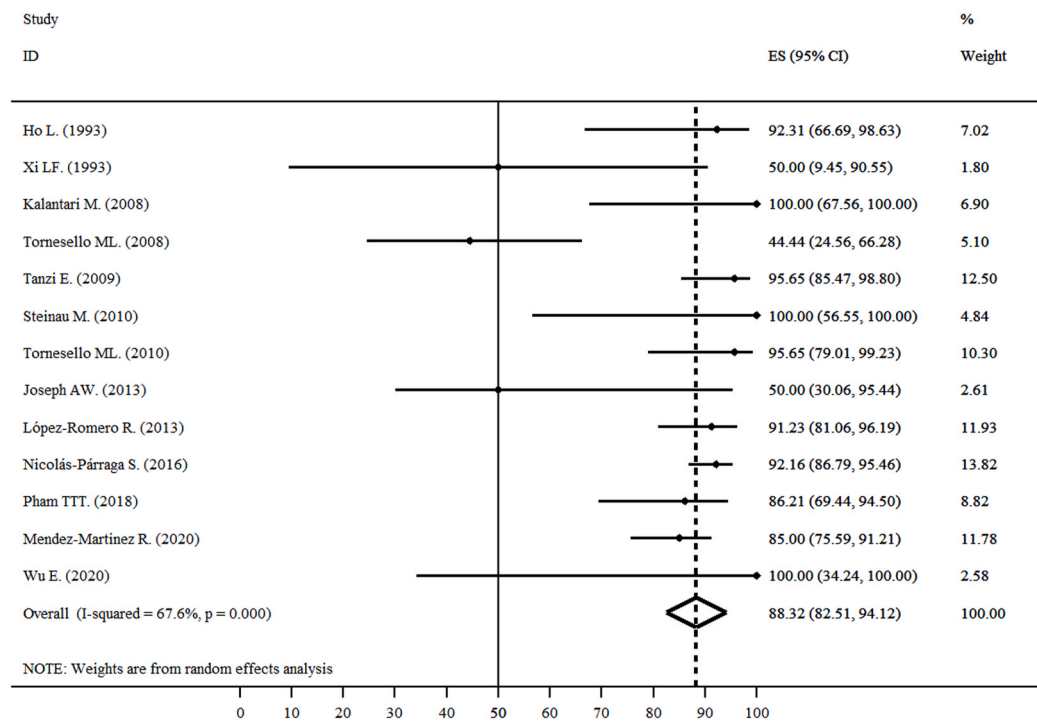


Fig. 2. Forest Plot of the overall prevalence of HPV-16 Lineage A variants. The horizontal axis represents the CI of risk difference. The points represent the risk difference in each study. The dots located to the right of the median line indicate higher prevalence of lineage A variants in the studied population; the size of the dots represents the relative weight of each study in the final outcome. The diamond indicates the final outcome of the meta-analysis with random effects. ES = Effect Size; CI, confidence interval (95%).

73.4%; $p < 0.0001$) among 13 studies from these four different geographic regions. Meanwhile, the overall prevalence of lineage D variants (Fig. 6B) found in 7 studies was homogeneously distributed at 14.62% (95%CI = 8.15–21.09%; $I^2 = 62.6%$; $p = 0.009$).

The prevalence of lineage A variants (Fig. 6A) in Asia ($n = 39$) was homogeneously distributed at 90.28% (95%CI = 81.20–99.36%; $I^2 = 0.0%$; $p = 0.768$). The Nicolas-Parraga et al. (Nicolás-Párraga et al., 2016) study did not distinguish the 38 male anal canal samples in their study according to geographical region. Regarding the 39 samples from the other three articles, 23 (58.97%) were sublineages A1-3, and 16

samples (41.02%) were identified as A4. Furthermore, lineage D variants (Fig. 6B) in Asia ($n = 5$) had a homogeneous distribution and prevalence of 11.47% (95%CI = 1.16–21.32%; $I^2 = 0.0%$; $p = 0.556$); unfortunately, the sublineages of the D variants detected were only available from the Ho et al. (Ho et al., 1993) study (1 sample of sublineage D3) and the other studies did not examine sublineages of D variants.

Concerning North America, five studies possessed a heterogeneous distribution ($I^2 = 61.1%$; $p = 0.036$) of lineage A variants (Fig. 6A) with a prevalence of 84.59% (95%CI = 73.59–95.58%). Only Xi et al.'s (Xi

