



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA
Dissertação de Mestrado

Detecção de Papilomavírus Humano (HPV) em Adultos Jovens com idades entre 18 a 25 anos do Município de Leopoldo de Bulhões-GO

MESTRANDA: GERUSA CRISTHINY DA PAIXÃO RONCATO

ORIENTADORA: Prof.a. Dra. Vera Aparecida Saddi

GOIÂNIA-GO

2011

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA

Detecção de Papilomavírus Humano (HPV) em Adultos Jovens com idades entre 18 a 25 anos do Município de Leopoldo de Bulhões-GO

GERUSA CRISTHINY DA PAIXÃO RONCATO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Genética

Orientadora: Prof^a Dr^a Vera Aparecida Saddi

GOIÂNIA-GO

2011

R769d Roncato, Geresa Cristhiny da Paixão.

Detecção de papilomavírus humano (HPV) em adultos jovens com idades entre 18 e 25 anos do município de Leopoldo de Bulhões-GO [manuscrito] / Geresa Cristhiny da Paixão Roncato. – 2011.

79 f. : il. figs.

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Programa de Mestrado em Genética, 2011.

“Orientadora: Profa. Dra. Vera Aparecida Saddi”.

Inclui Lista de tabelas, quadros, abreviaturas.

1. Papilomavírus humano (HPV) – adultos – detecção – Leopoldo de Bulhões (GO). 2. Doenças sexualmente transmissíveis. I. Título.

CDU: 616.98:578.8HPV(817.3Leopoldo de Bulhões)(043.3)



**PUC
GOIÁS**

II

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Av. Universitária, 1069 • Setor Universitário
Caixa Postal 86 • CEP 74605-010
Goiânia • Goiás • Brasil
Fone: (62) 3946.1070 • Fax: (62) 3946.1070
www.pucgoias.edu.br • prope@pucgoias.edu.br

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM GENÉTICA
DEFENDIDA EM 13 DE ABRIL DE 2011 E APROVADA
PELA BANCA EXAMINADORA COM NOTA

8,5 (... oito e meio)

Vera Aparecida Saddi

Dr^a. Vera Aparecida Saddi PUC Goiás
(presidente orientadora)

Renata de Bastos A. Soares

Dr^a. Renata de Bastos Ascenço Soares – PUC Goiás
(membro interno)

Rosane Ribeiro Figueiredo Alves

Dr^a. Rosane Ribeiro Figueiredo Alves - UFG
(membro externo)

Ao meu esposo Rômulo pelo amor, por acreditar e por me permitir chegar até aqui.

Ao meu filho Roberto, meu presente de Deus, por ser o motivo de orgulho da minha vida, pelos melhores abraços e sorrisos, isso é para você, por você!

Ao meu sogro Ângelo e a minha sogra Erondina pelo apoio e pela oportunidade de chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir saúde e capacidade para alcançar meus objetivos, essa vitória também é Dele!

A minha orientadora Prof^a Dr^a Vera Saddi, mulher dedicada e competente de grande personalidade, onde me espelhei com tantas atitudes assistidas. Agradeço pela paciência na hora das minhas dificuldades, por entender cada momento da minha luta, por me mostrar que o estudo é um caminho com chegada digna e obrigada por acreditar em mim!

À minha Comadre Conceição e ao meu Compadre Nilton, por cuidar do meu tesouro mais precioso, meu filho, com tanto amor e carinho nas horas em que eu precisava dedicar ao Mestrado!

Ao meu lindo e maravilhoso filho Roberto, que apesar de pequeno, entende as horas de minha ausência, para dedicar ao mestrado, mesmo dentro de casa!

Ao meu sogro Ângelo e a minha sogra Erondina, que fizeram por mim, o que se faz por uma filha, e pelo incentivo!

Ao meu esposo Rômulo pelo carinho e paciência, pelo permanente apoio nas horas em que mais precisei, pela conclusão na fase crítica de banco de dados e da estatística do meu trabalho!

A vocês, colegas que estiveram ao meu lado na hora de dúvidas e insegurança, obrigada pelo esforço e dedicação diária em todas as etapas do trabalho... Agradeço pelas horas de alegria e conversas de incentivo e por torcerem pela minha vitória. Jamais me esquecerei disso!

À Rosângela, minha querida amiga, agradeço pelas conversas maduras e sinceras, pelas risadas, e apesar da distância quero continuar com sua amizade!

À minha mãe Supriana, por me entender nas horas mais difíceis, pelas conversas de incentivo e apoio, por comparecer sempre que eu chamava. Você não deixava pronunciar a palavra “desistir”!

À minha Vó Maria Altair, que me deu a base de tudo com sua coragem e dedicação! Obrigada por ter me feito essa pessoa que sou!

À minha amada Tia Anita, que muitas vezes me acompanhava nas viagens a Goiânia para o Mestrado, com agradáveis conversas e orações!

Ao meu Tio Catulo, que na ausência do meu pai, se assumiu como pai várias vezes, durante minha caminhada de formação acadêmica!

Ao Centro de Saúde José Francisco Vargas, pela confiança e credibilidade!

Ao Dr° Raimundo Nonato e ao Dr° Eduardo Vilela, pela colaboração, durante a coleta do material biológico!

Ao Dr° Adriano de Paula, pelo treinamento dos médicos responsáveis pela coleta do material biológico trabalhado!

À Licerene, Secretária Municipal de Saúde do município, por aceitar minha ausência no trabalho sempre que precisei para ir ao meu curso de mestrado!

Às enfermeiras, minhas colegas de trabalho, que sempre compreenderam, me substituindo durante minha ausência!

À Junelle, que esteve comigo no começo da etapa realizada no laboratório, me ajudando em tudo que eu precisava, com disposição e dedicação do seu tempo!

Ao Diego, pelo apoio e colaboração na fase da Estatística!

À Marina e à Michele, amigadas valiosas que conquistei, pessoas de caráter, que sempre estiveram ao meu lado, me animando nas horas de cansaço!

Ao casal mais esforçado, Brunah e Caio Bruno, que torceram intensamente por mim, ajudando na conclusão dos resultados do meu trabalho!

Por fim, agradeço todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente e que foram extremamente importantes para que eu chegasse até aqui!

RESUMO

A infecção genital pelo papilomavírus humano (HPV) é considerada a doença sexualmente transmissível de maior prevalência na população mundial. O homem tem apresentado um importante papel como reservatório e o transmissor desse vírus. A maioria dos homens infectados pelo HPV são assintomáticos. A prevalência da infecção pelo HPV em jovens do sexo masculino é pouco conhecida e apenas alguns estudos encontram-se disponíveis. O objetivo deste trabalho foi avaliar a prevalência do HPV em um grupo de adultos jovens, com idades entre 18 e 25 anos, do sexo masculino, residentes no Município de Leopoldo de Bulhões-GO. Para a detecção do genoma viral utilizou a reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando a técnica com *primers* PGMY09/11. A estatística descritiva com suas respectivas frequências foi realizada para as variáveis relativas às características sócio-demográficas, comportamentais no grupo de homens assintomáticos para infecção pelo HPV. Para investigar as possíveis associações entre os fatores relacionados e a infecção realizou-se análise univariada, pelo teste do *qui-quadrado* com correção de Yates, selecionados no Centro de Saúde José Francisco Vargas. Dentre as características comportamentais do grupo estudado 43,9% dos indivíduos eram solteiros e 56,1% eram casados. A idade de início da atividade sexual foi de aproximadamente 15 anos. Todos os indivíduos foram informados sobre o estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. A prevalência da infecção pelo HPV no grupo estudado foi de 31,6%. A infecção pelo HPV esteve significativamente associada ao estado civil e ao número de parceiras, ou seja, a infecção foi mais prevalente nos indivíduos solteiros (56%) e que não apresentaram parceira fixa (57,1%). Quanto ao uso do preservativo e o início da atividade sexual a infecção pelo HPV não esteve significativamente associada. Nossos resultados demonstraram que fatores comportamentais do homem representam uma associação com risco significativo para a infecção pelo HPV

Palavras chaves: HPV, homens jovens, detecção molecular, PCR

ABSTRACT

Genital infection by human papillomavirus (HPV) is considered the sexually transmitted disease most prevalent among the population. The man has represented an important role as virus reservoir and transmitter. Most HPV-infected men are asymptomatic. The HPV infection prevalence in young males is poorly understood and few studies are available. This study aim was to evaluate the HPV prevalence in a group of young adults, ages 18 and 25, male, living in the City of Leopoldo de Bulhões-GO. For viral genome detection, was used the polymerase chain reaction (PCR) technique with primers PGMY09/11 Line Blot. Descriptive statistics and their frequencies was performed for the variables related to socio-demographic and behavioral features in the group of asymptomatic men for HPV infection. To investigate the possible associations between related factors and the infection, univariate analysis was performed by chi-square test with Yates correction. The study involved a population of 57 asymptomatic men aged between 18 and 25 years old living in the city of Leopoldo de Bulhões-GO, selected at the Jose Francisco Vargas Health Center. Among the study group behavioral characteristics, 43.9% of subjects were single and 56.1% were married. The individual's age who initiated sexual activity was approximately 15 years old. All subjects were informed about the study and signed a free and clear consent form. The HPV infection prevalence in the study group was 31.6%. HPV infection was significantly associated with marital status and partner's number, in other words, infection was more prevalent among unmarried individuals (56%) who did not have a steady partner (57.1%). As for condom use and early sexual activity, HPV infection was not significantly associated. Our results demonstrate that a man behavioral factor represents a significant risk for HPV infection association

Keywords: HPV, young men, molecular detection, PCR

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01-** Representação Esquemática do Genoma do HPV.....33
- Figura 02 -** Árvore Filogenética dos papilomavirus baseado na sequencia ORF L1 para classificar os papilomavírus.....35
- Figura 03 -** Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, corado com nitrato de prata, mostrando os produtos de PCR obtidos com a utilização de *primers* específicos para o gene GAPDH. Bandas de aproximadamente 90 pares de bases demonstram a presença do DNA genômico nas amostras estudadas.....49
- Figura 04 -** Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo, mostrando os produtos de amplificação do genoma do HPV, pelo método de PCR, obtidos com a utilização do kit comercial HPV *Detection and Genotyping- ROCHE*.
.....52

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 01 - Prevalência da infecção pelo HPV em homens de acordo com a região anatômica.....19

Quadro 02 - Estudos sobre a detecção de HPV em indivíduos do sexo masculino, utilizando o método de PCR.....26

Tabela 01 - Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores e protocolos de ciclagem usados no ensaio de PCR para a amplificação do gene GAPDH em amostras de glândula do pênis.... 46

Tabela 02 - Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores e protocolos de ciclagem usados no ensaio de PCR para a detecção do HPV em amostras de glândula do pênis47

Tabela 03 - Análise descritiva das características sócio-demográficas e comportamentais do grupo estudado.....51

Tabela 04 - Análise univariada das características sócio-demográficas e comportamentais avaliadas para os dois grupos estudados55

LISTA DE ABREVIATURAS

TCA - Ácido tricloroacético

DST - Doenças sexualmente transmissíveis

DNA - Ácido desoxirribonucléico

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

HPV - Papilomavírus humano

INCA - Instituto Nacional do Câncer

LCR - *Long control region* (região longa de controle do genoma do HPV).

NIC - Neoplasia intraepitelial cervical

ORF – do inglês: *Open reading frames* (moldura aberta de leitura)

PCR – Reação em cadeia da polimerase

RFLP – Análise de polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição

RRP – Papilomatose respiratória recorrente

SBU – Sociedade Brasileira de Urologia

URR – do inglês: *Upstream regulatory region* (região regulatória superior do genoma do HPV)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Epidemiologia da infecção pelo HPV em indivíduos do sexo masculino	16
1.2 Detecção molecular do HPV em homens	18
1.3 Doenças induzidas às infecções pelo HPV em homens	26
1.4 Diagnóstico de lesões induzidas pelo HPV em homens	28
1.5 Papilomavírus humano	30
1.5.1 Características	30
1.5.2 Classificação	30
1.5.3 Genoma viral do HPV	31
1.5.4 Replicação viral	34
1.5.5 Patogênese	35
1.6 Métodos de detecção do HPV	35
1.6.1 <i>Primers</i> utilizados na detecção do HPV	37
2 JUSTIFICATIVAS	40
3 OBJETIVOS	41
3.1 Objetivo geral	41
3.2 Objetivos específicos	41
4 METODOLOGIA	42
4.1 Desenho de estudo	42
4.2 Encaminhamento e aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa	42

4.3 Seleção de sujeitos e coleta de espécimes da glândula do pênis	42
4.4 Preparo das amostras e extração de DNA	43
4.5 Avaliação da integridade do DNA genômico dos pacientes selecionados	44
4.6 Detecção molecular do genoma do HPV	45
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
6 RESULTADOS	48
6.1 Caracterização da amostra	48
6.2 Detecção do genoma do HPV nas amostras de células descamativas da glândula do pênis utilizando o kit <i>Detection and Genotyping –ROCHE</i>	51
6.3 Fatores comportamentais associados à infecção pelo HPV	51
7 DISCUSSÃO	55
8 CONCLUSÕES	59
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
ANEXOS	69
TCLE	70
Questionário	75
Protocolo de PCR para amplificação de um fragmento do gene GAPDH	76
Gel de Poliacrilamida a 8% e coloração do gel por nitrato de prata	78
Protocolo CEPACCG N° 015/08	79

1. INTRODUÇÃO

A infecção pelo papilomavírus humano (HPV) é transmissível por contato sexual e pode persistir no organismo por muitos anos, na forma latente ou como lesões assintomáticas (Teixeira *et al*, 1999). O comportamento sexual é o fator de risco mais importante para a disseminação do HPV. Em indivíduos do sexo masculino, as infecções por HPV de alto risco oncogênico estão associadas com fatores comportamentais como contato com profissionais do sexo, número de parceiras sexuais e história prévia de doenças sexualmente transmissíveis (Thomas *et al*, 2001; Nielson *et al*, 2010). Dos mais de 100 tipos virais molecularmente caracterizados, cerca de 40 tipos têm sido encontrados em infecções da mucosa anogenital e, atualmente, esta representa a infecção sexualmente transmissível mais freqüente no mundo (Reis *et al*, 2010a).

Em mulheres, o HPV está fortemente associado ao câncer cervical, sendo considerado o agente etiológico tanto das lesões precursoras como do próprio câncer cervical. Vários estudos sobre a detecção do genoma do HPV em mulheres já foram desenvolvidos no mundo inteiro. Entretanto, os estudos sobre a detecção do HPV em homens ainda são escassos. A infecção pelo HPV apresenta uma alta prevalência em ambos os sexos (Rocha *et al*, 2008), com valores estimados entre 20 e 46% (Reis *et al*, 2010b). O homem é considerado um importante fator propagador desse vírus entre as mulheres (Rocha *et al*, 2008), daí a importância de se investigar essa infecção em indivíduos do sexo masculino.

Em homens, o HPV está associado ao câncer de pênis e estudos moleculares demonstram que mais de 50% dos carcinomas penianos apresentam DNA de HPV, prevalecendo os tipos oncogênicos 16 e 18 (Giuliano *et al*, 2008b). Contudo, a carência em estudos sobre a associação entre o HPV e os carcinomas penianos ainda é grande, pois essa neoplasia é considerada rara. O câncer de pênis é uma neoplasia que atinge 1/100.000 homens nos países desenvolvidos. A alta incidência é observada em países em desenvolvimento, incluindo o Brasil, onde é mais elevada nas regiões Norte e Nordeste, acometendo principalmente homens na terceira idade, independente de sua origem étnica. Adultos jovens também podem ser afetados pelo câncer de pênis, uma vez que aproximadamente 22% dos casos são registrados em pacientes com idades inferiores a 40 anos. A doença acomete

indivíduos de baixo nível social, com maus hábitos de higiene e não circuncidados, sendo a fimose considerada como um importante fator de risco (Reis *et al*, 2010b). Em indivíduos do sexo masculino, a infecção pelo HPV também pode resultar no condiloma acuminado. Assim, os homens podem ser portadores assintomáticos do vírus, abrigando lesões intrauretrais silenciosas, que os tornam uma fonte potencial de transmissão para as parceiras sexuais. Mulheres, cujos parceiros apresentam câncer de pênis, possuem um risco 2,8 a 3,2 vezes maiores para o desenvolvimento do câncer de colo uterino. Estudos epidemiológico moleculares comprovam a presença do DNA do HPV em cerca de 98% dos casos, demonstrando o papel do HPV como o agente etiológico do carcinoma de cérvix uterina (Bosch *et al*, 2002), evidenciando ainda a potencial associação entre o HPV e o câncer de pênis (Reis *et al*, 2010a).

No homem, as alterações citológicas relacionadas à infecção pelo HPV podem ser observadas em amostras de esfregaço peniano e são similares àquelas observadas em amostras cervicais, como coilocitose e alterações nucleares. A frequência dos achados de coilocitose é menor em amostras de esfregaço peniano, do que em amostras cervicais, perfazendo entre 4 e 5% das amostras analisadas. O número de células em esfregaço peniano é limitado e a baixa adesão dos homens aos exames clínicos dificulta o diagnóstico da infecção pelo HPV através dos métodos citológicos. A prevalência da infecção pelo HPV em homens é variável, dependendo da população em estudo, do tipo do HPV e da região anatômica avaliada (Rocha *et al*, 2008). Os testes moleculares para investigação do HPV mostram alta sensibilidade na detecção do genoma desses vírus em amostras biológicas. A PCR (reação de cadeia da polimerase) é um método utilizado para a amplificação de ácidos nucléicos e sua utilização demonstra alta sensibilidade e especificidade na detecção do DNA do HPV. Esse método baseia-se na utilização de uma DNA polimerase termoestável para a amplificação de fragmentos do DNA alvo, delimitados por pares de *primers* específicos. Vários conjuntos de *primers* podem ser utilizados com a finalidade de detectar os genótipos do HPV, por meio da técnica de PCR (Zaravinos 2009).

