



Universidade Federal do Maranhão
Pró- Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto e da
Criança Mestrado Acadêmico

SULAYNE JANAYNA ARAUJO GUIMARÃES

PRESENÇA DO PAPILOMA VIRUS HUMANO EM CARCINOMA
ANAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE PACIENTES ATENDIDOS
EM SÃO LUIS, MARANHÃO

SÃO LUÍS – MA
2014

SULAYNE JANAYNA ARAUJO GUIMARÃES

PRESENÇA DO PAPILOMA VIRUS HUMANO EM CARCINOMA ANAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE PACIENTES ATENDIDOS EM SÃO LUIS, MARANHÃO

Defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto e da Criança da Universidade Federal do Maranhão, como pré-requisito para obtenção do Título de Mestre em Saúde do Adulto e da Criança.

Área de Concentração/Linha de Pesquisa: Saúde da Mulher/ HPV e Câncer.

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Maria Oliveira Brito.

Co-orientadora: Profa. Dra. Flávia Castello Branco Vidal

Coordenação do Programa: Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão do Nascimento

SÃO LUÍS – MA
2014

SULAYNE JANAYNA ARAUJO GUIMARÃES

PRESENÇA DO PAPILOMA VIRUS HUMANO EM CARCINOMA ANAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE PACIENTES ATENDIDOS EM SÃO LUIS, MARANHÃO

Defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto e da Criança da Universidade Federal do Maranhão, como pré-requisito para obtenção do Título de Mestre em Saúde do Adulto e da Criança.

A Banca Examinadora da Defesa de Mestrado apresentada em sessão pública considerou a candidata aprovada em: ____/____/____.

Profa. Dra. Luciane Maria Oliveira Brito -(Orientadora)
Doutorado em Medicina (Mastologia) - UFRJ
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Gyl Eanes Barros Silva-(1º Examinador)
Doutorado em Patologia - USP
Universidade de São Paulo

Prof. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento- (2º Examinador)
Doutorado em Medicina - UNIFESP
(Universidade Federal do Maranhão)

Prof. Dra. Maria Bethânia da Costa Chein- (3º Examinador)
Doutorado em Medicina (Ginecologia) - UNIFESP
Universidade Federal do Maranhão

Guimarães, Sulayne Janayna Araujo.

Presença do papiloma vírus humano em carcinoma anal de células escamosas de pacientes atendidos em São Luís – Maranhão / Sulayne Janayna Araujo Guimarães. – São Luís, 2014.

142 f.

Impresso por computador (fotocópia).

Orientadora: Luciane Maria Oliveira Brito.

Co-orientadora: Flávia Castello Branco Vidal.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto e da Criança, 2014.

1. Neoplasia anal. 2. Carcinoma de células escamosas. 3. Vírus do papiloma humano. I. Título.

CDU 616-006

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha Avó, minha Mãe e minha Madrinha pelo apoio e força na minha criação.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a DEUS por ter-me capacitado à realização deste trabalho, sustentando-me em todos os momentos.

A Universidade Federal do Maranhão, ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto e da Criança (PPGSAC), ao corpo docente e administração que oportunizaram esse crescimento profissional.

À minha orientadora Profa. Dra. Luciane Maria Oliveira Brito pela vocação em formar pessoas, por destinar parte do seu precioso tempo em ensinamentos, correções e orientações na escrita dessa dissertação.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Flávia Castello Branco Vidal Cabral pelo incentivo, sua ajuda e orientação na elaboração desta dissertação de mestrado.

À Profa. Dra. Luisa Lina Villa do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer da FAPESP pelo apoio e parceria formada nessa pesquisa.

Ao Prof. Dr. George Castro Figueira de Mello pela sensibilidade e entendimento das minhas limitações no conhecimento clínico e na execução desta dissertação de mestrado.

A Profa. Dra. Sally Cristina Mountinho Monteiro pelo incentivo e apoio na execução da pesquisa.

A Profa. Dra. Maria Bethânia da Costa Chein pela segurança que me passou ao longo deste imenso aprendizado.

Ao Dr. Alexandre Alves Lourenço pelo apoio na execução da dissertação.

Ao Prof. Dr. Gyl Eanes Barros Silva pelo apoio na execução da dissertação e pela motivação para novas pesquisas.

Ao Doutorando Fábio França da Silva pela amizade, confiança e pelo grande apoio na execução da pesquisa.

À MSc. Isaura Danielli Sousa por me permitir acompanhar o seu trabalho de mestrado e suas orientações na execução do meu.

À Profa. Dra. Flávia Furtado pela ajuda e apoio na análise estatística e discussão dos dados deste trabalho.

Aos meus familiares por todo apoio nessa caminhada, suporte na educação e por entender a necessidade da dedicação exclusiva.

Aos colegas de laboratório pelo incentivo, apoio e amizade.

Aos graduandos e/ou bolsistas pelo suporte técnico prestado, em especial a Jéssica Maran Cavalcante, Laryssa Ferreira Guimarães, João Ricardo Jansen Moreira e Ítalo Ramon Araujo Amorim.

Ao Instituto de Oncologia Aldenora Bello (IMOAB) e ao Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (HUUFMA) por permitir a realização da pesquisa.

Aos funcionários do Serviço de Patologia do IMOAB e do HUUFMA, que foram incansáveis na busca dos blocos histopatológicos e nas informações da pesquisa, em especial ao Sr. Flávio Henrique Gomes Sousa do HUUFMA, e do IMOAB nas pessoas do Sr. Naison Oliveira Pereira e Sra. Ivania Rocha Freitas.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Maranhão pelo apoio e fomento para desenvolver as pesquisas.

À Sra. Lúcia de Fátima de Jesus Lisboa e Jucileide Mota Costa, funcionárias do BioBanco de Tumores do Maranhão, pelo cafezinho que me espertava a cada manhã, além das palavras de apoio.

Aos amigos de mestrado pelo momento de conhecimento e de alegria compartilhados.

Aos meus Bioamigos pelo apoio constante, em especial Maxwelllem Ferreira e Nadja Gaido.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
2.1	Papilomavírus Humano (HPV).....	20
2.2	Organização genômica.....	21
2.3	Classificação do HPV.....	22
2.4	Anexação do DNA viral a célula hospedeira.....	23
2.5	Carcinogênese induzida pelo HPV.....	26
2.6	Aspectos gerais do carcinoma anal.....	27
2.7	HPV e Carcinoma de Células Escamosas Anal.....	34
3	OBJETIVOS.....	39
3.1	Geral.....	39
3.2	Específicos.....	39
4	METODOLOGIA.....	40
4.1	Tipo de estudo.....	40
4.2	Período e Local do Estudo.....	40
4.3	Obtenção dos dados dos pacientes e das amostras biológicas.....	40
4.3.1	Critérios de inclusão.....	42
4.3.2	Critérios de exclusão.....	43
4.4	Fluxogramas das amostras.....	43
4.4.1	Instituto Maranhense de Oncologia AldenoraBello	43
4.4.2	Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão.....	45
4.5	Definição das Variáveis.....	47
4.6	Obtenção de Tecidos fixados em formalina e emblocados em parafina.....	47
4.7	Desparafinização.....	48
4.8	Extração de DNA genômico de tecido parafinado.....	48

4.9	Quantificação de DNA.....	49
4.10	Detecção do gene da β -globina.....	49
4.11	Genotipagem por Hibridização reversa.....	50
4.11.1	Amplificação do DNA extraído.....	50
4.11.2	Hibridização na membrana de nitrocelulose e revelação da cor.....	51
4.11.3	Interpretação do sinal padrão visual.....	52
4.12	Aspectos éticos	53
4.13	Análise estatística.....	53
5	RESULTADOS.....	55
6	REFERÊNCIAS.....	67
7	ANEXOS.....	81
	Anexo I – Ficha Padronizada para Coleta de Dados.....	81
	Anexo II – Aprovação no Comitê (COMIC).....	82
	Anexo III – Aprovação da CONEP.....	84
	Anexo IV – Roteiro de Apresentação e Redação da Dissertação PPGSAC.....	88
8	ARTIGO CIENTÍFICO.....	89
8.1	Nome do Periódico com sua classificação no WEBQUALIS da CAPES (A1,A2, B1, B2, B3) na area de avaliação Medicina II.....	89
8.2	Normas Editoriais/Normas para os autores.....	89
8.3	Artigo propriamente dito.....	104

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Organização do DNA circular do HPV.....	22
Figura 2	Dinâmica de ligação e envolvimento do HPV 16 na superfície da célula.....	25
Figura 3	Infecção pelo HPV.....	26
Figura 4	Anatomia do ânus.....	30
Figura 5	Lâmina corada com Hematoxilina Eosina (HE) 400x. NIA Extraído de MAIA, 2013.....	36
Figura 6	Lâmina corada com Hematoxilina Eosina (HE) 400x. NIA II Extraído de MAIA, 2013.....	37
Figura 7	Esquema de triagem para inclusão de pacientes diagnosticados com lesão intraepitelial anal ou carcinoma de células escamosas anal no IMOAB e no HUUFMA entre 2001a 2011..	42
Figura 8	Fluxograma das amostras do IMOAB entre os anos de 2001 a 2011.....	44
Figura 9	Fluxograma das amostras do HUUFMA entre os anos de 2001 a 2011.....	46
Figura 10	A- Corte de amostras em micrótomo. B- Armazenamento no tubo estéril das amostras cortadas pelo micrótomo.....	47
Figura 11	Tiras com sondas imobilizadas do Kit iNNo-LiPA™HPV.....	53

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Número de casos de pacientes do IMOAB e HUUFMA incluídos na pesquisa ao longo dos anos de 2001-2011 em São Luís, Maranhão – Brasil.....	55
Gráfico 2	Frequência de pacientes diagnosticados com Carcinoma de células escamosas anal por faixa etária, São Luís, MA.....	58
Gráfico 3	Prevalência do HPV 16 e do HPV Oncogênico não 16 nas amostras de carcinoma anal de células escamosas coletadas nos serviços de patologia do HUUFMA e do IMOAB em São Luís – janeiro de 2001 a dezembro de 2011.....	63
Gráfico 4	Tipos de HPV distribuídos por infecção simples e múltipla nas amostras de carcinomas anal dos pacientes atendidos entre os anos de 2001 a 2011 em São Luís, MA – Brasil.....	64
Gráfico 5	Distribuição da infecção pelo HPV segundo o sexo, nas amostras de carcinoma de células escamosas, em São Luís, MA, Brasil.....	66

LISTA DE QUADROS

Quadro 01.	Critérios para classificação de estadiamento clínico proposto pelo <i>American Jount of Committee on Cancer- AJCC/TNM</i> para tumores na região anal (2002).....	55
Quadro 02.	Agrupamento em estádios para Câncer na região anal.....	58
Quadro 03.	Descrição dos programas de amplificação do DNA do HPV e do gene da β -globina.....	63

LISTA DE TABELAS

- Tabela 01** - Classificação dos tipos de HPV quanto ao grupo de risco oncogênico..... 23
- Tabela 02** - Tipos de Câncer anal segundo a atual classificação da AJCC..... 31
- Tabela 03** - Prevalência (%) do HPV e dos tipos HPV 16 e 18 nos diferentes tipos de carcinoma no Brasil e Mundo..... 33
- Tabela 04** - Procedência dos pacientes pesquisados no HUUFMA e no IMOAB, São Luís, MA - Brasil..... 56
- Tabela 05** - Características sócio-demográficas de 27 pacientes estudados com diagnóstico de neoplasia anal, no HUUFMA e no IMOAB São Luís, MA, Brasil..... 57
- Tabela 06** - Características clínico-histopatológicas das amostras de carcinomas dos 27 pacientes atendidos em São Luís, MA, Brasil..... 59
- Tabela 07** - Características do desenvolvimento do carcinoma anal dos 27 pacientes estudados com diagnóstico de carcinoma de células escamosas anal, do HUUFMA e do IMOAB São Luís, MA, Brasil..... 61
- Tabela 08** - Infecção e prevalência do vírus HPV em neoplasias anais dos 27 pacientes provenientes do HUUFMA e do IMOAB São Luís, MA, Brasil..... 62
- Tabela 09** - Associação entre a variável sexo com características clínico-histopatológicas e a infecção pelo vírus do HPV, em São Luís, MA, Brasil, 2014..... 65
- Tabela 10** - Associação entre as características do desenvolvimento do carcinoma anal e a infecção pelo vírus do HPV, São Luís, MA, Brasil, 2014..... 66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NIA – Neoplasia Intraepitelial Anal

CEC – CarcinomaEspinocelular

DNA – Ácido Desoxiribonucléico

DST – Doença Sexualmente Transmissível

HE - Hematoxilina e Eosina

HPV – Papilomavirus Humano

HUUFMA – Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão

IARC - *International Agency for Research on Cancer*

IMOAB – Instituto Maranhense de Oncologia AldenoraBello

INCA - Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva

ORF – *Open Reading Frames*

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

5-FU - 5-fluorouracil

HC2 – Captura híbrida de segunda geração

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

HSIL – Lesão intra-epitelial escamosa de alto grau

ISH – Hibridação molecular *in situ*

LCR – Longa região de controle

LSIL – Lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau

RESUMO

Introdução: O carcinoma anal de células escamosas (SCCA) é raro, porém sua incidência vem aumentando e têm sido frequentemente associado à presença do papiloma vírus humano (HPV). **Objetivo:** Com o objetivo de verificar a prevalência da infecção por HPV nessa variante histológica, o estudo analisou amostras parafinadas de carcinoma anal em pacientes atendidos no Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (HUUFMA) e no Instituto Maranhense de Oncologia AldenoraBello (IMOAB), entre 2001 e 2011. **Método:** Foram incluídas amostras de câncer anal cujas lâminas histológicas e blocos parafinados constavam nos arquivos de pacientes diagnosticados nos Serviços de Anatomia Patológica do IMOAB e no HUUFMA e permitiram confirmação do diagnóstico e avaliação dos critérios propostos neste trabalho. Foram coletados variáveis referentes ao perfil sócio demográfico e clínico nos prontuários e nos laudos anatomopatológicos de 27 pacientes. As amostras de tecido conservadas em blocos de parafina foram encaminhadas para extração de DNA usando Xiol e Kit de coluna *Qiagen*. O gene constitutivo β -globina foi amplificado para atestar a integridade do DNA nas amostras. Posteriormente, realizou-se a amplificação do DNA do HPV pela técnica de Reação em Cadeia da Polymerase (PCR) utilizando o *primer SPF₁₀* e genotipagem por hibridização reversa. **Resultados:** Dentre os pacientes avaliados, 74,07% eram mulheres; e 40,75% dos pacientes estavam na faixa etária entre os 42 e 52 anos. Fatores de risco, como tabagismo (22,22%) e etilismo (11,11%) foram registrados no grupo estudado. Metástases foram detectadas em 11,11% dos casos tendo dois casos de metástase à distância para o fígado, reto e vagina. A detecção de HPV foi positiva em 81,48% das amostras. O HPV16 foi detectado em 100% das amostras positivas. Foi detectada alta prevalência também do HPV11 em 11/27 (40,74%). As infecções múltiplas apresentaram 45,45% (10/22) de prevalência na amostra estudada. **Conclusão:** Nossos resultados fornecem evidências adicionais em apoio à forte associação da infecção pelo HPV de alto risco no desenvolvimento do CCS anal, destacando também uma preocupação com o diagnóstico tardio e a necessidade de monitoramento e medidas de prevenção para o carcinoma anal.

Palavras-chaves: Neoplasia anal. Carcinoma de células escamosas. Vírus do papiloma humano. Genotipagem.

ABSTRACT

The anal squamous cell carcinoma (SCCA) is rare, but its incidence has increased and have often been associated with human papilloma presence virus (HPV).

Objective: In order to determine the prevalence of HPV infection in this histological variant, the study analyzed paraffin embedded samples of anal carcinoma in patients treated at the University Hospital of the Federal University of Maranhão (HUUFMA) and Maranhão Institute of Oncology Aldenora Bello (IMOAB) between 2001 and 2011. **Methods:** samples of anal cancer were included whose histological slides and paraffin blocks contained in patient files diagnosed in the Pathology Services IMOAB and HUUFMA and allowed confirmation of the diagnosis and evaluation of the proposed criteria this work. We collected demographic variables relating to the profile and clinical partner in the medical records and pathological reports of 27 patients. The tissue samples preserved in paraffin blocks were sent for DNA extraction using Qiagen column and Xylene Kit. The β -globin constitutive gene was amplified to certify the integrity of DNA in the samples. Later, there was amplification of HPV DNA by reaction technique Polymerase Chain (PCR) using the primer and SPF10 genotyping by reverse hybridization. **Results:** Among the patients evaluated, 74.07% were women; and 40.75% of the patients were aged between 42 and 52 years. Risk factors such as smoking (22.22%) and alcohol consumption (11.11%) were recorded in this group. Metastases were detected in 11.11% of cases with two cases of distant metastasis to the liver, rectum and vagina. HPV detection was at 81.48% of the positive samples. HPV16 was detected in 100% of the positive samples. High prevalence of HPV 11 was detected also in 11/27 (40.74%). Multiple infections showed 45.45% (10/22) of prevalence in the sample. **Conclusion:** Our results provide further evidence in support of the strong association of high-risk HPV infection in the development of anal SCC also highlighting a concern with late diagnosis and the need for monitoring and preventive measures for anal carcinoma.

Keywords: Anal neoplasia. Squamous cell carcinoma. Human papillomavirus. Genotyping.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente é registrado um aumento no número de tumores associado ao papiloma vírus humano (HPV), tanto na região ano - genital como na região da orofaringe, evidenciando que as alterações no comportamento sexual vêm definindo novos perfis epidemiológicos da infecção pelo vírus. (BOSCH et al., 2002; PARKIN e BRAY et al., 2006; KANODIA et al., 2007)

De acordo com as estatísticas mundiais, o HPV figura entre os vírus mais comuns em indivíduos jovens e sexualmente ativos de ambos os sexos. (BOSCH et al., 2002; PARKIN e BRAY et al., 2006; KANODIA et al., 2007; MONTALDO et al., 2007)

O HPV possui grande afinidade pelas células epiteliais, quer cutânea, quer das zonas mucosas. Sua penetração na camada basal do epitélio pode ser favorecida por microabrasões, frequentemente originada no contato das relações sexuais. (PARK, ANDROPHY, 2002; BOCARDDO E VILLA, 2004)

Existem pelo menos 40 tipos de HPV que infectam especificamente o trato anogenital. Doze destes (16,18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59) são considerados pela *Agency for Research on Cancer* como potencialmente oncogênicos. (BOUVARD, 2009; HOOST et al., 2009)

Apresença do HPV no organismo pode durar até um ano, ter caráter benigno e cursar com involução. Sua persistência pode favorecer a integração do DNA viral ao DNA do hospedeiro e levar a neoplasias malignas, como ocorre em 99,7% dos casos de carcinomas escamoso cervicais. (PLUMMER et al., 2007; RODRIGUEZ et al., 2008)

Os dados em tumores escamosos de outras localidades como, por exemplo, câncer de pênis, canal anal e vulvovaginais, não são bem explorados nos continentes em desenvolvimento ou subdesenvolvidos, como os da Ásia, África e América do Sul. Embora os estudos indiquem elevadas taxas de neoplasia cervical nessas localidades, é sugerida uma forte participação do vírus também

no carcinoma anal de células escamosas (SCCA). (WALBOOMERS et al., 1999; KLENCKE; PALEFSKY, 2003; BROOMALL et al., 2010)

Outra semelhança com o carcinoma cervical é que o carcinoma anal invasivo parece ser precedido por um estágio pré-canceroso reconhecido como neoplasia intraepitelial anal (NIA). As lesões são definidas como lesões de baixo grau (NIA I) sendo caracterizadas por 20% a 25% da espessura do epitélio com células displásicas ou alterações citopáticas (coilocitos); e lesões de alto grau com mais de 50% da espessura do epitélio com células indiferenciadas (NIA II e III). (PALEFSKY, RUBIN, 2009)

O SCCA é neoplasia mais frequente da região anal, apresentando comportamento geralmente agressivo, mas ainda é pouco comum, representando 1,5% a 3% das neoplasias do trato gastrointestinal. Quando diagnosticado ainda no início são grandes as possibilidades de cura. Afeta principalmente mulheres acima dos 50 anos, mas os homens dominam a faixa etária que vai dos 20 aos 49 anos. (PALEFSKY, RUBIN, 2009)

A infecção pelo HPV está entre os fatores de riscos comumente encontrados para ambos os sexos nas neoplasias anais e podem determinar a progressão maligna quando aliada a co-fatores, entre eles a prática de sexo anal, o alto número de parceiros sexuais, o histórico de verrugas genitais, a presença de processo de fistulização crônica, o tabagismo, e a infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida humana (HIV) (DALING et al., 2004).

O diagnóstico da presença analdo HPV pode ser realizado na forma clínica, subclínica e latente. Entre as técnicas empregadas estão exames que avaliam as lesões pelo exame físico como a identificação da lesão, o toque retal, a inspeção clínica da lesão, a anoscopia seguida de biópsia e exames histopatológicos para confirmação diagnóstica, além de testes de elevada sensibilidade para detecção viral como a reação em cadeia de polimerase (PCR), a captura híbrida e a hibridização *in situ*. (CALORE et al., 2001)

As lesões anais neoplásicas, por sua vez, tem sido um desafio diagnóstico devido ao aumento da sua incidência e a clínica inespecífica, que geralmente é

confundida com condições anorretais benignas, uma vez que ambas coexistem em 50% dos casos. (GERVAZ et al., 2004; MONK et al., 2007; TACHEZY et al., 2007)

É sugerido, semelhante ao que ocorre no carcinoma cervical, que o CCS anal seja precedido por lesões pré-invasoras classificadas como neoplasia intra-epitelialanal (NIA), que representam mudanças/alterações no epitélio basal com curso maligno, e que variam histologicamente do grau I ao grau III. (MONK et al., 2007)

No Brasil existem poucos dados epidemiológicos da infecção anal pelo HPV, com prevalência da infecção na região anorretal estimada em 4,7%. Essa taxa toma proporções alarmantes em grupos de risco específicos, como HIV soropositivos. Palesfky et al., (2001) relataram que homossexuais masculinos soronegativos a presença de HPV anal foi de 61% dos casos e de 93% nos soropositivos. Considerando mulheres soronegativas e soropositivas esses valores corresponderam a 42% e 76%, respectivamente. (PALESFKY et al., 2001; MAGI et al., 2003)

Embora a infecção pelo HPV seja crucial para o desenvolvimento do SCCA sua frequência não é conhecida com exatidão. No país, são limitados os estudos que avaliam a prevalência do HPV na população, a distribuição dos subtipos virais e o papel múltiplos tipos de HPV na região anal. Desse modo, reunir dados epidemiológicos de uma determinada região é essencial para subsidiar orientações específicas de tratamento e prevenção, como, por exemplo, um esquema eficaz de vacinação, principalmente nos grupos de riscos, bem como estabelecer a atribuição dos diferentes tipos de HPVs na história natural da infecção.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Papilomavírus humano*

Os papilomavírus compõem um grupo de vírus altamente espécie-específicos. O HPV tem no homemum importante hospedeiro para o desenvolvimento do seu ciclo de vida e replicação. Pertencem à família *Papovaviridae* e já foram descritos mais de 100 tipos distintos de HPV (NELSON, 2002; THOMISSON et al., 2008)

Esses vírus apresentam similaridades na estrutura física e na organização do genoma. O capsídeo protéico tem padrão icosaédrico, com um diâmetro de aproximadamente 55nm e não são revestidos por envelope lipídico (essa característica fortalece a viabilidade viral no meio extracelular). São constituídos ainda por uma dupla cadeia de DNA circular de genoma pequeno, com aproximadamente oito mil pares de bases e com todos os seus genes codificados na mesma cadeia. (FERREIRA, SOUZA, 2002; FINNEM et al., 2003).

O HPV infecta as células epiteliais, causando um espectro de lesões mucocutâneas que vão desde a verruga na pele passando pelas verrugas genitais (condiloma acuminados), os papilomas e o carcinoma. Sua replicação ocorre no núcleo das células escamosas epiteliais e estudos moleculares têm fornecido evidências da integração do DNA viral ao DNA humano bem como das alterações causadas no genoma e na fisiologia das células do hospedeiro. (SCHFFIMAN, CASTLE, 2003)

Em conseqüência da elevada presença e afinidade do HPV nas mucosas anogenitais o vírus é mais comumente transmitido nas relações sexuais. Outras formas de transmissão são pelo uso coletivo de materiais, como os fômites (toalhas, roupas íntimas, instrumentos cirúrgicos) e a transmissão vertical. Ainda são poucos os dados sobre as formas de transmissão por vias não sexuais. (YU et al., 2005)

O HPV pode manter-se associado ao hospedeiro durante longos períodos de tempo, causando infecções persistentes. Na maioria das vezes osefeitos não

costumam ser graves para o organismo, pois, a infecção mantém-se localizada e, os tecidos infectados estão continuamente regenerando-se, ao mesmo tempo, que as células alteradas vão sendo eliminadas. (PARK, ANDROPHP, 2002).

2.2 Organização genômica

O genoma do HPV é formado por aproximadamente oito *open reading frames* (ORF), que constituem regiões de leitura transcricional do DNA sem a presença de *stop* códons, a fim de evitar a formação de proteínas incompletas, já que o códon de finalização da transcrição se localiza após a ORF, favorecendo o ciclo de vida completo do vírus (Figura 01). (DOORBAR, 2005).