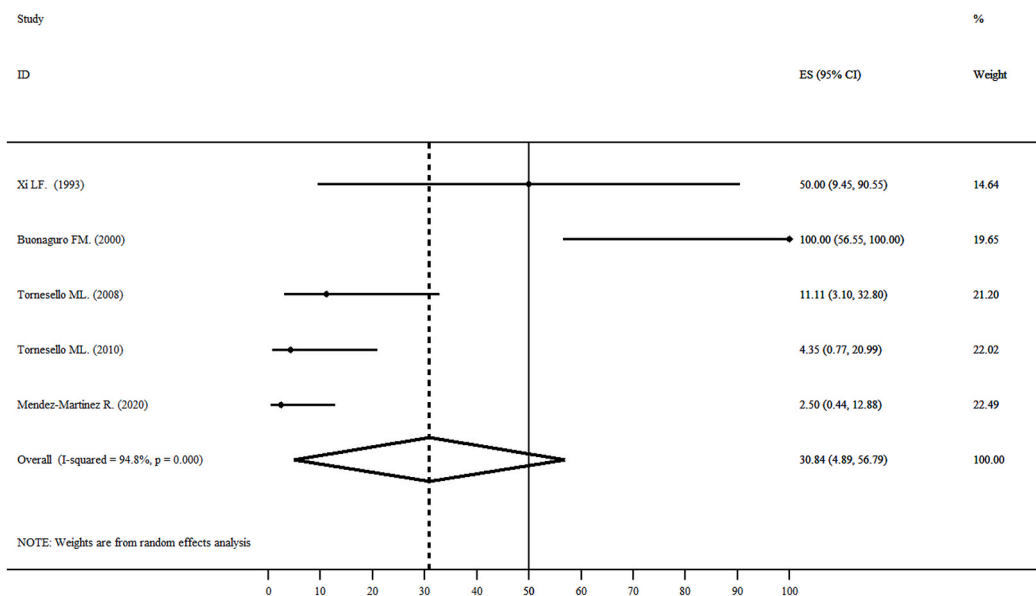


Fig. 3. Forest Plot of the overall prevalence of HPV-16 Lineage B variants. The horizontal axis represents the CI of risk difference. The points represent the risk difference in each study. The dots located to the right of the median line indicate higher prevalence of lineage B variants in the studied population; the size of the dots represents the relative weight of each study in the final outcome. The diamond indicates the final outcome of the meta-analysis with random effects. ES = Effect Size; CI, confidence interval (95%).

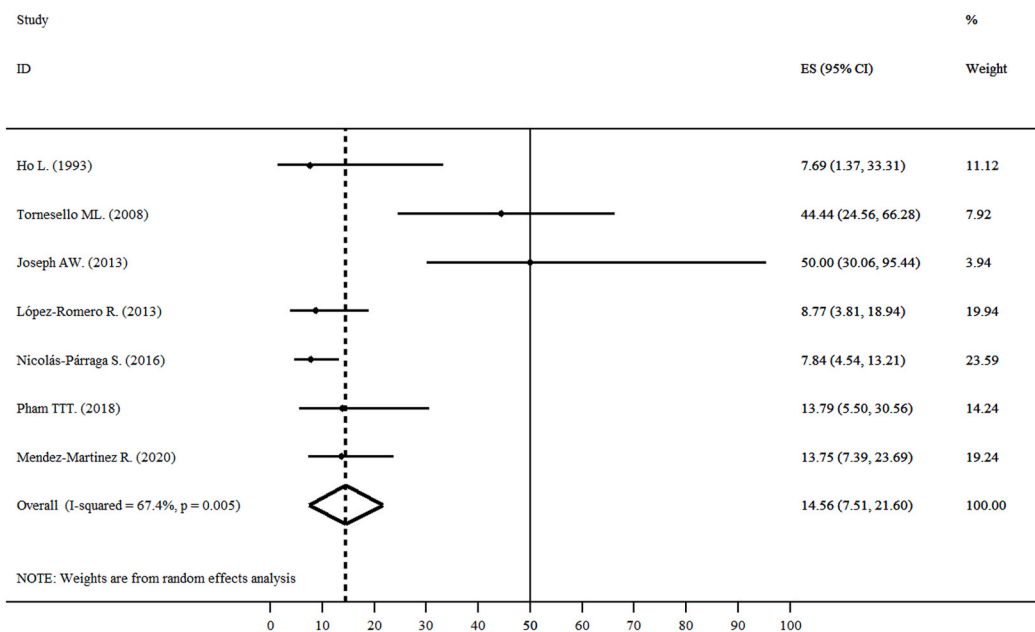


Fig. 4. Forest Plot of the overall prevalence of HPV-16 Lineage D variants. The horizontal axis represents the CI of risk difference. The points represent the risk difference in each study. The dots located to the right of the median line indicate higher prevalence of lineage D variants in the studied population; the size of the dots represents the relative weight of each study in the final outcome. The diamond indicates the final outcome of the meta-analysis with random effects. ES = Effect Size; CI, confidence interval (95%).

et al., 1993) and Joseph et al.’s (Joseph et al., 2013) studies had a lineage A prevalences of 50% (95%CI = 9.45–90.55%; 95%CI = 15–85%, respectively). Data available from both López-Romero et al. (López-Romero et al., 2013) and Nicolas-Parraga et al. (Nicolás-Párraga et al., 2016) did not allow for sublineage classification. The sublineages detected in the remaining studies were A1 (n = 66, 86.84%), A2 (n = 5, 6.58%), and A4 (n = 5, 6.58%). The prevalence of lineage D variants (Fig. 6B) were also heterogeneously distributed at 14.31% (95%CI = 3.78–24.84%; I² = 63.2%; p = 0.066). Only samples from Mendez-Martínez et al. (Méndez-Martínez et al., 2020) described lineage D variants at the sublineage levels: 3 and 6 anal canal samples were D2 and D3 sublineages, respectively. Only two samples were identified as sublineage B1: one from Xi et al. (Xi et al., 1993) and one from Mendez-Martínez et al. (Méndez-Martínez et al., 2020).