A transmissão do HPV da mulher para o homem parece ser comum, o que acarreta uma alta prevalência da infecção em homens, decorrente do comportamento sexual (Hernandez *et al*, 2008a).

1.1 Epidemiologia da infecção pelo HPV em indivíduos do sexo masculino

A infecção pelo HPV é sexualmente transmissível e cerca de 60% das pessoas sexualmente ativas apresentarão esta infecção durante suas vidas. Em homens, a infecção pelo HPV é menos estudada do que em mulheres. Por esta razão, os dados de prevalência da infecção pelo HPV em homens são pouco conhecidos (Rombaldi *et al*, 2006).

Uma revisão sistemática sobre a prevalência de HPV em homens, publicada em 2006, analisou 40 estudos, dos quais 12 investigaram a presença do HPV em diferentes sítios anatômicos. Os estudos que analisaram múltiplos sítios anatômicos resultaram numa prevalência que variou entre 1,3% a 72,9%. Dentre os estudos revisados, 15 revelaram prevalências acima de 20%. As variações de prevalência observadas nos diferentes estudos foram justificadas pela metodologia usada na detecção do HPV, o sítio anatômico a partir do qual a amostra foi obtida, a idade dos indivíduos analisados, o tipo de coleta empregada e o método de processamento da amostra. O estudo concluiu que pesquisas sobre a detecção de HPV em homens ainda são escassas e que são extremamente importantes no sentido de se explicar a transmissão da infecção pelo HPV e justificar a necessidade de vacinas para a população masculina (Dunne *et al*, 2006).

Um estudo internacional, incluindo Brasil, México e Estados Unidos, investigou a prevalência da infecção pelo HPV em homens com idades entre 18 e 70 anos. A prevalência das infecções com os tipos oncogênicos e não-oncogênicos e das infecções múltiplas foi comparada nos diferentes países. A média de prevalência do HPV em todas as populações estudadas foi de 65,2%. A prevalência dos tipos oncogênicos foi de 20% e para os não-oncogênicos foi de 20,7%. Infecções múltiplas com HPVs oncogênicos e não-oncogênicos foram detectadas em 17,8% dos homens estudados. Múltiplos tipos de HPVs foram detectados em 25,7% dos participantes do estudo. A prevalência da infecção pelo HPV no Brasil foi de 72,3%, nos Estados Unidos foi de 61,3% e no México de 61,9% (Giuliano *et al*, 2008b).

Um estudo conduzido na Itália investigou a prevalência da infecção pelo HPV em homens, em amostras de esperma e em células descamativas da glândula do pênis. O estudo incluiu 290 participantes com idades entre 33 e 38 anos. Esses participantes foram separados em grupos, sendo o grupo A constituído por indivíduos com verrugas genitais; o grupo B era formado por indivíduos que

apresentavam parceiras infectadas pelo HPV; o grupo C era constituído por indivíduos inférteis; e o grupo D por indivíduos atendidos em uma clínica de controle de fertilidade. A prevalência do HPV nas amostras de células da glândula do pênis foi de 85,7% no grupo A, 77,8% no grupo B, 36,4% no grupo C e de 100% no grupo D (Foresta *et al*, 2009).

Um estudo analisou a prevalência e os fatores de risco para a infecção pelo HPV em vários sítios anatômicos do pênis, em uma população de 2.705 homens sexualmente ativos, não circuncidados, soronegativos para o vírus da imunodeficiência humana (HIV), com idades entre 17 e 28 anos, na região geográfica do Quênia, na África. Esse importante estudo revelou uma prevalência de infecção pelo HPV igual a 51,1%, sendo que a maior prevalência foi observada para as amostras colhidas da glândula do pênis. Neste estudo, o HPV de alto risco foi detectado em 31,2% das amostras coletadas da glândula e em 12,3% das amostras coletadas da haste peniana (Smith *et al*, 2010).

Estudos sobre a prevalência da infecção pelo HPV em homens que fazem sexo com homens vêm sendo desenvolvidos nos últimos anos (Nyitray *et al*, 2011; Goldstone *et al*, 2011). Um desses estudos avaliou recentemente a prevalência do HPV em 602 homens soronegativos para o HIV e que fazem sexo com homens. A idade do grupo avaliado variou de 16 a 27 anos e as amostras celulares foram colhidas do pênis, região escrotal, perianal e intra-anal. Nesta população, a prevalência global da infecção pelo HPV foi de 48,0%, variando entre 18,5% no pênis, 17,1% na região escrotal, 33,0% na região perianal e 42,4% no canal anal (Goldstone *et al*, 2011).

Os fatores de risco para a infecção pelo HPV em homens também têm sido investigados exaustivamente. Dentre eles, o alto número de parceiras sexuais, a história de fimose e de outras infecções sexualmente transmissíveis parecem ser as mais importantes na contribuição para o aumento do risco da infecção pelo HPV em indivíduos do sexo masculino (Teixeira *et al*, 1999; Smith *et al*, 2010).

Com relação ao número de parceiras sexuais, verificou-se que, dentre os homens que relataram ter tido 20 ou mais parceiras, 58% apresentaram infecção pelo HPV e dentre eles, 45% apresentavam infecções por tipos virais oncogênicos, com predominância do HPV-16 (15% dos casos) (Svare *et al*, 2002).

A prevalência da infecção pelo HPV em homens também tem sido associada com a história de fimose. Estudos investigaram essa associação e observaram que

homens circuncidados têm um menor risco de infecção pelo HPV (Auvert *et al*, 2009; Gray *et al*, 2010). Um desses estudos comparou a prevalência da infecção pelo HPV em 621 homens não circuncidados e em 643 homens circuncidados, demonstrando resultados positivos em 23,2% dos homens não circuncidados e em 14,0% dos homens circuncidados (Auvert *et al*, 2009). Outro estudo longitudinal demonstrou que a circuncisão reduz não só o risco de infecções por múltiplos tipos de HPV de alto risco, mas também aumenta a resolução de infecções por HPV de alto risco em homens não infectados pelo HIV (Gray *et al*, 2010).

1.2 Detecção molecular do HPV em homens

A infecção pelo HPV é comum em homens sexualmente ativos e pode ser detectada por uma variedade de métodos e amostras. Algumas regiões anatômicas do trato genital masculino são consideradas mais adequadas para obtenção de amostras biológicas para detecção do DNA do HPV. Essas regiões incluem a glândula do pênis, a parte superior do pênis (*corona*), o prepúcio e a haste do pênis (Dunne *et al*, 2006), destacando o papel protetor do uso de preservativos. O quadro 1 mostra a prevalência da infecção pelo HPV em homens de acordo com as diferentes regiões anatômicas do trato genital masculino.

Quadro 01 - Prevalência de infecção pelo HPV em homens de acordo com a região anatômica.
Fonte: Dunne *et al*, (2006).

Região anatômica do pênis/ espécimes	Número de estudos levantados	Prevalência da infecção pelo HPV por região anatômica
Haste do pênis	03	5,6% - 51,5%
Prepúcio	04	24,0%- 50,0%
Região escrotal	05	7,1%- 46,2%
Uretra	07	8,7%- 50%
Ânus, área perianal, reto	NA (Informa que são poucos)	0%-32,8%
Sêmen	09	2,2%-41,3%

As regiões anatômicas do pênis investigadas para a detecção do HPV em homens são bastante discutidas. Um estudo incluindo 463 homens demonstrou que 51% dos mesmos eram positivos para a detecção do HPV e que a haste do pênis é a região de maior prevalência para detecção de infecção pelo HPV (Nielson *et al*, 2007). Outro estudo conduzido no Kenia, na África, analisou 98 homens, dos quais 88% apresentaram resultados positivos para detecção do HPV na região da haste do pênis (Smith *et al*, 2008). Além desses estudos, dois outros confirmam que o local mais adequado para a detecção de HPV em indivíduos do sexo masculino é a haste do pênis (Flores *et al*, 2008; Giovannelli *et al*, 2007).

Outro estudo sobre a detecção de HPV em homens analisou 379 estudantes universitários, com idades acima de 18 anos (Hernandez *et al*, 2008). Os sujeitos elegíveis para a pesquisa incluíram estudantes de graduação e pós-graduação, que falavam inglês, e que foram selecionados durante uma triagem para detecção de distúrbios da coagulação. As amostras de células exfoliativas foram coletadas de diferentes regiões anatômicas do pênis e usadas para extração de DNA. Um questionário contendo dados médicos, sócio-demográficos e de comportamento sexual foi aplicado aos participantes da pesquisa. A detecção do DNA do HPV foi feita por meio da metodologia de PCR, empregando os oligonucleotídeos iniciadores genéricos PGMY09/11 e os casos positivos foram genotipados por meio de hibridização reversa em linhas (*Line Blot*). A prevalência do DNA do HPV variou de acordo com o sítio anatômico usado para a coleta das células exfoliativas do pênis, sendo maior para a região do eixo do pênis (52% de positividade), glândula do pênis (32%), urina (10%) e sêmen (6%). Ao comparar homens circuncidados e não circuncidados, constatou-se que a prevalência foi maior em homens não circuncidados (46%). Segundo o estudo, os homens não circuncidados apresentam maior risco de infecção por tipos oncogênicos de HPV (31%), comparados aos homens circuncidados (16%) e o risco de infecções múltiplas também foi mais alto para os homens não circuncidados (31%), comparados aos circuncidados (12%). Em ambos os grupos, uma alta prevalência de HPV foi observada na haste do pênis, ou seja, 50% para homens circuncidados e 60% para homens não circuncidados, mas esta diferença não foi significativa. Foram detectados 33 tipos diferentes de HPV nas regiões anatômicas estudadas. O tipo 84 foi o mais encontrado em todas as regiões anatômicas, sendo 14% no eixo do pênis, 14% na parte anterior, 10% na região escrotal e 7% na urina. O HPV do tipo 84 foi o mais prevalente também na glândula do

pênis em ambos os grupos. Dentre os HPV oncogênicos mais encontrados, os tipos 16 e 39 foram mais prevalentes em homens circuncidados, enquanto os tipos 66, 52, 53 e 73 foram mais prevalentes em homens não circuncidados. O tipo não oncogênico mais encontrado em ambos os grupos foi o CP6108, na região da glândula do pênis.

Em Tucson, no Arizona, e em Tampa, na Flórida, um estudo investigou 463 homens com idades entre 18 a 40 anos (Nielson *et al*, 2007). O estudo avaliou o comportamento sexual, o conhecimento prévio sobre verrugas genitais, câncer de pênis ou de ânus, queixas de dor durante a micção, corrimento peniano e história de doenças sexualmente transmissíveis. Os participantes também responderam a um questionário incluindo dados sobre fatores econômicos, ocupação, raça, etnia, idade, renda, nível educacional, origem, uso do álcool e tabaco, primeira relação sexual, número de parceiras, frequência de relação sexual, uso de preservativo e contato homossexual. Todos os participantes foram examinados para investigação de lesões ou verrugas, inflamações, uso de piercing e circuncisão. Para a coleta das amostras na uretra foi introduzido um swab, na altura de 2 centímetros, com movimentos rotatórios de 360 graus. Para as outras regiões anatômicas, como glândula do pênis, sulco coronariano, haste do pênis, região escrotal e área perianal, foi utilizado um swab com fricção sobre a superfície desses locais. Os homens foram orientados para a coleta de sêmen por meio de masturbação. As diferentes amostras foram devidamente refrigeradas em tubos com identificação de cada participante. A detecção do DNA do HPV foi feita por meio da metodologia de PCR, empregando os iniciadores genéricos PGMY09/11 e os casos positivos foram genotipados por meio de hibridização reversa em linhas (*Line Blot*). Dentre os HPVs oncogênicos, os mais encontrados foram o tipo 16 (11,4%), 51 (6,0%), 52 (5,0%), e dentre os tipos não oncogênicos, os mais prevalentes incluíram o HPV 84 (10,6%), CP6108 (8,9%), HPV 6 (4,8%) e HPV 11 (0,4%). A região do pênis que apresentou maior prevalência para o HPV foi a haste do pênis (Nielson *et al*, 2007).

Outro estudo de coorte, realizado na mesma região geográfica acima descrita, analisou 294 amostras biológicas coletadas de diferentes regiões anatômicas do pênis de 42 homens, com idades entre 18 e 40 anos, para a avaliação da carga viral do HPV 16 e suas possíveis correlações com aspectos sócio-econômicos e hábitos sexuais (Flores *et al*, 2008). O DNA extraído do material celular e do sêmen foi usado para detecção de HPV pelo método de PCR, usando

os iniciadores PGMY9/11. A genotipagem foi conduzida usando o método denominado hibridização reversa em linhas. Dentre todas as regiões anatômicas analisadas, a prevalência global de detecção do HPV foi de 67,2%. A prevalência do HPV variou de acordo com cada região anatômica do pênis, ou seja, foi de 62,5% na região anal, 50,0% na perianal, 68,0% na glândula do pênis, 60,0% na região escrotal, 50,0% para o sêmen, 84,2% na haste do pênis e 40,0% na uretra. O estudo avaliou os casos positivos para o HPV-16 em pelo menos uma região anatômica. De forma geral, a carga viral do HPV 16 nos espécimes anogenitais masculinos foi mais baixa do que aquelas encontradas em espécimes cervicais de mulheres. Essa observação sugere que o epitélio cervical seja mais favorável para a replicação do vírus, enquanto o epitélio do pênis pode apresentar características que impedem a replicação viral. O presente estudo observou maior carga viral do HPV 16 na região da haste do pênis, sugerindo a possibilidade desta região ser mais favorável para a replicação viral em relação aos demais locais (Flores *et al*, 2008).

Um estudo, conduzido na cidade de Kisumu no Quênia, analisou 98 homens não circuncidados, com idades entre 18 e 24 anos, HIV soronegativos, em atividade sexual com a mesma parceira nos últimos 12 meses e residentes da cidade de Kisumu por pelo menos 2 anos (Smith *et al*, 2008). A detecção de HPV foi feita em material biológico obtido de diferentes regiões anatômicas do pênis, usando um swab umedecido. A haste do pênis e a parte externa, a glândula, o sulco coronariano e a uretra foram às regiões de escolha. A detecção de HPV foi feita pelo método de PCR, usando o conjunto de oligonucleotídeos iniciadores GP5+/6+. A genotipagem foi feita pelo método de hibridização reversa em linhas, que detecta vários tipos de HPVs de alto e baixo risco. As amostras positivas para a amplificação da beta-globina corresponderam a 94% dos casos colhidos da glândula do pênis, 87% das amostras da haste do pênis e 100% das amostras colhidas da uretra. A prevalência do HPV variou de acordo com a região anatômica, sendo 50% em células da glândula, 43% na haste do pênis e 18% na região da uretra. O HPV do tipo 16 foi o mais prevalente em todas as regiões analisadas. A prevalência do HPV foi considerada relativamente alta neste estudo (54%), mas foi consistente com dados obtidos de outros estudos similares (Smith *et al*, 2008).

Em Copenhague, na Dinamarca, uma pesquisa realizada em uma clínica de DST incluiu 216 homens, com idades entre 18 e 40 anos (Svare *et al*, 2002). Informações sobre questões sociais, hábito de fumar, história de DST, métodos de

higiene genital, hábitos sexuais e história de circuncisão foram coletadas. As amostras biológicas foram obtidas de diferentes regiões anatômicas do pênis e da área genital externa. Essas regiões incluíram a glândula, sulco coronariano, haste do pênis, saco escrotal e região perianal. O método de coleta das amostras empregou raspado celular, preservado em solução de PBS. A presença de DNA nas amostras foi verificada com amplificação do gene da beta-globina e 100% das amostras tiveram DNA presente. A detecção de HPV foi realizada por meio de PCR, usando os oligonucleotídeos iniciadores GP5+/6. O DNA do HPV foi encontrado em 89 homens (45%), sendo o HPV 16 o mais prevalente. Outros tipos de HPV de alto risco oncogênico também foram detectados, sendo o tipo 18 em 8% dos casos, o tipo 31 em 4% e tipo 33 em 3% dos casos. A prevalência do HPV não oncogênico foi de 14% sendo 6% para o HPV 6 e 8% para o HPV 11. O estudo relata que o alto número de parceiras representa um fator de risco importante para o aumento do risco de infecção por HPV em homens e que o risco de infecção diminui com a idade. Na faixa etária entre 25 e 34 anos, a prevalência de infecção por HPV é maior do que na faixa etária de 35 anos ou mais. O trabalho observa também uma menor prevalência de infecção por HPV em homens circuncidados e sugere que os fatores de risco para a infecção por HPV em homens assemelham aos mesmos observados em mulheres (Svare *et al*, 2002).