As proteínas codificadas nessa região são divididas em duas classes e denominadas segundo o momento em que os genes são expressos na infecção, existem aquelas principais provenientes dos genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7, localizados na região E (Early) e assim denominadas pela expressão precoce. Existem também aquelas oriundas de dois genes (L1 e L2) que são expressas tardiamente e estão localizadas na região L (Late). (SOUTO et al., 2005)

O gene 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. Os genes L1 e L2 codificam, respectivamente, a proteína principal e a secundária do capsídeo. (zur HAUSEN, 2000; MOTOYAMA, 2004)

O locus L1 da região tardia é o mais conservado do HPV, cujo produto, a proteína L1, representa 80% das proteínas do capsídeo viral, constituindo a proteína mais abundante e de alta imunogenicidade. Por sua vez, a proteína L2 contribui para a incorporação do DNA viral dentro do virion. (zur HAUSEN, 2000; MOTOYAMA, 2004)

Os genes E6 e E7 codificam proteínas associadas à malignização de lesões. Tais proteínas estimulam a proliferação celular através da interação com as proteínas celulares p53 e pRb envolvidas no controle da replicação celular, de

forma a suprimir suas funções. Acredita-se que apenas as proteínas E6/E7 de HPVs de alto risco oncogênico são capazes de immortalizar queratinócitos humanos, porém isso não ocorre nas proteínas análogas de HPVs de baixo risco oncogênico (DOORBAR, 2005; LETO et al., 2011)

A expressão das ORFs é controlada por uma região longa de controle (*Long Control Region* (LCR) ou *Upstream Regulatory Region* (URR)) não codificadora, variando de 400 a 1000pb, localizadas entre as regiões L1 e E6. Nessa região, existem sequências estimuladoras e repressoras da transcrição viral, além da origem de replicação. (SOUTO et al., 2005)

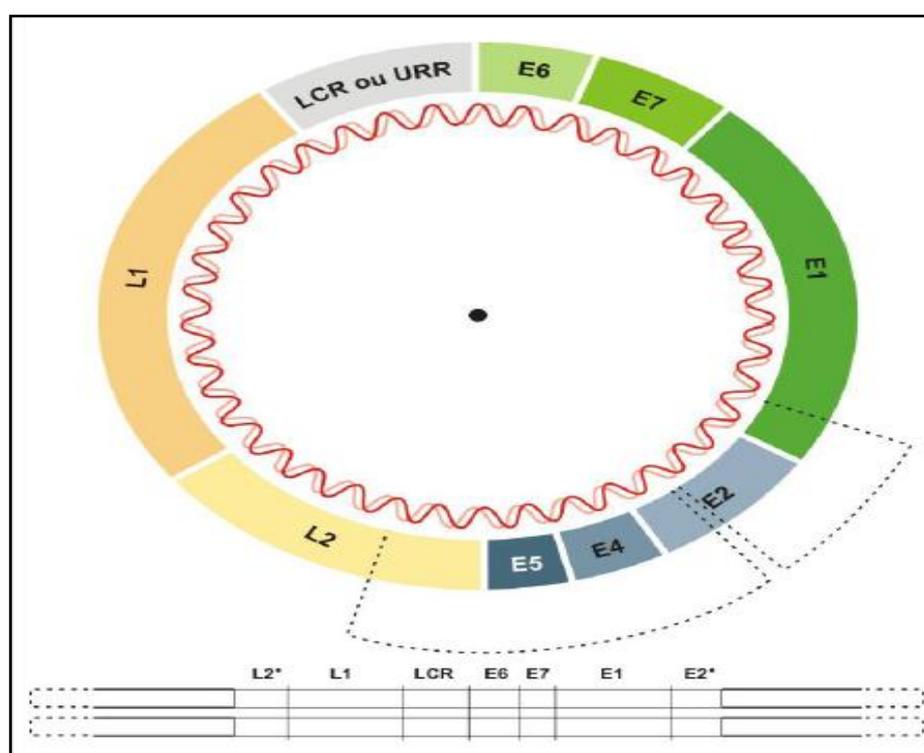


Figura 01 - Organização do genoma circular do HPV e seus sítios de integração no DNA da célula hospedeira. Fonte: REIS, 2005.

2.3 Classificação do HPV

Os tipos de HPV variam quanto à distinção genômica, ao tropismo celular e ao potencial oncogênico. Através do sequenciamento do genoma viral, foi possível estabelecer uma classificação baseada na homologia da sequência de DNA, usando para diferenciação a nomenclatura tradicional tipo, subtipo e

variante. Para isso, são utilizadas as regiões mais conservadas do genoma viral, as dos genes L1, E6 e E7. (MORTOZA, 2006; HOOST et al., 2009)

Estes genes representam cerca de 30% do DNA viral, e estabelecem as divergências entre a sequência estudada e os HPVs conhecidos, permitindo a diferenciação dos tipos (THOMISSON et al., 2008).

Se a divergência for menor que 2%, o vírus em estudo é considerado como um variante do mesmo tipo. Se a divergência na sequência de DNA estiver entre 2 a 10%, considera-se que foi identificado um subtipo viral. Por outro lado, se a divergência observada for superior a 10%, trata-se de um novo tipo de HPV. (SILVA et al., 2003)

De acordo com o sítio de infecção, os HPVs podem ser agrupados inicialmente em tipos cutâneos e mucosos. Os tipos mucosotrópicos são também qualificados em concordância com sua relação com as lesões proliferativas benignas ou malignas. (de VILLIERS et al., 2004; MORTOZA, 2006)

Assim, atualmente, os HPVs são classificados em baixo risco, de risco intermediário/inespecífico ou desconhecidos e alto risco oncogênico (Tabela 01). Entre os vírus de baixo potencial oncogênico destacam-se o tipo 6 e 11 (mais encontrados em condiloma acuminado), e entre os HPVs de alto risco oncogênico, estão os tipos 16 e 18. (de VILLIERS et al, 2004; BOCARRDO e VILLA, 2004; MORTOZA, 2006)

Tabela 01. Classificação dos tipos de HPVs quanto ao grupo de risco oncogênico.

Risco Oncogênico	Tipo de HPV
Inespecífico ou indeterminado	30, 34, 53, 57, 62, 64, 67, 69
Baixo Risco	6, 11, 26, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 12, 73, 81
Alto Risco	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 55, 56, 58, 59, 66, 68, 82

Fonte: adaptado de BOCCARDO e VILLA, 2004.

2.4 Anexação do DNA viral à célula do hospedeiro

O conhecimento do ciclo pode ajudar a entender a patogênese e a imunobiologia do vírus. No entanto, ainda não é possível o cultivo viral por longos períodos o que dificulta o conhecimento do seu ciclo completo. Por ser um dos tipos mais oncogênicos e estar relacionado com a causa de uma variedade de carcinomas, incluindo cervical, anal e cabeça e pescoço, a infecção viral pelo HPV16 tem sido largamente estudada o que tem ajudado a entender a ligação e a entrada desse vírus na célula hospedeira. (KANODIA et al., 2007; MONTALDO et al., 2007)

Acredita-se que as proteínas do capsídeo do HPV16 se ligam a proteoglicanos de sulfato de heparina (HSPGs) presentes na superfície das células epiteliais da membrana basal ou através da laminina-332 sobre a matriz extracelular, mediando a anexação viral (Figura 2).

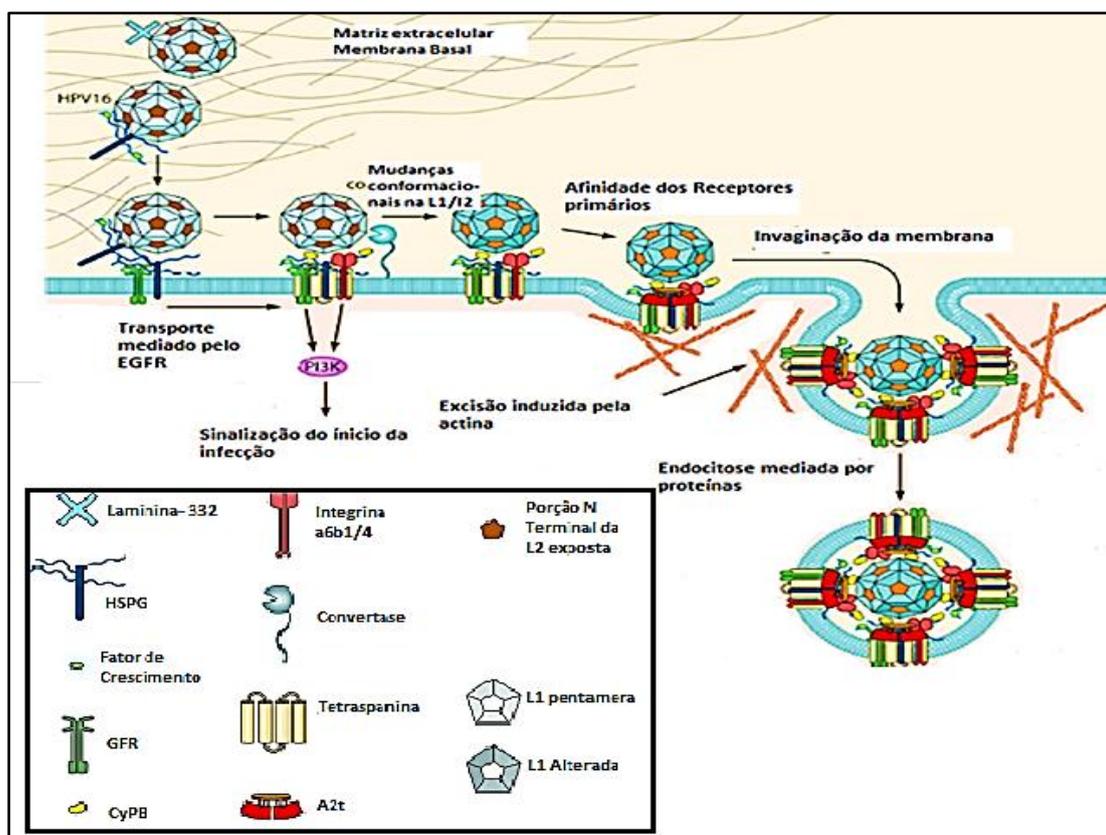


Figura 02. Dinâmica de ligação e envolvimento do HPV 16 na superfície célula. Fonte: adaptado de RAFF et al., 2013.

Posteriormente, tanto o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) quanto o receptor do fator de crescimento de queratinócitos (KGFR) tornam-se ativados através do complexo HSPGs-HPV16 e iniciam cascatas de sinalização intracelulares incluindo a ativação da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), para mediar vias de transporte do vírus (ELENIUS et al., 1991; CAREY, 1997; LIU e THORP, 2002; ROBERTS et al., 2007; CHOI et al., 2011)

Após a ligação ao HSPGs, a partícula viral (vírion) sofre uma alteração conformacional que é facilitada pela ciclofilina B (CYPB), já que esta expõe os aminoácidos da região N terminal da proteína L2 do capsídeo viral. Subsequentemente, o HPV16 se liga a 6-integrina, que inicia uma segunda cascata de sinalização intracelular. (SPONDEN et al., 2008)

Depois de passar por mudanças de conformação e sinalização, o capsídeo do HPV16 se liga a proteína heterotetrâmera anexina dois (A2t). Após a ligação do HPV com a A2t, clatrina, caveolina, lipídio saturado, flotillina, colesterol, e dinamina independente o processo de endocitose do HPV16 é acionado. (SPONDEN et al, 2008).

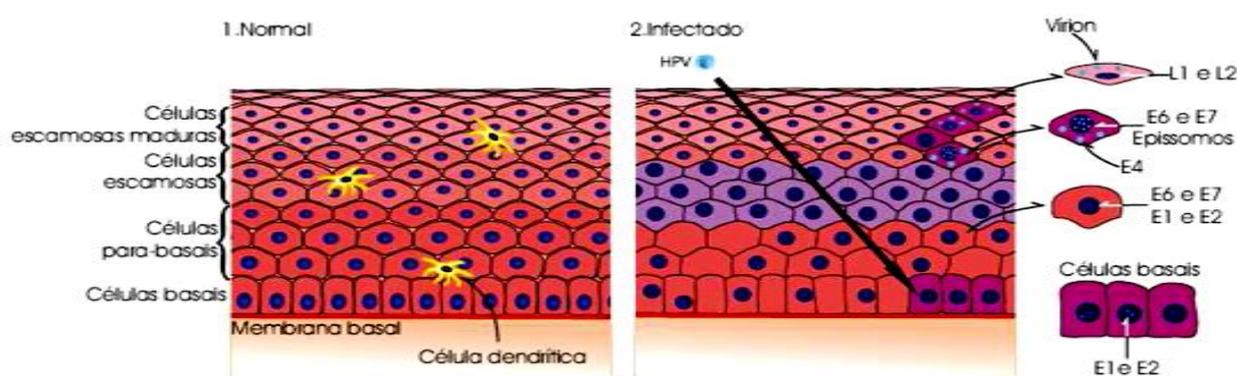
A ativação de PI3K induzida por HPV16 pode então levar ao envolvimento do vírus em uma vesícula da célula e posterior cisão pela actina. Existem também, tetraspaninas que hipoteticamente podem estar envolvidas na formação de uma membrana de domínio enriquecido que estabiliza as ligações entre as moléculas associadas ao HPV16. (LEVY et al., 2005;SCHEFFER et al., 2013)

Portanto, ao contrário de um processo sequencial de um receptor para outro no envolvimento do vírion, a hipótese mais aceita comumente é a de que, nesse processo de entrada viral na célula, um receptor aglutina e inclui complexas proteínas como os HSPGs, CYPB, 6-integrinas, tetraspaninas, EGFR, e A2t. (LEVY et al., 2005;SCHEFFER et al., 2013)

À medida que o vírus entra nas células e ocorre a divisão celular, as células basais e parabasais migram em direção à superfície e tornam-se diferenciadas (Figura 03). Ao deixar a camada basal, as células normais retiradas do ciclo, iniciam a diferenciação e começam a sintetizar queratinas de alto peso molecular. As funções vegetativas virais, síntese do DNA e proteínas do

capsídeo, bem como a montagem dos novos vírus ocorrem exclusivamente nestes queratinócitos diferenciados (HEBNER, LAIMINS, 2006).

As partículas infecciosas que serão liberadas podem infectar um novo hospedeiro, enquanto que um baixo número de cópias permanece indiferenciada na camada basal sob a forma epissomal, servindo como reservatório do DNA viral. As mudanças citológicas observadas são a coilocitose, multinucleações e alargamento nuclear. As células infectadas apresentam um espectro que vai desde a hiperplasia benigna até a displasia na neoplasia invasiva. Caso não haja progressão para esta última, o processo é reversível, incluindo o afastamento da infecção do papilomavírus e a regressão do pré-câncer. (MUNGER et al., 1992)



Fonte: MUNOZ, et al (2006).

Figura 03. Infecção pelo HPV.

2.5 Carcinogênese induzida pelo HPV

As etapas necessárias na carcinogênese induzida pelo HPV estão associadas ao tipo e à carga viral, ao sítio e à persistência da infecção, à interação das oncoproteínas e à resposta imunológica do hospedeiro, a progressão das lesões pré-cancerosas e eventual invasão. (MONK, TEWARIK, 2007)

É sugerido que a persistência na célula saudável e o próprio potencial oncogênico de alguns tipos virais sejam mediados, principalmente, pelo comportamento das proteínas E6 e E7. Em infecções com vírus de alto risco, as proteínas virais E6 e E7 são bastante ativas, interferindo, assim, profundamente

no ciclo celular. Estas proteínas possuem atividade complexa e quando combinadas degradam as proteínas supressoras de tumor p53 da célula hospedeira, inibindo a expressão de genes envolvidos na apoptose e nas paradas do ciclo do celular.(SILVA et al., 2003; THOMISSON, THOMAS, SHROYER, 2008)

Assim, a diminuição no número de apoptoses e a perda de controle no ciclo da célula levam a proliferação celular descontrolada. Essa divisão celular é processada mais rapidamente em vírus de alto risco oncogênico do que em infecções por vírus de baixo risco, ocorrendo o aumento das probabilidades de acontecer, acidentalmente, numa das células, a integração do DNA viral no genoma da célula hospedeira (HEBNER, LAIMINS, 2006).

Se não detectável precocemente, as lesões formadas após a integração viral podem progredir a carcinoma *in situ* ou tornar-se invasor. Este último podendo alcançar vasos sanguíneos e sistema linfático, metastatizando para outros locais do corpo. As evidências recentes usando testes específicos através de PCR mostraram que o DNA do HPV está presente em 85% dos casos de carcinoma anal de células escamosas.(JOSEF et al., 2008)

2.6 Aspectos gerais do carcinoma anal

O carcinoma anal representa apenas 3% dos tumores ano-retais, porém vem sendo observado um progressivo aumento nas últimas três décadas, mesmo nos países desenvolvidos. (JEMAL, 2009)

Nos Estados Unidos, por exemplo, a incidência estimada era de 0,5 a cada 100.000 habitantes, sendo que houve em 2010, 7.210 novos casos com 950 destes apresentando desfecho de morte. Na população em geral, a incidência anual é de <2/100.000 pessoas, com ligeira predominância entre as mulheres. (WHOCT, 2000; ABBASAKOOR e BOULOS 2005; GRULICH et al., 2006; DURAES, 2010; de VUYST et al., 2009;)

Dados do estudo feito entre 1973 a 2003 pelo *Surveillance, Epidemiology and End Results* (SEER), programa de vigilância americano, sugerem que a incidência esteja aumentando devido ao surgimento de grupos de risco como homens homossexuais/bissexuais e a epidemia do HIV. A taxa de incidência anual para homens homossexuais/bissexuais HIV negativos é de 35 por 100.000 e em HIV positivos esse número duplica. (RIES et al., 2005; MARTIN et al., 2009)

Avaliando a frequência entre as raças de 1973 a 2000, os homens negros tinham o maior aumento nas taxas de incidência de câncer anal, seguido por homens brancos, mulheres brancas e mulheres negras em ordem decrescente. (RYAN 2000; BERRY, 2003; RIES, 2005)

A média de idade ao diagnóstico dos pacientes com carcinoma anal varia de 60 a 65 anos. Aproximadamente 60 a 70% dos pacientes são incluídos nos estádios I e II. A taxa de sobrevivência em cinco anos para pacientes com tumores T1 e T2 é de 86% enquanto para os pacientes com tumores T3 e T4 é de 60% e 45%, respectivamente. (GERAD et al., 2001)

As taxas de mortalidade vêm aumentando, pois, o diagnóstico dessa neoplasia tem sido relatado na doença avançada, o que diminui as chances de cura, reservando para essas condições apenas a realização de quimioterapia paliativa. (JONSHON et al., 2004)

No Brasil o câncer já é considerado um problema de saúde pública. No entanto, para o carcinoma anal, ainda não existem dados reais que identifiquem especificamente essa patologia, sendo assim, essa doença ainda figura nas estatísticas que incluem cólon e reto (INCA, 2014).

Portanto, estimam-se para o ano de 2014, 15.070 novos casos de carcinoma de cólon e reto em homens e 17.530 em mulheres. Se considerado as estatísticas entre regiões, para homens o nordeste é a quinta região mais frequente (6,19/100 mil) e para mulheres é a terceira região (7,81/100 mil). Para o Estado do Maranhão, estimam-se 210 novos casos de carcinoma de cólon e reto,

estando concentrado na capital São Luís 100 novos casos apenas para o ano de 2014.(INCA, 2014)

A relativa raridade de tais tumores, a pouca nitidez dos limites da região anal e dos segmentos em que se pode dividir e a complexidade e variabilidade histológica da região dificulta a sistematização dos tumores malignos da região anal. Contudo a distinção entre a região anal e a retal é fundamental, pois, a região anal tem variedade histológica ampla resultante da diversidade das estruturas epiteliais da região e as neoplasias dessa localização têm comportamento e tratamentos distintos.

Do ponto de vista anatomo-patológico, então, é conveniente localizar a origem dos tumores da região anal no canal anal (epitélio escamoso) ou na margem anal (epitélio tegumentar).

O canal anal é um conduto tubular com função principal de continência retal. Situa-se numa região de transição distal entre o ectoderma e o endoderma embrionário. Apresenta três a quatro centímetros de comprimento permanecendo colado a maior parte do tempo, graças à ação de sua musculatura. Possui uma composição muscular tríplice (músculos esfínterianos internos, músculos esfínterianos externos e músculo pubo-retal) que forma o anel anorretal (Figura 4) (WENDELL-SMITH, 2000; GORDON, 2001).

A margem anal é o limite distal do canal anal, definida geralmente como uma área dentro de um raio de cinco centímetros do ânus. O ânus é a abertura distal externa do trato intestinal e é referido algumas vezes como margem anal. Essa região mantém as paredes em contato no seu estado normal de repouso. Ao redor da margem anal encontra-se a pele perianal (WENDELL-SMITH, 2000; GORDON, 2001).

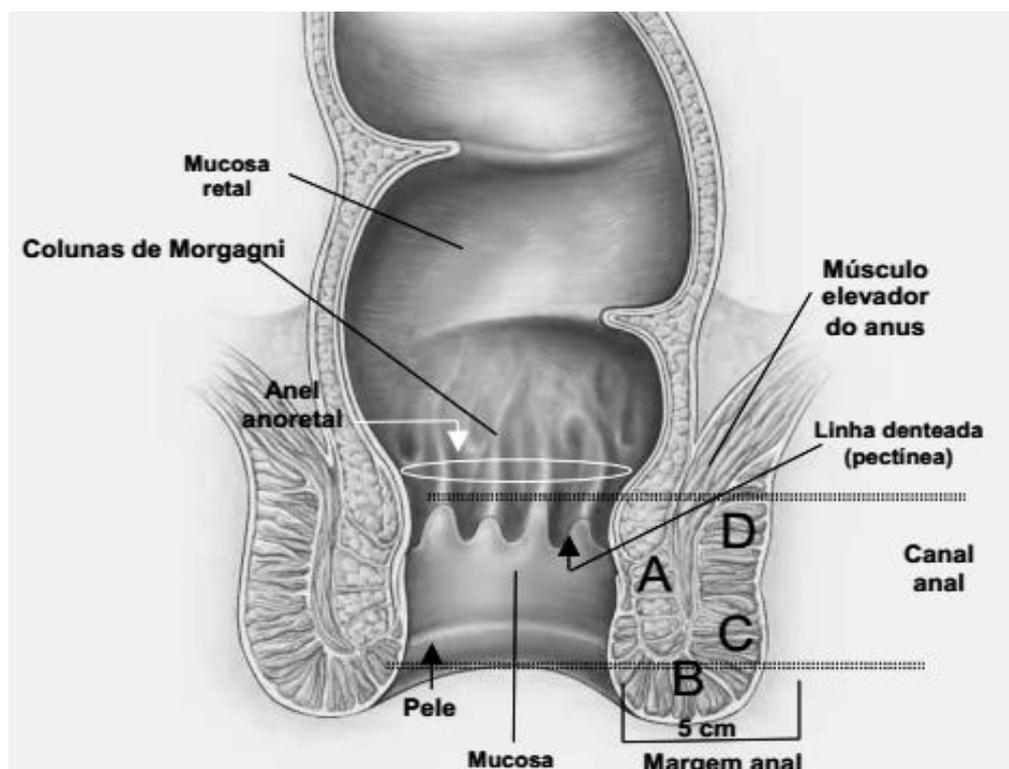


Figura 04. Anatomia do ânus. **(A)**Esfíncter interno. **(B)**Esfíncter subcutâneo externo. **(C)**Esfíncter superficial externo. **(D)**Esfíncter externo profundo e músculo púbis retal. Fonte: adaptado de OLIVATO, 2007.

A mucosa do canal anal apresenta três tipos diferentes de epitélio e a linha pectínea é a estrutura que demarca essa transição. Abaixo da linha pectínea até a borda anal identifica-se o epitélio escamoso proximal. O segmento superior proximal apresenta um epitélio distal de transição ou cloacogênico (originado do tecido embrionário da bexiga que pode ser cuboidal, colunar ou escamoso) e a porção superior distal do canal anal é revestida por epitélio colunar de padrão coloretal. (FENGER et al., 2002)

O epitélio torna-se enrugado e pigmentado próximo à margem anal. Na margem anal há a mistura com a mucosa pálida do canal distal, mucosa esta, coberta com epitélio escamoso modificado sem o apêndice epidérmico. A pele perianal é formada por epitélio escamoso com folículos pilosos e numerosas glândulas apócrinas. (FENGER et al., 2002)

É fundamental a distinção entre o epitélio tegumentar da margem anal e o epitélio escamoso do canal anal. Os tumores da margem anal e pele perianal são abordados semelhantemente as lesões de pele, ou seja, com excisão local

alargada (taxa de sobrevida de 80% em cinco anos). Os cânceres do canal anal, por sua vez, são tratados com a associação de quimioterapia e radioterapia. (CLARK et al., 2004)

Os tumores que surgem na área distal a linha pectínea são frequentemente carcinomas de células escamosas queratinizadas, enquanto aqueles que aparecem na mucosa transicional acima da linha pectínea são frequentemente não queratinizados. Os dois subtipos não queratinizados que outrora eram referidos como cloacogênico ou de células transicionais, são atualmente reconhecidos como variantes do carcinoma de células escamosas. O comportamento clínico, o tratamento e o prognóstico dos tumores queratinizado e não queratinizado do canal anal são semelhantes. (FENGER et al., 2002)

O carcinoma de células escamosas versa como a neoplasia maligna mais comum do canal anal, são neoplasias de crescimento agressivo que comprometem os músculos esfínterianos, acometendo também a região perianal e representando 90% a 96% dos cânceres do ânus. O pico de incidência está entre 58 e 64 anos. Na região anal são relatados ainda que raramente o carcinoma de células basais, a doença de Bowen, o carcinoma verrucoso ou tumor de Buschke-Löwenstein, o sarcoma de Kaposi e a doença de Paget perianal. (ESIASHVILI et al., 2002)

A avaliação adequada da extensão da doença loco-regional deve ser feita por inspeção visual, exame digital, anoscopia, exame dos linfonodos inguinais e exames de imagem. Metástases à distância ocorrem raramente e deve ser descartada com a imagem, incluindo tomografia computadorizada (TC) do abdômen e da pelve. A combinação de tomografia por emissão de pósitrons (PET) e / ou de tomografia computadorizada deve ser usada para identificar o tumor primário e nódulos envolvidos. (OLIVATTO, 2007)

Tabela 2. Tipos de Câncer anal segundo a atual classificação da AJCC.