Examining South and Central American samples, two studies had a prevalence with a heterogenous distribution of lineage A variants at 65.97% (95%CI = 31.32–100.62%; I² = 87.7%; p = 0.004) (Fig. 6A). The prevalence of lineage D variants (Fig. 6B) was 17.50% (95%CI = 5.90–29.10%) obtained from one article (Nicolás-Párraga et al., 2016). The sublineages were not examined from the sample pools of these two studies. Moreover, the Kalantari et al. (Kalantari et al., 2008) study possessed 9 samples of lineages C/D variants that could not be distinguished from one another.

Concerning European samples, lineage A variants (Fig. 6A) demonstrated a heterogeneous distribution from four studies at a prevalence of 86.59% (95%CI = 74.48–98.70%; I² = 86.2%; p < 0.0001). Only the study by Tornesello et al. (Tornesello et al., 2008) showed a prevalence of 44.44% (95%CI = 24.56–66.28%). Concerning lineage D variants

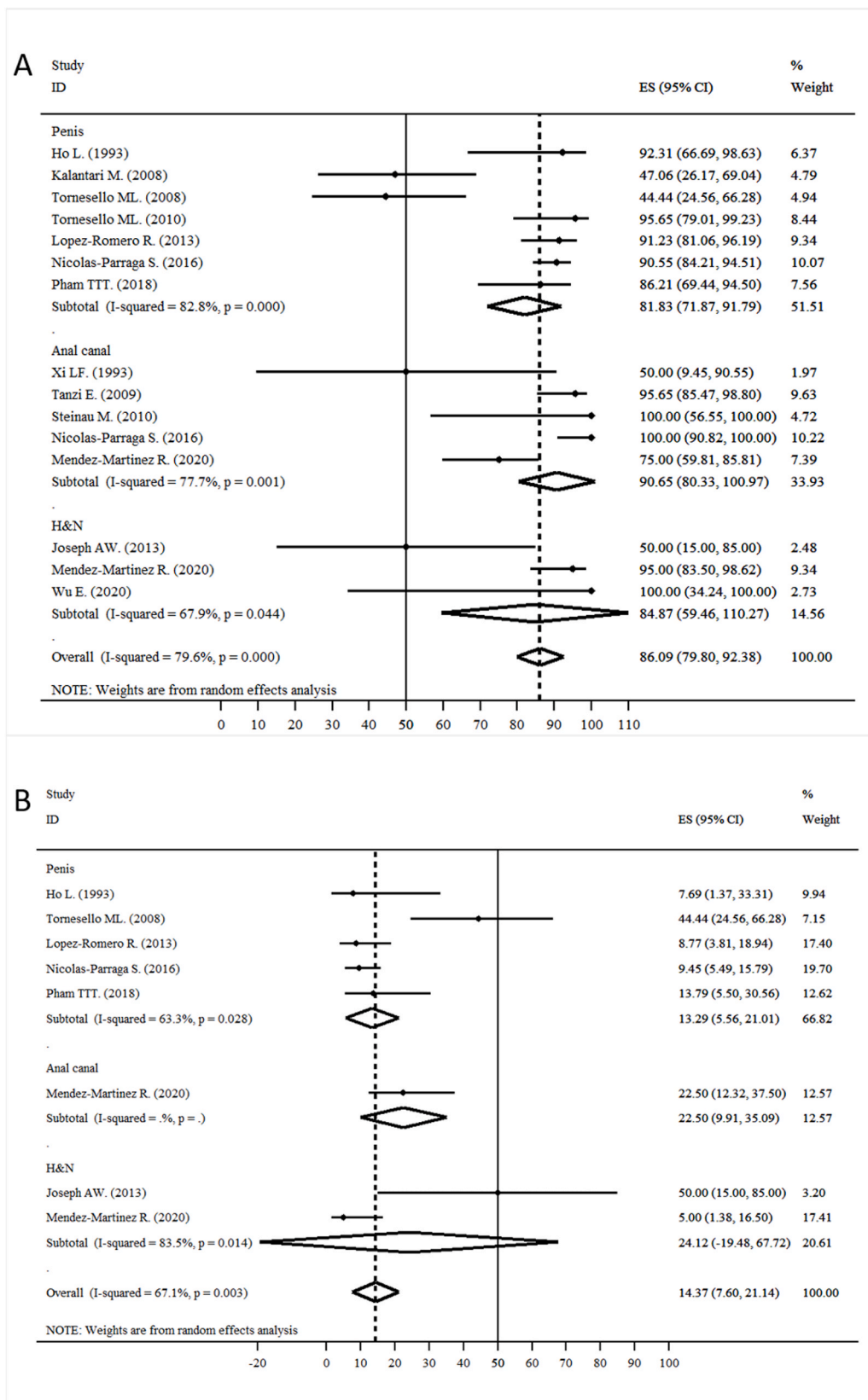


Fig. 5. Forest Plot of the overall prevalence of HPV-16 variants from different anatomical sites. The horizontal axis represents the CI of risk difference. The points represent the risk difference in each study. The dots located to the right of the median line indicate higher prevalence of lineage A variants (A) and lineage D variants (B) in the studied population; the size of the dots represents the relative weight of each study in the final outcome. The diamond indicates the final outcome of the meta-analysis with random effects. ES = Effect Size; CI, confidence interval (95%).