Um estudo conduzido em Caxias do Sul, no Brasil, analisou 99 homens que eram parceiros de mulheres com NIC (Rombaldi *et al*, 2006). Os fatores investigados incluíram a idade da primeira relação sexual, história de circuncisão, o uso de preservativo com profissionais do sexo, nível educacional, estabilidade conjugal, raça, uso de tabaco, história de doenças sexualmente transmissíveis e número de parceiras sexuais. A genitália externa dos homens foi examinada individualmente, com aplicação de ácido acético a 5%. A peniscopia foi utilizada para observação de áreas sugestivas de infecção pelo HPV. As células epiteliais do pênis foram coletadas com uma escova. As regiões de coleta do material incluíram o canal uretral, áreas identificadas por peniscopia sugestivas de infecção pelo HPV, glândula do pênis, mucosa prepucial e eixo do pênis. A presença do DNA extraído foi testada pela amplificação do gene da beta-globina. O teste para detecção do HPV foi realizado por meio de PCR, com os oligonucleotídeos iniciadores MY9/11. As amostras positivas para detecção do HPV foram genotipadas usando ensaios de RFLP (análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição). O

estudo demonstrou uma prevalência de 54.5% para o DNA do HPV nos casos estudados, sendo que 62% dos parceiros sexuais de mulheres com neoplasia intraepitelial cervical apresentaram lesões genitais condilomatosas, maculares ou papulares, pela avaliação com peniscopia, após a aplicação do ácido acético. O estudo observou que a área do pênis mais prevalente para a infecção pelo HPV foi a mucosa prepucial e o delta frenular. Essa prevalência sugere que essas regiões permanecem mais úmidas, podendo favorecer a contaminação durante a atividade sexual. Outra observação do estudo foi que os homens com alto número de parceiras sexuais apresentam maior risco para infecções pelo HPV (Rombaldi *et al*, 2006).

Um estudo realizado na Korea do Sul incluiu um grande número de adultos jovens de diferentes classes sociais (Shin *et al*, 2004). Esses estudantes completaram um questionário com dados sociodemográficos, hábitos e estilos de vida (incluindo consumo de álcool, tabaco e má alimentação), história prévia de doenças infecciosas, procedimentos cirúrgicos (circuncisão), número de parceiras sexuais e o uso de preservativo. O material celular foi coletado por técnica de exfoliação genital, por urologistas, com escova apropriada nas regiões do prepúcio (em homens não circuncidados), sulco coronariano, glândula do pênis e canal uretral. As amostras submetidas à extração de DNA foram testadas para amplificação do gene da beta globina. A detecção do DNA do HPV foi realizada por método de PCR, usando um conjunto de oligonucleotídeos iniciadores SPF. As amostras positivas para a detecção do HPV foram genotipadas por hibridização reversa. Os produtos de PCR foram hibridizados permitindo a detecção de 25 tipos de HPV. A prevalência da infecção pelo HPV foi de 8,7% para os estudantes. Os HPVs de alto risco estavam presentes em 54,8% dos casos positivos. Infecções por HPV de múltiplos tipos foram verificadas em 15,4% dos casos positivos e 16 tipos diferentes de HPV foram identificados no grupo. Uma alta prevalência foi observada em estudantes que tinham o hábito de fumar, perfazendo 51,6% dos casos positivos. O número de parceiras sexuais também foi um importante fator de risco para a infecção pelo HPV no grupo analisado, ou seja, o risco para aqueles que apresentaram mais de quatro parceiras foi 2,4 (Shin *et al*, 2004).

Um estudo sobre a aquisição e a persistência da infecção pelo HPV em jovens analisou 374 homens que prestavam serviço militar, com idades entre 19 e 22 anos (Kjaer *et al*, 2005). Os participantes responderam um questionário onde

eram solicitadas informações sobre hábitos sexuais, atividades físicas, consumo de álcool e cigarros, informações sócio-demográficas e o uso de preservativos. O estudo analisou material celular obtido da glândula do pênis e sulco coronariano do pênis usando um swab. As amostras celulares foram utilizadas para extração de DNA e sua presença confirmada pela amplificação do gene da beta-globina. Em seguida, as amostras foram submetidas à detecção do DNA do HPV, por meio de PCR, com os *primers* GP5+/6+. Os produtos de PCR obtidos foram genotipados por meio de um sistema de imunoensaio enzimático que permite identificar HPVs de alto risco e de baixo risco oncogênico. A coleta das amostras foi feita em etapas, com intervalos de 6 a 8 meses, com os mesmos participantes. Na primeira etapa, foram colhidas amostras de 337 homens com resultado de HPV positivo em 33,8% dos participantes. Na segunda etapa, foram colhidas amostras de 250 participantes com resultados positivos em 31,9% dos casos. A taxa de aquisição da infecção pelo HPV, no período analisado, para os indivíduos negativos no início da pesquisa, foi de 13,8%. Dentre os participantes que foram HPV positivos na primeira avaliação, 39,7% adquiriram um novo tipo do HPV, no período entre os dois exames e 4,3% dos participantes que eram HPV negativos adquiriram mais de um tipo do vírus. Dentre os participantes que já tinham infecção pelo HPV, no primeiro exame, 27,6% adquiriram infecções por múltiplos tipos. O principal fator de risco observado para a aquisição de uma nova infecção pelo HPV foi o número de parceiras. Os homens que tiveram mais de 3 parceiras, durante o período analisado, apresentaram um risco 17,2 vezes maior para a infecção pelo HPV comparados aos participantes que informaram ter tido somente uma parceira. O uso de preservativo também reduziu o risco de aquisição de infecção pelo HPV no grupo estudado. Em relação à persistência da infecção pelo HPV, o fator de risco mais importante foi o tabagismo. Segundo o estudo, o tabagismo pode ter um efeito imunossupressor contribuindo para a persistência da infecção pelo HPV. Mas o mecanismo de ação do tabaco em relação à persistência da infecção pelo HPV ainda não está bem esclarecido (Kjaer *et al*, 2005).

O quadro 02 a seguir mostra os estudos sobre a detecção de HPV em indivíduos do sexo masculino, utilizando o método de PCR.

Quadro 02 - Estudos sobre a detecção de HPV em indivíduos do sexo masculino, utilizando o método de PCR.

Referência/Número de casos/Faixa etária	HPV (+) (%)	Tipos mais prevalentes	Primers utilizados
1-Teixeira <i>et al</i> ,1999 (Campinas, Brasil) N = 337, Idades: 17 – 53 anos	72,1	Na	Na
2-Shin <i>et al</i> , 2004 (Busan, Coreia do Sul) N = 381, Idades: 18 – 25 anos	54,8	HPV-16, HPV-18, HPV-33, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-58, HPV-6, HPV-43, HPV-44, HPV-53, HPV-54, HPV-70.	SPF10
3-Kjaer <i>et al</i> , 2005 (Dinamarca) N = 374, Idades: 19 – 22 anos	33,8	HPV – 16, HPV-42, HPV-11, HPV-6, HPV-51, HPV-31, HPV-56, HPV-83	GP5+/6+
4-Giovanelli <i>et al</i> , 2006 (Palermo, Itália) N = 50, Idades: 23 – 58 anos	68	HPV-31, HPV-53, HPV-6, HPV-16	MY09/11 e GP5+/GP6+
5 Rombaldi <i>et al</i> , 2006 (Caxias do Sul, Brasil) N=99, Idades: 18 – 56 anos	54,5	HPV-6, HPV-11, HPV-16, HPV-40, HPV-61, HPV-84.	MY09/11
6-Nielson <i>et al</i> , 2007 (Florida, USA) n = 463, Idades: 18 – 40 anos	65,4	HPV-16, HPV-51, HPV-52, HPV-84, CP-6108,	PGMY09/PGMY11
7-Scheiner <i>et al</i> , 2008 (Rio de Janeiro, Brasil) N = 80, Idades: 36 – 86	44	HPV – 16	MY09/11
8-Favorito <i>et al</i> , 2008 (Rio de Janeiro, Brasil) N = 283, Idades:> 46 anos	6.36	Na	Na
9-Smith <i>et al</i> , 2008 (Kisumu, Kenia) n = 98, Idades:18 – 24 anos	50,0	Na	GP5+/6+
10-Flores <i>et al</i> , 2008 (Flórida,US) N = 463, Idades:18 – 40 anos	82	HPV-16	PGMY09/11
11-Giuliano <i>et al</i> , 2008 (Brazil, México, US) n=1.160; Idades: 18 – 70 anos	65,2	HPV-16, HPV-51, HPV-59, HPV-66, HPV-39, HPV-52, HPV-84, HPV-62, HPV-6, CP-6108	PGMY09/PGMY11 e GP5+/6+
12- Foresta <i>et al</i> , 2009 (Itália) N=290; Idades : 33 – 38 anos	85,7%	HPV-6, HPV-7, HPV-16, HPV-52, HPV-66, HPV-18, HPV-53, HPV-61, HPV-70, HPV-84	MY09/11 e GP5+/GP6+
13- Auvert <i>et al</i> , 2009 (África do Sul) N=1264; Idades:18 – 24 anos	23,2%	HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-68	Na

Na: não apresentado

1.3 Doenças induzidas às infecções pelo HPV em homens

A infecção genital pelo HPV é sexualmente transmissível na população mundial, sendo o fator de risco principal para o desenvolvimento do câncer cervical e do câncer de pênis (Palefski *et al*, 2010). Sua maior incidência ocorre nas faixas etárias entre 20 e 40 anos em indivíduos sexualmente ativos, que apresentam múltiplos parceiros, ou um parceiro único, mas, que por sua vez tenha vários parceiros (Weaver, 2004).

Estimativas mundiais indicam que 20% dos indivíduos sexualmente ativos saudáveis estão contaminados com o HPV. A maior parte das infecções é assintomática e o principal ônus dessa infecção é o desenvolvimento de câncer cervical e demais cânceres. O homem parece ter o papel de reservatório e vetor para a infecção pelo HPV. Assim, o diagnóstico da infecção pelo HPV no homem pode ser importante como um meio de prevenção do câncer cervical de sua parceira e no estabelecimento de medidas profiláticas para a infecção (Giovanelli *et al*, 2007). Além do câncer cervical, outros tipos de câncer também podem ser prevenidos com a prevenção dos fatores de risco para o HPV, incluindo 90% dos carcinomas anais, 40% dos carcinomas de vulva e vagina, 50% dos carcinomas de pênis e 33% a 72% dos carcinomas de orofaringe (Giuliano *et al*, 2008a).

Acredita-se que pelo menos 40% dos tumores de pênis estejam associados ao HPV e os estudos sobre a detecção de HPV em câncer de pênis demonstram a presença do genoma do vírus em 29% a 82% dos casos (Hernandez *et al*, 2008b). Apesar da incidência do câncer de pênis ser relativamente baixa, populações masculinas com baixas taxas de circuncisão e comportamentos sexuais de risco para infecção pelo HPV apresentam incidência de câncer de pênis mais elevada (Palefsky *et al*, 2010). No Brasil, os dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA) demonstram que o câncer de pênis representa 2% de todos os casos de câncer no homem, sendo mais freqüente nas regiões Norte e Nordeste que nas regiões Sul e Sudeste. De acordo com os dados da Sociedade Brasileira de Urologia (SBU), o estado de São Paulo concentra os maiores índices: 24,26%, em seguida vêm o Ceará com 12,87%, Maranhão com 10,66% e Rio de Janeiro com 9,19% (Carvalho *et al*, 2007). Um estudo sobre a epidemiologia do câncer de pênis no Brasil, realizado na cidade de Rio de Janeiro, no período de 2006 a 2007, analisou 283 casos de câncer de pênis, registrando 53,02% oriundos das regiões Norte e

Nordeste. A maioria dos pacientes tinha idades acima de 46 anos (78,96%) e 35,68% eram tabagistas. Em relação à infecção pelo HPV, 6,36% dos pacientes relataram história de infecção pelo HPV. Em 16,96% dos casos, o tumor afetou drasticamente a região da glândula do pênis e em 9,89% dos casos, afetou a haste do pênis. Segundo o estudo, a fimose é um fator de risco para o HPV sendo que impede a exposição da glândula do pênis, impossibilitando a higienização e os cuidados pessoais necessários (Favorito *et al*, 2008).

O câncer anal comparado com o câncer cervical é uma doença rara na população. Entretanto, a incidência está aumentando na população de mulheres e mais acentuadamente em homens. A infecção anal por HPV de alto risco oncogênico é o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer anal e de suas lesões precursoras (Colón-Lopez *et al*, 2010). O HPV 16 está presente em 70% dos casos de câncer anal, sendo mais comum em mulheres. A incidência anual de câncer anal é aproximadamente 1/100.000 na população geral, entretanto, esses valores são 30 a 100 vezes mais altos na população de homens que fazem sexo com homens (Palefsky, 2010). Homens que fazem sexo com homens e indivíduos HIV soropositivos representam a população de maior risco para o desenvolvimento da infecção anal pelo HPV e do câncer anal (Colón-Lopez *et al*, 2010). Um grande número de casos de condiloma anal recorrente também é visto nesta população (Watson, 2005).

A infecção pelo HPV associa-se também com neoplasias benignas e malignas da cavidade oral, sendo, destas últimas, o carcinoma espinocelular o mais comum. O seu achado em epitélio de mucosa oral normal, não permite inferências mais precisas quanto ao seu papel na carcinogênese, se agente etiológico principal, coadjuvante ou simples habitante do epitélio oral (Esquenazi *et al*, 2010). A maioria dos cânceres orais está associada ao uso excessivo do álcool e do tabaco, entretanto, uma parcela dos cânceres orais, cerca de 28% dos casos, está associada ao HPV. Esses cânceres ocorrem tipicamente na orofaringe e nas amígdalas e acometem indivíduos mais jovens com comportamento sexual de risco (Colón-Lopez *et al*, 2010). O prognóstico do câncer oral associado ao HPV tem sido melhor do que os que não estão associados (Palefsky, 2010). Outra consequência grave da infecção oral pelo HPV é a papilomatose laríngea respiratória recorrente (RRP), uma doença rara com importante morbidade.

O contato sexual é o principal modo de transmissão do HPV. Alguns autores consideram que, em adultos, a principal via de contágio da infecção oral pelo HPV parece ser por meio da prática do sexo orogenital, porém, a transmissão do trato genital para a mucosa oral ou vice-versa não está esclarecida (Esquenazi *et al*, 2010).

Outra doença importante associada ao HPV em homens é o condiloma acuminado. O condiloma é a doença mais comum encontrada na região do pênis e do ânus (Palefsky, 2010). As verrugas ocorrem com mais frequência na região da glândula do pênis, haste do pênis e prepúcio, e em 5 % dos casos envolvem a região do meato uretral e uretra, dificultando o tratamento (Watson, 2005). Essas lesões geralmente são causadas por HPV do tipo 6 e 11 e raramente são carcinogênicas. A incidência das verrugas genitais é considerada alta na população geral, com aproximadamente um milhão de novos casos por ano. Essas verrugas genitais geralmente não causam câncer, mas parecem representar um fator relacionado ao comportamento sexual que conduz a uma exposição para os tipos de HPV oncogênicos (Palefsky, 2010).

1.4 Diagnóstico das lesões induzidas pelo HPV no homem

Num contexto de alta prevalência, infectividade e diagnóstico na forma de lesões subclínicas e assintomáticas, fica evidente que a disseminação do HPV tende a ser universal entre os indivíduos sexualmente ativos, sendo o homem um importante meio propagador deste vírus entre as mulheres (Teixeira *et al*, 2002). As lesões induzidas por HPV no homem podem ser facilmente observadas, através de um exame clínico realizado com atenção. Alguns locais da região do pênis devem ser rigorosamente examinados, em especial atenção, pois as regiões da superfície ventral e distal da haste do pênis podem apresentar lesões e passarem despercebidas durante uma avaliação. A peniscopia permite uma melhor avaliação clínica, pois permite uma maior visualização das áreas devido à lente de aumento (Watson, 2005). Por outro lado, as imagens peniscópicas não apresentam uma correlação importante com os achados histopatológicos, pois a reação do ácido acético utilizada no procedimento da peniscopia é inespecífica e não permite diferenciar um condiloma plano de uma neoplasia intra-epitelial (Teixeira *et al*, 1999).

O diagnóstico das lesões induzidas pelo HPV pode ser feito por métodos imunológicos, citológicos, histológicos, histoquímicos e por técnicas de biologia molecular. O método imunológico pode ser feito pela detecção de anticorpos frente ao HPV. Esse método tem uma sensibilidade limitada, por produzir resultados de difícil interpretação e que não permitem diferenciar os genótipos virais. Sua utilização está mais voltada para estudos epidemiológicos e de prevalência de infecções. O método citológico tem sido utilizado principalmente para diagnóstico de infecção pelo HPV na mulher destacando a presença de alterações morfológicas que a infecção pelo HPV pode produzir como células gigantes, coilócitos, ou seja, células sugestivas de infecção pelo HPV. Em homens as lesões sugestivas de condilomas, devem ser examinadas com o auxílio da peniscopia, procedendo rigorosamente para as regiões do prepúcio, meato uretral, glande, sulco balanoprepucial, região perianal. Atualmente, o diagnóstico mais eficiente para detecção do HPV no homem é baseado em ensaios de biologia molecular. A hibridização e a amplificação genômica mediante reações de PCR apresentam alta sensibilidade permitindo a detecção de um elevado número de cópias do DNA viral e permitindo a identificação do tipo do HPV (Garcia *et al*, 2005).

O tratamento da infecção pelo HPV depende do ponto de vista médico. Pode variar desde procedimentos cirúrgicos a tratamentos profiláticos. O tratamento tem sido realizado com podofilina, ácido tricloroacético, fluoracil e interferom alfa (local ou sistêmico). O tratamento com cremes e soluções de podofilina (0.15% e 5% respectivamente) representa a opção mais usada para tratamento, mas com grandes desvantagens, incluindo dor, alto custo e resultados incertos. Um recente fármaco disponível no mercado é o imiquimod, um imunomodulador que produz estimulação na produção de citocinas. É usado durante 14 a 16 semanas e parece ser o fármaco de escolha no tratamento de condilomas, porém, não está isento de efeitos colaterais, como eritema, ardor e prurido e alguns pacientes (Garcia *et al*, 2005).