Canal Anal	Margem Anal
<ul style="list-style-type: none"> • Carcinoma de células escamosas • Carcinoma cloacogênico de transição • Adenocarcinoma • Melanoma • Carcinomabasalóide • Linfoma 	<ul style="list-style-type: none"> • Carcinoma de células escamosas • Carcinomas de células basais • Doença de Paget • Doença de Bowen • Carcinoma de células basais • Melanoma maligno • Tumor de Buschke-Lowenstein

Fonte: AJCC, 2002.

O sangramento retal é relatado na metade dos pacientes com câncer anal. Dor ou sensação de massa retal está presente em 30% dos pacientes, enquanto 20% não apresentam sintomas relacionados ao tumor. Os tumores com diâmetros maiores interferem na função do esfíncter anal levando a incontinência fecal. (OLIVATTO, 2007)

O toque retal permite avaliar a extensão do tumor primário e a fixação ou não do tumor primário às estruturas circunvizinhas como próstata, vagina e ossos da pélvis. O tumor primário cresce ao longo da circunferência do canal e invade os músculos esfíncterianos e tecidos conectivos perianais precocemente. (OLIVATTO, 2007)

Foi estabelecido pelo Comitê da Junta Americana em Câncer (AJCC) e pela União Internacional do Câncer (UICC) um sistema combinado de estadiamento TNM. (Quadro 1 e 2)

Outra classificação usada para carcinoma epidermóide é a de Broders, a qual se baseia no grau de queratinização, número de mitoses e no pleomorfismo nuclear. Tal classificação foi proposta pelo pesquisador Broders, em 1920, onde os tumores são classificados em três graus identificáveis: grau I – bem diferenciado, grau II – moderadamente diferenciado e, grau III – indiferenciados. (PAIVA, 2010)

Ao diagnóstico, 12% dos tumores são restritos à mucosa e submucosa e 34% aos músculos esfínterianos (sem metástases regionais). A extensão tumoral além do canal, ou seja, para o reto e pele perianal ocorre em 50% dos casos. Em 10% dos pacientes o septo ano-vaginal é invadido embora o comprometimento prostático seja incomum (BOMAN et al., 1984; CUMMINGS et al., 2004;).

O comprometimento dos linfonodos representa um importante fator prognóstico adverso. Um estudo, demonstrou que a incidência de metástase em linfonodos está relacionado com o tamanho do tumor com índices de 0% nos tumores com menos de 2 cm, 23% dos tumores de 2-5 cm e 67% de tumores maiores que 5 cm. (KAUH et al., 2005; AJANI et al., 2010)

As metástases extra-pélvicas estão geralmente presentes na primeira avaliação em aproximadamente 5% dos pacientes e são comumente identificadas por exames de imagem pélvica (ilíaca comum ou externa) ou dos linfonodos aórticos, fígado e pulmões. Em 10% dos pacientes as metástases à distância ocorrem como sítio único de falha depois do tumor primário e linfonodos regionais terem sido controlados. (MYERSON et al., 1997; CUMMINGS, 2005).

Quadro 1. Critérios para classificação de estadiamento clínico proposto pelo *American Jount of Committee on Cancer- AJCC/TNM* para tumores na região anal. (2002)

Tumor Primário (T)	Linfonodos (N)	Metástases à distância (M)
Tx Tumor primário que não pode ser avaliado Tis Carcinoma <i>in situ</i> T1 Tumor menor ou igual a 2 cm T2 Tumor >2–5 cm T3 Tumor >5 cm T4 Tumor invadindo para outros órgãos (vagina, uretra, bexiga, sacro) – canal anal Tumor invadindo estruturas mais profundas (músculo esquelético e cartilagem) – margem anal	N Nódulos regionais periretal, ilíaco interno e inguinal Nx Nódulos regionais não podem ser avaliados N0 Ausência de metástases nos nódulos regionais N1 Metástases em nódulos perirretais – anal canal Metástase de nódulos regionais– margem anal N2 Metástase unilateral no ilíaco interno e/ou nódulo inguinal – canal anal (No N2 para margem anal)	M0 Sem Metástase M1 Presença de Metástase

Fonte: AJCC (2002).

Quadro 2. Agrupamento em estádios para Câncer na região anal.

Tis	N0	M0	Estádio 0
T1	N0	M0	Estádio I
T2	N0	M0	Estádio II
T3	N0	M0	
T1	N1	M0	Estádio IIIA
T2	N1	M0	
T3	N1	M0	
T4	N0	M0	
T4	N1	M0	Estádio IIIB
Qualquer T	N2	M0	
Qualquer T	N3	M0	
Qualquer T	Qualquer N	M1	Estádio IV

Fonte: AJCC (2002).

Até 20 ou 30 anos atrás, a cirurgia abdominoperineal era o tratamento padrão para este tumor, que consistia na colostomia definitiva. A sobrevivência total de cinco anos era de cerca de 50-70%. Nos últimos anos, a abordagem terapêutica para o câncer anal mudou drasticamente de uma cirurgia mutilante a conservadora ou tratamento com radioquimioterapia. Hoje a cirurgia é usada principalmente para fins de diagnóstico e/ou como tratamento de resgate loco-regional após falha radio quimioterápica (GREENE et al., 2002; CASADEI et al., 2014).

2.7 HPV e Carcinoma de Células Escamosas Anal

As células escamosas do epitélio são suscetíveis à infecção pelo HPV, o que pode explicar o percentual significativo do HPV (tipo 16 e 18) no trato anogenital masculino e feminino (vulva, vagina, ânus e pênis) (Tabela 3).

Tabela 3. Prevalência (%) do HPV e dos tipos HPV 16 e 18 nos diferentes tipos de carcinoma no Brasil e Mundo.

	Brasil			Mundo		
	HPV	HPV16	HPV18	HPV	HPV16	HPV18
Colo Uterino	70	45,4	25,3	99	54,4	16,5
Vagina	-	-	-	90	52,9	10,3
Vulva	24,1	16,5	8,9	38	32,2	3,9
Ânus	-	-	-	85	65,3	8,0
Pênis	39,8	24,8	6,9	50	31,7	5,8

Fonte: WHO, 2002.

A associação do CCS anal com a infecção pelo HPV varia de acordo com a sensibilidade da técnica utilizada para detecção do vírus. Além disso, a infecção pelo HPV sozinha não é o suficiente para malignidade, por isso, são reconhecidos alguns co-fatores que favorecem esse processo em ambos os sexos, entre eles a idade superior a 50 anos, a infecção pelo HIV, imunossuprimidos, como os receptores de transplante, tabagismo, coito anal, múltiplos parceiros sexuais, fístulas anais crônicas e, particularmente, para as mulheres o histórico de câncer cervical, vulvar ou vaginal invasivo. (FENGER et al.,2000;WHO, 2011)

Um estudo demográfico realizado no município de Recife no período de 1993-2005 relatou 91 pacientes com diagnóstico de câncer de canal anal e ânus, confirmados pelo exame anatomopatológico. Com média de idade de 63, 8 anos de idade. Houve um predomínio no gênero feminino com 70 (76,9%) casos versus 21 (23,0%) no gênero masculino. A taxa de incidência variou entre 0,18 e 0,83 por 100.000 pessoas com uma média de 0,39 (desvio padrão de $\pm 0,16$) casos novos por ano nos 13 anos considerados no estudo. Outros dados do perfil sócio-demográficos não foram coletados. (TORRES et al., 2007)

A infecção pelo HPV parece ser fator crucial para o desenvolvimento do carcinoma anal. Existem mais de 100 tipos de HPV, sendo o HPV 16 o mais relacionado ao câncer anal, estando envolvidos também o HPV 18, HPV 31, HPV

33, e o HPV 45. O DNA do HPV apresenta-se em nosso organismo na forma de um epissomo circular normalmente. Nessa forma o vírus não consegue expressar as proteínas oncogênicas (E6 e E7). (MUNGER et al., 1992)

Acredita-se que a infecção por HIV diminui a expressão da proteína E2, que é responsável por manter o formato circular do DNA viral, e, portanto aumenta a expressão de E6 e E7, potencializando seu poder carcinogênico. (MUNGER et al., 1992)

Infecção pelo HIV tem sido um fator de risco independente para o câncer anal e esse tipo de câncer tem alcançado proporções epidêmicas entre os homens homossexuais infectados pelo HIV. O tratamento medicamentoso eficaz para o HIV diminuiu o risco de muitas doenças relacionadas com a AIDS, mas o mesmo não foi atingido em caso de câncer anal. (DIAMOND et al., 2005; ROARK, 2011; MITRA e CRANE, 2012)

O comportamento sexual promíscuo também aumenta o risco de infecção pelo HPV e pelo HIV, aumentando assim o risco de câncer anal. Coito anal também aumenta o risco de câncer anal tanto nos homens como nas mulheres, em especial, os menores de 30 anos de idade apesar da negatividade do HIV devido à exposição sexual ao HPV. Nos EUA, a incidência de câncer anal entre homossexuais é maior do que a incidência de câncer do colo do útero. (KLENCKE e PALEFSKY, 2003; GERVAZ et al., 2004)

O tabagismo tem sido descrito na literatura como fator para o aumento do risco de câncer anal. Phillips et al. (2004) analisaram o DNA de pacientes tabagistas em amostras de epitélio anal recuperados a partir de amostras hemorroidárias de fumantes ativos (n = 20) e com a mesma idade não-fumantes ao longo da vida (n = 16) e concluíram que os componentes da fumaça do tabaco causam dano genotóxico ao epitélio anal de fumantes, proporcionando assim uma explicação viável para uma associação causal entre o fumo e o câncer anal. (PHILLIPS et al., 2004)

As lesões são consideradas de baixo grau quando 20 a 25% da espessura do epitélio possuem células displásicas (NIA I) ou quando se identificam alterações citopáticas associadas à infecção pelo HPV (coilocitos) (Figura 05). Lesões de alto grau ocorrem quando mais de 50% da espessura do epitélio possui células indiferenciadas (NIA II e NIA III) (Figura 06). Ainda não está confirmado como estas lesões originam o câncer, mas as lesões de alto grau são mais graves e possuem maior probabilidade de progressão. (PALESFKY et al., 2009)

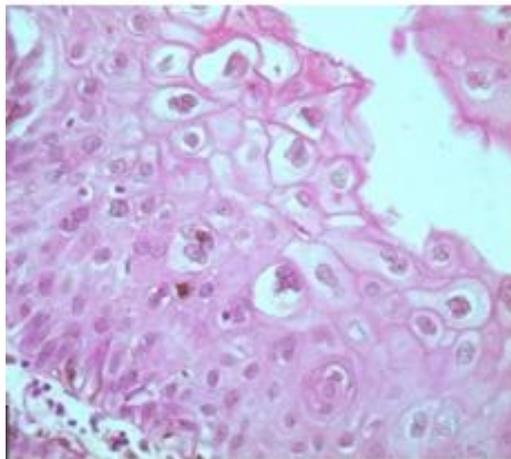


Figura 05. Lâmina corada com Hematoxilina Eosina (HE) 400x. NIA I. Extraído de MAIA, 2013.

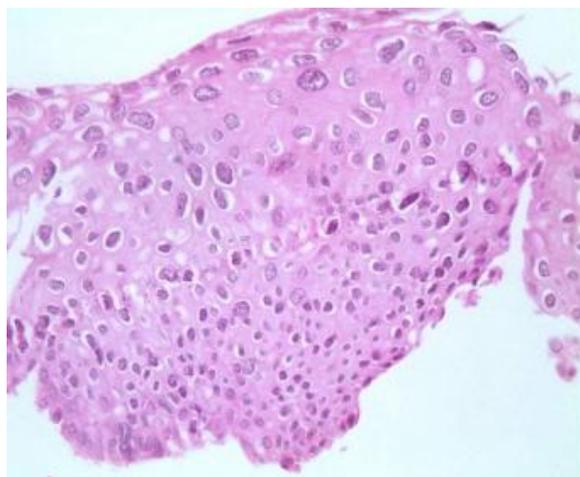


Figura 06. Lâmina corada com Hematoxilina Eosina (HE) 400x. NIA III. Extraído de MAIA, 2013.

O CCS anal é precedido por neoplasia intra-epitelial anal de alto grau(NIAA). A NIA pode ser causada por infecção principalmente dos tipos 16 e 18. (Tabela 4)A maioria dos estudos de prevalência do HPV na região anal e na neoplasia intra-epitelial anal tem sido feito com homossexuais masculinos, especialmente homens HIV positivos, mas também tem elevadas taxas em mulheres HIV positivas, pois ambos os grupos são considerados de alto risco.(FENGER et al., 2000;WHO, 2009)

Não existe uma estratégia clínica universalmente aceita. Os poucos dados de carcinoma anal em heterossexuais masculino HIV negativosena população feminina de baixo risco torna a busca para instituir um programa de triagem sem justificativa ou viabilidade. Mas o aumento da infecção pelo HPV em ambos os sexos e a possibilidade de detectar as lesões precursoras, exhibe a necessidade de programas padronizados de rastreamento, bem como protocolos de tratamento da NIA.(JOHNSON, 2004)

O consenso quase que geral entre os que estudam o assunto é que qualquer resultado anormal para alteração da forma e tamanho celular na citologia deva ser encaminhado para a anoscopia de alta resolução com biópsia das áreas atípicas. O diagnóstico precoce do câncer anal invasivo cursa com resultados bastante favoráveis; num estudo de 27 anos realizado por Johnsonet al. (2004), apenas 18% dos pacientes com metástases à distância estavam vivos em cinco anos de acompanhamento, comparados a 78 % dos pacientes com doença localizada, o que reforça a ideia de que a detecção precoce pode melhorar a sobrevida de pacientes com câncer anal. (JOHNSON, 2004)

Considerando-se uma doença sexualmente transmissível (DST), que acomete tanto homens como mulheres, com desenvolvimento sintomático ou assintomático, com força relevante de malignidade, sendo assunto de preocupação mundial, pela sua potencialidade de prevenção e diagnóstico precoce, torna-se viável um estudo aprofundado sobre a prevalência e genotipagem do papilomavírus humano nos pacientes diagnosticados com carcinoma anal no Estado do Maranhão.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a prevalência da infecção por HPV em amostras de tecido neoplásicas emblocadas em parafina de pacientes diagnosticados com carcinoma anal no Instituto Maranhense de Oncologia AldenoraBello (IMOAB) e no Hospital Universitário Universidade Federal do Maranhão (HUUFMA) de 2001 a 2011.

3.2 Específicos

- ✓ Identificar os tipos mais prevalentes de HPV nos carcinomas de pacientes atendidos em São Luís.
- ✓ Caracterizar o grau de diferenciação e estadiamento da lesão relacionando com os tipos de HPVs encontrados;
- ✓ Verificar se há associação entre os dados clínico-cirúrgico-radiológicos (do prontuário médico), parâmetros histopatológicos, infecção pelo HPV e tipo de HPV dos casos estudados.

4. METODOLOGIA

4.1 Delineamento do Estudo

Foi realizado um estudo do tipo transversal e retrospectivo. As amostras utilizadas representaram uma amostra não probabilística por conviniência.

4.2 Período e Local de Estudo

A pesquisa foi executada no período de janeiro de 2013 a agosto de 2014. Considerando dados provenientes de 10 anos (janeiro de 2001 a dezembro de 2011).

Os prontuários, os laudos, as lâminas e as amostras de tecido neoplásicos conservadas em bloco de parafina foram coletados no Laboratório de Patologia do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello (IMOAB) e da Divisão de Patologia do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (HUUFMA).

O processamento das amostras foi realizado no Laboratório de Pesquisa Multiusuário do BioBanco de Tumores do Maranhão do HUUFMA e no Instituto do HPV da Santa Casa de São Paulo.

4.3.1.1 Obtenção dos dados referentes às amostras biológicas

Foi selecionado por uma análise minuciosa dos registros nos livros de fluxo da divisão de patologia dos hospitais HUUFMA e IMOAB, no período de 01/2001 a 12/2011, a numeração de bloco de parafina da peça cirúrgica/biopsia e prontuário de pacientes que continham como descrição do procedimento realizado durante sua estadia no respectivo hospital, fatores relacionados aos critérios de inclusão do estudo.

Com a numeração obtida foi possível o acesso ao prontuário e laudo histopatológico dos blocos de tecido parafinado, para a confirmação da descrição do diagnóstico e a captura das características tumorais. Os dados obtidos foram registrados em planilhas para posterior análise.

As amostras preservadas em blocos de parafina eram provenientes de biópsia ou material de ressecção cirúrgica. Os médicos patologistas atestaram a presença dos tumores pesquisados nas lâminas espelho coradas com hematoxilinae eosina (HE) correspondentes aos casos. O material tumoral preservado em parafina dos pacientes diagnosticados com lesões intra-epiteliais anais e carcinomas anais foram coletados com auxílio e acompanhamento do técnico de laboratório dos setores. Ao fim da coleta de dados foi possível realizar duas triagens, uma mais robusta nos livros de fluxos das instituições envolvidas, a fim de garantir a inclusão de todas as amostras que seguiam os critérios de inclusão da seguinte pesquisa, sem que erros de registro ou confusão influenciasse esse resultado. A outra triagem envolveu a seleção das amostras, identificando aquelas que estavam em condições de serem encaminhadas para detecção do DNA viral. (Figura 07)

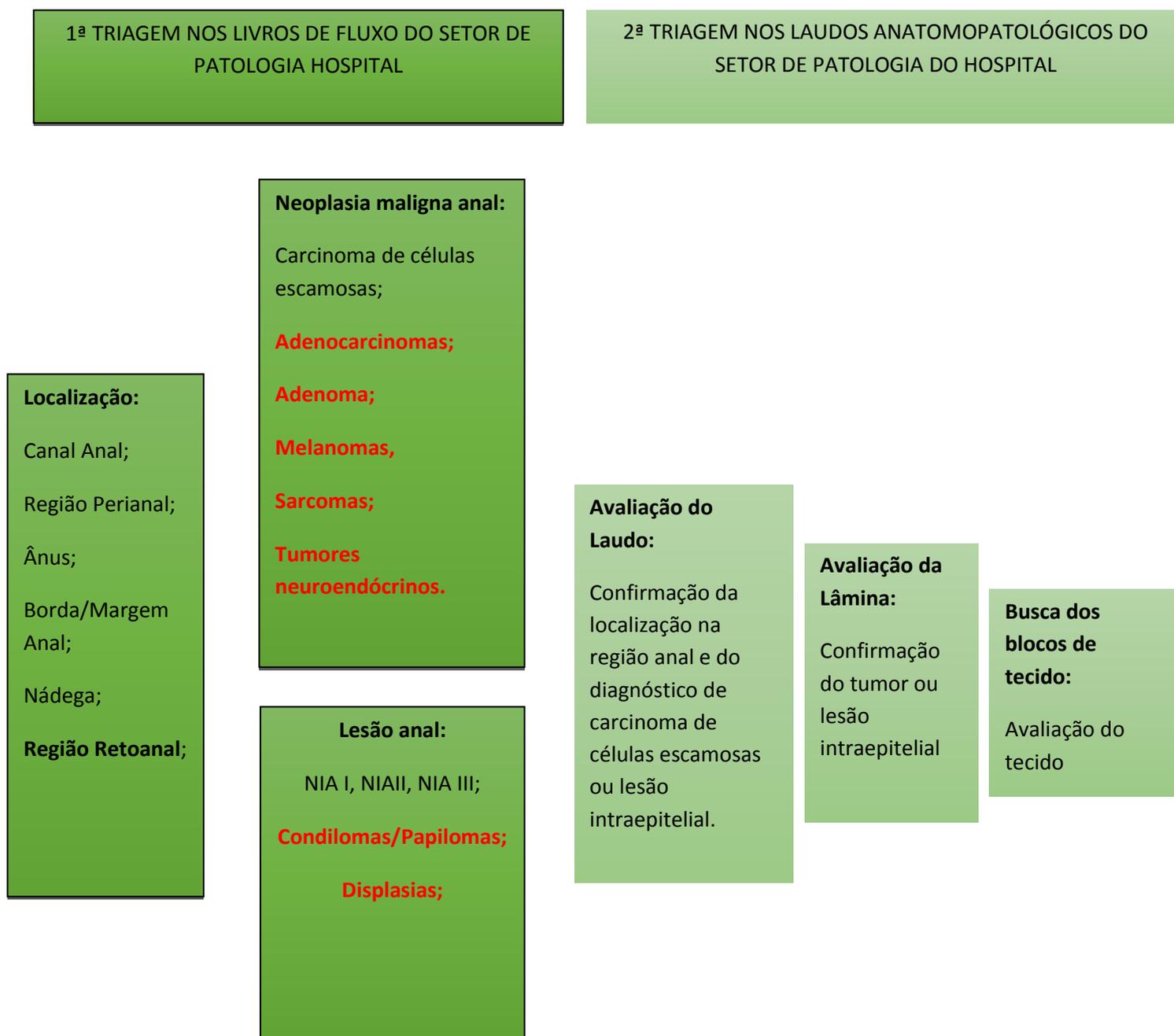


Figura 7.Esquema de triagem para inclusão de pacientes diagnosticados com lesão intraepitelial anal ou carcinoma de células escamosas anal no IMOAB e no HUUFMA entre 2001 e 2011.Fonte: Elaborado pelo autor (2014).

4.3.2 Critérios de Inclusão

Amostras de câncer anal cujas lâminas histológicas e blocos parafinados constavam nos arquivos de pacientes diagnosticados nos Serviços de Anatomia

Patológica do IMOAB e no HUUFMA e permitiram confirmação do diagnóstico e avaliação dos critérios propostos neste trabalho.

4.3.3 Critérios de Exclusão

Amostras de câncer anal de pacientes cujos laudos não forneceram informações pertinentes ao estudo;

Amostras de câncer anal de pacientes que tiveram divergência de diagnóstico nos registros (livro de fluxo/prontuário/laudo histopatológico).

Pacientes com outros tipos tumorais que não fosse do tipo carcinoma de células escamosas.

4.4 Fluxogramas das amostras

4.4.1 Instituto Maranhense de Oncologia AldenoraBello (IMOAB)

A figura 8 ilustra o fluxograma do processo de identificação e seleção das amostras. Inicialmente foram localizados 102 casos de neoplasias anais registrados nos livros de fluxo Divisão de Patologia do IMOAB durante o período de 2001 a 2011. A partir desses livros, foi possível obter os números dos blocos parafinados e respectivos prontuários e laudos histopatológicos.

A partir da análise dos mesmos, foram excluídos do estudo 40 adenocarcinomas, 07 adenomas, 06 doenças de Paget e 21 condilomas, já que os três primeiros não apresentam relação causal com HPV e o último está classificado como lesão benigna. Representaram perdas 03 amostras por não terem sido encontrados seus respectivos blocos, uma amostra que possuía dados nos laudos e nos prontuários inconsistentes, uma amostra por se tratar de metástase na região anal, uma por ser lesão intraepitelial anal e um bloco por apresentar o tecido degradado. Com isso, foram avaliadas 19 biópsias/peças cirúrgicas tumorais de carcinomas anal conservados em blocos de parafina provenientes do IMOAB.

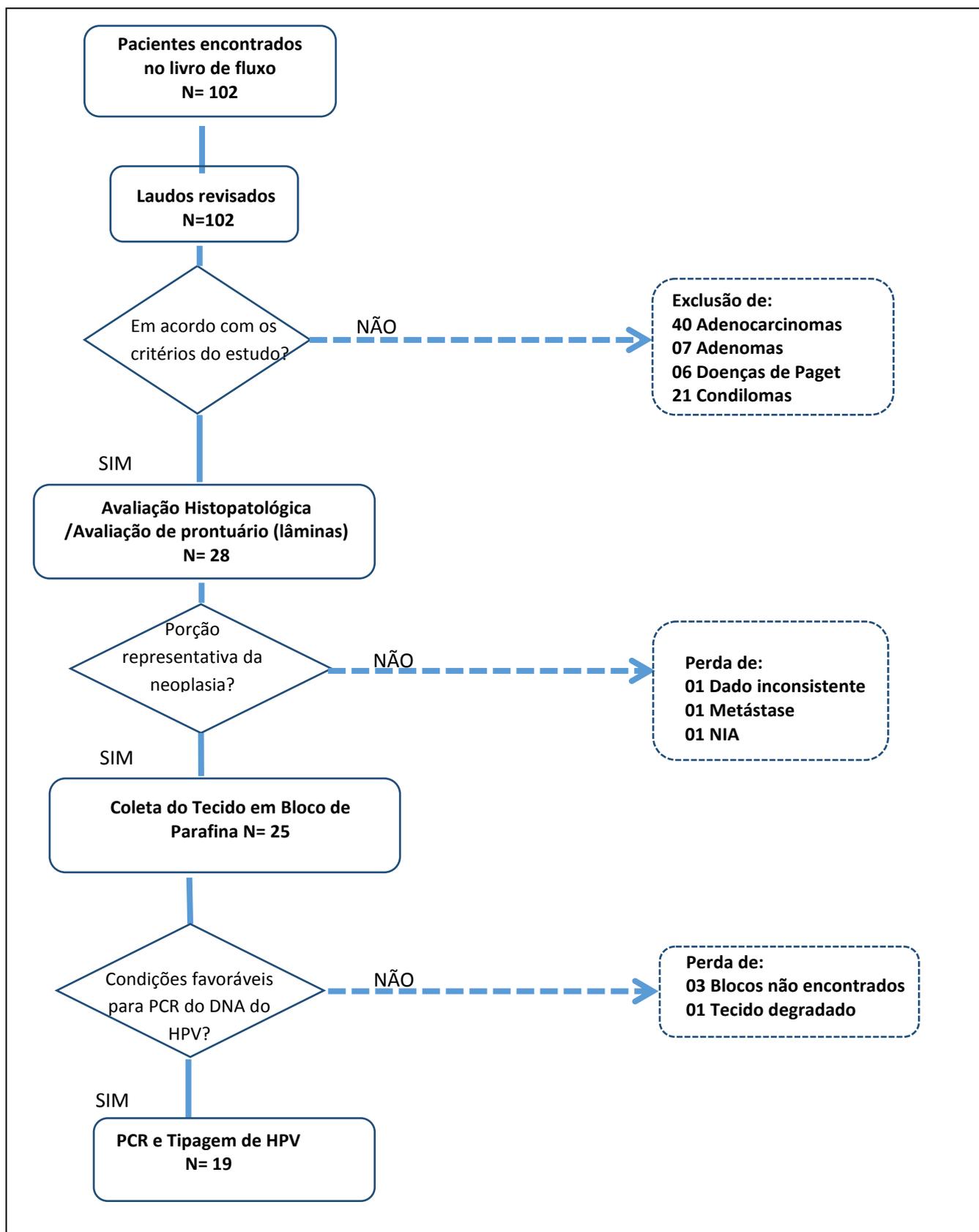


Figura 08. Fluxograma das amostras do IMOAB entre os anos de 2001 a 2011. Fonte: Elaborado pelo autor (2014).