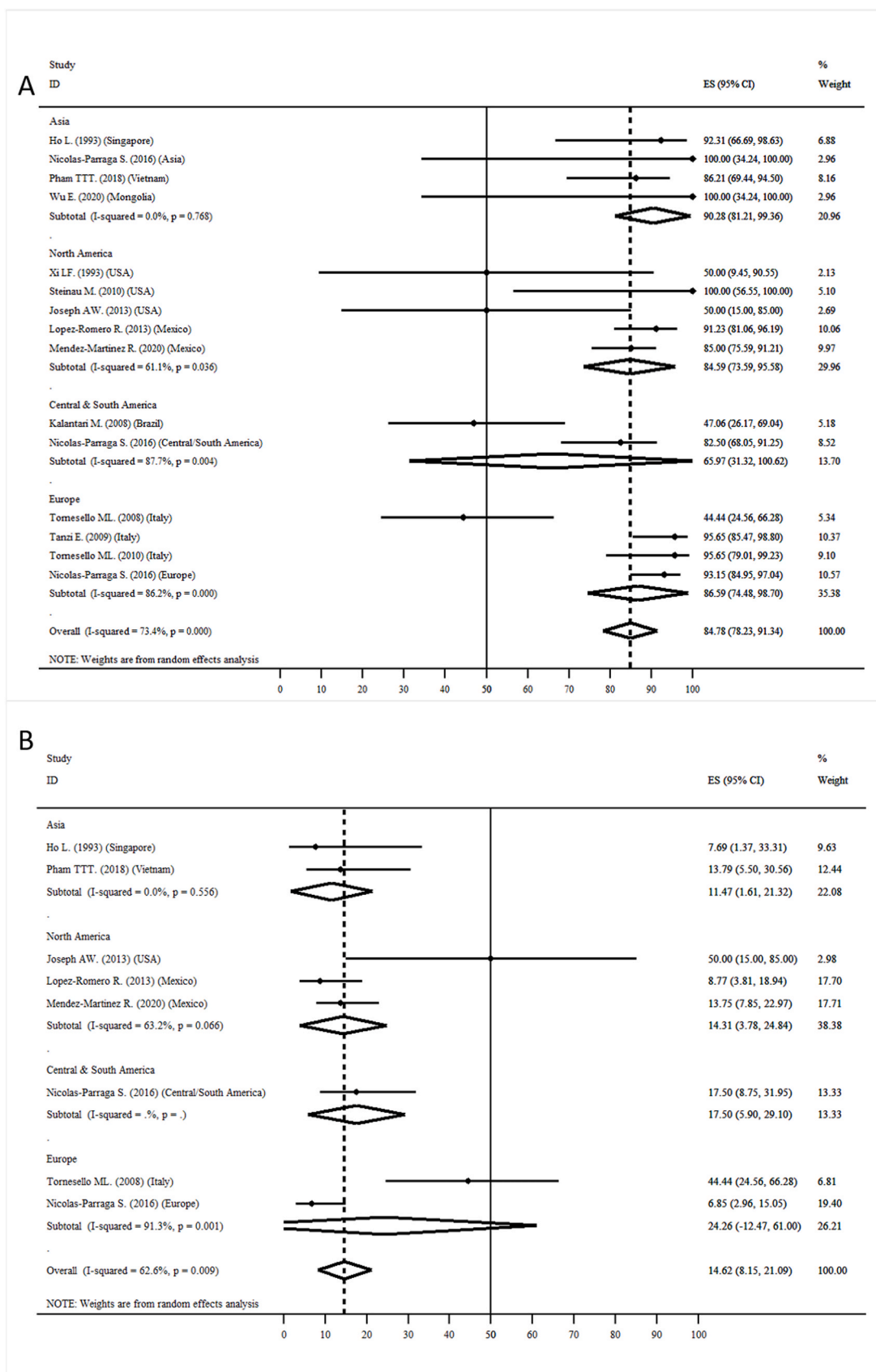


Fig. 6. Forest Plot of the overall prevalence of HPV-16 variants from different geographical locations. The horizontal axis represents the CI of risk difference. The points represent the risk difference in each study. The dots located to the right of the median line indicate higher prevalence of lineage A variants (A) and lineage D variants (B) in the studied population; the size of the dots represents the relative weight of each study in the final outcome. The diamond indicates the final outcome of the meta-analysis with random effects. ES = Effect Size; CI, confidence interval (95%).

(Fig. 6B) there was heterogenous distribution and prevalence of 24.29% (95%CI = -12.47–61.00%; $I^2 = 91.3\%$; $p = 0.001$) among European samples. The sublineages identified were A1-3 ($n = 74$), B1 ($n = 2$), C1 ($n = 2$), and D3 ($n = 8$).

Finally, the article by Buonaguro et al. (Buonaguro et al., 2000) was the only study with data from Africa that could be properly interpreted and included in this review. However, being the only study at the time of the search and including only 5 samples (all sublineage B1 variants), meta-analyses could not be performed concerning prevalence and distribution as pertains to geography.

4. Discussion

Based upon nucleotide sequence analysis of the viral genome fragments, several studies have depicted the prevalence of the different HPV-16 variants within different populations, revealing the uneven distribution patterns of these isolates globally (Cornet et al., 2012; Ho et al., 1993; Yamada et al., 1997). Nevertheless, the majority of studies conducted have relied on cervical samples, whereas to date the prevalence of HPV-16 variants in other HPV-related neoplasms such as penile, anal, and oropharyngeal cancers in men is far less reported.