O diagnóstico das verrugas genitais comuns se baseia na apresentação clínica, na sua localidade anatômica e na histologia e a solução para as mesmas inclui métodos terapêuticos para destruir as células infectadas, como terapias cirúrgicas por laser de CO₂ e retirada das verrugas por métodos cirúrgicos. Esses procedimentos, segundo estudos, não são os tratamentos com maior êxito (Concha, 2007). Tanto diagnóstico como tratamento da doença produzida pelo HPV, assim

como os cânceres associados ao vírus, representam um dos maiores desafios na última década (Concha, 2007).

1.5 Papilomavirus Humano

1.5.1 Características

O HPV tem sido considerado o fator etiológico para o câncer anogenital e principalmente para o câncer cervical. Esses vírus infectam o epitélio induzindo lesões malignas ou benignas em mucosas e pele. A infecção pelo HPV inicia-se na membrana basal do epitélio, e as manifestações mais comuns compreendem as verrugas e papilomas observados na pele e nas lesões genitais (Sandy *et al*, 2007).

O HPV pode infectar regiões anatômicas diferentes em homens e mulheres. As verrugas anogenitais são causadas por HPV de baixo risco do tipo 6 e 11. Os HPV de alto risco podem causar câncer ou lesões precursoras de câncer do pênis, colo do útero e ânus (Daron *et al*, 2009). Alguns tipos de HPV são considerados de alto risco devido a seu potencial carcinogênico, em particular uma progressão maligna para tumores cervicais. O papilomavirus humano é um vírus pequeno, não encapsulado, com uma estrutura icosaédrica e possui um genoma de dupla fita circular de DNA com 7.500 a 8.000 pares de bases. O material genético está envolto por um capsídeo, que possui um diâmetro de 50nm com 72 subunidades denominadas capsômeros, formadas por duas proteínas estruturais (L1 e L2). Este vírus pertence à família *Papillomaviridae*, incluindo o gênero *Papillomavirus* que são vírus distribuídos amplamente na natureza e infectam tanto aves como em mamíferos (Concha, 2007; Hoory *et al*, 2008).

1.5.2 Classificação

O HPV é um vírus de DNA que infecta preferencialmente tecidos epiteliais, incluindo o trato anogenital. Mais de 100 tipos diferentes de HPV tem sido identificados e 40 tipos estão envolvidos nas infecções do trato genital. Esses HPV são classificados como de alto risco e baixo risco, de acordo com o potencial transformante do vírus e sua relação com o câncer cervical (Garnett & Hughes, 2006).

Com base nos estudos de sequenciamento do genoma viral, diferentes genótipos de HPV foram descritos. Atualmente considera-se um novo tipo de HPV quando as sequências de nucleotídeos dos genes L1, E6 e E7 (aproximadamente 30% do genoma viral) diferirem em mais de 10% dos tipos conhecidos. Se esse percentual for menor que 2%, então o novo vírus isolado é designado como uma variante do mesmo tipo. Os subtipos virais correspondem aos genomas cujas seqüências nucleotídicas nas regiões gênicas diferem entre 2% e 10% dos tipos já descritos (Souto *et al*, 2005).

Esses genótipos produzem infecções que podem evoluir de formas diferentes, desde uma infecção assintomática até um câncer invasivo. As diversidades das manifestações clínicas e a seqüência dos eventos celulares envolvidas na patogênese das infecções relacionadas ao HPV apresentam aspectos em comum (Franco *et al*, 1999; Ylitali *et al*, 2000; Lo *et al*, 2002; Franco *et al*, 2003). Nos indivíduos de sexo masculino, alguns tipos de HPV têm sido implicados no desenvolvimento de malignidades nas regiões anatômicas que comumente infectam, incluindo pênis, uretra, saco escrotal e região anal. Os HPV infectam tanto as mucosas quanto os tecidos cutâneos. Assim, podem ser classificados segundo seu tropismo como cutâneotrópicos e mucosotrópicos. As diferenças em se tratando de tropismo ainda carecem de estudos, porém, nos últimos anos, tem-se estudado intensamente as variações discretas em certas porções do genoma que possam resultar em potencial patogênico distinto. A diferença entre os tipos de HPV encontrados em tumores benignos e malignos permite classificá-los como HPV de alto e baixo risco oncogênico (Souto *et al*, 2005).

1.5.3 Genoma viral do HPV

O genoma do HPV é constituído por aproximadamente oito quadros de leitura aberta, possuindo pelo menos seis genes que se expressam precocemente e dois genes que se expressam tardiamente, sendo respectivamente E (*Early*) e L (*Late*). A região E é formada pelos genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7, dentre estes, E1 tem relação com a replicação viral, E2 com a transcrição e replicação, E4 com a maturação viral e alteração da matriz intracelular. E5, E6 e E7 estão envolvidos na transformação celular. A região L é formada pelos genes L1 e L2, que codificam as proteínas do capsídeo. Somando-se a isso, o genoma é dotado de uma longa região

regulatória LCR (*Long Control Region*), variando de 400 a 1000 pb, localizadas entre as regiões L1 e E6. Nessa região, existem sequências estimuladoras e repressoras da transcrição viral, além de origem de replicação (Souto *et al*, 2005). A figura 01 representa um esquema do genoma do HPV do tipo 16.

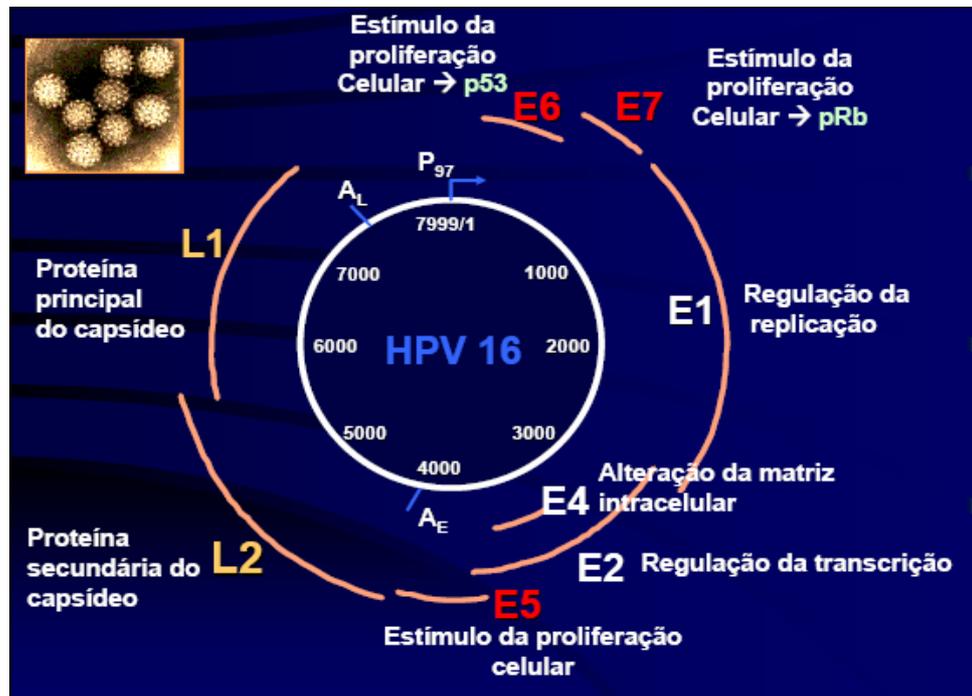


Figura 01 - Representação Esquemática do Genoma do HPV (De Paula *et al*, 2009)

O potencial carcinogênico do HPV está relacionado com duas proteínas virais denominadas E6 e E7, as quais são capazes de interagir com proteínas que regulam o ciclo celular e que atuam como supressoras de tumores, como a P53 e PRb. Essa interação provoca a degradação e inativação das proteínas celulares, conduzindo à transformação, imortalização celular e posteriormente à carcinogênese (Garnet & Hughes, 2006). Em infecções por vírus de alto risco, as proteínas virais E6 e E7, chamadas oncoproteínas, integradas, são muito ativas e interferem profundamente no ciclo celular. Isso resulta em uma divisão celular mais rápida do que em infecções por vírus de baixo risco, aumentando a probabilidade de ocorrer integração do DNA viral no genoma celular. Essa integração parece ser a causa da carcinogênese (Esquenazi *et al*, 2010)

A organização filogenética do HPV surgiu a partir de uma seqüência de genomas, mesmo sendo classificados de acordo com a região infectada e a doença com a qual eles podem estar associados. O genoma do HPV está dividido em três

regiões denominadas quadro de leitura aberta (ORF, do inglês: *open reading frame*) que são genes que codificam as proteínas virais (Hoory *et al*, 2008). A figura 02 representa a árvore filogenética do HPV baseado na ORF L1.

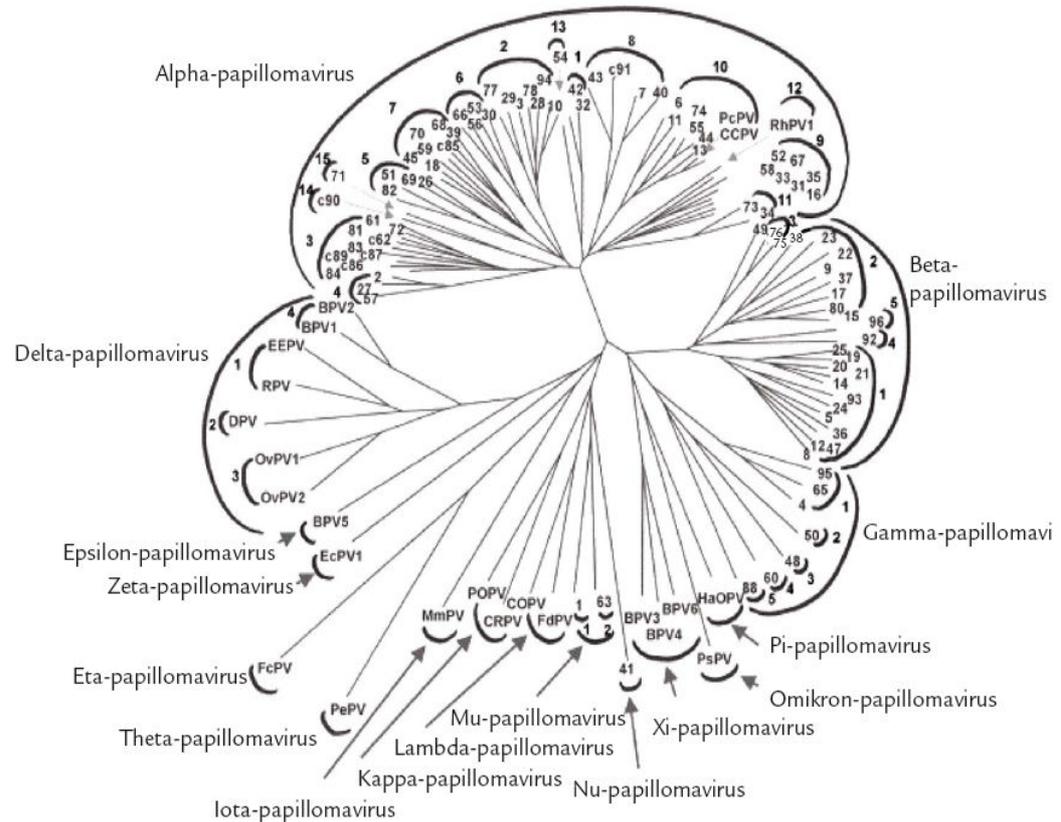


Figura 02 - Árvore Filogenética do papilomavírus baseado na sequência ORF L1 para classificar os papilomavírus (Modificado por Hoory *et al*, 2008)

Na região precoce, as sequências E, E1, E2, E4, E5, E6 e E7 têm a função de codificar proteínas responsáveis pela transformação e replicação. O gene E1 tem importante função na replicação, os genes E1 e E2 na transcrição e os genes E5, E6 e E7 na transformação celular (Zur Hausen, 2000). A proteína codificada pelo gene E2, controla a transcrição dos genes virais E6 e interage com E1 na estimulação da replicação, por facilitar a ligação de E1 à origem de replicação. A proteína E4 é feita nas camadas mais diferenciadas do epitélio infectado, durante o ciclo reprodutivo viral (Palesky *et al*, 1991; Doobar *et al*, 2005). A proteína E5 apresenta apenas uma fraca atividade de transformação, amplificando o sinal mitogênico do receptor de crescimento epidérmico (Zur Hausen, 2000). A expressão do gene E6 resulta em uma proteína de cerca de 150 aminoácidos, que se liga ao produto do gene p53,

levando à sua degradação (Scheffner *et al*, 1993; Zur Hausen, 2000, Zur Hausen, 2006). A proteína p53 é responsável por monitorar danos ocorridos nas moléculas de DNA e tem como função a regulação do ciclo celular; por isso, é considerada como supressora tumoral (Doorbar *et al*, 2005). Os genes L1 e L2, de expressão tardia, codificam proteínas principais e secundárias do capsídeo, respectivamente, e ambos são sequências altamente conservadas entre todos os HPVs. A proteína L1 é a mais abundante no capsídeo viral e constitui cerca de 80% do total das proteínas virais. A proteína L2, associada à L1, participa da incorporação do DNA viral à célula hospedeira (Hoory *et al*, 2008). A origem de replicação viral está localizada numa região de 500 a 1.000 pares de bases, entre L1 e E6, designada LCR (*Long Control Region*) ou URR (*Upstream Regulatory Region*). Nesta região foram mapeados vários sítios para ligação de elementos regulatórios virais (proteínas E2) ou celulares (diversos fatores de transcrição), elementos responsivos a hormônios glicocorticóides e progesterona que, em conjunto, determinam a modulação positiva ou negativa da transcrição do genoma viral (IARC, 1995; Howley, 1996).

1.5.4 Replicação viral

Dois modos de replicação dos HPV são descritos (zur Hausen, 2002). O primeiro ocorre nas células da camada basal da epiderme, onde o genoma viral é mantido de forma estável em cópias múltiplas, sendo distribuído homogeneamente entre as células-filhas. Este tipo de replicação garante um número de cópias nas células proliferativas da camada basal. Outra forma de replicação do DNA é a vegetativa, que ocorre nas camadas mais diferenciadas da epiderme. Na camada proliferativa, o vírus pode se replicar e expressar suas proteínas precoces. No entanto, a replicação vegetativa do DNA viral, a síntese das proteínas do capsídeo e a montagem das partículas virais só têm lugar nas células mais diferenciadas. Este deve ser o motivo pelo qual é impossível propagar os HPV em cultura de células (Zur Hausen, 2000). O período mínimo entre a infecção e a liberação das partículas de HPV, é, em média, de três semanas. Durante essa fase, grande parte das lesões é eliminada pelo sistema imune espontaneamente, mas em alguns casos, os vírus podem escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro resultando em uma infecção persistente (Munoz *et al*, 2004). A integração do DNA viral no genoma da célula hospedeira parece ocorrer ao acaso. Os tipos virais que integram com mais

frequência ao genoma humano são os tipos 16 e 18 (Munoz *et al*, 2004). É importante ressaltar que as infecções por HPV, isoladamente, não são capazes, por si só, de induzirem progressão para lesões precursoras, sendo que menos de 2% das lesões induzidas por esses vírus evoluirão para a neoplasia invasora, o que demonstra a necessidade de outros eventos moleculares (Meijer *et al*, 2000).

1.5.5 Patogênese

A infecção pelo HPV tem sido descrita de três formas: clínica, subclínica e latente. A forma clínica consiste na presença de condilomas acuminados e verrugas genitais, localizadas nas regiões do sulco prepucial, glândula do pênis, haste do pênis e no meato uretral. Os condilomas planos são menos freqüentes, mas podem aparecer nessas regiões (Garcia *et al*, 2005).

A infecção subclínica se expressa nas lesões denominadas aceto brancas, com possível visualização por meio de peniscopia e genitoscopia e a utilização do ácido acético 5% na região potencialmente afetada. Estas manifestações aparecem em homens cujas parceiras também apresentam infecção por HPV (Garcia *et al*, 2005). Na forma latente, a infecção pelo HPV só pode ser diagnosticada por meio de técnicas de biologia molecular, não havendo evidências clínicas, citológicas ou histológicas (Lauro *et al*, 2000).

1.6 Métodos de detecção do HPV

A infecção pelo HPV está associada com o aumento de risco e com o desenvolvimento de neoplasias. Para um diagnóstico preciso é necessário um método sensível para a detecção do HPV. A técnica PCR (Reação em cadeia da polimerase) permite a detecção do DNA do HPV de forma específica e sensível (Doorn *et al*, 2002). Alguns estudos mostram uma variabilidade quanto à sensibilidade e especificidade de métodos utilizados na detecção do HPV, demonstrando características importantes que podem contribuir para a detecção do genoma e identificação do tipo viral (Guglielmo *et al*, 2010). A PCR é considerada o método mais adequado, por ser uma técnica de alta sensibilidade que permite a detecção de ácidos nucléicos com a amplificação genômica (Moya *et al*, 2006).

Os testes envolvendo a amplificação de sequências gênicas por meio de PCR permitem multiplicação *in vitro* de regiões únicas do DNA, possibilitando sua detecção mesmo na presença de milhares de sequências concomitantes. Esse método é considerado o mais flexível e sensível entre todos os utilizados para detecção do DNA do HPV, podendo ser utilizado, não só para detecção, como também quantificação viral, seqüenciamento de DNA e análise de mutações. A região L1 é a mais utilizada para o desenvolvimento de metodologias baseadas em PCR, pois essa região apresenta-se altamente conservada entre os diversos tipos de HPV, facilitando a detecção de uma maior quantidade de tipos virais em uma só reação (Hubbard, 2003).