4.4.2 Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão - Unidade Presidente Dutra (HUUFMA)

A figura 9 ilustra o fluxograma do processo de identificação e seleção das amostras. Inicialmente foram localizados 52 casos de neoplasias anais registrados nos livros de fluxo do Serviço de Anatomia Patológica do HUUFMA durante o período de 2001 a 2011. A partir desses livros, foi possível obter os números dos blocos parafinados e respectivos prontuários e laudos histopatológicos.

A partir da análise dos mesmos, foram excluídos do estudo 31 adenocarcinomas, 5 adenomas, e 6 condilomas, já que as duas primeiras variantes não apresentam relação causal com HPV e o último está classificado como lesão benigna. Excluiu-se um paciente por não ter sido encontrado seu respectivo bloco e um por ser lesão intraepitelial anal. Com isso, foram avaliadas biópsias/peças cirúrgicas tumorais de carcinomas anais de nove amostras de tecido conservados em blocos de parafina coletados na Divisão de Patologia do Hospital Universitário Presidente Dutra (HUUFMA).

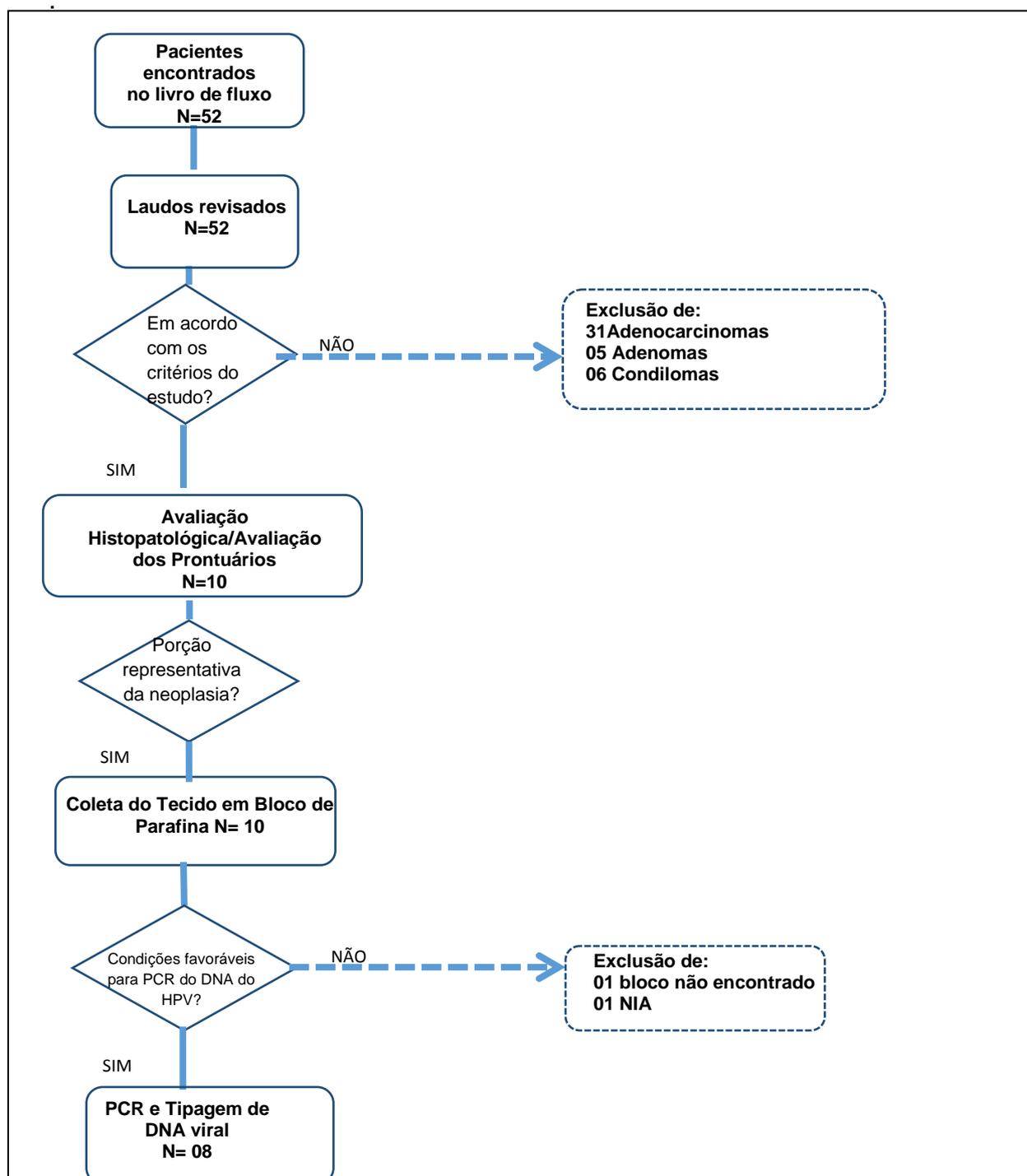


Figura 9. Fluxograma das amostras do HUUFMA com período de coleta entre os anos de 2001 a 2011. Fonte: Elaborado pelo autor (2014).

4.4.1 Definição das Variáveis

Foram consideradas as variáveis clínicas, histopatológicas e sociodemográficas. a) idade ao diagnóstico; b) profissão; c) sexo; d) estado civil; e) tabagismo; f) etilismo; g) tipo de amostra (biópsia ou peça cirúrgica); h) localização do tumor; i) tipo e tamanho da lesão; j) Grau de Broders (diferenciação); k) infiltração e invasão de estruturas e vasos; l) comprometimento linfonodal; m) presença de processo inflamatório crônico; n) presença de HPV; o) tipo de HPV; p) metástase.

A fim de padronizar as informações obtidas nos prontuários médicos foi gerada uma ficha com informações unificadas para ambas as instituições. (ANEXO I)

4.6 Obtenção de Tecidos fixados em formalina e emblocados em parafina

Foram utilizadas para a extração de DNA 15 seções com 5 μ m de espessura dos blocos contendo material de ressecção cirúrgica das peças e 20 seções de mesma espessura dos blocos contendo as biópsias, coletadas pelos técnicos na anatomia patológica. Os cortes foram armazenados em tubos de 2,0 mL a 4°C até a etapa seguinte que corresponde à desparafinização. (Figura 10)

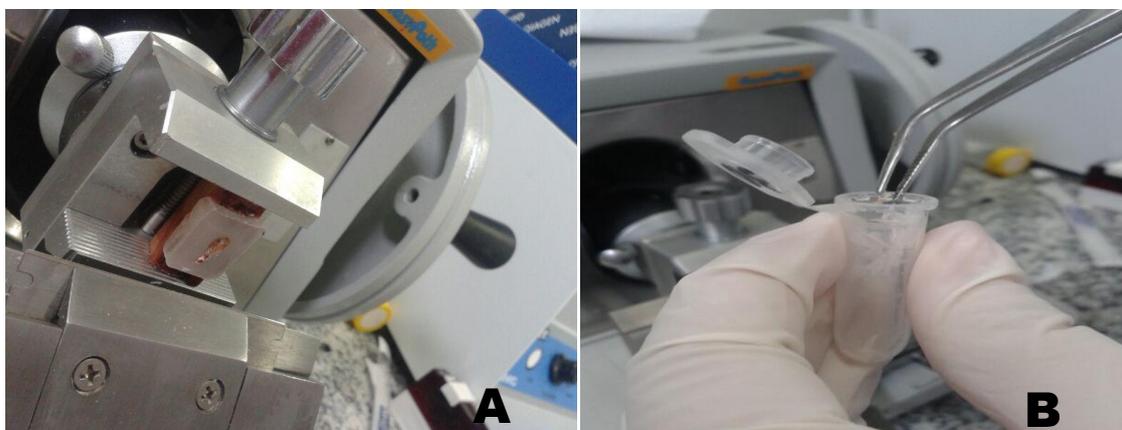


Figura 10. A- Corte de amostras em micrótomo. B- Armazenamento no tubo estéril das amostras cortadas pelo micrótomo. Fonte: Elaborado pelo autor (2014).

4.7 Desparafinização

A extração de DNA de blocos parafinados foi realizada a partir de tecido tumoral seccionados e depositados em tubos de 2mL. O processo de desparafinização consistiu na adição de 1mL de Xilol P.A (Vetec, RJ, Brasil) à amostra sendo esta homogeneizada vigorosamente em vórtex por aproximadamente 10 segundos. A mistura foi submetida à centrifugação a 14.000 rpm por 4 minutos. Esta etapa foi repetida por três ou quatro vezes. Caso a parafina ainda permanecesse, a amostra era aquecida a 55°C. O sobrenadante foi retirado e adicionado 1mL de Etanol P.A (Vetec, RJ, Brasil) seguido de homogeneização em vórtex e centrifugação a 14.000 rpm por 6 minutos. Novamente 1mL de Etanol foi adicionado à amostra, esta homogeneizada em vórtex e centrifugada a 14.000 rpm por 6 minutos. O sobrenadante foi retirado e a amostra centrifugada novamente a 14.000 rpm por 1 minuto para completa retirada do etanol. Os tubos foram abertos e incubados a 90°C no termomixer por 1 minuto para a evaporação do etanol se completar.

O processo de desparafinização consiste em adicionar 1mL de Xilol P.A (Vetec, RJ, Brasil) aos cortes, vortexar vigorosamente e centrifugar a 14.000 rpm por 4 minutos. Esta etapa foi repetida quatro vezes. Após a última centrifugação, o sobrenadante foi retirado, 1mL de etanol P.A (Vetec, RJ, Brasil) foi adicionado ao pellet e posteriormente centrifugado a 14.000 rpm por 6 minutos. Esta etapa foi repetida 5 vezes. Após remoção do sobrenadante, os tubos foram incubados a 90°C em banho seco para evaporação completa do etanol.

4.8.1 Extração de DNA Genômico de Tecido Parafinado

A extração do DNA foi realizada com o kit QIAamp DNA FFPE Tissue (QIAGEN, Valencia, CA) conforme especificado pelo fabricante. Após centrifugação breve, o pellet foi homogeneizado em solução contendo tampão ATL e proteinase K e incubado “overnight” a 56°C em termomixer.

Após a incubação, as amostras foram incubadas por mais 1 hora a 90°C. Posteriormente, foi adicionada a amostra uma solução contendo tampão AL e etanol P.A (96-100%). A solução foi transferida para a coluna e centrifugada a 8000 rpm, por 2min. Após a centrifugação, as amostras foram lavadas em tampão AW1, centrifugadas a 8000 rpm, por 2 min. e lavadas novamente em tampão AW2 para posterior centrifugação a 8000 rpm, por 2 min.

Após a centrifugação, foi aplicado Tampão ATE no centro da coluna e a amostra incubada nesta solução por 5 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, o tubo foi centrifugado a 14000 rpm, por 4 minutos e o DNA purificado armazenado a -20 °C até posterior utilização.

4.8.2 Quantificação de DNA

Para determinar a qualidade e a quantidade de DNA, uma alíquota de cada amostra (2µl) foi quantificada através da leitura de absorbância em espectrofotômetro Nanovue (GE) utilizando comprimento onda igual a 260nm. A pureza do DNA foi verificada a partir da leitura a 280 nm, para a detecção de uma eventual contaminação da amostra por proteínas. Quando a relações entre as densidades ópticas, A260/A280, foi igual ou maior que 1,7 o material foi considerado puro. A quantificação foi fornecida em ng/µl.

4.10 Detecção do gene da β -globina

A síntese do DNA por PCR é feita a partir de uma fita simples de DNA que é usada como molde para a síntese de novas cadeias complementares sob a ação da enzima DNA polimerase, que adiciona nucleotídeos presentes na reação segundo a fita-molde.

Amplificação do gene β -globina foi utilizada como controle da integridade do DNA obtido. A reação consistiu em um volume final de 25 µl contendo 80nM de cada primer, 2,5µl de tampão 10X, 1,5µl de cloreto de magnésio a 2mM, 0,2mM de dNTP e 0,5U de Taq Polimerase e água destilada estéril. (Quadro 03)

Dois microlitros do DNA extraído foram adicionados a 23 μ l da mistura de reação para PCRe submetido à reação de amplificação do gene β -globina, utilizando os iniciadores PCO3 e PCO4.

O produto das reações foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X. Uma alíquota de 5 μ l de DNA foi homogeneizada em uma solução de tampão de carregamento (Sigma-Aldrich, USA) e corante 0,1% de Gel Red sendo toda a mistura aplicada no gel. A eletroforese foi realizada por 35 minutos a 5 V/cm² em cuba horizontal (Life Technologies, EUA). Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta (BIO-RAD Laboratories, EUA).

4.11 Genotipagem por Hibridização reversa

Esse procedimento é um ensaio de sondas em linha (tiras), para diagnóstico *in vitro* concebido para a identificação de 28 genótipos diferentes do vírus do HPV através da detecção de sequências específicas na região L1 do genoma HPV.

4.11.1 Amplificação do DNA extraído

Esse procedimento foi realizado em parceria com o Instituto do HPV da Santa Casa de São Paulo (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia das Doenças do Papilomavirus Humano). A detecção de DNA do HPV foi realizada utilizando-se os *primers*SPF₁₀ que amplificam um fragmento de 65pb da região L1 dos HPV de baixo e de alto risco. Esse primer está protegido pela patente EP 1012348B da Innogenetics, a patente norte-americana 6,482,588B e equivalentes estrangeiras (integrante do kit INNO - LiPA HPV GenotypingExtraAmp).

O mix para PCR foi preparado com os tampões fornecidos pelo fabricante. Foi preparado um Master MIX considerando a quantidade de amostra de cada bateria de exame, incluindo um controle positivo e um controle negativo. Para cada amostra foi pipetado em um tubo de 0,5ml, 37,7 μ l do reagente AMP MIX, 2,3 μ l mais do reagente do ENZ MIX e 10 μ l do DNA. Foi distribuído 40 μ l da

mistura em cada tubo e adicionado 10µl da solução de DNA em concentração final de 100ng/µl. Os tubos foram homogeneizados e agitados no vórtex antes do uso. As amostras colocadas em termociclador (Biocycler) para amplificação. (Quadro 03)

Foi analisada a qualidade da PCR pelo procedimento de observação dos produtos de amplificação em gel de agarose 1,5%. Foram consideradas positivas as amostras que continham o fragmento amplificado.

Quadro 3. Descrição dos programas de amplificação do DNA do HPV e do gene da β -globina. Fonte: Elaborado pelo autor (2014)

Programa		SFP ₁₀ (Região L1)		β -globina	
		Tempo	°C	Tempo	°C
Desnaturação Inicial		10 min	37	5 min	95
01 ciclo	Ciclo extra	9 min	94	----	----
		----	----	----	----
		----	----	----	----
40 ciclos	Desnaturação	30s	94	1 min	95
	Anelamento	45s	52	1 min	55
	Extensão	45s	72	1 min	72
Extensão Final		7 min	72	5 min	72

4.11.2 Hibridização na membrana de nitrocelulose e revelação da cor

Esse procedimento foi realizado em parceria com o Instituto do HPV da Santa Casa de São Paulo. Inicialmente foi adicionado na canaleta um volume de 10µl da solução de desnaturação e misturado com um volume de 10µl do produto amplificado e incubado por 5 min a temperatura ambiente. Para cada amostra foi retirada com pinça estéril uma tira com uma linha roxa de marcação e sondas imobilizadas, identificada com o número da amostra e posicionada na canaleta para continuação do teste.

Posteriormente, as tiras foram colocadas nas canaletas presentes no suporte do exame e inserida no equipamento automatizado Autoblot 3000-H. Esse equipamento funciona com programação de nove etapas para revelação das tiras.

O Step 1 – Solução de hibridização usa uma temperatura de 49°C por 1h com volume de 2ml, agitação média, com apenas um ciclo e finalizando com aspiração. O Step 2 – Solução de lavagem estrigente usa uma temperatura de 49°C por 1min com volume de 2ml, agitação média, em dois ciclos e finalizando com aspiração. O Step 3 – Solução de lavagem estrigente usa uma temperatura de 49°C por 30min com volume de 2ml, agitação média, com apenas um ciclo e finalizando com aspiração. O Step 4 – Solução de lavagem 5X RINSE a temperatura ambiente por 1min com volume de 2ml, agitação média, em dois ciclos e finalizando com aspiração. O Step 5 – Conjugado (estreptavidina-peroxidase) a temperatura ambiente por 30min com volume de 2ml, agitação média, em um ciclo e finalizando com aspiração. O Step 6 – Solução de lavagem 5X diluído a temperatura ambiente por 1min com volume de 2ml, agitação média, em um ciclo e finalizando com aspiração. O Step 7 – Solução do substrato a temperatura ambiente por 1min com volume de 2ml, agitação média, em dois ciclos e finalizando com aspiração. O Step 8 – Adiciono o substrato a temperatura ambiente por 30min com volume de 2ml, agitação média, em um ciclo e finalizando com aspiração. O Step 9 – Solução de lavagem 5X RINSE a temperatura ambiente por 3min com volume de 2ml, agitação média, em dois ciclos e finalizando com aspiração.

4.11.3 Interpretação do sinal padrão visual

Depois da hibridização e da lavagem rigorosa, a estreptavidina conjugada com fosfatase alcalina é adicionada e liga-se a quaisquer híbridos com biotina formados anteriormente, dessa forma as sondas imobilizadas como linhas paralelas nas tiras de membrana são reveladas. A incubação com o cromógeno produz um precipitado púrpura que pode ser interpretado visualmente ou com o software LiRAS® para LiPA HPV. O iNNO LIPA pode identificar 28 genótipos do

HPV (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 74, 82).(Figura 11)

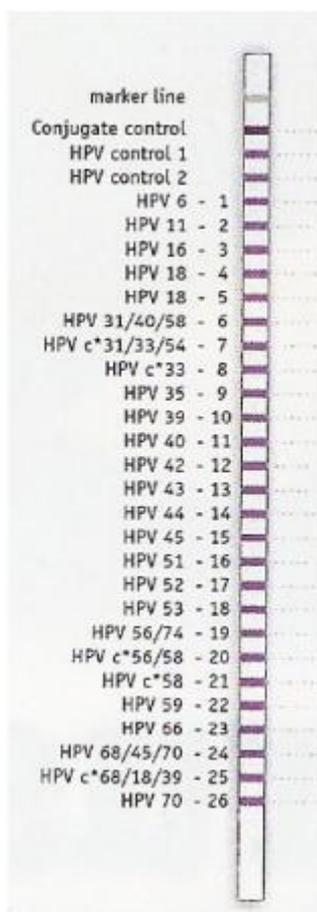


Figura 11. Tiras com sondas imobilizadas do KitiNNo-LiPA™ HPV.
 Fonte: manual do INNo –LiPaAssayGenotyping extra (2014).

4.12 Aspectos éticos:

Esta pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUUFMA, segundo o parecer consubstanciado de nº 348.397 atendendo os requisitos fundamentais da Resolução do CNS/MS nº 466/12 itens III.2 “i” e IV.3 “e” e suas complementares (ANEXO II e ANEXO III).

4.13 Análise estatística

O Banco de Dados da pesquisa foi tabulado no aplicativo Microsoft Office® Excel 2010. Para cálculos de frequências, médias, medianas, desvio padrão, mínimo e máximo das variáveis utilizou-se o programa EpiInfo 7.

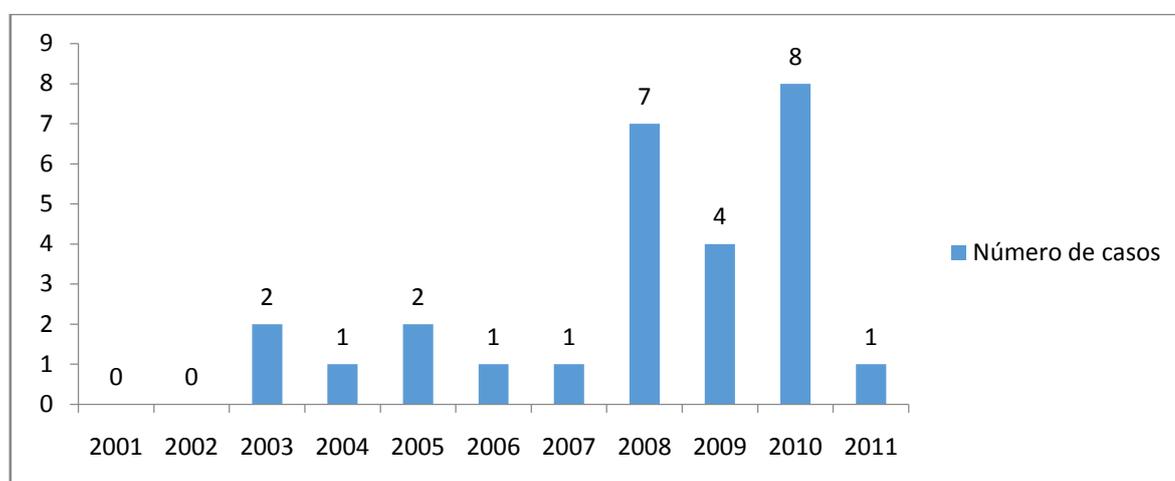
A análise descritiva das variáveis categóricas foi feita por meio da distribuição de frequências. Para as variáveis numéricas, foram utilizadas médias, mediana, desvio padrão, valor mínimo e máximo e intervalo de confiança. Tabelas e gráficos foram construídos após a análise descritiva.

Para a avaliação da relação entre os dados epidemiológicos e clínicos e a presença de HPV, foi utilizado o teste Qui-quadrado, sendo os resultados considerados estatisticamente significativos 5% de probabilidade $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Dos 154 casos inicialmente reunidos, vinte e sete atenderam aos critérios de inclusão nessa pesquisa (Gráfico 1). Sendo caracterizada uma maior prevalência entre os anos de 2008 a 2010. Acredita-se que a intensificação de campanhas para triagem de lesões cancerígenas em homens e mulheres nesses anos durante os meses de outubro e novembro tenham oportunizado o maior número de diagnóstico nesse período.

Gráfico 1. Número de casos de pacientes do IMOAB e do HUUFMA incluídos na pesquisa ao longo dos anos de 2001 a 2011, São Luís, MA, Brasil.



Foram avaliadas amostras de tecidos parafinados de 27 carcinomas de células escamosas anais nas duas instituições pesquisadas. Foram observados apenas dois pacientes com amostras de lesão intraepitelial anal (Tabela 04). A escassez de diagnósticos de lesão intraepitelial anal pode sugerir busca tardia pelos pacientes de orientação/tratamento médico. Todos os dados foram coletados dos prontuários médicos, laudos e livros de fluxos das instituições envolvidas.

Tabela 04. Procedência dos pacientes pesquisados no HUUFMA e no IMOAB, São Luís, MA - Brasil.

	N	%
Procedência Hospitalar	154	100
HUUFMA (2001-2011)	52	37,77
IMOAB (2001-2011)	102	62,23
Incluídos	27	100
HUUFMA (2001-2011)	08	29,63
IMOAB (2007-2011)	19	70,37
Não Incluídos	118	100
HUUFMA (2001-2011)	42	35,60
IMOAB (2007-2011)	76	64,40
Excluídos/Perdas	09	100
HUUFMA	02	22,22
IMOAB	07	77,78

A faixa etária dos 27 pacientes acometidos pelotumor variou de 32 a 85 anos de idade, com média de 54,96 anos, desvio padrão de $\pm 15,81$ e mediana de 51 anos, sendo a faixa etária mais prevalente compreendida entre 42 e 52 anos de idade (Gráfico 02).

Dos pacientes envolvidos na pesquisa 74,07% (20/27) eram do sexo feminino. Considerando alguns fatores de risco foram relatados entre os pacientes 14,81% fumantes ativos e 7,41% eram ex-fumantes. Quanto à ingestão de bebida alcoólica 7,41% relataram que bebiam com frequência, 3,7% eram ex-etilista e 48,15% negavam a ingestão de álcool. Não foi relatado o uso de drogas endovenosas. (Tabela 05)

Poucos dados sócio - demográficos dos participantes da pesquisa foram avaliados. Esse fato ocorreu devido à ausência de informação nos prontuários. Os dados associados com o comportamento sexual e orientação, como o número de parceiros, idade da primeira relação sexual e prática de sexo anal receptivo não foi relatado nos registros médicos.

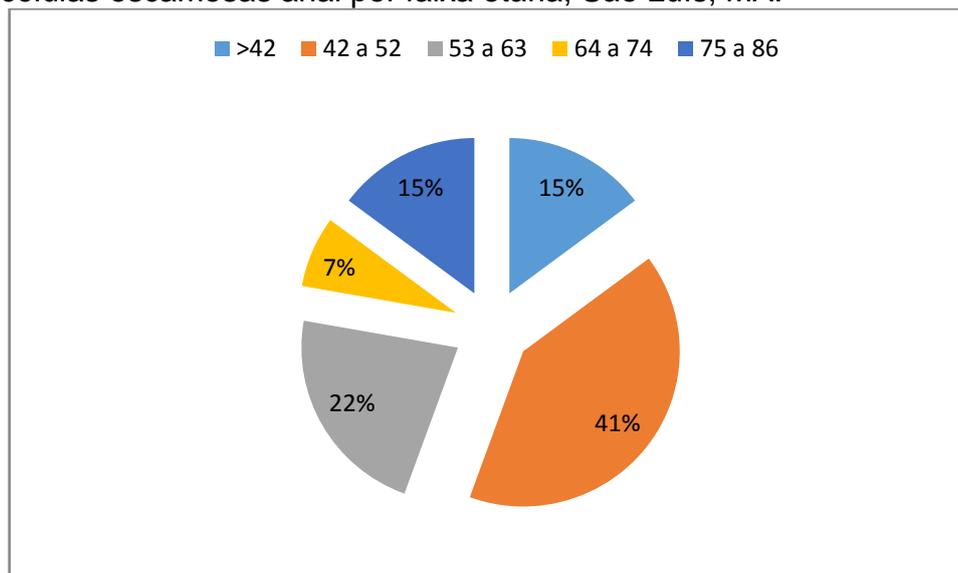
Em apenas um prontuário constava o caso de relação sexual com 10 parceiros sexuais durante sua vida, e em dois, mulheres casadas não faziam coito anal. No acompanhamento de dois casos fora solicitado os exames laboratoriais de VDRL e HIV, os quais apresentaram sorologia não reagente.