Similar to the cervix, data summarized in this meta-analysis revealed that at the male genitals, lineage A variants were the most commonly detected followed by lineage D variants. Moreover, lineage A variants were the most prevalent independent of the anatomical site assessed and were detected among 81.83%, 90.65%, and 84.87% of penile, anal canal and H&N samples, respectively. Although HPV-16 lineage D variants were detected in approximately 14% of penile and H&N samples, the prevalence of these variants in anal canal samples was 22.5% from one study (Méndez-Martínez et al., 2020). Overall, HPV-16 lineage B variants were detected only in 10 samples (8 penile, 2 anal canal) from 5 studies (Buonaguro et al., 2000; Méndez-Martínez et al., 2020; Tornesello et al., 2008, 2010; Xi et al., 1993), and lineage C variants in only 2 anal canal samples from one study (Tanzi et al., 2009).

Among HIV + women a high diversity of HPV-16 variants are detected in anal canal samples (Volpini et al., 2017), as well as in the cervix in comparison to HIV- women (Mayrand et al., 2000). It is now clear that those who are HIV + MSM are the highest at-risk group for both anal cancer (Clifford et al., 2021) and HPV-16 infection at this anatomical region when compared to HIV- men (Machalek et al., 2012). In the present meta-analysis, four studies sequenced non-tumoral anal canal samples of HIV + MSM populations in the USA, Italy, and Mexico (Méndez-Martínez et al., 2020; Steinau et al., 2010; Tanzi et al., 2009; Xi et al., 1993) and only one study (Nicolás-Parraga et al., 2016) examined confirmed anal cancer samples from HIV- men. Although extensive considerations are hindered by the small number of studies, a higher variability of HPV-16 lineage variants were detected among HIV + MSM (lineages A, B, C, and D) compared to those identified among HIV- MSM (lineages A and D) (Table 1). Interestingly, the analysis of HPV-16 variants in 40 paired anal canal and oral samples obtained from HIV + MSM revealed matching variants in only 8 (20%) individuals (Méndez-Martínez et al., 2020).

We, and others, have previously demonstrated that, among multi-ethnic populations, HPV-16 infections with lineage D and sublineage A4

variants confer increased risk for cervical infection persistence and lesion development (Berumen et al., 2001; Hildesheim et al., 2001; Mirabello et al., 2016; Sichero et al., 2007). Specific HPV-16 variants seem also to be associated with histopathological features of cervical tumors, where variants of sublineages A1-A3 are associated only to squamous cell carcinomas (SCC), and those of lineage D are associated with both SCC and adenocarcinomas (ADC), which are often more aggressive than SCC (Berumen et al., 2001; Lou et al., 2020; Mirabello et al., 2016). A summary of tumor vs. nontumor samples may be found in Table 3. Regarding men, nearly all the studies exploring the HPV-16 prevalence at the genitals, involved cancers samples, while only two studies investigated non-cancerous tissues (Ho et al., 1993; Xi et al., 1993) (Table 2). Among the 36 normal penile specimens, 34 (94.4%) harbored lineage A variants, whereas lineage D variants were detected in a single specimen (2.8%). On the other hand, among the 232 penile cancer tissue samples, 196 (84.5%) possessed HPV-16 lineage A variants, and 29 (12.5%) harbored lineage D variants, indicating that HPV-16 lineage D variants could also confer to men an increased risk for penile cancer.

Within H&N samples, a higher prevalence of HPV-16 lineage D variants was also observed among cancer samples (33.3%) in comparison with non-tumoral samples. However, only one study included herein characterized HPV-16 variants among samples obtained from normal oral mucosa (Méndez-Martínez et al., 2020), precluding any further considerations (Table 3). Furthermore, because it was not possible to distinguish between male and female HPV-16 lineage D anal canal cancer samples analyzed in the study of Nicolas-Parraga, it was not possible to compare the distribution of HPV-16 variants between normal and cancer samples in this anatomical region. However, as seen in Table 3, we were able to make some observations. We observed that there were more HPV-16+ tumor samples than HPV-16+ non-tumor samples. Moreover, of the HPV-16+ tumor samples, lineages A and D appear to be the most prevalent. Looking at just the lineage D positive samples 31/43 (72%) were tumor samples, while considering lineage A samples 238/390 (61%) were also tumor samples. The apparently higher prevalence of lineage D positive tumor samples observed, prompted our hypothesis that lineage D variants may be more carcinogenic – as is observed in cervical carcinomas.

Lopez-Romero et al., Kalantari et al., and Tornesello et al. (2008) provided some insight as to the histopathology of their tumor samples. However, the other studies only referred to their samples as penile cancers (Buonaguro et al., Pham et al.) or at most squamous cell carcinomas with no specificities of grade or sub-type (Nicolas-Parraga et al.). Lopez-Romero et al.'s study described 52 penile SCC, 1 sarcomatoid, 4 condylomatous, 2 papillary, 2 verrucous, 10 carcinomas in situ, and 15 mixed carcinomas. Unfortunately, they did not distinguish these samples with the sequencing data, therefore, we cannot associate the variants with the histopathology. As for the histopathological characteristics of Kalantari et al.'s samples, they were described in another paper (Bezerra et al., 2001). Based upon that other paper, the 24 samples likely used for the article included herein were HPV-16, HPV-18, and HPV-6/-11 positive samples. For our current review and analysis, the HPV-16 samples were of interest. Unfortunately, the authors of this previous paper did not describe the histopathological characteristics of

Table 3
HPV-16 lineage variants distribution in tumoral and non-tumoral samples of different anatomical regions in men.