A PCR permite a amplificação *in vitro* de regiões específicas do DNA utilizando atividade enzimática. A técnica de PCR torna possível tanto a detecção como a determinação do tipo viral do HPV em amostras biológicas. O método permite o uso de pequenas quantidades de DNA, uma vez que uma sequência pode ser amplificada milhões de vezes. Para isso, são desenvolvidos *primers* complementares a uma região alvo do DNA que se pretende amplificar, e adicionados a uma mistura que contém nucleotídeos livres, cloreto de magnésio e a enzima Taq DNA-Polimerase. Após alguns ciclos de reações que envolvem desnaturação da molécula de DNA, anelamento dos *primers* à sequência complementar e extensão da cadeia amplificada pela ação da enzima Taq DNA-Polimerase, milhões de cópias são formadas igualmente à sequência alvo. O DNA do HPV pode ser amplificado por uma série de reações que levam a um aumento das sequências virais presentes nos espécimes biológicos. A análise do produto amplificado pode ser feita de diferentes maneiras incluindo eletroforese, dot blot ou hibridização em fita (Zaravinos, 2009).

Uma variação do método de PCR, denominada PCR em tempo real, é usada em estudos de quantificação da carga viral do HPV. Os sistemas usados na PCR em tempo real são baseados na detecção e quantificação de um sinal fluorescente, que aumenta na proporção direta da quantidade do produto formado em cada ciclo de uma reação. A PCR em tempo real mede a quantidade de produto amplificado por PCR na medida em que ele é formado, ou seja, em tempo real. O método é capaz de medir a quantidade do produto ainda na fase exponencial da reação de PCR. Como nesta fase a quantidade de produto formada traduz de maneira eficiente a concentração inicial de moléculas moldes amplificadas, é possível inferir sobre a

quantidade de uma sequência específica numa determinada amostra. As reações de PCR em tempo real dispensam a análise dos produtos de amplificação em géis, o que torna a técnica mais fácil para a análise de maior quantidade de amostras (Zaravinos *et al*, 2009; Iftner & Villa, 2003).

O método da hibridização direta baseia-se no pareamento complementar de uma sonda marcada para antígenos de HPV ou para os ácidos nucleicos do vírus. A técnica se baseia em uma série de sondas de hibridização. A amostra amplificada e marcada com biotina se liga a uma série de sondas onde ocorre a hibridização com suas respectivas sequências complementares. Após essa reação o conjugado estreptavidina-peroxidase se une com a biotina onde ocorre a hibridização. A interpretação dos resultados deve ser feita por um profissional preparado e capacitado (Moyá *et al*, 2006).

Os testes de hibridização molecular baseiam-se no seguinte fenômeno: em condições adequadas, uma fita única de ácido nucleico tem um complemento específico. As moléculas de ácidos nucleicos conhecidas e marcadas com P32, S35 e H3 (conhecidas como sondas quentes-*hot probes*) ou aquelas biotiniladas e não radioativas (conhecidas como sondas frias - *cold probes*) permitem fazer a detecção específica dos complementos desconhecidos, chamados de alvos-diagnósticos, que também formam moléculas híbridas completas (Zaravinos *et al*, 2009).

1.6.1 Primers utilizados na detecção do HPV

Oligonucleotídeos iniciadores genéricos ou consensuais usados nas reações de PCR têm sido desenvolvidos e apresentam resultados satisfatórios na detecção do genoma do HPV. Os testes são usados na identificação na maioria dos genótipos de HPV. Os oligonucleotídeos iniciadores, GP5+/GP6+, SPF10, MY09/11, e PGMY, possuem atributos que permitem detectar uma grande quantidade de genótipos do HPV (Zaravinos *et al*, 2009).

A sensibilidade e a especificidade dos métodos de PCR podem variar de acordo com os oligonucleotídeos iniciadores utilizados, tamanho do fragmento a ser amplificado, condições de reações, qualidade do DNA a ser amplificado e da habilidade na detecção dos tipos de vírus. Os protocolos mais utilizados fazem o uso de oligonucleotídeos iniciadores consensuais que apresentam como alvo as regiões conservadas do gene L1 do HPV e são capazes de detectar todos os tipos

conhecidos. Esses oligonucleotídeos iniciadores consensuais incluem os denominados GP5+/GP6+, além dos oligonucleotídeos iniciadores PGMY09/11.

As reações de PCR usando oligonucleotídeos iniciadores como PGMY09/11, têm mostrado mais eficientes na detecção de infecção por mais de um tipo de HPV na mesma amostra do que reações que utilizam oligonucleotídeos iniciadores consensuais simples, como o GP5+/GP6+ (Iftner & Villa, 2003).

Os oligonucleotídeos iniciadores PGMY09/11 representam uma versão estendida dos oligonucleotídeos iniciadores MY09/11, com o objetivo de melhorar a sensibilidade e a eficiência da detecção de múltiplos tipos de HPV. O fragmento amplificado após a reação de PCR é formado por 450 pares de bases. Esses oligonucleotídeos iniciadores apresentam maior complementaridade com as seqüências alvos do que os oligonucleotídeos iniciadores MY09/11, sendo capazes de detectar e genotipar, de forma mais sensível, diversos tipos de HPV e amostras com múltiplos genótipos. Estudos que utilizam os oligonucleotídeos iniciadores PGMY09/11 apresentam maior eficiência na detecção de infecções relacionadas ao HPV. A mudança de oligonucleotídeos iniciadores PGMY09/11 proporcionou mais sensibilidade à técnica e melhora na detecção de vários tipos de HPV (Coutlée *et al*, 2006).

Os oligonucleotídeos iniciadores GP5+/6+ são comumente usados em reações de PCR para detecção do DNA do HPV. A seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores GP5+/6+ é capaz de alinhar com as seqüências correspondentes da região L1 de 23 diferentes genótipos de HPVs mucosotrópicos. Os amplicons desses oligonucleotídeos iniciadores têm um tamanho de aproximadamente 150 pares de bases. Os oligonucleotídeos iniciadores GP5+/6+ representam uma versão modificada dos primers GP5/GP6. Essa modificação foi feita com o objetivo de melhorar a especificidade e sensibilidade da reação para detecção do DNA do HPV. Um aumento do tamanho dos oligonucleotídeos iniciadores contribuiu para uma amplificação mais eficiente. Com essas modificações, a reação de PCR passou a apresentar menos co-amplificação de DNA celular, ganhando um aumento nos níveis de detecção do HPV e uma maior especificidade (Schimitt *et al*, 2008).

Existe uma grande variedade de métodos disponíveis utilizados na detecção do genoma do HPV, a técnica de PCR tem sido apresentada como a mais eficiente e de maior sensibilidade. Os conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores consensuais que se ligam às regiões conservadas do genoma do HPV têm sido usados na

detecção de vários tipos de HPV em uma só reação, mostrando-se efetivos na detecção de múltiplos tipos de HPV e por tipo único de HPV (Hubbard, 2003).

2 JUSTIFICATIVAS

O presente estudo é justificado pelos seguintes aspectos apresentados e analisados:

(1) A infecção pelo HPV é atualmente a infecção de transmissão sexual mais prevalente no mundo.

(2) A infecção pelo HPV é o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer cervical, o qual o homem é um importante fator de risco para o desenvolvimento do câncer de pênis.

(3) A maioria dos homens infectados pelo HPV na região genital apresenta infecção assintomática, assim, eles funcionam como reservatórios do vírus, transmitindo a infecção por meio do contato sexual.

(4) Poucos dados estão disponíveis com relação à prevalência da infecção genital pelo HPV em homens, especialmente em adultos jovens da região Centro-Oeste do Brasil.

(5) A infecção pelo HPV é mais freqüente na faixa etária de vida sexual ativa.

(6) Uma vez que vacinas contra o HPV encontram-se disponíveis no mercado, conhecer a prevalência da infecção em adultos jovens do sexo masculino é importante, no sentido de avaliar a necessidade de vacinação deste grupo populacional.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

(1) Determinar a prevalência da infecção pelo HPV em um grupo de adultos jovens, do sexo masculino, com idades entre 18-25 anos, residentes no Município de Leopoldo de Bulhões-GO.

3.2 Objetivos específicos

(1) Detectar o genoma do HPV, utilizando métodos de PCR, em amostras de escovado de glândula de pênis, obtidas de 57 adultos jovens, do sexo masculino, do Município de Leopoldo de Bulhões-GO e áreas rurais vizinhas do município.

(2) Descrever os aspectos relacionados aos hábitos sexuais (número de parceiras, início da atividade sexual, uso de preservativos, hábitos sexuais, etc.) do grupo estudo estudado.

(3) Avaliar as possíveis associações existentes entre a infecção pelo HPV no grupo de jovens analisados, seus aspectos sócio demográfico e hábitos sexuais (número de parceiras, início da atividade sexual, uso de preservativos, hábitos sexuais, etc.).

(4) Avaliar clinicamente a região genital dos jovens participantes da pesquisa, investigando sinais e sintomas potencialmente relacionados à infecção pelo HPV.

4 METODOLOGIA

4.1 Desenho de estudo

O trabalho consiste de um estudo prospectivo do tipo corte transversal. Palestras sobre infecções sexualmente transmissíveis foram ministradas pela mestrandia responsável pelo projeto, junto ao Centro de Saúde José Francisco Vargas, no município de Leopoldo de Bulhões, Goiás. Durante as palestras, foram divulgados os objetivos e os métodos a serem usados no estudo e os jovens que participaram das palestras foram convidados a participar do projeto, sendo instruídos a procurar posteriormente o centro de saúde do município para agendamento das consultas e entrevistas. Os jovens que agendaram e compareceram à consulta, foram informados detalhadamente sobre a pesquisa. Todos os procedimentos clínicos foram desempenhados pelo médico colaborador do estudo.

4.2 Encaminhamento e aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa

O protocolo desta pesquisa foi autorizado pela instituição que colaborou com o projeto, o Centro de Saúde José Francisco Vargas, no município de Leopoldo de Bulhões, Goiás e posteriormente submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Associação de Combate ao Câncer de Goiás, sendo registrado e recomendado de acordo com o protocolo n° 015/2008.

4.3 Seleção de sujeitos e coleta de espécimes da glândula do pênis

O estudo incluiu 57 homens, com idades entre 18 e 25 anos, residentes no município de Leopoldo de Bulhões. Todos os pacientes foram esclarecidos quanto aos objetivos do projeto e quanto à coleta de material biológico. Só então, os indivíduos foram encaminhados e atendidos no Centro de Saúde José Francisco Vargas no município de Leopoldo de Bulhões, no ambulatório médico. Os homens que atenderam ao convite e preencheram os critérios de inclusão, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1) e foram incluídos no estudo, sendo submetidos à consulta clínica com coleta de material da glândula do pênis para

detecção do genoma do HPV. No ambulatório médico do Centro de Saúde José Francisco Vargas, todos os participantes foram submetidos a exame clínico cuidadoso, com inspeção dos órgãos genitais externos e região anal. Após a inspeção e o exame clínico foi realizado um procedimento, onde o prepúcio foi afastado, permitindo expor a glândula do pênis. A seguir, foi coletado material da glândula do pênis, utilizando uma escova apropriada. Essa escova foi aderida no local entre a glândula e a haste do pênis, e utilizada em movimentos giratórios, realizando uma esfoliação. O material colhido foi colocado em uma solução-tampão (UCM, *Universal Collection Medium, Qiagen*) e em seguida as amostras foram armazenadas no freezer a -20°C, até serem transferidas para o Laboratório de Diversidade Genética da PUC-Goiás, em Goiânia. No laboratório, as amostras foram mantidas em freezer a -20°C, até serem processadas para extração de DNA e pesquisa do HPV. Os procedimentos de coleta foram realizados pelo Dr. Raimundo Nonato Rodrigues Diniz Filho (médico do Centro de Saúde do Município de Leopoldo de Bulhões), após orientação feita pelo Dr. Adriano Augusto Peclat de Paula (médico do Serviço de Urologia do HAJ), ambos colaboradores desse projeto.

O DNA purificado das amostras de células descamativas da glândula do pênis foi submetido à PCR para detecção do genoma do HPV. Cada amostra de DNA purificada foi previamente testada para amplificação de uma sequência do gene constitutivo GAPDH. As amostras positivas para GAPDH foram então testadas para a detecção de HPV, utilizando o kit comercial *HPV Detection and Genotyping – Roche Molecular Diagnostics*.

4.4 Preparo das amostras e extração de DNA

Todas as escovas contidas nos tubos com solução-tampão preservadora eram previamente agitadas, sendo posteriormente centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos, para que as células formassem um pellet. Com uma micropipeta, foram aspirados cerca de 200 µl do sedimento de cada amostra e transferidos para um microtubo previamente identificado, para posterior lise celular e purificação do DNA.

A extração do DNA do HPV das amostras de células descamativas colhidas da glândula do pênis foi feita com a utilização do kit comercial *Pure Gene Invitrogen*, utilizando o protocolo descrito pelo fabricante.

4.5 Avaliação da integridade do DNA genômico dos pacientes selecionados

As amostras de DNA purificadas a partir das células descamativas foram submetidas à reação de PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores específicos para a amplificação do gene GAPDH (Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, um gene constitutivo humano), que amplificam um fragmento de aproximadamente 90 pb (pares de base). A amplificação do GAPDH é necessária para assegurar a qualidade do DNA extraído e a ausência de inibidores inespecíficos da reação de PCR. Para não haver contaminação da PCR, esta foi realizada em câmara de fluxo previamente limpa com álcool a 70% e irradiada com luz ultravioleta por 30 minutos. Todos os reagentes da PCR foram rapidamente centrifugados e homogeneizados no vórtex, sendo previamente descongelados sobre o gelo picado. Um controle negativo da reação contendo todos os componentes, exceto o DNA, foi incluído em todas as amplificações. Como controle positivo, utilizou-se DNA humano extraído do sangue humano saudável. O protocolo para PCR de GAPDH com todos os reagentes encontra-se descrito no Anexo 3. As amplificações foram realizadas em termociclador (Biocycler) e as sequências dos primers e as condições da PCR estão descritas na tabela 2. Os produtos obtidos pelas reações de PCR foram analisados em gel de poliacrilamida a 8% e corados com nitrato de prata (Anexo 5).

Tabela 01 - Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores e protocolos de ciclagem usados no ensaio de PCR para amplificação do gene GAPDH em amostras de glândula do pênis

<i>Fragmento Amplificado/Oligonucleotídeos iniciadores</i>	<i>Condições de ciclagem</i>
(90 bp)	
Primer P1 (f) : 5' - TGGACTCCACGACGTAAGTCTCAG - 3'	94°C - 5 min
	94°C - 30 s
	59°C - 1 min } 35 ciclos
	72°C - 1 min
	72°C - 7 min
	4°C ~
Primer P2 (f) : 5' - TTGTCATCAATGGAAATCCCATCA - 3'	

4.6 Detecção molecular do genoma do HPV

Para a detecção do genoma do HPV foi usado o kit comercial *HPV Detection and Genotyping – ROCHE Molecular Diagnostics*, que amplifica um fragmento da região L1 do genoma do viral utilizando oligonucleotídeos iniciadores PGMY09/11. Foram utilizados de 1 µl a 3 µl de DNA, de acordo com a qualidade do DNA testado previamente com primers de GAPDH. O DNA foi diluído em 11,5 µl de H₂O milliQ autoclavada e 12,5 µl de mistura de reação. A mistura de reação foi preparada com Cloreto de Magnésio, sendo que para cada 580µl dessa mistura, foram adicionados 125 µl de Cloreto de Magnésio. A mistura de reação foi homogeneizada por inversão por 15 a 20 vezes, evitando formação de bolhas, e distribuído nos respectivos tubos contendo o DNA correspondente a cada amostra e previamente diluído. Para a visualização dos produtos de amplificação, 5 µl do produto de PCR foram colocados em gel de agarose. Um marcador de peso molecular de 100 pb foi usado para visualizar as bandas amplificadas com oligonucleotídeos iniciadores PGMY09/11 e da beta-globina. O programa de ciclagem está descrito na tabela abaixo.

Tabela 02 - Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores e protocolos de ciclagem usados no ensaio de PCR para a detecção do HPV em amostras de glândula do pênis

Fragmento Amplificado/oligonucleotídeos iniciadores	Condições de Ciclagem
Região L1 do HPV	95 °C – 13 min } 1 ciclo
Oligonucleotídeos iniciadores PGMY09/11	95 °C – 60 sec 55 °C – 60 sec } 40 ciclos
	72 °C – 60 sec 72 °C – 5 min
Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores PGMY 09/11.	
Nome dos oligonucleotídeos iniciadores	Sequência do oligonucleotídeo iniciador (5'3')
PGMY11-A	GCA CAG GGA CAT AAC AAT GG
PGMY11-B	GCG CAG GGC CAC AAT AAT GG
PGMY11-C	GCA CAG GGA CAT AAT AAT GG
PGMY11-D	GCC CAG GGC CAC AAC AAT GG
PGMY11-E	GCT CAG GGT TTA AAC AAT GG
PGMY09-F	CGT CCC AAA GGA AAC TGA TC
PGMY09-G	CGA CCT AAA GGA AAC TGA TC
PGMY09-H	CGT CCA AAA GGA AAC TGA TC
PGMY09-I	G CCA AGG GGA AAC TGA TC
PGMY09-J	CGT CCC AAA GGA TAC TGA TC
PGMY09-K	CGT CCA AGG GGA TAC TGA TC
PGMY09-L	CGA CCT AAA GGG AAT TGA TC
PGMY09-M	CGA CCT AGT GGA AAT TGA TC
PGMY09-N	CGA CCA AGG GGA TAT TGA TC
PGMY09-P	G CCC AAC GGA AAC TGA TC
PGMY09-Q	CGA CCC AAG GGA AAC TGG TC
PGMY09-R	CGT CCT AAA GGA AAC TGG TC
HMB01	GCG ACC CAA TGC AAA TTG GT

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Um banco de dados foi criado, utilizando o programa pacote office for windows, contendo todos os dados sócio-demográficos, comportamentais e clinicopatológicos dos homens avaliados neste estudo, além da detecção de HPV nas amostras obtidas por meio de escovado da glândula do pênis. A estatística descritiva com suas respectivas frequências foi realizada para as variáveis relativas às características sócio-demográficas, comportamentais e clínico-patológicas das amostras obtidas. O teste do *qui-quadrado* com correção de Yates, nível de significância de 5% e intervalo de confiança de 95% foi usado para avaliar as possíveis associações entre os aspectos sócio-demográficos, comportamentais e clínico-patológicos, no grupo de homens estudados.