Em virtude de dados incompletos nos prontuários, apenas 11,11% (3/27) foram avaliados pela cor da pele, todos da raça negra. Entre os dados 29,62% afirmaram ter uma atividade profissional ativa e remunerada, 18,53% eram aposentados e 37,04% eram donas de casa.

Tabela 05. Características sócio-demográficas de 27 pacientes estudados com diagnóstico de neoplasia anal, provenientes de dois hospitais de referência de São Luís, MA, Brasil.

	N=27	100%
Sexo		
Feminino	20	74,07
Masculino	07	25,93
Idade ao Diagnóstico		
Idade média	54,96 DP±15,81	
≤42	04	14,81
42-52	11	40,75
53-63	06	22,22
64-74	02	7,41
75-86	04	14,81
Local ao diagnóstico		
São Luís	22	81,48
Outros municípios	04	17,24
Sem Informação	01	3,45
Atividade profissional		
Aposentado	05	18,53
Doméstica	02	7,41
Do Lar	10	37,04
Faturista	01	3,7
Lavrador	04	14,81
Pescador	01	3,7
Sem Informação	04	14,81
Tabagismo		
Sim	04	14,81
Não	11	40,74
Ex-fumante	02	7,41
Sem informação	10	37,04
Etilismo		
Sim	02	7,41
Não	13	48,15
Ex-etilista	01	3,7
Sem informação	11	40,74

Gráfico 02. Frequência de pacientes diagnosticados com carcinoma de células escamosas anal por faixa etária, São Luís, MA.



Entre os pacientes pesquisados, 14, 81% (4/27) relatam ser do estado civil casado, 3,7% (1/27) é viúvo e 3,7% (1/27) é solteiro com voto de celibato, e 85,18% (23/27) não responderam ou não foram questionados sobre essa variável. Entre os pacientes 81,48% (22/27) relataram moradia atual na capital São Luís e 14,81% (4/27), em outros municípios do Estado do Maranhão.

Dentre as 27 amostras, 16 tiveram como material de diagnóstico a biópsia, 10 foram representados por peça cirúrgica e 01 proveniente de exérese. Em relação aos aspectos clínico-patológicos, a lesão predominantemente encontrada foi a do tipo vegetante aliada à ulcerada com 22,22%, seguida da ulcerada de forma isolada (14,81%), e depois a vegetante isolada (7,41%). Não foi possível avaliar o tipo de lesão em 51,85 % dos casos, pois não constavam esses dados nos laudos ou prontuários. (Tabela 06)

Quanto à localização do tumor foi observada maior ocorrência na região do canal anal de forma isolada com 70,37%, seguida do canal anal mais borda anal com 18,52% e apenas borda anal com 11,11%.

Na investigação da história clínica, observou-se presença de dor em região analem 29,63% (8/27), sangramento/hematoquezia em 25,92% (7/27), sensação de corpo estranho em região analem 11,11% (3/27) e constipação em

14,81% (4/27). Apresentaram nódulo e dificuldade ao defecar 7,41% (2/27) dos pacientes.

A frequência de 3,7% (1/27) foi semelhante nas queixas de mudança das características das fezes, prurido anal, dor abdominal, lesão anal visível, enterorragia, hemorróidas, perda de apetite, falta de memória, diurese, aumento das evacuações, fístula, secreção anal, prurido, condiloma e processo inflamatório crônico. Ainda foi observado que 24,14% dos casos não apresentaram queixas iniciais.

Tabela 06. Características clínico-histopatológicas das amostras de carcinomas dos 27 pacientes atendidos em São Luís, MA, Brasil.

	N	100%
Origem do bloco parafinado	27	100
Biópsia	16	59,26
Peça cirúrgica	10	37,04
Exérese	01	3,7
Variante histológica	27	100
<i>In situ</i>	03	11,11
Invasivo	18	66,67
Sem informação	06	22,22
Localização	27	100
Borda Anal	03	11,11
Canal Anal	19	70,37
Borda e Canal Anal	05	18,52
Lesão predominante	27	100
Ulceração	04	14,81
Vegetação	02	7,41
Ulceração + Vegetação	06	22,22
Estenosante	01	3,7
Sem Informação	14	51,85
Tamanho da lesão (0,3-9cm)	27	100
≤0,5	01	3,7
0,6-2,0	08	29,63
2,1-5,0	15	55,56
≥5,1	03	11,11

O tamanho das lesões variou de 0,3 a 9,0 cm, com predominância no intervalo de 2,1 – 5,0 cm, em 55,56% (15/27) das amostras. Segundo o Grau de Broders, 22,22% dos tumores foram classificados como bem diferenciados, 70,38% apresentaram-se moderadamente diferenciados, 3,7% indiferenciados e, 3,7% diferenciados.

Quanto ao estadió, houve uma leve variaçãó: dois pacientes eram estadió I, dois estadió II e nove eram estadió III. Doze pacientes foram submetidos a quimioterapia com 5-fluorouracil (5-FU) e mitomicina, nas dosagens de 8 – 13mg por infusãó contínuá do 1º ao 4º dia, combinada a radioterapia em pelve e iguinais. A radioterapia utilizada foi externa com toxicidade de leve a moderada, sendo leucorréia, anemia, cefaléia, náuseas, vômitos, ardência anal como as principais queixas relatadas.

Duas pacientes foram encaminhadas à cirurgia abdmoninoperineal para ressecçãó do tumor residual ou recidiva. A doença foi considerada irressecável em uma delas, sendo submetido a novas sessões de quimioterapia com 5-FU e mitomicina e em seguida a tratamentos paliativos. As informações contidas nos prontuários não permitiram o acompanhamento da sobrevida e/ou desfecho de óbito.

A tabela 07 demonstra as características do desenvolvimento do carcinoma. Oito casos apresentaram infiltraçãó em, pelo menos, uma das seguintes estruturas: parede do canal anal, região perianal, vagina e colo do útero, região estromal e região vulvar.

Foram detectadas cinco pacientes com presença de algum processo inflamatório na lesãó. Foram observados sete casos de comprometimento linfonodal e dois casos em processo de necrose.

Comprometimentos dos linfonodos foram encontrados em 25,93%. Três pacientes apresentaram metástase, sendo duas destas à distância localizadas uma na região do fígado e a outra na região do reto e da vagina.

Tabela 7. Características do desenvolvimento do carcinoma anal dos 27 pacientes estudados com diagnóstico de carcinoma de células escamosas anal, provenientes dos dois hospitais de referência de São Luís, MA, Brasil.

	N = 27	100%
Agrupamento de Estádio UJCC/TNM		
Estádio I	02	7,41
Estádio II	02	7,41
Estádio III	09	33,33
Estádio IV	0	0
Sem Informação	14	51,85
Grau do Tumor		
Bem Diferenciado	06	22,22
Moderadamente Diferenciado	19	70,38
Pouco Diferenciado	01	3,7
Indiferenciado	01	3,7
Invasão		
Sim	09	33,33
Não	12	44,45
Sem Informação	06	22,22
Local da Infiltração		
Parede do canal anal	01	3,7
Região Perianal	01	3,7
Gordura Periretal	01	3,7
Vagina e Colo do Útero	01	3,7
Estromal	01	3,7
Camada Muscular	01	3,7
Perineural	01	3,7
Vulvar	01	3,7
Sem Informação	01	3,7
Não infiltrou	18	66,7
Comprometimento de linfonodos		
Sim	07	25,93
Não	15	55,55
Sem Informação	05	18,52
Metástase		
Sim	03	11,11
Não	19	70,37
Sem informação	05	18,52
Processo inflamatório		
Sim	05	18,52
Não	12	44,44
Sem Informação	10	37,04
Presença de necrose		
Sim	02	7,41
Não	12	44,44
Sem Informação	13	48,15

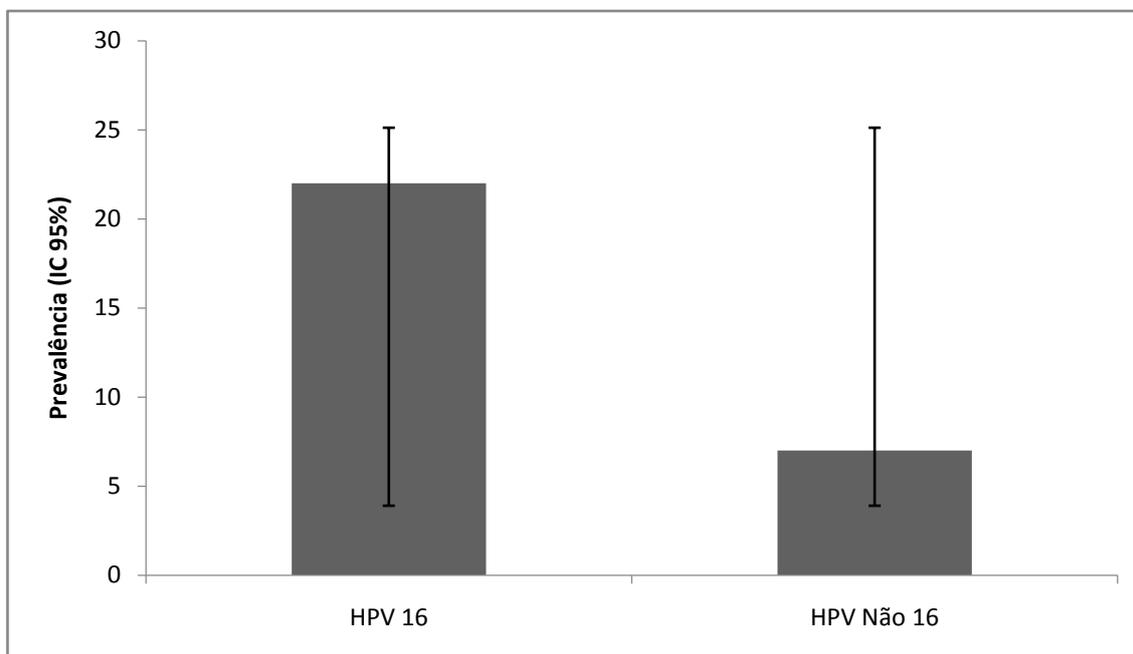
As amostras de DNA dos tumores foram enviadas ao Instituto do HPV onde se procedeu a detecção viral e genotipagem pela técnica de hibridização reversa. O DNA do HPV foi detectado em 81,48% (22/27 - $p=0,00001$) das amostras de neoplasias anais. A genotipagem revelou que, dentre as amostras, 100% estavam infectadas com tipos virais de alto risco oncogênico, sendo o HPV 16 encontrado em todas das amostras positivas (Tabela 8).

Tabela 8. Infecção e prevalência do vírus HPV em neoplasias anais dos 27 pacientes provenientes de dois hospitais de referência de São Luís, MA, Brasil.

	N	100%
Neoplasias	27	100
HPV +	22	81,48
HPV -	05	18,52
Tipos de HPV	22	100
HPV 11	07	31,81
HPV16	22	100
HPV18	03	13,63
HPV29	01	4,54
HPV39	02	9,09
HPV45	01	4,54
HPV52	05	
HPV59	01	4,54
HPV66	01	4,54
HPV68	02	9,09

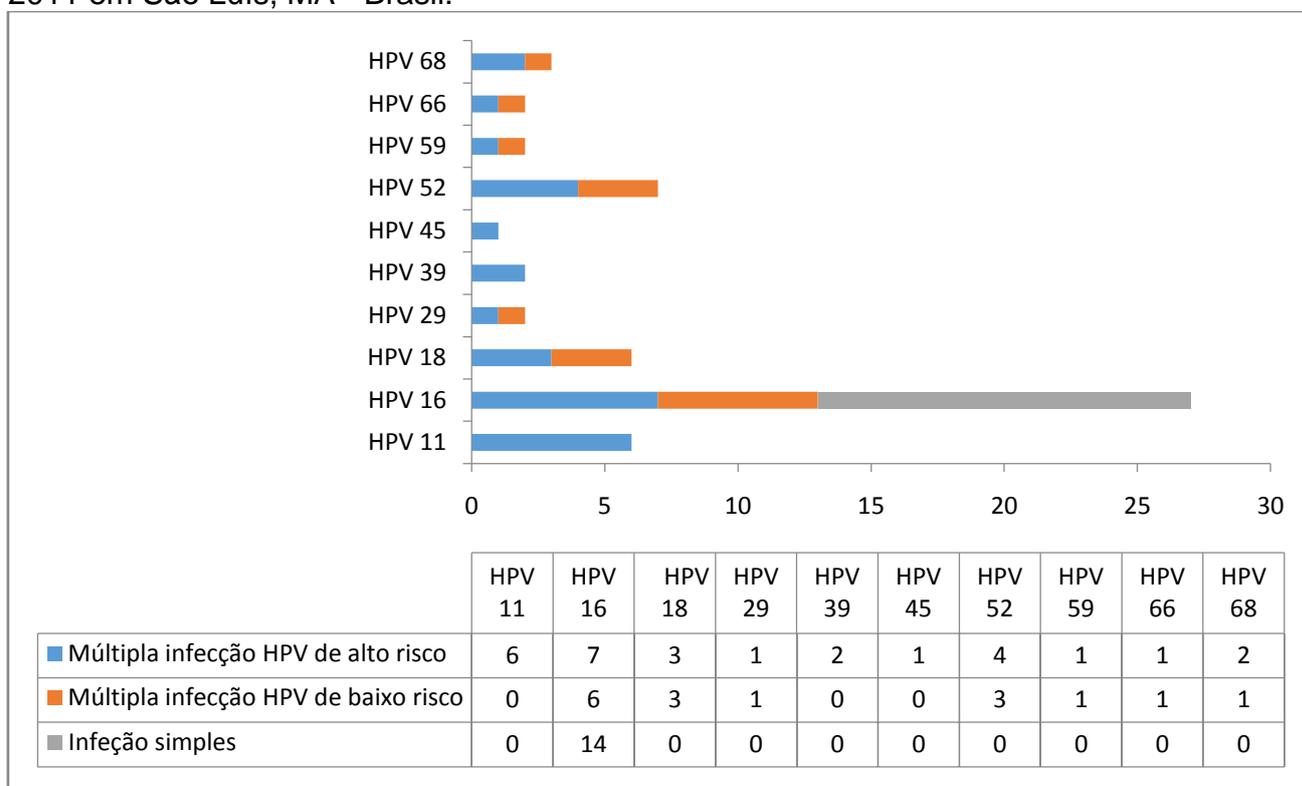
Dentre os tipos virais de alto risco, estavam presentes também os tipos 18, 29, 39, 45, 52, 59, 66 e 68. O HPV do tipo 11 foi o único de baixo risco detectado. (Gráfico 03)

Gráfico 03. Prevalência do HPV 16 e do HPV Oncogênico não 16 nas amostras de carcinoma anal de células escamosas coletadas nos serviços de patologia do HUUFMA e do IMOAB em São Luís – janeiro de 2001 a dezembro de 2011.



O procedimento revelou que, dentre as amostras, 50,09% (12/22) estavam infectadas com apenas um tipo viral (infecção simples), sendo o HPV 16 de alto risco oncogênico encontrado em todas essas infecções. As infecções múltiplas apresentaram 45,45% (10/22) de prevalência na amostra estudada. (Gráfico 04)

Gráfico 04. Tipos de HPV distribuídos por infecção simples e múltipla nas amostras de carcinomas anal dos pacientes atendidos entre os anos de 2001 a 2011 em São Luís, MA - Brasil.



As Tabelas 08 e 09 demonstram que não houve associação ($p < 0,05$) entre a infecção pelo vírus do HPV e as variáveis sócio-demográficas e clínico-histopatológicas (sexo, idade, localização, lesão predominante, tamanho da lesão, tipo histológico, estadiamento UJCC, grau de diferenciação, invasão, infiltração, comprometimento de linfonodos e processo inflamatório) estudadas.

Tabela 9. Associação entre a variável sexo com características clínico-histopatológicas ea infecção pelo vírus do HPV, em São Luís, MA, Brasil.

	HPV (+) N=20	HPV(-) N=7	p-valor
Sexo			0,1751^a
F	15	05	
M	05	02	
Localização			0,2386^a
Margem Anal	03	-	
Canal Anal	15	05	
Margem e Canal Anal	03	03	
Lesão predominante			0,7809^a
Ulceração	03	01	
Vegetação	02	-	
Ulceração + Vegetação	05	01	
Estenosante	01	0	
Sem informação	10	06	
Tamanho da lesão			0,3657^a
≤0,5	-	01	
0,6-2,0	06	02	
2,1-5,0	11	04	
≥5,1	03	-	
Sem informação			

*Valores significativos $p < 0,05$.^aTeste Exato de Fisher.

A Tabela 10 demonstra que não houve associação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre a infecção pelo vírus do HPV e o desenvolvimento do carcinoma anal com amostra considerada na pesquisa.

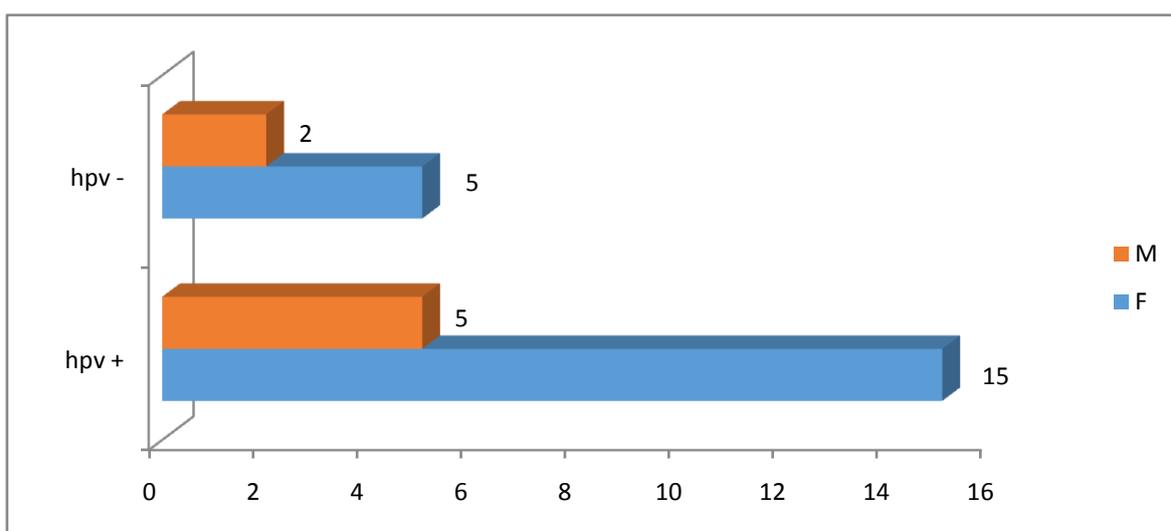
Tabela 10. Associação entre as características do desenvolvimento do carcinoma anal e a infecção pelo vírus do HPV, São Luís, MA, Brasil.

	HPV (+) N=20	HPV (-) N=7	p-valor
Agrupamento de Estádio UJCC/TNM			0,7542
Estadio I	-	01	
Estadio II	02	-	
Estadio III	09	-	
Estadio IV	-	-	
Sem Informação	09	06	
Comprometimento dos linfonodos			0,3133
Sim	07	-	
Não	11	05	
Sem Informação	02	02	
Processo inflamatório			0,3017
Sim	03	02	
Não	12	02	
Sem Informação	06	04	

*Valores significativos $\leq 0,05$. Teste q-quadrado

O Gráfico 05 mostra distribuição da infecção pelo HPV segundo o sexo em pacientes diagnosticados com carcinoma de células escamosas de região anal. A infecção pelo papilomavírus humano foi predominante no sexo feminino acometendo 15 das 20 mulheres diagnosticadas. Entre os homens foi detectado DNA viral em cinco dos sete casos diagnosticados.

Gráfico05. Distribuição da infecção pelo HPV segundo o sexo, nas amostras de carcinoma de células escamosas, em São Luís, MA, Brasil.



REFERENCIAS

ABBASAKOOR F, BOULOS PB. Anal intraepithelialneoplasia.**Br J Surg**(2005);92:277–290.

ABRAMOWITZ L, JACQUARD AC, JAROUD F, et al. Human papillomavirus genotype distribution in anal cancer in France: the EDITH V study. **Int J Cancer**.(2011);129:433–9.

ADAM B. RAFF, ANDREW W. WOODHAM, LAURA M. RAFF, JOSEPH G. SKEATE, LISA YAN, DIANE M. DA SILVA, MARIO SCHELHAAS, W. MARTIN KAS. The Evolving Field of Human Papillomavirus Receptor Research: a Review of Binding and Entry. **J of Virol**(2013) p. 6062–6072 June Volume 87 Number 11

AJANI JA, WINTER KA, GUNDERSON LL, et al: Prognostic factors derived from a prospective database dictate clinical biology of anal cancer: the intergroup trial (RTOG 98-11). **Cancer** (2010) 116:4007–4013.

ALEMANY L, SAUNIER M, ALVARADO-CABRERO I, QUIROS B, SALMERON J, SHIN HR, PIROG EC, GUIMERA N, HERNANDEZ-SUAREZ G, FELIX A, CLAVERO O, LLOVERAS B, KASAMATSU E, GOODMAN MT, et al. Human papillomavirus DNA prevalence and type distribution in anal carcinomas worldwide. **Int J Cancer**(2014).

American Joint Committee on Cancer (AJCC) Cancer Staging Manual, 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1997.

AMIRIAN ES, FICKEY PA JR, SCHEURER ME, CHIAO EY. Anal Cancer Incidence and Survival: Comparing the Greater San-Francisco Bay Area to Other SEERCancer Registries. **PLoS ONE**(2013) 8(3): e58919. doi:10.1371/journal.pone.0058919

BERRY JM, PALESFKY JM, JAY N, CHENG SC, et al. Performance characteristics of anal cytology and human papillomavirus testing in patient of high-resolution anoscopy-guided biopsy of high-grade anal intraepithelial neoplasia. **DisColonRectum**(2009).Feb 52 (2): 239 – 47.

BOCCARDO E, VILLA LL. Virus e Câncer. In: Ferreira CG, da Rocha JCC. **Oncol Mol**. São Paulo. Atheneu, 2004; 1ed. p. 123-132.

BOMAN, B. M., MOERTEL, C. G., O'CONNELL, M. J., SCOTT, M., WEILAND, L. H., BEART, R. W., GUNDERSON, L. L., and SPENCER, R. J. Carcinoma of the anal canal. A clinical and pathologic study of 188 cases. **Cancer**(1984); 54[1], 114-125.

BOUVARD V, BAAN R, STRAIF K, et al. A review of human carcinogens Part B: biological agents. **Lancet Oncol**(2009); 10(4): 321–322.

BROOMALL EM, REYNOLDS SM, JACOBSON RM. Epidemiology, clinical manifestations, and recent advances in vaccination against human papillomavirus. **PostgradMed**(2010);122(2):121-9.

BOSCH FX, LORINCZ A, MUNOZ N, MEIJER CJ, e SHAH KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **JClinPathol**(2002);55[4], 244-265.

BOYER SN, WAZER DE, BAND V. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitinproteasome pathway. **Cancer Res**(1996);56: 4620-24

BURD EM. Human Papillomavirus expression in oral mucosa premalignant conditions and squamous cell carcinoma: a retrospective review of the literature. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod**(1996); 82:57-68.

CALORE EE, NADAL SR, MANZIONE CR, CAVALIERE MJ, VILELA ALMEIDA L, VILLA LL. Expression of Ki – 67 can assist in predicting recurrences of low-grade anal intraepithelial neoplasia in AIDS. **DisColonRectum**(2001);44:534-537.

CAREY DJ. Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. **BiochemJ**(1997); 327(Pt 1):1–16.

CASADEI GARDINI A, CAPELLI L, ULIVI P, GIANNINI M, FREIER E, et al. KRAS, BRAF and PIK3CA Status in Squamous Cell Anal Carcinoma (SCAC). **PLoS ONE**(2014); 9(3).

Centers for Disease Control and Prevention (CDC).[Internet]. HPV-Associated Anal Cancer Rates by Race and Ethnicity.[cited 2010]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/cancer/hpv/statistics/anal.htm>. Acesso em 20 jun 2014.

CHOI Y, CHUNG H, JUNG H, COUCHMAN JR, OH ES.. Syndecans as cell surface receptors: unique structure equates with functional diversity. **Matrix Biol.** (2011) 30:93–99.

CLARK MA, HARTLEY A, e GEH JI. Cancer of the anal canal. **Lancet Oncol**(2004); 5[3], 149-157

COUPLÉE F, GRAVITT P, KORNEGAY J, HANKINS C, RICHARDSON H, LAPOINTE N, VOYER H, FRANCO E. Use of PGMV Primers in L1 Consensus PCR Improves Detection of Human Papillomavirus DNA in Genital Samples. **J Clin Micro**(2002), p. 902–907

CUMMINGS BJ, AJANI JA, SWALLOW CJ. Cancer of the anal region, in DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds). **Cancer: Princ And Pract Oncol**(2004); 7th Ed. Philadelphia, PA, Lippincott, Williams and Wilkins, pp 1125 -1136.

CUMMINGS BJ. Current management of anal canal cancer. **Semin Oncol** (2005); 32[6 Suppl 9], S123-S128.