Anatomical Distribution of HPV-16 Lineages								
Anat. Region (N)	Lineage A		Lineage B		Lineage C		Lineage D	
	Tumor % (N)	Non-tumor % (N)	Tumor % (N)	Non-tumor % (N)	Tumor % (N)	Non-tumor % (N)	Tumor % (N)	Non-tumor % (N)
Penis (268)	84.5% (196)	94.4% (34)	3% (7)	2.8% (1)	0%	0%	12.5% (29)	2.8% (1)
Anal Canal (131)	100% (38)	86% (80)	0%	2.2% (2)	0%	2.2% (2)	0% ^a	9.7% (9)
Head & Neck (46)	66.7% (4)	95% (38)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	33.3% (2)	5% (2)

^a The distinction between lineage D variants of male and female anal canal samples could not be interpreted. Anat. = Anatomical; Percentages were calculated based upon the total number of tumor samples, or the total number of non-tumor samples available for each anatomical region and lineage.

the HPV-16 positive samples alone, but rather they pooled the HPV-16/-18/-6/-11 samples as HPV+. On the other hand, Tornesello et al.'s (2008) study reported that 17 keratinizing SCC and 1 basaloid SCC were sequenced. Two keratinizing SCC were lineage B variants, while 7 keratinizing SCC samples and 1 basaloid SCC sample were lineage D variants. The remaining 8 samples of keratinizing SCC were lineage A variants (reported as not prototype). This furthers our hypothesis that lineage D may have a more carcinogenic tendency. Although SCC types were reported, there were no reports of ADCs. However, based on these small numbers we cannot extrapolate any general conclusions, thus, warranting further investigation.

The distribution of HPV-16 variants characterized in cervical samples in different geographical areas varies significantly and correlates with the intrinsic admixture level of each population (Cornet et al., 2012; Ho et al., 1993; Yamada et al., 1997). Sublineages A1-A3 variants are most frequently detected worldwide, and also respond for almost all HPV-16 positive cervical samples within Europe (Cornet et al., 2012; Zehbe et al., 1998). In Africa, lineages B and C variants are the most prevalent, in Southeast Asia sublineage A4 variants prevail, whereas lineage D variants are prevalent in the Americas and are the second most frequently identified variant globally in cervical samples (Cornet et al., 2012; Yamada et al., 1997). In our analyses considering all the samples herein, similar patterns of HPV-16 variant distributions associated with geography were observed among men. Overall, HPV-16 lineage A variants were the most commonly detected independent of the country where samples were obtained, and the highest prevalences were observed in Europe (86.59%) and Asia (90.28%) in comparison with North (84.59%) and Central/South (65.97%) Americas. Furthermore, as expected, all samples of lineage A variants were of sublineages A1-A3 among samples obtained from European populations, while in Asia sublineage A4 variants were found in 36% of the samples. It is noteworthy that sublineage A4 variants were more prevalent among penile cancer samples (44.8%) (Pham et al., 2018) compared to penile swabs obtained from healthy men (7.7%) (Ho et al., 1993) in Asia. Although further studies regarding the distribution of these variants are warranted among men, in women it has been shown that sublineage A4 variants are associated with a higher risk of cervical cancer in comparison with sublineage A1 variants infection (Mirabello et al., 2016).

Lineage D variants were identified in samples from every geographic region, except Africa, and as expected, higher prevalences of these variants were observed within the Americas. Nevertheless, the raw data of most studies included did not allow for a distinction between variants of HPV-16 sublineages D2 and D3.

There were a few limitations in this study that should be addressed. One of the greatest obstacles in identifying eligible articles was the use of different systems of nomenclature for variant assignment. Although a standardized A, B, C, D system was proposed in 2012 (Cornet et al., 2012), many recent studies continue using geographical nomenclature, or E6 gene-based nomenclature to classify HPV-16 variants (Boldrini et al., 2018; de la Garza-Ramos et al., 2020). The problem with these systems is that, often, not enough SNPs were described that could distinguish variant lineages, and the samples were excluded from analysis. In fact, 10 of the 14 studies examined herein were subject to a detailed manual “translation” of the nomenclature into the current classification system based upon the raw sequences presented in the data, supplementary data, and text. We recognize the usefulness of the former classification systems in certain contexts, but recommend that future studies concerning HPV-16 variants consider applying the nomenclature system proposed by Cornet et al. (Cornet et al., 2012).

Another important limitation of this study was the lack of data coming from the African continent likely influenced the prevalence values of lineage B and C variants identified. Furthermore, 5 out of the 14 studies included in this review had ≤ 5 HPV-16 positive samples. Finally, our analyses were unable to address, in a detailed way, the possibility/prevalence of multisite infections or persistence of infections.

5. Conclusion

This systematic review with meta-analysis presents a prevalence and distribution of the lineages and sublineages of HPV-16 variants among men as currently reported in the literature. Examining 14 articles, which included 445 samples of clearly defined HPV-16 lineages, derived from the anogenital region and/or oral cavities of male participants in North America, Central/South America, Asia, Europe or Africa, our findings corroborate and extend the broad literature obtained from women regarding the global distribution and prevalence HPV-16 lineages and sublineages and further suggest that specific variants may be associated with increased genital cancer risk among males. Nevertheless, well-designed, large-scale studies are required to better understand the natural history of HPV-16 infections in different anatomical sites of men.