6 RESULTADOS

A amplificação do gene constitutivo GAPDH foi positiva nas 57 amostras testadas por PCR. A figura 03 mostra os resultados dos produtos de PCR analisados em gel de poliacrilamida 8%, obtidos com a utilização de *primers* específicos para o gene GAPDH.

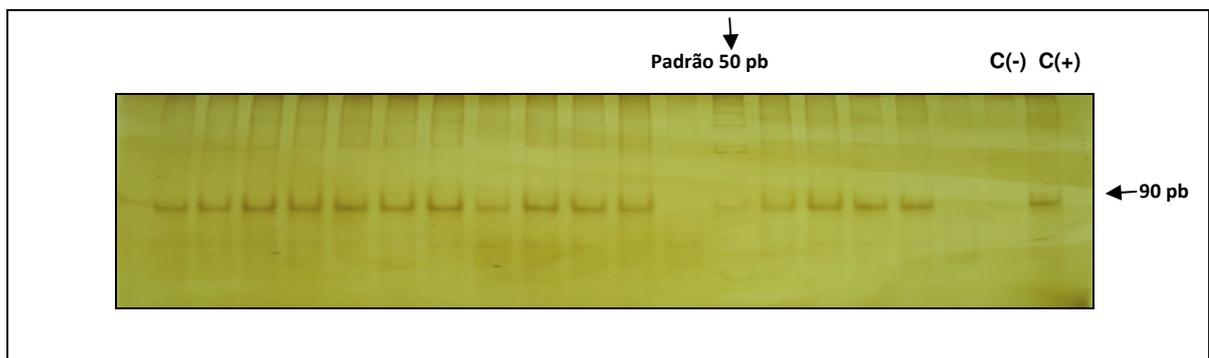


Figura 03 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, corado com nitrato de prata, mostrando os produtos de PCR obtidos com a utilização de oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene GAPDH. Bandas de aproximadamente 90 pares de bases demonstram a presença do DNA genômico nas amostras purificadas.

6.1 Caracterização da amostra

O grupo de estudo continha 57 homens com idades entre 18 e 25 anos e média de 20,7 anos. As características sócio-demográficas e comportamentais da população amostral estão descritas na tabela 03. Ao analisar os aspectos sóciodemográficos, como estado civil e escolaridade da população amostral, verificou-se que 43,9% dos homens eram solteiros. Quanto à escolaridade, 52,6% concluíram o ensino fundamental, 33,3% concluíram o ensino médio, 10,5% tinham o curso superior incompleto e 3,5% concluíram o ensino superior.

Com relação aos hábitos sexuais, a idade média da primeira relação sexual foi aos 15,7 anos, variando de 11 a 20 anos. Quanto ao número de parceiras sexuais, 40,4% dos homens tiveram de 2 a 9 parceiras sexuais e 59,6% tiveram mais de 9 parceiras. Dentre os indivíduos analisados, 17,5% relataram o uso de preservativos freqüentemente, enquanto 82,4% relataram o uso ocasionalmente.

Dentre os indivíduos incluídos no estudo, 5,3% relataram contato homossexual, enquanto 94,7% eram heterossexuais. O grupo amostral apresentou 3,5% de homens circuncisados e 96,5% de homens não circuncisados. A história de lesão no pênis foi relatada por 22,8% dos participantes e 77,2% informaram que nunca tiveram lesão no pênis. Com relação aos hábitos analisados, 73,7% informaram que não realizavam higienização após relação sexual e 26,3% tinham o hábito de higienização. Dentre os participantes, 87,7% relataram que não compareciam à consulta médica de rotina, enquanto somente 12,3% informaram que compareciam à consulta médica regularmente. Com relação às parceiras sexuais, 36,8% dos jovens informaram não ter parceira fixa, enquanto 63,2% relataram ter uma única parceira.

Tabela 03 - Análise descritiva das características sócio-demográficas e comportamentais do grupo estudado.

Variável	N	%
Idade (anos)		20,7(18 - 25)
Estado Civil		
Solteiros	25	43,9
Casados	32	56,1
Escolaridade		
Fundamental	30	52,6
Médio	20	33,3
Superior incompleto	6	10,5
Superior	1	3,5
Idade da 1ª relação sexual		15,7(11 - 20)
N. de parceiras sexuais		
2 a 9	23	40,4
Mais de 9	34	59,6
Circuncisão		
Sim	2	3,5
Não	55	96,5
Contato homossexual		
Sim	3	5,3
Não	54	94,7
Uso de preservativo		
Frequentemente	10	17,5
Ocasionalmente	47	82,4
Já teve lesão no pênis		
Sim	13	22,8
Não	44	77,2
Vai ao médico regularmente		
Sim	7	12,3
Não	50	87,7
Higienização após relação sexual		
Sim	15	26,3
Não	42	73,7
Possui parceira fixa		
Sim	36	63,2
Não	21	36,8

6.2 Detecção do genoma do HPV nas amostras de células descamativas da glândula do pênis utilizando o kit HPV *Detection and Genotyping* – ROCHE.

Nosso estudo demonstrou o genoma do HPV em 18/57 (31,6%) amostras de células exfoliativas coletadas dos jovens participantes. A figura 4 mostra os resultados das reações de PCR usadas para a detecção do genoma viral, utilizando os *primers* PGMY09/11. A presença do DNA viral é comprovada pelo aparecimento de uma banda de aproximadamente 450 pares de bases, enquanto as bandas menores (aproximadamente 300 pares de bases) correspondem à amplificação de fragmentos de beta-globina, usados como controles internos da amplificação.

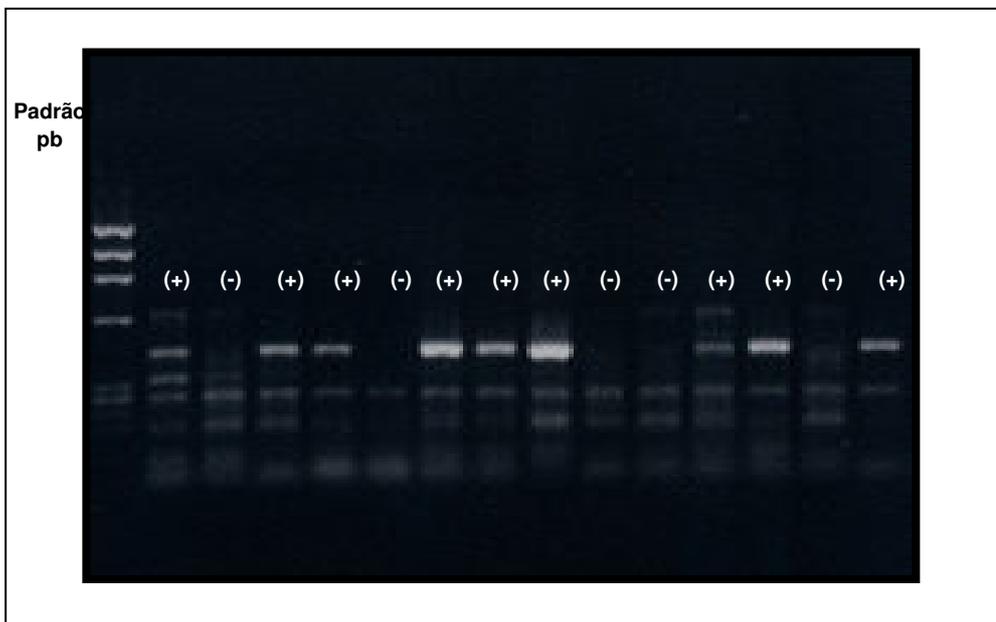


Figura 04: Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo, mostrando os produtos de PCR obtidos com a utilização do kit comercial HPV *Detection and Genotyping* – ROCHE. As bandas de aproximadamente 450 pares de bases correspondem aos fragmentos do genoma do HPV amplificados, enquanto as bandas menores (aproximadamente 300 pares de bases) correspondem à amplificação de fragmentos de beta-globina, usados como controles internos da amplificação.

6.3 Fatores comportamentais associados à infecção

A tabela 04 apresenta os resultados da detecção do HPV de acordo com as variáveis comportamentais para o grupo de homens estudados. Quanto aos hábitos sociodemográficos e sexuais, a detecção do HPV foi mais prevalente no

grupo de homens solteiros, ou seja, o DNA do HPV foi detectado em 56% dos homens solteiros e em 12,5% dos homens casados [OR = 0,11; IC 95% (0,03-0,417)].

Quanto ao número de parceiras sexuais, a detecção do HPV foi mais prevalente nos indivíduos que apresentaram número maior ou igual a 10 parceiras sexuais. O DNA do HPV foi detectado em 21,7% dos homens com menos de 10 parceiras e em 38,2% dos homens com mais de 10 parceiras, entretanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p>0,05$).

O nível de escolaridade não esteve associado à detecção do HPV, sendo que o vírus foi detectado em 26,7% dos homens com nível fundamental, 35% dos homens com nível médio e em 42,9% dos homens com nível superior completo ou incompleto. A diferença entre os níveis de escolaridade não foi estatisticamente significativa ($p>0,05$).

Com relação ao início da atividade sexual, a idade média de início da atividade sexual nos indivíduos infectados pelo HPV positivos foi de 15,3 anos, enquanto que a idade média de início da atividade sexual nos indivíduos HPV negativos foi de 15,9 anos, porém, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p>0,05$).

Dentre o grupo de homens estudado, somente dois relataram história de circuncisão, sendo que um deles apresentou o genoma do HPV (50%). De todos os homens que participaram do estudo, três informaram ter tido contato homossexual e dois deles (66,7%) apresentaram o genoma do HPV.

O uso do preservativo também foi um aspecto investigado no grupo. Dentre os dez homens que informaram usar o preservativo freqüentemente, 50% foram positivos para a detecção do genoma do HPV, enquanto que dos 57 homens que relataram usar o preservativo ocasionalmente, 27,7% foram positivos para a detecção do HPV, porém, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p>0,05$).

O genoma do HPV foi encontrado em 30,8% dos homens que informaram história de algum tipo de lesão no pênis, comparados aos homens que nunca apresentaram algum tipo de lesão no pênis, nos quais a detecção do HPV foi positiva em 31,8% dos casos. Com relação a esse aspecto, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada ($p>0,05$).

No grupo de homens avaliado em nosso estudo, o genoma do HPV foi detectado em 42,9% daqueles que relataram ir ao médico regularmente, enquanto naqueles que não vão ao médico regularmente, o HPV foi detectado em 30% nas amostras ($p>0,05$).

Com relação à higienização feita pelo homem após a relação sexual, nos homens que informaram realizar a higienização (15 indivíduos), o genoma do HPV foi encontrado em 33,3% dos casos, enquanto que nos homens que relataram não realizar a higienização (42 indivíduos), o HPV foi encontrado em 31% dos casos ($p>0,05$).

No grupo de homens estudado, uma associação estatisticamente significativa foi observada entre a detecção do genoma do HPV e o fato desses homens possuírem parceira fixa. No grupo de homens que informaram não ter parceira sexual fixa (21 indivíduos), a detecção do genoma do HPV foi positiva em 57,1% dos casos, enquanto que naqueles que informaram ter parceira sexual fixa (36 indivíduos), o genoma do HPV foi encontrado em 16,7% dos casos ($p<0,05$) [OR = 6,667; IC (1,947-22,830)].

Tabela 04 - Análise univariada das características sócio-demográficas e comportamentais comparando os dois grupos estudados.

Variável	Grupos				p	**IC 95%
	HPV negativo		HPV positivo			
	N	%	N	%		
Idade (anos)	21,2 (18- 25)		19,7 (18 -25)		0,097	
Estado Civil						
Solteiro	11	44	14	56		1
Casado	28	87,5	4	12,5	<0,001*	0,112 (0,03 - 0,417)
Escolaridade						
Fundamental	22	73,3	8	26,7		1
Médio	13	65	7	35	0,529	1,481 (0,435 - 5,038)
Superior completo e incompleto	4	57,1	3	42,9	0,652	2,063 (0,376 - 11,309)
Idade da 1ª relação sexual	15,9 (11 - 20)		15,3 (12 - 18)		0,580	
N. de parceiras sexuais						
2 a 9	18	78,3	5	21,7		1
mais de 9	21	61,8	13	38,2	0,161	2,229 (0,666 - 7,461)
Circuncisado						
Sim	1	50	1	50		1
Não	38	69,1	17	30,9	0,568	0,447 (0,026 - 7,582)
Teve contato homossexual						
Sim	1	33,3	2	66,7		1
Não	38	70,4	16	29,6	0,179	0,211 (0,018 - 2,490)
Uso de preservativo						
Frequentemente	5	50	5	50		1
Ocasionalmente	34	72,3	13	27,7	0,207	0,382 (0,095 - 1,542)
Já teve lesão no pênis						
Sim	9	69,2	4	30,8		1
Não	30	68,2	14	31,8	0,943	1,050 (0,276 - 4,001)
Vai ao médico regularmente						
Sim	4	57,1	3	42,9		1
Não	35	70	15	30	0,493	0,571 (0,114 - 2,872)
Higienização após relação sexual						
Sim	10	66,7	5	33,3		1
Não	29	69	13	31	0,865	0,897 (0,255 - 3,152)
Possui parceira fixa						
Sim	30	83,3	6	16,7		1
Não	9	42,9	12	57,1	0,002*	6,667 (1,947 - 22,830)

*Resultados com diferença significativa entre as características analisadas e os grupos estudados

**IC: intervalo de confiança

7 DISCUSSÃO

A infecção pelo HPV em homens é um importante fator relacionado ao câncer cervical em mulheres (Nielson *et al*, 2007; Hernandez *et al*, 2008, Giovanelli *et al*, 2007; Rombaldi *et al*, 2006; Giuliano *et al*, 2008). Frente a essa importância, o homem tem sido apresentado como um vetor e reservatório da infecção pelo HPV (Giovanelli *et al*, 2006). Poucos estudos encontram-se disponíveis sobre a epidemiologia e a história natural da infecção pelo HPV em homens (Kjaer *et al*, 2005).

Nosso estudo analisou 57 amostras de homens assintomáticos para a infecção pelo HPV. A idade dos homens estudados variou de 18 a 25 anos e outros estudos sobre a detecção da infecção pelo HPV em homens também tem investigado essa faixa etária (Aguilar *et al*, 2006; Kjaer *et al*, 2005; Shin *et al*, 2004; Weaver *et al*, 2004; B- Giuliano *et al*, 2008).

Dentre as características comportamentais analisadas em nosso estudo, diferenças estatisticamente significativas foram observadas com relação ao estado civil e ao fato do indivíduo apresentar parceira fixa. Uma possível explicação para esse fato seria que os homens solteiros estão expostos a um maior número de parceiras sexuais e não usam frequentemente um método de barreira de proteção, como preservativos. O estado civil demonstrou ser um fator importante, uma vez que os homens casados apresentaram resultados mais baixos para a infecção pelo HPV. O fato dos homens serem casados foi considerado um fator de proteção com relação à infecção pelo HPV. O estado civil tem sido descrito como um importante fator de risco para infecção pelo HPV e esta associação é demonstrada em vários estudos (Watson, 2005; Partridge, *et al*, 2007; Nielson *et al*, 2009; Nyitray *et al*, 2009).

De acordo com Giuliano *et al* (2008a), a infecção pelo HPV é mais comum em homens jovens, sexualmente ativos. Em seu estudo, 68,9% dos 998 homens que apresentaram algum tipo de infecção pelo HPV iniciaram a vida sexual com 13 anos de idade. O início precoce da atividade sexual está relacionado com a infecção pelo HPV e é considerado um fator de risco, pois possibilita um maior número de parceiros(as) e, conseqüentemente, maior exposição a outras doenças sexualmente transmissíveis. Nosso estudo constatou que a idade média de início da atividade

sexual nos indivíduos HPV positivos foi de 15,3 anos, enquanto que a idade média de início da atividade sexual nos indivíduos HPV negativos foi de 15,9 anos, porém, essa diferença não foi estatisticamente significativa.