DALING JR, MADELEINE MM, JOHNSON LG, et al. Human papillomavirus, smoking, and sexual practices in the etiology of anal cancer. **Cancer**(2004); 101:270–80.

DIAMOND C, TAYLOR TH, ABOUMRAD T, BRINGMAN D, ANTON-CULVER H. Increased incidence of squamous cell anal cancer among men with AIDS in the era of highly active antiretroviral therapy. **Sex Transm Dis**(2005); 32:314–320. [PubMed: 15849533]

DOORBAR J. The papillomaviruses life cycle. **J Clin Virol**(2005);32:Suppl1:S7- 15.

DURAESLC e SOUSAJB. Câncer anal e doenças sexualmente transmissíveis: qual a correlação?. **Rev Col Bras Cir** [online]. 2010, vol.37, n.4 [acesso em: 2014-08-15],pp.265-268. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010069912010000400005&lng=en&nrm=iso>. ISSN 0100-6991.

ECHENIQUE I, & PHILLIPS BR. Anal warts and anal intradermal neoplasia. **Clinics in ColoRect Surg**(2011); volume 24, number 1.

ELENIUS K, VAINIO S, LAATO M, SALMIVIRTA M, THESLEFF I, JALKANEN M. Induced expression of syndecan in healing wounds. **J Cell Biol**(1991).114:585–595.

ESIASHVILI N, LANDRY J, MATTHEWS RH. Carcinoma of the anus: strategies in management. **Oncol** (2002);7:188–99.

FENGER C, FRISCH M, MATI MC, PARC R. Tumors of the canal anal. HAMILTON SR, AALTONEN LA in WHO Classification of tumors. Pathology and genetics of tumors of the digestive system. Lyon, France: **Inter Agenc Research on Cancer** (IARC), 2002. 146-55.

FERREIRA W, SOUSA J. **Microbiologia**2002. Volume3. LIDEL, Lisboa.

FINNEN RL, ERICKSON KD, CHEN XS, GARCEA RL. Interactions between Papillomavirus L1 and L2 Capsid Proteins.**J Virol**(2003); 77: 1410-4826.

GALLEN M, PLA J, MIGUEL A, IBEAS R, CHARLES J, FABREGAT X. Anal carcinoma: a 14 year experience. **Rev Esp Enferm Dig** (1997);89:23-8.

GENTHER SM, STERLING S, DUENSING S, MÜNGER K, SATTLER C, LAMBERT PF. Quantitative role of the human Papillomavirus type 16 E5 gene during the productive stage of the viral life cycle. **J Virol**(2003);77(5):2832-42.

GERAD JP, CHAPET O, SAMIEI F, MORIGNAT E, ISAAC S, PAULIN C, ROMESTAING P, FAVREL V, MORNEX F, BOBIN JY. Management of inguinal lymph node metastases in patients with carcinoma of the anal canal: experience in a series of 270 patients treated in Lyon and review of the literature. **Cancer** (2001); 92[1], 77-84.

GERVAZ P, HAHNLOSER D, WOLFF BG, ANDERSON SA, CUNNINGHAM J, BEART RW JR, KLIPFEL A, BURGART L, THIBODEAU SN. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the anus: a comparison of HIV-positive and HIV-negative patients. **J Gastrointest Surg**(2004);8:1024-30.

GIRALDO P, JACYNTHO C, COSTA C, IGLESIAS M, GONDIM C, CARVALHO F, *et al.* Prevalence of anal squamous intra-epithelial lesion in women presenting genital squamous intra-epithelial lesion. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol** (2009);142(1):735.

GIRALDO P, JACYNTHO C, COSTA C, IGLESIAS M, GONDIM C, CARVALHO F, *et al.* Prevalence of anal squamous intra-epithelial lesion in women presenting genital squamous intra-epithelial lesion. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.**(2009);142(1):73-5.

GIRALDO PC, SILVA MJPMA, FEDRIZZI EM, GONÇALVES AKS, AMARAL RLG, ELEUTÉRIO JR J, et al. Prevenção da infecção por HPV e lesões associadas com o uso de vacinas. **J Bras Doenças Sex Transm**(2008);20(2):132-40.

GIULIANO AR, NIELSON CM, FLORES R, et al. The optimal anatomic sites for sampling heterosexual men for human papillomavirus (HPV) detection: the HPV detection in men study. **J Infect Dis** (2011); 196:1146 –52.

GORDON PH. Anorectal anatomy and physiology. **Gastroenterol Clin North Am**(2001).30[1], 1-13.

GREENE FL, PAGE DL, FLEMING ID, et al, eds. AJCC Cancer Staging Manual American Joint Committee on Cancer. 6th ed. New York: **Springer-Verlag**(2002).

GRULICH AE, POYNTEN IM, MACHALEK DA, JIN F, TEMPLETON DJ, HILLER T, POPPELREUTHER S, STUBENRAUCH F, IFTNER T. Comparative analysis of 19 genital human papillomavirus types with regard to p53 degradation, immortalization, phylogeny, and epidemiologic risk classification. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**(2006);15(7):1262-7.

GUIMARÃES, A. P.; MATOS, D.; SEGRETO, R.; FORONES, N. M. Carcinoma Espinocelular de Canal Anal: análise de 11 casos. *Arq. Gastroenterologia*, v. 38, n. 1, p. 9 - 13, Janeiro/Março, Julho/Setembro, 2001.

HEBNER CM, LAIMINS LA. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. **Rev Med Virol**(2006), v. 16, p. 83-97.

HILLMAN RJ: The epidemiology of anal cancer. **Sex Health** (2012); 9(6):504–508.

HOOST BE, PALESFKY GM, PIMENTA JM, SMITH JS. Human papillomavirus type distribution in anal cancer and anal intraepithelial lesions. **Int J Cancer**(2009). 124(10): 2375 – 83.

HOLM RTG, KARLSEN F, NESLAND JM. Prevalence and physical state of human papillomavirus DNA in anal carcinomas. **ModPathol** (1994) May;7(4):449-53.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Estimativa 2014: Incidência de câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: **INCA**, 2014.

JEMAL A, SIEGEL R, WARD E, HAO Y, XU J, THUN MJ. Cancerstatistics, 2009. CA. **Cancer J Clin**(2009);59(4):225–249

JOHNSON LG, MADELEINE MM, NEWCOMER LM, SCHWARTZSM, DALING JR. Anal cancer incidence and survival: the surveillance, epidemiology, and end results experience, 1973-2000. **Cancer**(2004);101(2):281–288

JOSEPH DA, MILLER JW, WU X, et al. Understanding the burden of human papillomavirus-associated anal cancers in the US. **Cancer**(2008);113:2892–900

KANODIA, S. et al. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. **CurrCancerDrugTargets** (2007). v. 7, p. 79-89.

KAUH J, KOSHY M, GUNTHEL C, JOYNER MM, LANDRY J, THOMAS CR-Jr. Management of anal cancer in the HIV-positive population. **Oncol**(2005)(Williston Park) 19:1634 –1638, 2005; discussion 1638–1640, 1645p.

KLENCKE BJ, PALEFSKY JM. Anal cancer: an HIV-associated cancer. **HematolOncolClin North Am**(2003);17:859-72.

LETO MGP et al. Infecção pelo papilomavírus humano: etiopatogenia, biologia molecular e manifestações clínicas. **An Bras Dermatol** 2011. v. 86, n. 2, p. 306-17.

LEVY S, SHOHAM T: Protein-protein interactions in the tetraspanin web. **Physiology**. **Bethesda**(2005); 20: 218-224.

LIU J, THORP SC. Cell surface heparan sulfate and its roles in assisting viral infections. **MedResRev**(2002);22:1–25.

MAGI JC, RODRIGUES MRS, GUERRA GML, COSTA ACL, FORMIGA GJS. O Papilomavírus humano (HPV) na forma subclínica como diagnóstico diferencial da etiologia do prurido anal. **Rev Bras Colo-proctol**(2003);23(4):273-7.

MAIA LB, MARINHO LC, OLIVEIRA PC. Estudo comparativo entre os exames de citologia esfoliativa convencional e em base líquida para o rastreamento de lesões intraepiteliais anais associadas à infecção pelo papilomavírus humano em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana. [Dissertação] Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, 2013.

MARTIN FT, KAVANAGH D, WALDRON R. Squamous cell carcinoma of the anal canal. **Surgeon** (2009);7(4):232–37.

MITRA S, CRANE L. Diagnosis, treatment, and prevention of anal cancer. **Curr Infect Dis Rep** (2012); 14(1):61-66

MONTALDO, C. et al. Detection and genotyping of human papillomavirus DNA in samples from healthy Sardinian patients: a preliminary study. **J Oral PatholMed**(2007). v. 36, p. 482-487.

MORTOZA GJ. Patologia cervical: da teoria a prática clínica. Rio de Janeiro: **Cient**(2006);133-135 p.

MOTOYAMA S, LADINES-LLAVE CA, VILLANUEVA SL, MARVOT. The Role of Human Papillomavirus in the Molecular Biology of Cervical Carcinogenesis. **J Med Sci**(2004). v. 50, p. 9-19.

MONK BJ, TEWARI KS. The spectrum and clinical sequelae of human papillomavirus infection. **GynecolOncol**(2007);107(2 Suppl 1):S6-13.

MÜNGER K, SCHEFFNER M, HUIBREGTSE JM, HOWLEY PM. Interactions of HPV E6 and E7 oncoproteins with tumour suppressor gene products. **Cancer Surv**(1992);12:197-217.

MUNÓZ M, BOSCH FX, de SANJOSÉ S, HERRERO R, CASTELLSAGUE X, SHAH KV, SNIJDERS PJF, MEIJER JL. Epidemiological classification of HPV-types causing squamous cell cervical cancer: implications for prevention. **New Engl J Med**(2002); 203: 518-527.

MYERSON RJ, KARNELL LH, and MENCK HR. The National Cancer Data Base report on carcinoma of the anus. **Cancer**(1997);80[4], 805-815.

NADAL SR, MANZIONE CR, GALVÃO VM, SALIMVR, SPERANZINI MB. Perianal diseases in hivpositive patients compared with a seronegative population. **Dis Colon Rectum**(1999); 42:649-54.

NAKAJIMA GS, SANTOS RT, ALVES VAF, HABRGAMAA. Carcinoma de ânus: aspectos epidemiológicos, histológicos, imuno-histológicos e por hibridação in situ. **Arq Bras de Cir Dig**(2001);v. 14, p. 133 – 138.

NELSON LM, ROSE RC, MOROIANU J. Nuclear import strategies of high risk HPV16 L1 major capsid protein. **J Biol Chem**(2002); 277(26):23958-964.

OLIVATTO LO, FERREIRA CGM. Tratamento do Carcinoma do Canal Anal com Quimiorradioterapia ou Radioterapia Exclusiva/ Rio de Janeiro, 2007.127f. Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Oncologia do Instituto Nacional de Câncer - Coordenação de Pesquisa

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS). Policies and managerial guidelines for national cancer control programs. **Rev Panam Salud Publica**2002. 12(5):366- 70.

ORTH G, FAVRE M. Human papillomaviruses. Biochemical and biologic properties. **Clin Dermatol**(1985);3:27-42.

PALEFSKY JM, HOLLY EA, RALSTON ML, COSTA M, GREENBLATT RM. Prevalence and risk factor for anal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus HIV-positive and high-risk HIV-negative women. **J Infect Dis**(2001); 183:383-91.

PALEFSKY JM, HOLLY EA, EFIRDC JT, DA COSTA M, JAY N, BERRY JM, DARRAGH TM. Anal intraepithelial neoplasia in the highly active antiretroviral therapy era among HIV-positive men who have sex with men. **AIDS**. 2005;19(13):1407–1414.

PALEFSKY JM, RUBIN M. The epidemiology of anal human papillomavirus and related neoplasia. **ObstetGynecolClin North Am**(2009); 36:187–200.

PALEFSKY JM, HOLLY EA, GONZALES J, BERLINE J, AHN DK, GREENSPAN JS. Detection of human papillomavirus DNA in anal intraepithelial neoplasia and anal cancer. **Cancer Res**(1991); 51:1014-9.

PAIVA GR. Carcinoma de pênis: panorama da doença no estado da Bahia: considerações epidemiológicas e histopatológicas. Salvador, BA. Dissertação de mestrado, Universidade Federal da Bahia, 2010. 70 p.

PARK RB, ANDROPHY EJ. Genetic Analysis of Human-Risk E6 in Episomal Maintenance of Human Papillomavirus Genomes in Primary Human Keratinocytes. **J of Virol**(2002); 76: 11359-11364

PARKIN DM, BRAY F. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. **Vacci**(2006);24Suppl 3:S11–25.

PATEL HS, SILVER AR, NORTHOVER JM. Anal cancer in renal transplant patients. **Int J Colorectal Dis** (2007);22(1):1–5.

PHILLIPS DH, HEWER A, SCHOLEFIELD JH, SKINNER P. Smoking-related DNA adducts in anal epithelium. **Mutat Res** (2004);560(2):167–72.

PLUMMER M, SCHIFFMAN M, CASTLE PE, MAUCORT-BOULCH D, WHEELER CM. A 2-Year Prospective Study of Human Papillomavirus Persistence among Women with a Cytological Diagnosis of Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance or Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion. **J Infect Dis** (2007); 195:1582–9

RAFF AB, WOODHAM AW, RAFF LM, SKEATE JG, YAN L, DA SILVA DM, SCHELHAAS M, KAST WM. The evolving field of human papillomavirus receptor research: a review of binding and entry. **J Virol**(2013);doi:10.1128/JVI.00330-13

REIS AAS, MOURA KKV, CRUZ AD. História Natural da Infecção por Papilomavirus Humano. – Dissertação de Mestrado. Goiânia, 2005.

RIES LAG, HARKINS D, KRAPCHO M et al., SEER Cancer Statistics Review, 1975-2003. Baltimore, MD. **NCancerInst**(2005). 1-103.

ROARK R. The need for anal dysplasia screening and treatment programs for HIVinfected men who have sex with men: a review of the literature. **J Assoc Nurses AIDS Care**(2011); 22(6):433-43

ROBERTS JN, BUCK CB, THOMPSON CD, KINES R, BERNARDO M, CHOYKEPL, LOWY DR, SCHILLER JT. Genital transmission of HPV in a mousemodel is potentiated by nonoxynol-9 and inhibited by carrageenan. **NatMed**(2007);13:857– 861.

RODEL F, WIELAND U, FRAUNHOLZ I, KITZ J, RAVE-FRANK M, WOLFF HA, WEISS C, WIRTZ R, BALERMPAS P, FOKAS E e RODEL C. Human papillomavirus DNA load and p16INK4a expression predict for local control in patients with anal squamous cell carcinoma treated with chemoradiotherapy.**Int J Cancer**(2014).

RODRIGUEZ AC, SCHIFFMAN M, CASTLE PE, MAUCORT-BOULCH D, WHEELER CM. A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence

among woman with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion. **J Infect Dis**(2007);195:1582.

RODRIGUEZ AC, SCHIFFMAN M, HERRERO R, et al. Rapid clearance of human papillomavirus and implications for clinical focus on persistent infections. **J Natl Cancer Inst**(2008);100:513.

RYAN DP, COMPTON CC, MAYER RJ. Carcinoma of the anal canal. **N Engl J Med**(2000);342(11):792–800

SCHEFFNER M, WHITAKER NJ. Human papillomavirus-induced carcinogenesis and the ubiquitin proteasome system. **Semin Canc Biol**(2003);v.13, n.1, p.59–67.

SCHEFFER KD, GAWLITZA A, SPODEN GA, ZHANG XA, LAMBERT C, BERDUTCHEVKI F, FLORIN L. Tetraspanin CD151 mediates papillomavirus type 16 endocytosis. **J Virol**(2013);87:3435 – 3446.

SCHIFFMAN M, CASTLE F. Human Papillomavirus Epidemiology and Public Health. **Arch Pathol Lab Med** (2003); 127: 930-934

SILVA AMTC, AMARAL MVT, CRUZ AD. O papel do papiloma vírus humano no câncer. **Biotecnol Cienc Desenvol**(2003);29:48-54.

SILVA ITC et al .Anal cancer precursor lesions in HIV-positive and HIV-negative patients seen at a tertiary health institution in Brazil. **Acta Cir Bras**. São Paulo , v. 26, n. 1, Feb. 2011 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010286502011000100012&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 07 de setembro de 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502011000100012>.

SILVA DSM, SILVA AMN, BRITO LMO, GOMES SRL, NASCIMENTO MDSB, CHEIN MBC. Rastreamento do câncer do colo do útero no Estado do Maranhão, Brasil. **Ciênc Saud Coletiva**(2014) vol.19 no.4 Rio de Janeiro Apr.

SOPER D. Reducing the Health Burden of HPV Infection Through Vaccination. **Infect Dis ObstetGynecol**(2006);14(1):83084.

SPODEN G, FREITAG K, HUSMANN M, BOLLER K, SAPP M, LAMBERT C, FLORIN L. Clathrin- and caveolin-independent entry of humanpapillomavirus type 16 —involvement of tetraspanin-enriched microdomains(TEMs).**PLoS One**(2008).

SOUTO R, FALHARI JPB, CRUZ AD. O Papilomavírus: um fator relacionado coma formação de neoplasias. **Rev Bras de Canc** 2005;51(2): 155-160.

SYRJANEN SM, SYRJANEN KJ. New concepts on the role of human papillomaviruses in cell cycle regulation.**Ann Med** 1999.31:175-87.

TACHEZY R, JIRASEK T, SALAKOVA M, LUDVIKOVA V, KUBECOVA M, HORAK L et al.Human papillomavirus infection and tumours of the anal canal: correlation of histology, PCR detection in paraffin sections and serology. **APMIS**(2007);115(3):195-203

THOMISSON III J, THOMAS LK, SHROYER KR. Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma.**HumanPathol**(2008); v. 39, p. 154-166.

THOMAS M, PIM D, BANKS L. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV.**Oncogen**(1999);18:7690-700.

TORRES NETO JR; PRUDENTE ACL; SANTOS, RL. Estudo demográfico do câncer de canal anal e ânus no estado de Sergipe. **Rev BrasColoproct** (2007);27(2): 190-195.

UICC: União Internacional Contra o Câncer. TNM: Classificação dos tumores malignos. 5ª Ed. Rio de Janeiro. **Ministério da Saúde**(1998). P 36-40.

URONIS HEE BENDELL JC. Anal Cancer: An Overview.**Oncol**(2007);12:524-534.

de VILLIERS EM, et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**(2004). v. 324, p. 17-27.

de VUYST H, CLIFFORD GM, NASCIMENTO MC, MADELEINE MM, FRANCESCHI S: Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: a meta-analysis. **Int J Cancer**(2009);124(7):1626–1636.

VILLIERS EM, FAUQUET C, BROKER TR, BERNARD HU, ZURHAUSEN H. Classification of papillomaviruses. **Virology**(2004);324:17-27.

WALBOOMERS JM, JACOBS MV, MANOS MM, BOSCH FX, KUMMER JA, SHAH KV, ET AL. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **J Pathol**(1999); 189:12-9.

WEAVER BA. Epidemiology and natural history of genital human papillomavirus infection. **J Am Osteopath Assoc**(2006);106(3 Suppl 1):S2-8.

WENDELL-SMITH CP. Anorectal nomenclature: fundamental terminology. **Dis Colon Rectum**(2000);43[10], 1349-1358.

WILEY D, MASONGSONG E. Human papillomavirus: the burden of infection. **ObstetGynecolSurv**(2006).61(6 Suppl 1):S3-14.

WONG AK, CHAN RC, AGGARWAL N, SINGH MK, NICHOLSON Se BOSE S. Human papillomavirus genotypes in anal intraepithelial neoplasia and anal carcinoma as detected in tissue biopsies. **Modern Pathol**(2009) 23, 144–150; doi:10.1038/modpathol.143.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Pathology and genetics of tumors of the digestive system. **Lyon: IARC Press** (2000).

WORLD HEALTH ORGANIZATION/Institut Català d'Oncologia (WHO/ICO). HPV Information Centre. Human Papillomavirus and Related Cancers – Brazil, Summary Report 2009.

YU T, FERBER MJ, CHEUNG TH, CHUNG TK, WONG IF, SMITH DI. The role of viral integration in the development of cervical cancer. **Cancer Genet Citogenet** (2005); 158 (1):27-34.

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

ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. **J Natl Cancer Inst** (2000). v. 92, p. 690-699.

ANEXOS**ANEXO I**

FICHA PADRONIZADA PARA OS PACIENTES HPV E CARCINOMA ANAL – 2001 A 2011 – HUUFMA E IMOAB

DADOS CLINICOS E SOCIODEMOGRÁFICOS

SIGLA: **IDADE AO DIAGNOSTICO:**

DATA DE NASCIMENTO: **SEXO:**

RESIDENCIA: **NATURALIDADE:**

EPP: **PRONTUÁRIO:** **BLOCO:**

ESTADO CIVIL: **COR:**

SOROLOGIA:

DIABETES: **HAS:** **HISTORICO DE CA NA FAMÍLIA:**

QUEIXA INICIAL:

DIAGNOSTICO:

LOCALIZAÇÃO: **TNM:**

MATERIAL:

TIPO HISTOLÓGICO:

TIPO DA LESÃO: **TAMANHO DA LESÃO:**

INFILTRAÇÃO E INVASÃO:

COMPROMETIMENTO LINFONODAL:

PRESEÇA DE PROCESSO INFLAMATÓRIO:

GRAU DE BRODERS: **EMBOLIZAÇÃO LINFÁTICA:**

TRATAMENTO:

QUIMIOTERAPIA

RADIOTERAPIA

CIRURGIA

PALIATIVO

OBSERVAÇÕES:

ANEXO II

 	UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DIRETORIA ADJUNTA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO COMISSÃO CIENTÍFICA - COMIC	
---	---	---

PARECER CONSUBSTANCIADO	Nº do Protocolo: 001423/2013-70
NATUREZA DO PROJETO	Data de Entrada no COMIC: 02/04/2013
Graduação () Especialização () Mestrado (X)	Nº do Parecer: 53/2013
Doutorado () Serviço/HUUFMA () Outros ()	Parecer: APROVADO

I - Identificação:

Título: Prevalência e genotipagem de HPV em amostras de tecidos parafinados de carcinoma anal e lesões intra-epiteliais de canal anal em pacientes de São Luís, Maranhão.		
Pesquisador responsável: Luciane Maria Oliveira Brito		
Identificação da Equipe Executora: Sulayne Janayna Araujo Guimarães		
Unidade do HUUFMA onde será realizado: Unidade Presidente Dutra		
Sector de realização: Laboratório de Patologia		
Cooperação estrangeira: Não	Multicêntrico: Não	Dissertação de Mestrado

II – Objetivos**Objetivo Geral**

Avaliar a prevalência dos tipos de HPV em lesões intra-epiteliais anais e carcinomas anais em pacientes tratados no Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Belo (IMOAB) e no Hospital Universitário Presidente Dutra (HUUFMA).

Objetivos específicos

- Avaliar a prevalência da infecção pelo HPV em lesões intra-epiteliais anais e carcinomas anais em pacientes do Maranhão e correlacionar com os dados nacionais.
- Analisar os tipos mais prevalentes de HPV nas lesões intra-epiteliais anais e carcinomas anais em pacientes do Maranhão e correlacionar com os dados nacionais.
- Conhecer o perfil dos pacientes com lesões intra-epiteliais anais e carcinomas anais dos pacientes do Maranhão e correlacionar com os dados nacionais.
- Analisar possíveis correlações entre os dados clínico-cirúrgico-radiológicos (do prontuário médico), parâmetros histopatológicos, infecção pelo HPV e tipo de HPV dos casos estudados.

III - Resumo do projeto: (Enfocando o tipo de pesquisa, objetivo, metodologia, cronograma, análise dos dados, financiamento e relevância).

Trata-se de um estudo no qual serão analisados laudos histopatológicos dos pacientes diagnosticados no período de 01/2001 a 12/2011 com lesões intra-epiteliais anais e carcinomas anais, assim como amostras parafinadas de lesões precursoras e do carcinoma anal do Laboratório de Patologia do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Belo (IMOAB) e do Laboratório de Patologia do Hospital Universitário Presidente Dutra (HUUFMA), objetivando avaliar a prevalência dos tipos de HPV em lesões intra-epiteliais anais e carcinomas anais nas Instituições supracitadas. Para a avaliação da relação entre os dados epidemiológicos e clínicos e a presença de HPV, serão utilizados o teste Qui-quadrado e o exato de Fisher, sendo os resultados considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

IV - Parecer Consubstanciado

- X APROVADO**
- COM PENDÊNCIA (Em caso de pendência fazer a descrição)
- RETIRADO (Em caso de retirada descrever o motivo)
- NÃO APROVADO (Em caso de não aprovado descrever o motivo)

Obs: A avaliação de projetos posteriores estará condicionada à entrega do relatório final (cópia em CD) da pesquisa anterior sob a responsabilidade do investigador principal.