Funding

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) [Grant number 2017/23211-8 to LS; and 2019/15717-4 to MTF]; and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [Grant number 303431/2018-0 to LS].

CRediT authorship contribution statement

Matthew Thomas Ferreira: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing – original draft, Writing – review & editing, All authors have read and agreed to the published version of the manuscript. **Milena Giulia Gonçalves:** Methodology, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing – original draft, Writing – review & editing, All authors have read and agreed to the published version of the manuscript. **Laura Sichero:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Data curation, Writing – original draft, Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition, All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Acknowledgements

We would like to thank Ms. Ana Paula de Morais e Olivera of the School of Medical Sciences Library at State University of Campinas (UNICAMP) for her kind assistance in performing the initial search for the articles.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.virol.2021.03.007>.

Potential conflicts of interest

None reported.

Declaration of interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

- Berumen, J., Ordoñez, R.M., Lazcano, E., Salmeron, J., Galvan, S.C., Estrada, R.A., et al., 2001. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J. Natl. Cancer Inst.* 91 (17), 1325–1330.
- Bezerra, A.L.R., Lopes, A., Santiago, G.H., Ribeiro, K.C.B., Latorre, M.R.D.O., Villa, L.L., 2001. Human papillomavirus as a prognostic factor in carcinoma of the penis. *Cancer* 91 (12), 2315–2321.