Vários estudos investigam as possíveis associações entre as práticas homossexuais e as infecções pelo HPV (Watson, 2005; Nielson *et al*, 2007; Nielson *et al*, 2009; Grov *et al*, 2010; Nyitray *et al*, 2011; Goldstone *et al*, 2011). Teoricamente, práticas homossexuais podem aumentar o risco de infecção pelo HPV devido ao aparecimento de microlesões durante a relação sexual anal (Grov *et al*, 2010). As práticas homossexuais têm sido associadas tanto ao condiloma acuminado recorrente, como ao câncer anal de células escamosas e suas lesões precursoras, representando um importante tema atual (Watson, 2005; Nyitray *et al*, 2011; Goldstone *et al*, 2011). Em nosso estudo, somente três indivíduos (5,3%) informaram contato homossexual, dos quais, dois (66,7%) foram positivos para a detecção do genoma do HPV, entretanto, o reduzido número de casos impossibilitou a detecção de associações estatisticamente significativas.

A circuncisão é demonstrada como um fator protetor contra a infecção pelo HPV. Homens não circuncidados apresentam maior risco de contraírem infecção pelo HPV e de transmitirem esta infecção para suas parceiras, comparados aos homens circuncidados (Castellsagué *et al*, 2002; Svare *et al*, 2002; Nielson *et al*, 2007; Hernandez *et al*, 2008b; Gray *et al*, 2010; Smith *et al*, 2011; Weaver *et al*, 2011). No nosso estudo, dois indivíduos apresentaram história de circuncisão, sendo que um foi positivo para detecção do genoma do HPV. Porém, o reduzido número de casos impossibilitou qualquer tipo de avaliação.

O uso adequado do preservativo diminui o risco de infecção pelo HPV em homens (Rombaldi *et al*, 2006; Kjaer *et al*, 2005, Giuliano *et al*; 2008a). Nosso estudo não foi capaz de demonstrar nenhuma associação estatisticamente significativa entre o uso de preservativos e a infecção pelo HPV.

A prevalência da infecção pelo HPV em homens varia de acordo com a população em estudo, com a idade, a região genital usada para a coleta da amostra e a metodologia utilizada para detecção do DNA do HPV, como citado anteriormente. Vários estudos investigaram a prevalência do HPV em homens relacionando com o local da região genital e a metodologia da coleta utilizada. Um estudo conduzido no Brasil apresentou uma prevalência de 54,5% de infecção pelo HPV em homens parceiros de mulheres com neoplasia intraepitelial cervical. O

estudo analisou o canal uretral, haste e glânde do pênis e para a coleta do material biológico foi utilizada a técnica de esfoliação através das imagens de peniscopia (Rombaldi *et al*, 2006). Estudos demonstram uma prevalência que varia de 26% (Teixeira *et al*, 1999) a 65,2% (Nielson *et al*, 2008). Esses estudos realizaram a detecção do HPV em homens assintomáticos e sem sinais clínicos para infecção pelo HPV e a técnica utilizada foi a PCR, concordando com nosso estudo. O local da região genital mais adequado para a detecção do HPV ainda é discutido. Weaver *et al* (2004) demonstrou uma prevalência de 35% e Kjaer *et al* (2005) demonstrou uma prevalência de 33,8 em homens. Em ambos os estudos, a glânde do pênis foi o local da região genital onde foi realizada a coleta do material biológico para a detecção do HPV. A técnica utilizada durante a coleta do material foi através de escovação na glânde do pênis, concordando com a técnica realizada em nosso estudo. Nosso estudo demonstrou uma prevalência de 31,6% da infecção pelo HPV em homens assintomáticos.

Estima-se que 20% da população adulta estejam infectadas pelo HPV e que anualmente surjam 500 mil novos casos de câncer cervical, 70% deles em países em desenvolvimento, além de inúmeros casos de carcinoma anal e carcinomas de pênis relacionados ao vírus em questão. Esses dados indicam a necessidade de reforçar a prevenção desses tumores e suas lesões precursoras, e as vacinas profiláticas contra o HPV oferecem essa oportunidade. Vacinas que imunizam contra os tipos virais 16 e 18, mais freqüentes nos carcinomas cervicais, e HPV 6 e 11, relacionados às verrugas anogenitais estão disponíveis no mercado. Tais vacinas são indicadas para mulheres de 11 a 25 anos de idade (Nadal & Nadal, 2008). Nos Estados Unidos, o intervalo de idade das mulheres incluídas no programa de vacinação é um pouco mais largo, sendo de 18 a 26 anos (Kim, 2010). As vacinas conferem imunidade superior à da naturalmente adquirida, embora o tempo de duração dessa imunidade não esteja ainda totalmente estabelecido. A vacinação não afasta a necessidade dos exames periódicos para rastreamento, mas a médio prazo certamente poderão ampliar o intervalo entre tais exames (Nadal & Nadal, 2008). A vacina quadrivalente foi desenvolvida e aprovada nos Estados Unidos no ano de 2006 e disponibilizada apenas para mulheres, com a finalidade de prevenir o câncer cervical e verrugas genitais. No ano de 2009 a vacina bivalente foi aprovada nos Estados Unidos e também disponível somente para mulheres. A vacina ainda não está disponibilizada para homens, mas estudos têm sido desenvolvidos com o

objetivo de justificar a inclusão de homens no programa de vacinação contra o HPV (Hernandez *et al*, 2010).

Determinar a prevalência da infecção pelo HPV em homens em cada população constitui uma etapa fundamental para a elaboração de estratégias de prevenção adequadas à realidade da nossa população nos serviços de saúde. Como contribuição individual, a detecção permite que o grupo de homens tenha conhecimento sobre a importância de ser o disseminador desse vírus que induz sérios agravos a saúde da mulher, já que nos homens a infecção pelo vírus é assintomática. Como contribuição coletiva, permite o planejamento para a introdução de estratégias de prevenção, como palestras educativas em Centros de Saúde e escolas de nível médio, distribuição de materiais educativos, orientação individual, orientação para o público masculino e orientação para o casal portador do HPV. O conhecimento sobre o HPV para profissionais de saúde não é suficiente, o conhecimento precisa ser fornecido para esses profissionais, e quanto à população o conhecimento é muito pouco esclarecido. Programas educativos são necessários a fim de conscientizar os profissionais de saúde sobre o risco da infecção pelo HPV e sobre as formas de prevenção desta infecção.

8 CONCLUSÕES

(1) A detecção do genoma do HPV nos adultos jovens, com idades entre 18 e 25 anos, residentes no Município de Leopoldo de Bulhões –GO, foi positiva em 18 dos 57 indivíduos estudados (31,6%).

(2) Associação estatisticamente significativa foi demonstrada entre a infecção pelo HPV e o estado civil solteiro dos indivíduos estudados e o relato de não ter parceira fixa.

(3) Não foram detectadas associações significativas entre a infecção pelo HPV e os demais aspectos investigados, como idade do início da atividade sexual, circuncisão, contato homossexual, uso de preservativo, presença de lesão no pênis, consulta médica de rotina e higienização após relação sexual.

(4) Nenhum sinal clínico foi detectado nos indivíduos estudados, sendo o grupo totalmente assintomático para a infecção pelo HPV.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGUILAR, L.; LAZCANO-PONCE, E.; VACCARELLA, S.; *et al.* Human papillomavirus in men: Comparison of different genital sites. *Sex Trasm Infect* 2006; 82: 31-33.
2. AUVERT, B.; IAMBKOU, JS.; CUTLER, E.; *et al.* Effect of male circumcision on the prevalence of high-risk human papillomavirus in young men : Results of randomized controlled trial conducted in orange farm, South Africa. *JID* 2009; 199:15-19.
3. BOSCH, F. X; LORINCZ, A.; MUNOZ, N.; MEIJER, C. J.; SHAH, K.V. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*; 55(4): 244-65; 2002.
4. CARVALHO, N.; KANNENBERG, A.; MUNARETTO,; *et al.* Associação entre HPV e câncer peniano: Revisão da literatura. *Jornal Brasileiro Doenças Sexualmente Transmissíveis* 2007; 19: 92-95.
5. CASTELLSAGUÉ, X.; BOSCH,X.; MUNOZ,N.; *et al.* Male circumcision, penile human papillomavirus infection, and cervical câncer in female partners 2002; 346: 1105-1112.
6. CONCHA, M. Diagnóstico y terapia del vírus papiloma humano. *Rev Chil Infect* 2007; 24: 209-214
7. COUTLÉE, F.; ROULEAU, D.; PETIGNAT, P.; *et al.* Enhanced detection and typing og human papillomavirus (HPV) DNA in anogenital samples with PGMY primers and the linear array HPV genotyping test. *Journal of clinical microbiology* 2006; 44: 1998-2006.
8. COLÓN-LÓPEZ, V.; ORTIZ, AP.; PALEFSKY, J.; Burden of Human Papillomavirus Infection and Related Comorbidities in Men: Implications for

- Research, Disease Prevention and Health Promotion Among Hispanic Men. *PR Health Sci J*. 2010; 29(3):232-40
9. DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol*. 2005; 32 (suppl 1): S7 15.
 10. DOORN, L.J.; QUINT, W.; KLETER, B.; *et al.* Genotyping of human papillomavirus in liquid cytology cervical specimens by the PGMY line blot assay and SPF10 line probe assay. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; 40: 979-983.
 11. DUNNE, F.; NIELSON, M.; STONE, M.; *et al.* Prevalence of HPV infection among men : A systematic review of the literature. *The Journal of infectious disease* 2006; 194: 1044-57.
 12. DARON, F.; WALLER, J.; MILLER, J.; *et al.* Variables Associated with Human Papillomavirus (HPV) Vaccine Acceptance by Men. *JABFM* 2009; 22: 34-41.
 13. ESQUENAZI, D.; BUSSOLOTI, I.; CARVALHO, G.; *et al.* The Frequency of Human Papillomavirus Findings in Normal Oral Mucosa of Healthy People by PCR. *BRZ J Otorhinolaryngol* 2010 76: 78-84.
 14. FAVORITO L.; NARDI, A.; RONALSA, M.; Epidemiology study on penile câncer in Brazil. *International Braz J Urol* 2008; 34: 587-593.
 15. FLORES, R.; BEIBEI, L.; NIELSON, C.; *et al.* Correlates of human papillomavirus viral load with infection site in asymptomatic men. *Cancer Epidemiol Biomarkers* 2008; 17: 3573-76.
 16. FORESTA, C.; PIZZOL, D.; MORETTI, A.; *et al.* Clinical and prognostic significance of human papillomavirus DNA in the sperm or exfoliated cells of infertile patients and subjects with risk factors. *Fertil Steril* 2009; 94: 1723-7.

17. FRANCO, E. L. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis* 1999; 180, n. 5, p. 1415-23.
18. FRANCO, E.L. Chapter 13: Primary screening of cervical cancer with human papillomavirus tests. *J Natl Cancer Inst Monographs* 2003; 31: 89-96.
19. GARCIA, G.; MAMPASO, E.; SOMESO, S.; *et al.* Infección por papillomavirus en el hombre. Estado actual. *Actas Urol. Esp.* 2005; 29: 365-372.
20. GARNETT & HUGHES. Modulation of apoptosis by human papillomavirus (HPV). *Arch Virol* 2006; 151: 2321-2335.
21. GIOVANNELLI, L.; MIGLIORE, M.; CAPRA, G.; *et al.* Penile, urethral, and seminal sampling for diagnosis of human papillomavirus infection in men. *Journal of clinical microbiology* 2007; 45: 248-251.
- 22.A- GIULIANO, A.; LAZCANO, E.; VILLA, L.; *et al.* Circumcision and sexual behavior: Factors independently associated with human papillomavirus detection among men in the HIM study. *International journal cancer* 2008; 124: 1251-57.
- 23.B- GIULIANO, A.; LAZCANO-PONCE, E.; VILLA, L.; *et al.* The human papillomavirus infection in men study: human papillomavirus prevalence and type distribution among men residing in Brazil, Mexico, and United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers* 2008; 17:2036-43.
24. GROV, C.; PARSONS, J.; BIMBI, D.; The association between penis size and sexual health among men who have sex with men. *Arch Sex Behav* 2010; 39: 788-797.
25. GUGLIELMO, A.; RODRIGUEZ, Z. Métodos utilizados em La identificación Del virus de papiloma humano. *An. Sist. Sanit. Navar* 2010; 33: 71-77.

26. GRAY, R.; SERWADDA, D.; KONG, X. Male Circumcision Decreases Acquisition and Increases Clearance of High-Risk Human Papillomavirus in HIV-Negative Men: A Randomized Trial in Rakai, Uganda. *JID* 2010; 201: 1455 -1462.
27. GOLDSTONE, S.; PALEFSKY, J.; GIULIANO, A. Prevalence of and Risk Factors for Human Papillomavirus (HPV) Infection Among HIV-Seronegative Men Who Have Sex With Men. *JID* 2011; 203: 67-74.
- 28.A- HERNANDEZ, B.; WILKENS, L.; ZHU, X.; *et al.* Transmission of human papillomavirus in heterosexual couples. *Emerging Infectious Disease* 2008; 14: 888-894.
- 29.B- HERNANDEZ, B.; WILKENS, L.; ZHU, X.; *et al.* Circumcision and human papillomavirus infection in men: A site-specific comparison. *The Journal of Infectious Diseases*. 2008; 197: 787-794.
30. HERNANDEZ, B.; WILKENS, L.; THOMPSON, P.; *et al.* Acceptability of prophylactic human papillomavirus vaccination among adult men. *Hum vaccin.* 2010; 6: 467-475.
31. HOORY, T.; MONIE, A.; GRAVITT, P. Molecular epidemiology of human papillomavirus. *J Formos Med Assoc* 2008; 107: 198-217.
32. HOWLEY, P. M.; FIELDS, B.; KNIPE, D. M. Papillomaviridae and their replication. *Fundamental Virology*. 2 ed. New York: Ravar Press 1996; p. 947-78.
33. HUBBARD, R. Human papillomavirus testing methods. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127: 940-945.
34. IARC-International Agency for Research on Cancer. Human papillomaviruses, v. 64. Geneva: World Health Organization, 1995.

35. IFTNER, T., VILLA, L.L., Chapter 12: Human papillomavirus technologies. *J Natl Canc Inst Monographs* 2003 ; 31 : 80-88.
36. KIM, J., J. Cost effectiveness analysis of including boys in a human papillomavirus vaccination programme in the United States. *BMJ* 2010; 1-10.
37. KJAER, S.; MUNK, C.; WINTHER, J.; *et al.* Acquisition and persistence of human papillomavirus infection in younger men: A prospective follow-up study among Danish soldiers. *Cancer Epidemiol Biomarkers* 2005; 14: 1528-33.
38. LAURO, C.; AMMATURO, F. P.; QUIRINO, L. *et al.* Evaluation of partners of women with HPV infection. *Minerva Ginecol.* 2000; 52: 503-7.
39. LO, K.W., WONG, Y.F., CHAN, M.K.; *et al.* Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a multicenter study in China. *Int J Cancer* 2002; 100: 327-31
40. MEIJER, C. J. L. M.; SNIJDERS, P. J. F.; BRULE, A. Screening for cervical cancer: should we test for infection with high-risk HPV? *CMAJ.* 2000; 163: 535-8.
41. MOYA, A.; GÓMEZ, E.; ARAGÓN, V.; *et al.* Detección y tipificación mediante biología molecular del virus del papiloma humano en muestras genitales. *Rev. Esp. Quimioterap.* 2006; 19: 161-166.
42. MUNOZ, N.; MENDEZ, F.; POSSO, H. *et al.* Incidence, duration and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results. *J Infect Dis* 2004; 190: 2077-87.
43. NIELSON, M.; FLORES, R.; HARRIS, B. *et al.* Human papillomavirus prevalence and type distribution in male anogenital sites and semen. *Cancer Epidemiol Biomarkers* 2007; 16 (6): 1107-14.

44. NADAL & NADAL. Indicações da vacina contra o papilomavirus humano. *Revista Brasileira de Coloproctologia* 2008; 28 (1): 124-126.
45. NIELSON, M.; HARRIS, B.; FLORES, R.; *et al.* Multiple – type human papillomavirus infection in male anogenital sites: prevalence and associated factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers* 2009; 18 (4): 1077-83.
46. NYITRAY, G.; KIM, J.; HSU, C.; *et al.* Test-retest reliability of a sexual behavior interview for men residing in Brazil, Mexico and United States. *Am J Epidemiol* 2009; 170 (8): 965-974.
47. NYITRAY, G.; SILVA, R.; BAGGIO, M.; *et al.* Age-Specific Prevalence of Risk Factors for Anal Human Papillomavirus (HPV) among Men Who Have Sex with Women and Men Who Have Sex with Men: The HPV in Men (HIM) Study. *JID* 2011; 203: 49-57.
48. PALEFSKY, J. M.; HOLLY, E. A.; GONZALES, J. *et al.* Detection of human papillomavirus DNA in anal intraepithelial neoplasia and anal cancer. *Cancer Res.* 1991; 51:1014-9.
49. PALEFSKY, JOEL M. Human papillomavirus-related disease in men: Not just a women's issue. *Journal Adolescent Health* 2010; 46: S12-S19.
50. PARTRIDGE, J.; HUGHES, J.; FENG, Q.; *et al.* Genital human papillomavirus infection in men: Incidence and risk factors in a cohort of university students. *The Journal of Infectious Diseases* 2007; 196: 1128-36.
51. QUEIROZ, D.; PESSOA, S.; SOUSA, R.. Infecção pelo papilomavírus humano (HPV) incertezas e desafios. *ACTA Paul Enferm.* 2005; 18:190-196.
52. ROMBALDI, R.; SERAFINI, E.; VILLA, L.; *et al.* Infection with human papillomaviruses of sexual partners of women having cervical intraepithelial neoplasia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2006; 39: 177-187.