São Luís, 17 de junho de 2013

Profa. Dra. Sirlene Garcia Marques
Coordenadora da COMIC

ANEXO III



HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MARANHÃO/HU/UFMA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PREVALÊNCIA E GENOTIPAGEM DE HPV EM AMOSTRAS DE TECIDOS PARAFINADOS DE CARCINOMA ANAL E LESÕES INTRAEPITELIAIS DE CANAL ANAL EM PACIENTES DE SÃO LUÍS, MARANHÃO

Pesquisador: Luciane Maria Oliveira Brito

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 07132013.1.0000.5086

Instituição Proponente: Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão/HU/UFMA

Patrocinador Principal: FUNDO DE AMPARO A PESQUISA AO DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO DO MARANHÃO - FAPEMA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 348.397

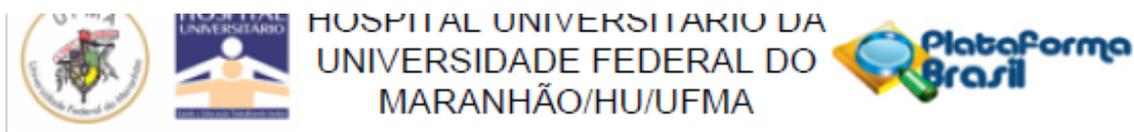
Data da Relatoria: 16/08/2013

Apresentação do Projeto:

O câncer do canal anal apresenta-se como um tipo raro de neoplasia. Aproximadamente 93% dos cânceres nessa região estão associados com a infecção pelo papilomavirus humano (HPV). A persistência da infecção pode levar a uma neoplasia intra-epitelial anal e, posteriormente, carcinoma. O estudo tem o objetivo de verificar a prevalência da infecção por HPV, o estudo analisará amostras parafinadas de lesões precursoras e do carcinoma anal e será realizado no Hospital Universitário Presidente Dutra (HUUFMA) e no Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Belo (IMOAB). A coleta dos dados será realizada com base nos arquivos de laudos histopatológicos e blocos de biópsia de diagnóstico e material de ressecção cirúrgica, além das lâminas espelho coradas com eosina e hematoxilina (HE) correspondentes aos pacientes diagnosticados com lesões intra-epiteliais anais e carcinomas anais do Laboratório de Patologia do Hospital Universitário. A amostra conetará de 150 blocos de lesões e carcinoma de canal anal de pacientes assistidos nas instituições referidas no período de 01/2001 a 12/2011. Serão coletados os Para a extração de DNA será utilizado material tumoral preservado em parafina. Para a avaliação da relação entre os dados epidemiológicos e clínicos e a presença de HPV, serão utilizados o teste Qui-quadrado e o teste exato de Fisher, sendo os

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227
Raiiro: CENTRO

CPF: 65.020-070



Continuação do Parecer: 348.397

resultados considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. Toda a análise estatística será feita no programa GraphPad (GraphPad Software, CA, USA). A pesquisa tem apoio financeiro da FUNDE DE AMPARO A PESQUISA AO DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO DO MARANHÃO - FAPEMA.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVOS GERAL

Avaliar a prevalência e a genotipagem de HPV em lesões intra-epiteliais anais e carcinomas anais em pacientes tratados no Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Belo (IMOAB) e no Hospital Universitário.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a prevalência da infecção pelo HPV em lesões intra-epiteliais anais e carcinomas anais em pacientes do Maranhão.
- Analisar os tipos mais prevalentes de HPV nas lesões intra-epiteliais anais e carcinomas anais em pacientes do Maranhão.
- Conhecer o perfil dos pacientes com lesões intra-epiteliais anais e carcinomas anais dos pacientes do Maranhão.
- Analisar possíveis correlações entre os dados clínico-cirúrgico-radiológicos (do prontuário médico), parâmetros histopatológicos, infecção pelo HPV e tipo de HPV dos casos estudados e comparar com os dados nacionais e internacionais.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos que envolvem a participação do sujeito da pesquisa são mínimos (considerando as dimensões psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual) e estão associados ao sigilo e confidencialidade, uma vez que será utilizado material tumoral preservado em parafina, o qual será recuperado através do arquivo de blocos e lâminas.

Benefícios:

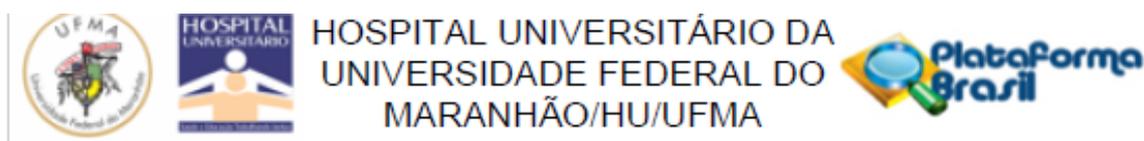
Os benefícios estarão baseados na avaliação da incidência da infecção pelo HPV lesões intra-epiteliais anais e carcinomas anais, podendo comparar os dados obtidos com os nacionais e internacionais de incidência assim como avaliar os tipos virais mais prevalentes especificamente na região maranhense além de contribuir com estratégias de prevenção contra o HPV.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo relevante considerando proposta de avaliar incidência da infecção pelo HPV em lesões intraepiteliais anais e carcinoma anal com o propósito de identificação da genotipagem de HPV e

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227
Bairro: CENTRO

CEP: 65.020-070



Continuação do Parecer: 348.397

contribuições com estratégias de prevenção. O protocolo apresenta documento de autorização das instituições para utilização dos blocos parafinados para a realização do estudo, documentos de anuência assinado pelos membros da equipe executora.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O protocolo cumpre com as exigências em relação aos "Termos de apresentação obrigatória": folha de rosto, projeto de pesquisa, orçamento e currículo do(s) pesquisador(es). Atende às exigências da Resolução CNS/MS nº 466/12.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O pesquisador atendeu as pendências referidas na avaliação anterior sendo o protocolo considerado APROVADO por atender aos requisitos da Resolução CNS/MS nº 466/12 e suas complementares.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

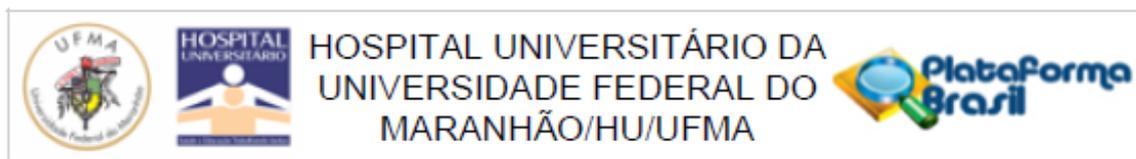
Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O PROJETO atende aos requisitos fundamentais da Resolução CNS/MS nº 466/12 e suas complementares, sendo considerado APROVADO.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Relatórios parcial e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente no final da coleta de dados e ao término do estudo.



Continuação do Parecer: 348.397

SAO LUIS, 03 de Agosto de 2013

Assinador por:
Dorlene Maria Cardoso de Aquino
(Coordenador)

ANEXO IV

Roteiro de Apresentação e Redação de Dissertações

SUMÁRIO

RESUMO**ABSTRACT****1. INTRODUÇÃO****2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA****3. OBJETIVOS**

3.1 Geral

3.2 Específicos

4. METODOLOGIA

4.1 Tipo de estudo

4.2 Período e local de estudo

4.3 Amostra/Amostragem

4.4 Cálculo do tamanho amostral

4.5 Instrumento de coleta e avaliação de dados

4.6 Processamento e tratamento estatístico

4.7 Aspectos éticos

5. RESULTADOS**6. REFERÊNCIAS****7. ANEXOS****8. APÊNDICES****9. PRIMEIRO ARTIGO CIENTÍFICO**

9.1 Nome do periódico com sua classificação na WEBQUALIS da CAPES (A1, A2, B1, B2 ou B3) na área de AVALIAÇÃO MEDICINA II

9.2 Normas Editoriais/Normas para os autores

9.3 Artigo propriamente dito

9. ARTIGO CIENTÍFICO

9.1 Nome do Periódico com sua classificação no WEBQUALIS da CAPES (A1,A2,B1, B2, B3) na area de avaliação Medicina II

Infectious Agents and Cancer Classificação na Webqualis Área de conhecimento Medicina II - B1



9.2 Normas Editorias/Normas para as autores

Infectious Agents and Cancer Classificação na Webqualis Área de conhecimento Medicina II - B1



Instructions for authors

Infectious Agents and Cancer is an open access, peer-reviewed online journal that encompasses all aspects of basic, clinical and translational research providing an insight into the association between chronic infections and cancer.

Each article type published by *Infectious Agents and Cancer* follows a specific format, as detailed in the corresponding instructions for authors; please choose an article type from the list on the left to view the instructions for authors.

The instructions for authors includes information about preparing a manuscript for submission to *Infectious Agents and Cancer*, criteria for publication and the online submission process. Other relevant information about the journal's policies, the refereeing process and so on can be found in ['About this journal'](#).

***Infectious Agents and Cancer* publishes the following article types:**

- [Research articles](#)
- [Commentaries](#)
- [Hypotheses](#)
- [Letters to the Editor](#)
- [Meeting reports](#)
- [Methodologies](#)
- [Reviews](#)
- [Short reports](#)

We use plagiarism detecti

Instructions for authors

Research articles

[Submission process](#) | [Preparing main manuscript text](#) | [Preparing illustrations and figures](#) | [Preparing tables](#) | [Preparing additional files](#) | [Style and language](#)

See '[About this journal](#)' for descriptions of different article types and information about policies and the refereeing process.

Submission process

Manuscripts must be submitted by one of the authors of the manuscript, and should not be submitted by anyone on their behalf. The submitting author takes responsibility for the article during submission and peer review.

Please note that *Infectious Agents and Cancer* levies an article-processing charge on all accepted Research articles; if the submitting author's institution is a [BioMed Central member](#) the cost of the article-processing charge may be covered by the membership (see [About](#) page for detail). Please note that the membership is only automatically recognised on submission if the submitting author is based at the member institution.

To facilitate rapid publication and to minimize administrative costs, *Infectious Agents and Cancer* prefers [online submission](#).

Files can be submitted as a batch, or one by one. The submission process can be interrupted at any time; when users return to the site, they can carry on where they left off.

See below for examples of [word processor](#) and [graphics file formats](#) that can be accepted for the main manuscript document by the online submission system.

Additional files of any type, such as [movies](#), animations, or [original data files](#), can also be submitted as part of the manuscript.

During submission you will be asked to provide a cover letter. Use this to explain why your manuscript should be published in the journal, to elaborate on any issues relating to our editorial policies in the '[About *Infectious Agents and Cancer*](#)' page, and to declare any potential competing interests. You will be also asked to provide the contact details (including email addresses) of potential peer reviewers for your manuscript. These should be experts in their field, who will be able to provide an objective assessment of the manuscript. Any suggested peer reviewers should not have published with any of the authors of the manuscript within the past five years, should not be current collaborators, and should not be members of the same research institution. Suggested reviewers will be considered alongside potential reviewers recommended by the Editor-in-Chief and/or Editorial Board members.

Assistance with the process of manuscript preparation and submission is available from [BioMed Central customer support team](#).

We also provide a collection of links to useful tools and resources for scientific authors on our [Useful Tools](#) page.

File formats

The following word processor file formats are acceptable for the main manuscript document:

- Microsoft word (DOC, DOCX)
- Rich text format (RTF)
- Portable document format (PDF)
- TeX/LaTeX (use [BioMed Central's TeX template](#))
- DeVice Independent format (DVI)

TeX/LaTeX users: Please use [BioMed Central's TeX template](#) and BibTeX stylefile if you use TeX format. During the TeX submission process, please submit your TeX file as the main manuscript file and your bib/bbl file as a dependent file. Please also convert your TeX file into a PDF and submit this PDF as an additional file with the name 'Reference PDF'. This PDF will be used by internal staff as a reference point to check the layout of the article as the author intended. Please also note that all figures must be coded at the end of the TeX file and not inline.

If you have used another template for your manuscript, or if you do not wish to use BibTeX, then please submit your manuscript as a DVI file. We do not recommend converting to RTF.

For all TeX submissions, all relevant editable source must be submitted during the submission process. Failing to submit these source files will cause unnecessary delays in the publication procedures.

Preparing main manuscript text

General guidelines of the journal's style and language are given [below](#).

Overview of manuscript sections for Research articles

Manuscripts for Research articles submitted to *Infectious Agents and Cancer* should be divided into the following sections (in this order):

- [Title page](#)
- [Abstract](#)
- [Keywords](#)
- [Background](#)
- [Results and discussion](#)
- [Conclusions](#)
- [Methods](#)
- [List of abbreviations used](#) (if any)
- [Competing interests](#)
- [Authors' contributions](#)
- [Authors' information](#)
- [Acknowledgements](#)
- [Endnotes](#)
- [References](#)
- [Illustrations and figures](#) (if any)
- [Tables and captions](#)
- [Preparing additional files](#)

The **Accession Numbers** of any nucleic acid sequences, protein sequences or atomic coordinates cited in the manuscript should be provided, in square brackets and include the corresponding database name; for example, [EMBL:AB026295, EMBL:AC137000, DDBJ:AE000812, GenBank:U49845, PDB:1BFM, Swiss-Prot:Q96KQ7, PIR:S66116].

The databases for which we can provide direct links are: EMBL Nucleotide Sequence Database ([EMBL](#)), DNA Data Bank of Japan ([DDBJ](#)), GenBank at the NCBI ([GenBank](#)), Protein Data Bank ([PDB](#)), Protein Information Resource ([PIR](#)) and the Swiss-Prot Protein Database ([Swiss-Prot](#)).

You can [download a template](#) (Mac and Windows compatible; Microsoft Word 98/2000) for your article.

For reporting standards please see the information in the [About](#) section.

Title page

The title page should:

- provide the title of the article
- list the full names, institutional addresses and email addresses for all authors
- indicate the corresponding author

Please note:

- the title should include the study design, for example "A versus B in the treatment of C: a randomized controlled trial X is a risk factor for Y: a case control study"
- abbreviations within the title should be avoided

Abstract

The Abstract of the manuscript should not exceed 350 words and must be structured into separate sections: **Background**, the context and purpose of the study; **Methods**, how the study was performed and statistical tests used; **Results**, the main findings; **Conclusions**, brief summary and potential implications. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract. **Trial registration**, if your research article reports the results of a controlled health care intervention, please list your trial registry, along with the unique identifying number (e.g. **Trial registration**: Current Controlled Trials ISRCTN73824458). Please note that there should be no space between the letters and numbers of your trial registration number. We recommend manuscripts that report randomized controlled trials follow the [CONSORT extension for abstracts](#).

Keywords

Three to ten keywords representing the main content of the article.

Background

The Background section should be written in a way that is accessible to researchers without specialist knowledge in that area and must clearly state - and, if helpful, illustrate - the background to the research and its aims. Reports of clinical research should, where appropriate, include a summary of a search of the literature to indicate why this study was necessary and what it aimed to contribute to the field. The section should end with a brief statement of what is being reported in the article.

Results and discussion

The Results and discussion may be combined into a single section or presented separately. Results of statistical analysis should include, where appropriate, relative and absolute risks or risk reductions, and confidence intervals. The Results and discussion sections may also be broken into subsections with short, informative headings.

Conclusions

This should state clearly the main conclusions of the research and give a clear explanation of their importance and relevance. Summary illustrations may be included.

Methods

The methods section should include the design of the study, the type of materials involved, a clear description of all comparisons, and the type of analysis used, to enable replication.

List of abbreviations

If abbreviations are used in the text they should be defined in the text at first use, and a list of abbreviations can be provided, which should precede the competing interests and authors' contributions.

Competing interests

A competing interest exists when your interpretation of data or presentation of information may be influenced by your personal or financial relationship with other people or organizations. Authors must disclose any financial competing interests; they should also reveal any non-financial competing interests that may cause them embarrassment were they to become public after the publication of the manuscript.

Authors are required to complete a declaration of competing interests. All competing interests that are declared will be listed at the end of published articles. Where an author gives no competing interests, the listing will read 'The author(s) declare that they have no competing interests'.

When completing your declaration, please consider the following questions:

Financial competing interests

- In the past five years have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that may in any way gain or lose financially from the publication

of this manuscript, either now or in the future? Is such an organization financing this manuscript (including the article-processing charge)? If so, please specify.

- Do you hold any stocks or shares in an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? If so, please specify.
- Do you hold or are you currently applying for any patents relating to the content of the manuscript? Have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that holds or has applied for patents relating to the content of the manuscript? If so, please specify.
- Do you have any other financial competing interests? If so, please specify.

Non-financial competing interests

Are there any non-financial competing interests (political, personal, religious, ideological, academic, intellectual, commercial or any other) to declare in relation to this manuscript? If so, please specify.

If you are unsure as to whether you, or one your co-authors, has a competing interest please discuss it with the editorial office.

Authors' contributions

In order to give appropriate credit to each author of a paper, the individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section.

According to [ICMJE guidelines](#), An 'author' is generally considered to be someone who has made substantive intellectual contributions to a published study. To qualify as an author one should 1) have made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) have been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content; 3) have given final approval of the version to be published; and 4) agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. Acquisition of funding, collection of data, or general supervision of the research group, alone, does not justify authorship.

We suggest the following kind of format (please use initials to refer to each author's contribution): AB carried out the molecular genetic studies, participated in the sequence alignment and drafted the manuscript. JY carried out the immunoassays. MT participated in the sequence alignment. ES participated in the design of the study and performed the statistical analysis. FG conceived of the

study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support.

Authors' information

You may choose to use this section to include any relevant information about the author(s) that may aid the reader's interpretation of the article, and understand the standpoint of the author(s). This may include details about the authors' qualifications, current positions they hold at institutions or societies, or any other relevant background information. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used to describe any competing interests.

Acknowledgements

Please acknowledge anyone who contributed towards the article by making substantial contributions to conception, design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data, or who was involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content, but who does not meet the criteria for authorship. Please also include the source(s) of funding for each author, and for the manuscript preparation. Authors must describe the role of the funding body, if any, in design, in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. Please also acknowledge anyone who contributed materials essential for the study. If a language editor has made significant revision of the manuscript, we recommend that you acknowledge the editor by name, where possible.

The role of a scientific (medical) writer must be included in the acknowledgements section, including their source(s) of funding. We suggest wording such as 'We thank Jane Doe who provided medical writing services on behalf of XYZ Pharmaceuticals Ltd.'

Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements section.

Endnotes

Endnotes should be designated within the text using a superscript lowercase letter and all notes (along with their corresponding letter) should be included in the Endnotes section. Please format this section in a paragraph rather than a list.

References

All references, including URLs, must be numbered consecutively, in square brackets, in the order in which they are cited in the text, followed by any in tables or legends. Each reference must have an individual reference number. Please avoid excessive referencing. If automatic numbering systems are used, the reference numbers must be finalized and the bibliography must be fully formatted before submission.

Only articles, datasets, clinical trial registration records and abstracts that have been published or are in press, or are available through public e-print/preprint servers, may be cited; unpublished abstracts, unpublished data and personal communications should not be included in the reference list, but may be included in the text and referred to as "unpublished observations" or "personal communications" giving the names of the involved researchers. Obtaining permission to quote personal communications and unpublished data from the cited colleagues is the responsibility of the author. Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted. Journal abbreviations follow Index Medicus/MEDLINE. Citations in the reference list should include all named authors, up to the first 30 before adding '*et al.*'..

Any *in press* articles cited within the references and necessary for the reviewers' assessment of the manuscript should be made available if requested by the editorial office.

Style files are available for use with popular bibliographic management software:

- [BibTeX](#)
- [EndNote style file](#)
- [Reference Manager](#)
- [Zotero](#)

Examples of the *Infectious Agents and Cancer* reference style are shown [below](#). Please ensure that the reference style is followed precisely; if the references are not in the correct style they may have to be retyped and carefully proofread.

All web links and URLs, including links to the authors' own websites, should be given a reference number and included in the reference list rather than within the text of the manuscript. They should be provided in full, including both the title of

the site and the URL, in the following format: **The Mouse Tumor Biology Database** [<http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>]. If an author or group of authors can clearly be associated with a web link, such as for weblogs, then they should be included in the reference.

Examples of the Infectious Agents and Cancer reference style

Article within a journal

Koonin EV, Altschul SF, Bork P: **BRCA1 protein products: functional motifs**. *Nat Genet* 1996,**13**:266-267.

Article within a journal supplement

Orengo CA, Bray JE, Hubbard T, LoConte L, Sillitoe I: **Analysis and assessment of ab initio three-dimensional prediction, secondary structure, and contacts prediction**. *Proteins* 1999,**43**(Suppl 3):149-170.

In press article

Kharitonov SA, Barnes PJ: **Clinical aspects of exhaled nitric oxide**. *Eur Respir J*, in press.

Published abstract

Zvaifler NJ, Burger JA, Marinova-Mutafchieva L, Taylor P, Maini RN: **Mesenchymal cells, stromal derived factor-1 and rheumatoid arthritis [abstract]**. *Arthritis Rheum* 1999, **42**:s250.

Article within conference proceedings

Jones X: **Zeolites and synthetic mechanisms**. In *Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore*. Edited by Smith Y. Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996:16-27.

Book chapter, or article within a book

Schnepf E: **From prey via endosymbiont to plastids: comparative studies in dinoflagellates**. In *Origins of Plastids. Volume 2*. 2nd edition. Edited by Lewin RA. New York: Chapman and Hall; 1993:53-76.

Whole issue of journal

Ponder B, Johnston S, Chodosh L (Eds): **Innovative oncology**. In *Breast Cancer Res* 1998, **10**:1-72.

Whole conference proceedings

Smith Y (Ed): *Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore*. Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996.

Complete book

Margulis L: *Origin of Eukaryotic Cells*. New Haven: Yale University Press; 1970.

Monograph or book in a series

Hunninghake GW, Gadek JE: **The alveolar macrophage**. In *Cultured Human Cells and Tissues*. Edited by Harris TJR. New York: Academic Press; 1995:54-56.

[Stoner G (Series Editor): *Methods and Perspectives in Cell Biology*, vol 1.]

Book with institutional author

Advisory Committee on Genetic Modification: *Annual Report*. London; 1999.

PhD thesis

Kohavi R: **Wrappers for performance enhancement and oblivious decision graphs**. *PhD thesis*. Stanford University, Computer Science Department; 1995.

Link / URL

The Mouse Tumor Biology

Database [<http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>]

Link / URL with author(s)

Corpas M: **The Crowdfunding Genome Project: a personal genomics community with open source values**

[<http://blogs.biomedcentral.com/bmcblog/2012/07/16/the-crowdfunding-genome-project-a-personal-genomics-community-with-open-source-values/>]

Dataset with persistent identifier

Zheng, L-Y; Guo, X-S; He, B; Sun, L-J; Peng, Y; Dong, S-S; Liu, T-F; Jiang, S; Ramachandran, S; Liu, C-M; Jing, H-C (2011): **Genome data from sweet and grain sorghum (*Sorghum bicolor*)**. *GigaScience*

Database. <http://dx.doi.org/10.5524/100012>.

Clinical trial registration record with persistent identifier

Mendelow, AD (2006): **Surgical Trial in Lobar Intracerebral Haemorrhage**.

Current Controlled Trials. <http://dx.doi.org/10.1186/ISRCTN22153967>

Preparing illustrations and figures

Illustrations should be provided as separate files, not embedded in the text file. Each figure should include a single illustration and should fit on a single page in portrait format. If a figure consists of separate parts, it is important that a single

composite illustration file be submitted which contains all parts of the figure. There is no charge for the use of color figures.

Please read our [figure preparation guidelines](#) for detailed instructions on maximising the quality of your [figures](#).

Formats

The following file formats can be accepted:

- PDF (preferred format for diagrams)
- DOCX/DOC (single page only)
- PPTX/PPT (single slide only)
- EPS
- PNG (preferred format for photos or images)
- TIFF
- JPEG
- BMP

Figure legends

The legends should be included in the main manuscript text file at the end of the document, rather than being a part of the figure file. For each figure, the following information should be provided: Figure number (in sequence, using Arabic numerals - i.e. Figure 1, 2, 3 etc); short title of figure (maximum 15 words); detailed legend, up to 300 words.

Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder to reproduce figures or tables that have previously been published elsewhere.

Preparing a personal cover page

If you wish to do so, you may submit an image which, in the event of publication, will be used to create a cover page for the PDF version of your article. The cover page will also display the journal logo, article title and citation details. The image may either be a figure from your manuscript or another relevant image. You must have permission from the copyright to reproduce the image. Images that do not meet our requirements will not be used.

Images must be 300dpi and 155mm square (1831 x 1831 pixels for a raster image).

Allowable formats - EPS, PDF (for line drawings), PNG, TIFF (for photographs and screen dumps), JPEG, BMP, DOC, PPT, CDX, TGF (ISIS/Draw).

Preparing tables

Each table should be numbered and cited in sequence using Arabic numerals (i.e. Table 1, 2, 3 etc.). Tables should also have a title (above the table) that summarizes the whole table; it should be no longer than 15 words. Detailed legends may then follow, but they should be concise. Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

Smaller tables considered to be integral to the manuscript can be pasted into the end of the document text file, in A4 portrait or landscape format. These will be typeset and displayed in the final published form of the article. Such tables should be formatted using the 'Table object' in a word processing program to ensure that columns of data are kept aligned when the file is sent electronically for review; this will not always be the case if columns are generated by simply using tabs to separate text. Columns and rows of data should be made visibly distinct by ensuring that the borders of each cell display as black lines. Commas should not be used to indicate numerical values. Color and shading may not be used; parts of the table can be highlighted using symbols or bold text, the meaning of which should be explained in a table legend. Tables should not be embedded as figures or spreadsheet files.

Larger datasets or tables too wide for a landscape page can be uploaded separately as additional files. Additional files will not be displayed in the final, laid-out PDF of the article, but a link will be provided to the files as supplied by the author.

Tabular data provided as additional files can be uploaded as an Excel spreadsheet (.xls) or comma separated values (.csv). As with all files, please use the standard file extensions.

Preparing additional files

Although *Infectious Agents and Cancer* does not restrict the length and quantity of data included in an article, we encourage authors to provide datasets, tables, movies, or other information as additional files.

Please note: All Additional files **will be published** along with the article. Do not include files such as patient consent forms, certificates of language editing, or revised versions of the main manuscript document with tracked changes. Such

files should be sent by email to editorial@infectagentscancer.com, quoting the Manuscript ID number.

Results that would otherwise be indicated as "data not shown" can and should be included as additional files. Since many weblinks and URLs rapidly become broken, *Infectious Agents and Cancer* requires that supporting data are included as additional files, or deposited in a recognized repository. Please do not link to data on a personal/departmental website. The maximum file size for additional files is 20 MB each, and files will be virus-scanned on submission.

Additional files can be in any format, and will be downloadable from the final published article as supplied by the author. We recommend CSV rather than PDF for tabular data.

Certain supported files formats are recognized and can be displayed to the user in the browser. These include most movie formats (for users with the Quicktime plugin), mini-websites prepared according to our guidelines, chemical structure files (MOL, PDB), geographic data files (KML).

If additional material is provided, please list the following information in a separate section of the manuscript text:

- File name (e.g. Additional file 1)
- File format including the correct file extension for example .pdf, .xls, .txt, .pptx (including name and a URL of an appropriate viewer if format is unusual)
- Title of data
- Description of data

Additional files should be named "Additional file 1" and so on and should be referenced explicitly by file name within the body of the article, e.g. 'An additional movie file shows this in more detail [see Additional file 1]'.