- Boldrini, N.A.T., Volpini, L.P.B., Bueno de Freitas, L., Musso, C., Merçon de Vargas, P.R., Cruz Spano, L., Espinosa Miranda, A., 2018. Anal HPV infection and correlates in HIV-infected patients attending a Sexually Transmitted Infection clinic in Brazil. *Publ. Librar. Sci.* 13 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199058>.
- Bouvard, V., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F., et al., 2009. A review of human carcinogens—Part B: biological agents. *Lancet Oncol.* 10 (4), 321–322.
- Buonaguro, F.M., Tornesello, M.L., Salatiello, I., Okong, P., Buonaguro, L., Beth-Giraldo, E., et al., 2000. The Uganda study on HPV variants and genital cancers. *J. Clin. Virol.* 19 (1–2), 31–41.
- Clifford, G.M., Georges, D., Shiels, M.S., Engels, E.A., Albuquerque, A., Poynten, I.M., et al., 2021. A meta-analysis of anal cancer incidence by risk group: towards a unified anal cancer risk scale. *Int. J. Canc.* 148, 38–47.
- Cornet, I., Gheit, T., Franceschi, S., Vignat, J., Burk, R.D., Sylla, B.S., et al., 2012. Human papillomavirus type 16 genetic variants: phylogeny and classification based on E6 and LCR. *J. Virol.* 86 (12), 6855–6861.
- de la Garza-Ramos, M.A., Urrutia-Baca, V.H., Urbina-Rios, C.S., García-Robayo, D.A., Tamez-Guerra, P., Gomez-Flores, R., 2020. Prevalence of human papillomavirus in the oral cavity of an indigenous community from Southwest México. *Infect. Genet. Evol.* 83, 104283. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104283>.
- de Sanjosé, S., Serrano, B., Tous, S., Alejo, M., Lloveras, B., Quirós, B., et al., 2018. Burden of human papillomavirus (HPV)-Related cancers attributable to HPVs 6/11/16/18/31/33/45/52 and 58. *JNCI Cancer Spectr.* 2 (4).
- Doorbar, J., Egawa, N., Griffin, H., Kranjec, C., Murakami, I., 2015. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev. Med. Virol.* 25 (Suppl. 1), 2–23.
- Durst, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., Zur Hausen, H., 1983. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80 (12 I), 3812–3815.
- Health NI of. Quality Assessment Tool for Observational Cohort and Cross-Sectional Studies, 2014.
- Hildesheim, Allan, Schiffman, Mark, Bromley, Christina, Wacholder, Sholom, Herrero, Rolando, Rodriguez, Ana Cecilia, et al., 2001. Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 93, 315–318. <https://doi.org/10.1093/jnci/93.4.315>.
- Ho, L., Tay, S.K., Chan, S.Y., Bernard, H.U., 1993. Sequence variants of human papillomavirus type 16 from couples suggest sexual transmission with low infectivity and polyclonality in genital neoplasia. *J. Infect. Dis.* 168 (4), 803–809.
- Joseph, A.W., Ogawa, T., Bishop, J.A., Lyford-Pike, S., Chang, X., Phelps, T.H., et al., 2013. Molecular etiology of second primary tumors in contralateral tonsils of human papillomavirus-associated index tonsillar carcinomas. *Oral Oncol.* 49 (3), 244–248.
- Kalantari, M., Villa, L.L., Calleja-Macias, I.E., Bernard, H.-U., 2008. Human papillomavirus-16 and 18 in penile carcinomas: DNA methylation, chromosomal recombination, and genomic variation. *Int. J. Canc.* 123 (8), 1832–1840.
- López-Romero, R., Iglesias-Chiesa, C., Alatorre, B., Vázquez, K., Piña-Sánchez, P., Alvarado, I., et al., 2013. HPV frequency in penile carcinoma of Mexican patients: important contribution of HPV16 european variant. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 6 (7), 1409–1415.
- Lou, H., Boland, J., Torres-Gonzalez, E., Albanez, A., Zhou, W., Steinberg, M., et al., 2020. The D2 and D3 sublineages of human papillomavirus 16-positive cervical cancer in Guatemala differ in integration rate and age of diagnosis. *Can. Res.* 2020 canres.0029.
- Machalek, D.A., Poynten, M., Jin, F., Fairley, C.K., Farnsworth, A., Garland, S.M., et al., 2012. Anal human papillomavirus infection and associated neoplastic lesions in men who have sex with men: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol.* 13 (5), 487–500.
- Mayrand, M.H., Coutlee, F., Hankins, C., Lapointe, N., Forest, P., De Ladurantaye, M., et al., 2000. Detection of human papillomavirus type 16 DNA in consecutive genital samples does not always represent persistent infection as determined by molecular variant analysis. *J. Clin. Microbiol.* 38 (9), 3388–3393.
- Méndez-Martínez, R., Maldonado-Frías, S., Vázquez-Vega, S., Caro-Vega, Y., Rendón-Maldonado, J.G., Guido-Jiménez, M., et al., 2020. High prevalent human papillomavirus infections of the oral cavity of asymptomatic HIV-positive men. *BMC Infect. Dis.* 20.
- Mirabello, L., Yeager, M., Cullen, M., Boland, J.F., Chen, Z., Wentzensen, N., et al., 2016. HPV16 sublineage associations with histology-specific cancer risk using HPV whole-genome sequences in 3200 women. *J. Natl. Cancer Inst.* 108 (9).
- Nicolás-Párraga, S., Gandini, C., Pimenoff, V.N., Alemany, L., de Sanjosé, S., Xavier Bosch, F., et al., 2016. HPV16 variants distribution in invasive cancers of the cervix, vulva, vagina, penis, and anus. *Cancer Med* 5 (10), 2909–2919.
- Ouzzani, M., Hammady, H., Fedorowicz, Z., Elmagarmid, A., 2016. Rayyan-a web and mobile app for systematic reviews. *Syst. Rev.* 5, 210.
- Pham, T.T.T., Bi, X., Hoang, H.T.T., Ishizaki, A., Nguyen, M.T.P., Nguyen, C.H., et al., 2018. Human papillomavirus genotypes and hpv16 e6/e7 variants among patients with genital cancers in Vietnam. *Jpn. J. Infect. Dis.* 71 (6), 419–426.
- Sichero, L., Ferreira, S., Trottier, H., Duarte-Franco, E., Ferenczy, A., Franco, E.L., et al., 2010. Differences and changes in human papillomavirus type 16 variant status in human immunodeficiency virus-positive adults are not uncommon. *J. Gen. Virol.* 91 (Pt 8), 2068–2072.
- Tanzi, E., Amendola, A., Bianchi, S., Fasolo, M.M., Beretta, R., Pariani, E., et al., 2009. Human papillomavirus genotypes and phylogenetic analysis of HPV-16 variants in HIV-1 infected subjects in Italy. *Vaccine* 27 (Suppl. 1), A17–A23.
- Tornesello, M.L., Duraturo, M.L., Losito, S., Botti, G., Pilotti, S., Stefanon, B., et al., 2008. Human papillomavirus genotypes and HPV16 variants in penile carcinoma. *Int J cancer* 122 (1), 132–137.
- Tornesello, M.L., Loquercio, G., Tagliamonte, M., Rossano, F., Buonaguro, L., Buonaguro, F.M., 2010. Human papillomavirus infection in urine samples from male renal transplant patients. *J. Med. Virol.* 82 (7), 1179–1185.
- Volpini, L.P.B., Boldrini, N.A.T., De Freitas, L.B., Miranda, A.E., Spano, L.C., 2017. The high prevalence of HPV and HPV16 European variants in cervical and anal samples of HIV-seropositive women with normal Pap test results. *PLoS One* 12 (4).
- Whiting, P., Savović, J., Higgins, J.P.T., Caldwell, D.M., Reeves, B.C., Shea, B., et al., 2016. ROBIS: a new tool to assess risk of bias in systematic reviews was developed. *J. Clin. Epidemiol.* 69, 225–234.
- Wu, E., An, G., Wu, R., Tang, Y., Li, Q., Wang, J., et al., 2020. Prevalence of human papillomavirus in archival head and neck cancer in the eastern Inner Mongolian Autonomous Region, China. *Tumori* (5).
- Xi, L.F., Demers, W., Kiviat, N.B., Kuypers, J., Beckmann, A.M., Galloway, D.A., 1993. Sequence variation in the noncoding region of human papillomavirus type 16 detected by single-strand conformation polymorphism analysis. *J. Infect. Dis.* 168 (3), 610–617.
- Xi, L.F., Koutsky, L.A., Hildesheim, A., Galloway, D.A., Wheeler, C.M., Winer, R.L., et al., 2007. Risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia associated with variants of human papillomavirus types 16 and 18. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 16 (1), 4–10.
- Yamada, T., Manos, M.M., Peto, J., Greer, C.E., Muñoz, N., Muñoz, M., et al., 1997. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J. Virol.* 71 (3), 2463–2472.
- Zehbe, I., Wilander, E., Delius, H., Tommasino, M., 1998. Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Can. Res.* 58 (4).