53. ROCHA, M. G. L.; FARIA, F. L.; SOUZA, M. C. M.; FERNANDES, P. A. Detection of human papillomavirus infection in penile samples through liquid-based cytology and polymerase chain reaction. *Cancer Cytopathology* 2008; 114: 489 - 493.
- 54.A- REIS, A. A. S.; MONTEIRO, C. D. ; PAULA. Papilomavírus humano e saúde pública: prevenção ao carcinoma de cérvix uterina. *Ciência & Saúde Coletiva* 2010; 15: 1055 -1060.
- 55.B- REIS, A. A. S.; PAULA, L. B. ; PAULA, A. A. P;. Aspectos clínico - epidemiológicos associados ao câncer de pênis. *Ciência e Saúde Coletiva* 2010; 15: 1105 – 1111.
56. SANDY & PENELOPE. Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. *Arch Virol* 2008; 153: 307-408.
57. SCHEFFNER, M.; WERNESS, B. A.; HUIBREGTSE, J. M. *et al.* The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*. 1993; 75:495-505.
58. SCHMITT, M.; DONDOG, B.; WATERBOER, T.; *et al.* Homogeneous amplification of genital human alpha papillomaviruses by PCR using novel broad-spectrum GP5+ and GP6+ primers. *Journal of clinical microbiology* 2008; 46:1050-1059.
59. SHIN, HR.; FRANCESCHI, S.; VACCARELLA, S.; *et al.* Prevalence and determinants of genital infection with papillomavirus in female and male university students in Busan, South Korea. *The Journal of Infectious Diseases* 2004; 190: 468-76.
60. SMITH, J.; MOSES, S.; HUDGENS, M.; *et al.* Increased risk of HIV acquisition Kenyan men with human papillomavirus infection. *The Journal of Infectious Diseases* 2007; 201: 1677-1685.

61. SMITH, J.; HUDGENS, M.; AGOT, K.; *et al.* Human papillomavirus detection by penile site in young men from Kenya. *Sex. Transm. Dis.* 2008; 34: 928-934.
62. SMITH, J.; BACKERS, D.; HUDGENS, M.; *et al.* Prevalence and Risk Factors of Human Papillomavirus Infection by penile Site in Circumcised Kenyan Men. *Int J Cancer.* 2010; 126(2): 572-577.
63. SOUTO, R.; FALHARI, J.; CRUZ, A. O papilomavírus humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2005; 51: 155-160
64. SVARE, E.; KJAER, S.; WORM, A.; *et al.* Risk factors for genital HPV DNA in men resemble those found in women: a study of male attendees at a Danish STD clinic. *Sex transm Infect* 2002; 78:215-218.
65. TEIXEIRA, J.; SANTOS, C.; DERCHAIN, F.; *et al.* Lesões induzidas por papilomavírus humano em parceiros de mulheres com neoplasia intra-epitelial do trato genital inferior. *RBGO* 1999; 21: 431-437.
66. TEIXEIRA, C.; DERCHAIN, S.; TEIXEIRA, L.; *et al.* Avaliação do parceiro sexual e risco de recidivas em mulheres tratadas por lesões genitais induzidas por papilomavírus humano (HPV). *RBO* 2002; 24: 315-320.
67. THOMAS, D.; RAY, R.; KUYPERS, J.; *et al.* Human papillomaviruses and cervical cancer in Bangkok. III. The role of husbands and commercial sex workers. *American Journal of Epidemiology.* 2001; 153: 740-748.
68. WATSON, R. Human papillomavirus: Confronting the Epidemic- A Urologist's perspective. *Rev. Urol* 2005; 7: 135-144.
69. WEAVER, BA. Evaluation of Genital Sites and Sampling Techniques For Detection Of Human Papillomavirus DNA in Men. *The Journal of Infectious Diseases* 2004 Feb; 189 (4): 677-85.

70. WINER, L.; FENG, Q.; HUGHES, P.; *et al.* Risk of female human papillomavirus acquisition associated with first male sex partner. *The Journal of Infectious Diseases* 2008; 197 (2): 279-282.
71. WAWER, M.; TOBIAN, A.; KIGOZI, G.; *et al.* Effect of circumcision of HIV-negative men on transmission of human papillomavirus to HIV-negative women: a randomised trial in Rakai, Uganda. *Lancet* 2011; 377: 209-18
72. YLITALI, N.; JOSEFSSON, A.; MELBYE, M.; A prospective study showing long-term infection with human papillomavirus 16 before the development of cervical carcinoma *in situ*. *Cancer Res.* 2000; 60: 6027- 6032.
73. ZARAVINOS, A.; MAMMAS, I.; SOURVINOS, G.; *et al.* Molecular detection methods of human papillomavirus (HPV). *The international journal of biological markers* 2009; 24: 215-222.
74. ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 342-50.
75. ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute*, 2000; v. 92. n. 9, May 3.
76. ZUR HAUSEN, H. *Infections Causing Human Câncer*, Wiley-VCH, Weinheim-New York, 2006; pp. 1-517.

ANEXOS

ANEXO I - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Departamento de Biologia – Mestrado em Genética**

Projeto: DETECÇÃO DE PAPILOMAVÍRUS
HUMANO (HPV) EM ADULTOS JOVENS COM IDADES ENTRE 18 A
25 ANOS DO MUNICÍPIO DE LEOPOLDO DE BULHÕES-GO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Você está sendo convidado para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado de forma alguma. Em caso de dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com o pesquisador responsável: Gerusa Cristhiny da Paixão Roncato no telefone : 96535399. Em caso de dúvida sobre os seus direitos como participantes nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, no telefone 3243-7050

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:**Título do Projeto: Detecção****Pesquisador Responsável: Gerusa Cristhiny da Paixão Roncato****Orientadora: Prof^a Dr^a Vera Aparecida Saddi****Pesquisadores colaboradores: Raimundo Nonato Rodrigues Diniz Filho (médico).****Adriano Augusto Peclat de Paula (médico).****Silvia Helena Rabelo (Farmacêutica).****Rosane Ribeiro F. Alves (médica).****Descrição da pesquisa, objetivos, procedimentos, forma de acompanhamento:**

O papilomavírus humano (HPV) é um vírus DNA transmitido sexualmente, sendo aceito como o agente causador do câncer de colo uterino (Palefsky, *et al.*, 2003) e também relacionado a uma parcela significativa dos cânceres de pênis. As infecções por HPV estão associadas com lesões da pele e da mucosa. Mais de 100 tipos diferentes de HPVs já foram identificados, dos quais cerca de 40 tipos foram detectados em cânceres de colo uterino e em suas lesões precursoras, as denominadas lesões intraepiteliais escamosas (SIL) (Levi, *et al.* 2002), comumente classificadas como lesões de baixo grau (LSIL) e lesões de alto grau (HSIL).

O presente estudo visa detectar a presença e o tipo de HPV encontrado em adultos jovens do sexo masculino, com idades entre 18 e 25 anos, com vida sexual ativa, residentes na cidade de Leopoldo de Bulhões e áreas rurais vizinhas. Visa ainda avaliar as possíveis associações existentes entre a infecção pelo HPV, no grupo de jovens analisados, e seus hábitos sexuais (número de parceiras, início da atividade sexual, uso de preservativos, hábitos sexuais, etc.).

Objetivo: Avaliar a prevalência das infecções pelo HPV em um grupo de adultos jovens do sexo masculino, sexualmente ativos, atendidos no Centro de Saúde José Francisco Vargas, no município de Leopoldo de Bulhões e áreas rurais vizinhas.

Metodologia: Após concordarem em participar do projeto, os rapazes deverão assinar um consentimento escrito (Anexo 1). Só então, serão encaminhados e atendidos no ambulatório médico do Centro de Saúde José Francisco Vargas do município de Leopoldo de Bulhões, onde serão submetidos ao exame clínico cuidadoso de inspeção dos órgãos genitais e região anal, e coleta de material biológico da glândula do pênis. Os homens que atenderem ao convite, preencherem os critérios de inclusão e assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1) serão incluídos no estudo. A coleta de material da glândula do pênis será feita por um médico, colaborador do projeto, com uma escova de *cytobrush* umedecida com PBS (tampão fosfato). A esfoliação (escovação) será feita por meio da escova, com movimentos rotatórios. Esse procedimento não oferece nenhum risco de ocorrer lesão que provoque sangramento e/ou cicatriz, a não ser que você já tenha uma lesão no órgão genital. Você pode sentir um desconforto durante a coleta, mas nenhuma dor exagerada, nenhuma lesão. Pacientes que apresentarem lesões visíveis durante o exame de inspeção, poderão ser atendidos no consultório médico do Centro de Saúde José Francisco Vargas, com seguimento apropriado e/ou tratamento.

O estudo não oferece nenhuma vantagem direta para você, a não ser de contribuir sobre o conhecimento de uma infecção que pode se transformar em um câncer. Você tem o direito de pleitear indenizações em caso de danos comprovadamente decorrentes de sua participação nesta pesquisa. Por sua participação na pesquisa, você não receberá nenhuma gratificação financeira. Sua participação no projeto deve durar cerca de 60 minutos, constando de resposta a um questionário e do exame do pênis com coleta do material de escovado.

Os dados pessoais de cada paciente deverão ser mantidos sob absoluto sigilo. Os resultados obtidos serão utilizados somente para fins científicos, podendo ser publicados em revistas e jornais especializados.

O projeto tem duração de doze meses e deverá ser concluído até o mês de Março de 2009.

O paciente tem garantia expressa de liberdade para retirar o consentimento escrito e se desligar da pesquisa em qualquer fase que julgar necessária.

Gerusa Cristhiny da Paixão Roncato

CPF: 907.408.401-00

Telefone: (62) 96535399

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____, RG/ CPF/ nº. de prontuário/ nº. de matrícula _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo _____, como sujeito. Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador _____ sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento.

Local e data _____

Nome e Assinatura do sujeito ou responsável _____

Assinatura Dactiloscópica:

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar

Testemunha (não ligada à equipe de pesquisadores):

Nome: _____

Assinatura: _____

ANEXO II - Questionário

Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Departamento de Biologia – Mestrado em Genética

Projeto: Detecção de Papilomavírus Humano (HPV) em Adultos Jovens com Idades entre 18 a 25 anos do Município de Leopoldo de Bulhões- GO

Nome: _____ Data de nascimento: _____

Endereço: _____ Telefone: _____

Naturalidade: _____ Procedência: _____

Estado civil: () casado () solteiro

Profissão: _____ Escolaridade: () 1º grau () 2º grau () Superior completo () Superior incompleto

Raça/cor: () Branco () Pardo () Preto () Mestiço () Indígena

Idade da primeira relação sexual: _____ N° de parceiras: _____

História de prostituição: () sim () não

Contato homossexual: () sim () não

Tabagista: () sim () não

Etilismo: () sim () não

Uso de preservativo: () frequentemente () raramente () ocasionalmente ()

História de câncer na família: () sim () não

Presença de algum tipo de ferida no pênis () sim () não

Visita médica regularmente: () sim () não

Dor ou desconforto ao urinar: () frequentemente () às vezes () Não

Prurido após relação sexual: () sim () não

Observa vermelhidão no órgão genital: () sim () não

Realiza higienização após relação sexual: () sim () não

Uso de algum medicamento: () sim () não Qual (is)? _____

Possui parceira fixa: () sim () não

Data da coleta do material biológico: _____

ANEXO III - Protocolo de PCR para amplificação de um fragmento do gene GAPDH

Lise celular

Cerca de 100 µl de solução de lise celular foram adicionados a cada microtubo contendo 100 µl da amostra e o tubo foi homogeneizado com uma pipeta por 30 a 50 vezes. O lisado celular foi incubado a 65°C por 15 minutos, sendo posteriormente adicionados 5 µl da solução de Proteinase K (20mg/U). Os tubos foram homogeneizados 25 vezes por inversão e incubados a 55°C por uma hora, com inversões periódicas. Posteriormente, foi observado se houve lise celular em cada um dos tubos.

Tratamento com RNase

Confirmada a lise celular, foram adicionados 0,5 µl da solução de RNase ao lisado, e este foi homogeneizado 25 vezes por inversão e incubado a 37°C por 15 minutos.

Precipitação de proteínas

Cerca de 33 µl da solução de precipitação de proteínas foram adicionados ao lisado, e os tubos foram vigorosamente agitados no vórtex em alta velocidade por 20 segundos. A amostra foi então colocada no freezer por 15 minutos. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 3 minutos. As proteínas precipitadas formaram um *pellet*. Caso o *pellet* não fosse visível, o tubo era agitado novamente no vórtex em alta velocidade por 20 segundos e colocado novamente no freezer seguindo os passos citados anteriormente.

Precipitação do DNA

O sobrenadante contendo o DNA (deixar o *pellet* no tubo) foi transferido para outro microtubo de 1,5 ml, previamente identificado, no qual, adicionou-se 100 µl de

isopropanol 100% gelado. Os tubos foram gentilmente homogeneizados 50 vezes por inversão e centrifugados a 14.000 rpm por 5 minutos. Após a precipitação, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram invertidos sobre papel absorvente. Os *pellets* contendo o DNA foram lavados com 100 μ l de etanol 70%, e os tubos homogeneizados 25 vezes por inversão. Os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi cuidadosamente descartado. Os tubos foram invertidos sobre um papel absorvente e o *pellet* correspondente a cada amostra foi seco à temperatura ambiente.

Hidratação do DNA

O *pellet* correspondente a cada amostra foi ressuspendido em 20 μ l da solução de hidratação e deixado *overnight* à temperatura ambiente. O DNA resultante foi armazenado em freezer -20°C até a realização dos ensaios de PCR.

Protocolo para PCR de GAPDH

Reagentes	Concentração Inicial	Volume para 1 reação
Tampão (10x)	10x	2,5 μ l
MgCl ₂	50mM	1,0 μ l
DNTPs	2mM	2,5 μ l
P1	2,5 μ M	0,5 μ l
P2	2,5 μ M	0,5 μ l
DNA	10 ng/ μ l	2,0 μ l
Enzima Taq	5U/ μ l	1,0 μ l
H ₂ O	ultra pura	15,0 μ l
Volume Total		25 μl

Anexo IV - Gel de Poliacrilamida a 8% e coloração do gel por nitrato de prata

Gel de Poliacrilamida a 8%

Todos os produtos de PCR foram visualizados em gel de poliacrilamida a 8% e posteriormente corados com Nitrato de Prata. O gel de poliacrilamida 8% foi preparado com 34 ml de água destilada e deionizada, 10 ml de solução de acrilamida 40%, 5 ml de TBE (tampão Tris- Borato-EDTA) 10 X concentrado. Para a polimerização foi adicionado 500 µl de persulfato de amônio a 10% e 50 µl de TEMED (tetrametiletilenodiamina). As amostras e controles negativo e positivo foram preparadas com 10 µl do produto de amplificação, acrescido de 3 µl do tampão de corrida. Como marcador de peso molecular foi utilizado o LADDER de 50 pb. O marcador de peso molecular foi preparado com 5 µl do LADDER, acrescido de 3 µl de água milliQ e 3 µl do tampão de amostra. Após a polimerização foram aplicados em gel cerca de 10 µl de todas as amostras. Em seguida o gel foi submetido à eletroforese, na fonte de tensão, com voltagem constante de 150 V e 150 A por 1 hora e 15 minutos, utilizando-se como tampão de corrida TBE 1X concentrado, pH 8,3.

Coloração do gel por nitrato de prata AgNO₃

Utilizamos o protocolo de coloração rápida pela prata. Solução de Fixação: 50 mL de álcool etílico P.A., 2 mL de ácido acético, água deionizada q.s.p. 300 mL. Solução de coloração: Nitrato de Prata 15%. Solução de revelação: 15 mL de hidróxido de sódio 30%, 2 mL de formaldeído 37% e água deionizada q.s. p. 200mL. O gel era depositado em um recipiente de plástico limpo, no qual eram adicionados 150mL da solução de fixação, 2 mL de solução de coloração, agitando por 5 minutos. A Solução de Fixação era desprezada e o gel lavado com água deionizada, por 15 segundos (repetir este procedimento por duas vezes); A solução de revelação era adicionada juntamente com 2 mL de formaldeído a 37% (no momento do uso), homogeneizando e a mistura agitada lentamente até a revelação das bandas.

ANEXO V - Protocolo CEPACCG Nº 015/08**PROTOCOLO CEPACCG Nº 015/08****Goiânia, 05/06/2008**

INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL (IES): Mestranda – Gersa Cristhiny da Paixão Roncato
Orientadora: Profª. Drª. Vera Aparecida Saddi

TÍTULO: Detecção e Genotipagem de Papilomavirus Humano (HPV) em Região Genital de Adultos Jovens do Sexo Masculino de 18 a 25 anos do Município e Áreas Rurais de Leopoldo de Bulhões-GO.

Área Temática: Grupo III

Área de Conhecimento: Ciências Biológicas-Genética Humana

Local de Realização: Núcleo de Pesquisas Replicon/Depto. De Biologia

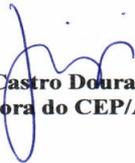
Senhor(a) Pesquisador(a),

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa da Associação de Combate ao Câncer em Goiás, após o análise das modificações apresentadas em resposta às pendências notificadas, aprovou o projeto de Pesquisa acima referido, e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

Não há necessidade de aguardar o parecer da CONEP- Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa.

O pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEPACCG, relatórios trimestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões).

O não encaminhamento de relatórios trimestrais implicará na suspensão imediata da pesquisa e comunicado à CONEP.


Dra. Juliana Castro Dourado Pinezi
Coordenadora do CEP/ACCG

Rua 239 nº206 Setor Universitário · Goiânia · GO
Fone: 62 3243-7000 · Fax: 62 3218-5513 · CEP 74605-070
www.accg.org.br