Additional file formats

Ideally, file formats for additional files should not be platform-specific, and should be viewable using free or widely available tools. The following are examples of suitable formats.

- Additional documentation
 - PDF (Adobe Acrobat)
- Animations
 - SWF (Shockwave Flash)
- Movies
 - MP4 (MPEG 4)

- MOV (Quicktime)
- Tabular data
 - XLS, XLSX (Excel Spreadsheet)
 - CSV (Comma separated values)

As with figure files, files should be given the standard file extensions.

Mini-websites

Small self-contained websites can be submitted as additional files, in such a way that they will be browsable from within the full text HTML version of the article. In order to do this, please follow these instructions:

1. Create a folder containing a starting file called index.html (or index.htm) in the root.
2. Put all files necessary for viewing the mini-website within the folder, or sub-folders.
3. Ensure that all links are relative (ie "images/picture.jpg" rather than "/images/picture.jpg" or "http://yourdomain.net/images/picture.jpg" or "C:\Documents and Settings\username\My Documents\mini-website\images\picture.jpg") and no link is longer than 255 characters.
4. Access the index.html file and browse around the mini-website, to ensure that the most commonly used browsers (Internet Explorer and Firefox) are able to view all parts of the mini-website without problems, it is ideal to check this on a different machine.
5. Compress the folder into a ZIP, check the file size is under 20 MB, ensure that index.html is in the root of the ZIP, and that the file has .zip extension, then submit as an additional file with your article.

Style and language

General

Currently, *Infectious Agents and Cancer* can only accept manuscripts written in English. Spelling should be US English or British English, but not a mixture.

There is no explicit limit on the length of articles submitted, but authors are encouraged to be concise.

Infectious Agents and Cancer will not edit submitted manuscripts for style or language; reviewers may advise rejection of a manuscript if it is compromised by grammatical errors. Authors are advised to write clearly and simply, and to have their article checked by colleagues before submission. In-house copyediting will be minimal. Non-native speakers of English may choose to make use of a copyediting service.

Help and advice on scientific writing

The abstract is one of the most important parts of a manuscript. For guidance, please visit our page on [Writing titles and abstracts for scientific articles](#).

Tim Albert has produced for BioMed Central a [list of tips](#) for writing a scientific manuscript. [American Scientist](#) also provides a list of resources for science writing. For more detailed guidance on preparing a manuscript and writing in English, please visit the [BioMed Central author academy](#).

Abbreviations

Abbreviations should be used as sparingly as possible. They should be defined when first used and a list of abbreviations can be provided following the main manuscript text.

Typography

- Please use double line spacing.
- Type the text unjustified, without hyphenating words at line breaks.
- Use hard returns only to end headings and paragraphs, not to rearrange lines.
- Capitalize only the first word, and proper nouns, in the title.
- All pages should be numbered.
- Use the *Infectious Agents and Cancer* [reference format](#).
- Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted.
- Please do not format the text in multiple columns.
- Greek and other special characters may be included. If you are unable to reproduce a particular special character, please type out the name of the symbol in full. **Please ensure that all special characters used are embedded in the text, otherwise they will be lost during conversion to PDF.**

Units

SI units should be used throughout (liter and molar are permitted, however).

9.3 Artigo propriamente dito

Detection of human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the anus of Maranhão state

Detecção do Virus do PapilomaHumano em carcinoma de células escamosas do ânus no Estado do Maranhão

Sulayne Janayna Araujo Guimarães^{1*}, Jéssica Cavalcante Maranh², João Ricardo Sousa², Laryssa Ferreira Guimarães³, Italo Ramon², Fábio França Silva⁴, Sally Cristina Moutinho Monteiro⁵, Gyl Eanes Barros Silva⁶, George Castro Figueira de Mello⁷, Maria Bethânia da Costa Chein⁸, Flávia Castello Branco Vidal⁹, Luciane Maria Oliveira Brito¹⁰.

* Correspondence:

Sulayne Janayna Araujo Guimarães, BioBanco de Tumores do Maranhão,
Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brasil.

Address: Rua Coelho Neto, 311. CEP: 65020-140

Email address: sulaynebio@hotmail.com

Phone number: +55 98 2109-1273

Abstract**Introduction:**

The anal squamous cell carcinoma (ASCC) is rare, but its incidence has been increasing and frequently associated with the presence of human papilloma virus.

Objective:

Aiming to determine the prevalence of HPV infection in this histological variant, the study analyzed paraffin embedded samples of anal carcinoma at the University Hospital of the Federal University of Maranhão (HUUFMA) and Oncology Institute Maranhense Aldenora Bello (IMOAB) between 2001 and 2011.

Methods:

Data regarding demographic and clinical in the medical records and pathological reports of 27 patients were collected. The constitutive β -globin gene was amplified to attest the integrity of DNA in the samples. Subsequently, there was amplification of HPV DNA by PCR using the primer SPF10 and genotyping by reverse hybridization.

Results:

The global prevalences of HPV, high-risk HPV (HR-HPV), and low-risk HPV (LR-HPV) types were 74.42%, 25.58%, respectively. The detection of HPV was positive in 81.48% ($p < 0,00001$) of cases analyzed. An association was found between anal HPV16 positivity and anal squamous cell carcinoma was detected in 100% of the positive samples. High prevalence was also detected HPV11 in 11/27 (40.74%). Multiple infections showed 45.45% (10/22) prevalence in the study sample. HPV was found in 14,81% of men younger than 52 years vs. 37.05% of women. Seventy four percent were women; and 40.75% of patients

were aged between 42 and 52 years. Risk factors such as smoking (22.22%) and alcohol consumption (11.11%) were recorded in the study group.

Conclusion: Our results provide additional evidence in support of strong association of infection with high-risk HPV, especially HPV 16, in the development of SCCA, also highlighting a concern with late diagnosis and the need for monitoring and prevention measures for anal carcinoma.

Key-words: Anal Carcinoma. Squamous Cell Carcinoma. Human papillomavirus. Multiple infection.

Background

O vírus do papiloma humano (HPV) é um fator de risco importante para o desenvolvimento do carcinoma de células escamosas (SCCA) tanto na região ano-genital como na região da orofaringe. [1-3]

Essa é a neoplasia mais frequente da região anal, apresenta comportamento geralmente agressivo, mas ainda é pouco comum, representando 1,5% a 3% das neoplasias do trato gastrointestinal. Afeta principalmente mulheres acima dos 50 anos, e entre os homens dominam a faixa etária que vai dos 20 aos 49 anos. Vem apresentando um crescimento expressivo especialmente em populações de risco, como os homossexuais e os soropositivos. Quando diagnosticada ainda no início diminui a morbimortalidade e aumenta as possibilidades de cura. [4,5]

No Brasil, a frequência do carcinoma anal não é conhecida com exatidão. As estatísticas nacionais a incluem nas ocorrências de cólon e reto. [6]

Além disso, as lesões intraepitelial anal representam um desafio diagnóstico devido o aumento da sua incidência e a clínica inespecífica, que geralmente é confundida com condições anoretais benignas, uma vez que ambas coexistem em 50% dos casos. [7-9]

A detecção da presença viral do HPV deve estar presente na avaliação clínica, pois sua forte associação (80% dos casos) com lesões na região anal pode explicar a progressão dessa lesão para o carcinoma invasivo, semelhante ao que ocorre no carcinoma de colo de útero.

O diagnóstico da presença anal do HPV pode ser realizado na forma clínica, subclínica e latente. Entre as técnicas empregadas estão exames que avaliam as lesões originadas pelo exame físico com o toque retal; exames histopatológicos para confirmação diagnóstica como a anoscopia seguida de biópsia, além de testes de elevada sensibilidade para detecção viral como a reação em cadeia de polimerase (PCR), a captura híbrida e a hibridização *in situ*.
[10]

No Brasil existem poucos dados epidemiológicos da infecção anal pelo HPV, com prevalência da infecção na região anorretal estimada em 4,7%. Essa taxa toma proporções alarmantes em grupos de risco específicos, como nos pacientes HIV positivos. Um estudo de Palesfky et al. (2001) relatou no grupo de pacientes homossexuais masculinos soronegativos a presença de HPV anal em 61% dos casos e acometendo 93% dos soropositivos. Nas mulheres, esses valores corresponderam a 42% e 76%, respectivamente. [10,12]

Embora a infecção pelo HPV seja fundamental para o desenvolvimento do SCCA, sua frequência não é conhecida com exatidão. No país, são limitados os estudos que avaliam a prevalência do HPV na população, a distribuição dos subtipos virais, o papel das infecções múltiplas na região anal bem como a associação do vírus com outros fatores de risco.

Desse modo, reunir dados epidemiológicos de uma determinada região é essencial para subsidiar orientações específicas de tratamento e prevenção, como, por exemplo, um esquema eficaz de vacinação, principalmente nos grupos de riscos, bem como estabelecer a atribuição dos diferentes tipos de HPVs na história natural da infecção.

Os objetivos deste trabalho foram detectar e genotipar o vírus HPV no carcinoma anal de células escamosas e determinar as associações existentes entre a presença viral e os aspectos clínicos - histopatológicos.

Results

As amostras positivas foram enviadas ao Instituto do HPV onde se procedeu a genotipagem para os tipos virais pela técnica de hibridização reversa. O DNA do HPV foi detectado em 81,48% (22/27) das amostras de neoplasias anais.

A genotipagem revelou que, dentre as amostras positivas, 100% estavam infectadas com tipos virais de alto risco oncogênico, com a detecção do HPV 16 em todas as amostras (Gráfico 01).

Dentre os tipos virais de alto risco, estavam presentes também os tipos 18, 29, 39, 45, 52, 59, 66 e 68. O HPV do tipo 11 foi o único genótipo de baixo risco detectado.

O procedimento revelou ainda que 50,09% (12/22) estavam presentes apenas um tipo viral (infecção simples), sendo o HPV 16 de alto risco oncogênico encontrado em todos os casos estudados. As infecções múltiplas apresentaram 45,45% (10/22) de prevalência na amostra examinada (Gráfico 02).

Dos pacientes envolvidos na pesquisa 74,07% (20/27) eram do sexo feminino. A presença do vírus do papiloma humano foi predominante no sexo feminino acometendo 15 das 20 mulheres diagnosticadas. Entre os homens foi detectado DNA viral em cinco dos sete casos diagnosticados.

Quando avaliados a idade ao diagnóstico dos pacientes acometidos pelo SCCA, observou-se que variou de 32 a 85 anos de idade, com média de 54,96 anos, desvio padrão de $\pm 15,81$ e mediana de 51 anos, sendo a faixa etária mais prevalente compreendida entre 42 e 52 anos de idade.

Não houve associação ($p < 0,05$) entre a infecção pelo vírus do HPV e as variáveis sócio-demográficas e clínico-histopatológicas (sexo, idade, localização, lesão predominante, tamanho da lesão, tipo histológico, estadiamento UJCC, grau de diferenciação, invasão, infiltração, comprometimento de linfonodos e processo inflamatório) pesquisadas (Tabela 01).

Não foi identificada associação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre a infecção pelo vírus do HPV e o desenvolvimento do carcinoma anal com amostra considerada nesse estudo.

Discussion

Analisando as 27 amostras de tecido de SCCA coletadas retrospectivamente, observou-se a alta prevalência do DNA do HPV (81,48%) nas amostras de neoplasias anais desse estudo. Destas, 50,09% apresentavam presença isolada do vírus, sendo o HPV 16, de alto risco oncogênico, detectado em todos os casos.

A neoplasia avaliada acometeu, em sua maioria, pacientes do sexo feminino (74,07%); houve predomínio do diagnóstico entre 42 e 52 anos de idade (41%), lesão do tipo vegetante concomitante a ulcerada (22,22%), cujos tamanhos em 55,56% dos casos estava entre 2,1 - 5,0cm. Ainda, 70,37% destas neoplasias comprometeram a região do canal anal de forma isoladamente e os padrões histológicos apresentaram-se moderadamente diferenciados em 70,38% dos casos.

Alemany et al. (2014) em uma abordagem retrospectiva (1986-2011) delineada e coordenada pelo Institut Catala d'Oncologia (ICO) em Barcelona (Espanha), avaliaram 496 casos de SCCA invasivo, por meio de um estudo multicêntrico, na Europa, America do Norte, América do Sul, África, Asia e Oceania, quanto a detecção de DNA do HPV pelo ensaio imunoenzimático de DNA (DEIA) e genotipagem por hibridização reversa em linha, foi encontrado taxas de prevalência para cada continente de 87,6%, 95,8%, 90,4%, 61,9% e 81,1%, respectivamente.^[13]

No estudo de Ouhoumane et al. (2013), em duas áreas urbanas de Quebec (Canada), 606 carcinomas anais invasivos foram diagnosticados entre 1990 e 2005 e 96 casos de carcinomas anal de células escamosas foram

encaminhadas para detecção de DNA do HPV pela técnica de PCR (primers PGMY) e genotipagem pelo ensaio Linear Array, sendo 92% das amostras positivas para presença viral. Esses dados corroboram com os achados da presente análise. ^[14]

No Brasil, Guimarães et al. (2001) analisaram retrospectivamente 11 casos de SCCA entre 1995 e 1999 e Neto et al. (2007) analisaram 91 casos (1993 à 2005). Esses estudos não avaliaram a presença do HPV nas neoplasias, mas destacaram o papel do HPV como fator de risco para SCCA por meio de dados da literatura internacional. ^[15,16]

Aguiar et al., (2014) realizou um estudo no Hospital Araujo Jorge da Associação de Combate ao Câncer, em Goiânia-Goiás, entre (2004-2011), 53,5% das amostras eram de SCCA e 76,3% foram amostras positivas para HPV, detectadas por PCR (primers SPF10). Os resultados confirmam os dados da presente pesquisa quanto à prevalência do DNA. No entanto, no estudo de Aguiar et al (2014) não foram realizadas genotipagem. Isso evidencia a importância de mais estudos, principalmente nas áreas com carência dessas informações. ^[17]

Soares et al (2011) avaliando 75 pacientes de ambos os sexos divididos em dois grupos (Grupo Teste = pacientes com SCCA e Grupo Controle = pacientes com lesão anal benigna), provenientes do serviço do Hospital Ophir Loyola (HOL), em Belém, no Pará entre os anos de 1998 a 2000 identificou prevalência do DNA viral por PCR e tipagem por hibridização dot blot em 60,6% e 22,6%, respectivamente. Apresentando uma relação estatisticamente significativa entre os grupos. ^[18]

Entre os dados levantados nesse estudo, observou-se grande maioria dos carcinomas anais em pacientes com idade inferior a 55 anos, sendo, portanto, indivíduos mais jovens do que os relatados na literatura. Ouhoumane et al. (2013) e Alemany et al. (2014) revelaram uma prevalência de 80% e 56%, respectivamente, dos casos de SCCA acima do 50 anos. Esses diferentes estudos reportam que a faixa etária mais prevalente foi acima dos 65 anos, assim como no estudo de Aguiar et al. (2013), com 46,5% entre 61 – 75, o que sugere alta exposição e adaptação viral ao tecido anal devido a persistência por longo período.^[13,14,17]

Quanto à idade, a comunidade científica vem demonstrando grande variação. Esse resultado distinto encontrado em nossa análise pode estar relacionado a fatores de risco associados ao desenvolvimento do carcinoma, entre eles o homossexualismo, múltiplos parceiros, histórico de DST, imunossupressão (HIV e Transplantados), tabagismo, etilismo, neoplasia cervical para as mulheres. No entanto, os dados coletados nos prontuários médicos foram insuficientes para apresentar o perfil sociodemográfico e sorológicos das amostras avaliadas.^[13, 14, 17,19]

Silva et al. (2011) avaliaram 344 pacientes de ambos os sexos com soropositivos e soronegativos para HIV submetidos a anoscopia de alta resolução com biópsia, e detectaram prevalência de lesão intraepitelial anal de alto grau significativamente maior em pacientes HIV positivos. A idade média dos pacientes selecionados foi de 39 anos. Os homossexuais tendiam a ser mais jovens do que as mulheres (33 anos contra 40 anos) e pacientes sem riscos para o câncer anal mais velho do que todos os outros grupos (46 anos).^[19]

De 108 amostras de 86 era do sexo feminino (78,8%), com média de 30,44 ± 11,2 anos, a faixa etária era 1-54 anos de idade e 23 era masculino (21,1%), com média de 31,7 ± 9,4 anos. Em um estudo brasileiro, Nakajima et al. (2001), analisaram 58 pacientes com câncer anal com média de idade de 61 anos, sendo a faixa etária mais acometida entre 60 e 64 anos. Já no estudo de Silva et al. (2011) a idade média dos pacientes selecionados foi de 39 anos. Em um estudo os homossexuais masculinos tendiam a ser mais jovens do que as mulheres (33 anos contra 40 anos) e pacientes sem risco para o câncer anal mais velho do que todos os outros grupos (46 anos).^[19-20]

Alguns dados da literatura internacional mostram que entre as mulheres, a incidência de câncer anal é maior na faixa etária acima de 65 anos. No entanto, os homens apresentam uma taxa ligeiramente mais elevada entre pacientes com idade de 20 anos para 49 anos.^[19,21]

O início precoce da atividade sexual sem uso de preservativos contribui para maior exposição à infecção pelo HPV, principal agente etiológico das neoplasias anais, implicando no surgimento destas neoplasias nas mais variadas idades.

Quanto ao gênero, foi observada maior prevalência de carcinoma anal no sexo feminino (74,07%) em relação ao sexo masculino com proporção de 2,85 para 1. Nos estudos realizados por Frisch et al. (1997), Daling et al (2004), Abramovitz et al. (2010) e Alemany et al. (2014) essas taxas variaram de 61,4% a 88% no sexo feminino e 3,6% a 42% no masculino, sendo a proporção encontrada de 2,4 mulheres para cada homem.^[13,22-24]

Um estudo tcheco realizado por Tachezy et al. (2007), que analisou o mesmo número de pacientes da presente pesquisa, revelou a prevalência de

52,4% no sexo feminino. Outros dois estudos, de tamanho amostral pequeno, realizados no Brasil, observaram a ocorrência de 62,8 a 78,8% entre as mulheres contra 21,2 a 37,2% nos homens. Esses resultados são bem semelhantes ao encontrados no presente trabalho. [9,17-18]

Acredita-se que existem alguns fatores ligados com o aumento da frequência de HPV na região anogenital nas mulheres, dentre eles: múltiplos parceiros sexuais, ter um parceiro sexual que tenha vários parceiros sexuais, ter parceiro sexual não circuncisado e histórico de lesão ou carcinoma cervical.

Estudo realizado por Giraldo et al. (2009) com 184 mulheres brasileiras mostrou que havia uma importante associação entre lesões intraepiteliais cervicais e lesões intraepiteliais anais. Foi encontrada uma prevalência de 17,4% de lesões anais nas pacientes com lesões genitais, e apenas 3,2% nas pacientes sem lesões genitais. [25]

A infecção por HPV nas mulheres pode ser facilitado ainda por práticas não sexuais e auto - inoculação (transferência via secreção vaginal, digital e fômites), tendo em vista a proximidade anatômica do introito vaginal e do ânus. [26,27]

Um estudo realizado nos países do México, Brasil e Estados Unidos observou que prevalência da infecção anal pelo HPV entre homens foi de 38,4%, considerando dois sítios anogenitais (pênis e ânus). Foi relatado também um aumento da infecção pelo HPV em homens, particularmente entre homossexuais HIV positivos. [28]

No maranhão dados de um estudo retrospectivo no ano de 2011 mostrou na avaliação de 139.505 exames citopatológicos em mulheres para

rastreamento do carcinoma de colo de útero a presença de alterações tipo neoplasias de baixo e alto grau e carcinoma invasor em 1124. Esse dado foi fornecido pela Secretaria de Estado de Saúde do Maranhão (SES-MA) e reflete que o maranhão já possui bem estabelecido um sistema de rastreamento desse carcinoma. Contudo, é necessário acompanhar também a apresentação clínica da região anal dessas mulheres, haja vista que essas alterações citológicas são fatores de risco para o carcinoma anal também. [29]

Os resultados desse presente estudo descritivo indicam ainda que o DNA viral foi identificado em 81,48% (22/27) dos casos. Esses dados corroboram com os achados nacionais e internacionais apresentados nas pesquisas de Varnai et al (2005), Ramamoorthy et al (2010) e Soares et al. (2011) com prevalência entre 60,6% e 80%, se aproximando também dos dados de uma metanálise publicada recentemente, onde de Vuyst et al. (2009) encontraram prevalência de 73%. [18,26,30,31]

Esses e outros estudos epidemiológicos e moleculares vêm mostrando que a doença sexualmente transmissível resultante da infecção pelo HPV tem sido o mais importante agente etiológico da neoplasia anogenital. [13,32]

Foi identificado genótipo do HPV 16 em 100% das amostras positivas, representando 22 das 27 pesquisadas. Este é também o tipo viral mais comum encontrado em outros estudos como aqueles desenvolvidos por Youk et al. (2001) e Tachezy et al. (2007) que identificaram o mesmo resultado da presente, sendo assim todas as amostras positivas infectadas pelo tipo 16. Nos estudos de Ramammoorthy et al. (2010), Komlos et al. (2011), Alemany et al. (2014), Rodel et al. (2014), Kagawa et al. (2006), Laytragoon-Lewin et al. (2007) o HPV 16 foi principal tipo evidenciado, acometendo acima de 80% dos carcinomas. [9,12,30,33-35]

Os tipos 8, 16, 18, 31 e 45 do HPV são os mais comuns na região anogenital e são considerados como oncogênicos. As oncoproteínas E6 desses tipos virais interagem com a E6AP ubiquitina ligase e se ligam a várias proteínas celulares, incluindo a p53, causando degradação proteica e mantendo a célula em constante proliferação. Muitos autores acreditam que o potencial oncogênico desse vírus provavelmente venha dessa interação. [34]

Os achados de Daling et al (2004) evidenciaram que o uso de cigarro é um fator de risco na progressão da infecção pelo HPV para carcinoma de células escamosas em ambos os sexos, independente da idade e de outros fatores de risco. Nesse presente análise, a maioria dos pacientes estudados é não fumante 40,74% e o tabagismo foi avaliado em apenas 14,81%. Esse dado poderia ter resultado diferente já que em 37,04% essas informações não puderam ser avaliadas por falta de informação. [23]

Os fatores de risco dessa neoplasia que podem facilitar a entrada do papiloma vírus humano são as doenças prévias locais como fístulas, fissuras, hemorróidas, ou abscessos, pois causam irritação crônica do canal anal. Dentre os pacientes acompanhados, observaram-se que 42% apresentavam fissura anal, as outras morbidades não foram relatadas. [35]

Alguns dados epidemiológicos indicam que as características clínicas histopatológicas e sociais podem influenciar no desenvolvimento da neoplasia anal. No presente estudo não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre essas variáveis e a presença do HPV. [18]

O diagnóstico de carcinoma de células escamosas anal é simples frente ao conhecimento da patologia pelo médico e a realização do exame do toque na

região anal. Apesar disso, a sintomatologia é comum a quadros hemorroidários (dor local, sangramento e massa tumoral). Segundo Fox et al (2005), os pacientes com carcinoma anal geralmente apresentam massa perianal, com ou sem prurido anal, ou dor e sangramento.^[36]

No Brasil ainda há grandes dificuldades em levantar dados na literatura sobre as características demográficas do carcinoma anal. Câncer de células escamosas do ânus exige uma equipe multidisciplinar e abordagem especializada para os melhores resultados.

Limitations and strengths

Uma possível limitação do estudo é a não representatividade da amostra populacional e a indisponibilidade de informações nos prontuários médicos. É necessário um esforço maior para garantir o preenchimento dos prontuários dos pacientes com lesão intraepitelial anal ou carcinoma anal, cuja anamnese contemple dados socioeconômicos, demográficos e laboratoriais.

A raridade do tumor e a falta de manejo clínico podem ser responsáveis pela escassez de dados. Devido o tamanho amostral, os resultados aqui encontrados devem ser considerados apenas para a amostra em questão, sendo necessários mais estudos a fim de comprová-los.

Conclusion

Carcinoma de células escamosas anal ainda é bem raro e seu crescimento tem sido notado pela comunidade científica como preocupante devido à forte associação com o HPV.

Com essa pesquisa foi possível concluir que o carcinoma de células escamosas de canal anal teve maior incidência no sexo feminino. A detecção do DNA viral nos SCCA apresentou elevada prevalência. Sendo o HPV 16 o tipo mais freqüente.

A idade média dos pacientes do estudo foi de 58,96 anos e foi observada maior freqüência do vírus nas faixas etárias abaixo dos 52 anos. Prevaleram às lesões maiores de 2,1 cm, na região do canal anal, em geral vegetantes e ulceradas e moderadamente diferenciadas. As variáveis clínico-histopatológicas não tendem a uma associação com a infecção pelo vírus do HPV.

Esse trabalho confirma a importância do rastreamento do HPV na região anal. No entanto, estudos mais aprofundados se justificam para entender os processos moleculares envolvidos na prevalência/persistência de determinados tipos de HPV na população.

Methods

Foi realizado um estudo do tipo transversal e retrospectivo. no período de janeiro de 2013 a agosto de 2014, em dois hospitais públicos de referência na cidade de São Luís, Maranhão, Brasil. Foram avaliadas 27 biópsias/peças cirúrgicas tumorais de carcinomas anal conservados em blocos de parafina e seus respectivos dados anatomopatológicos e sócio-demográficos. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (HU/UFMA com número de protocolo nº 348,397).

Os critérios de inclusão foram: amostras de lesão e/ou câncer anal cujas lâminas histológicas e blocos parafinados constavam nos arquivos de pacientes diagnosticados nos Serviços de Anatomia Patológica do IMOAB e no HUUFMA e permitiram confirmação do diagnóstico e avaliação dos critérios propostos neste trabalho.

Foram excluídas amostras de lesão e/ou câncer anal cujas lâminas histológicas e/ou blocos parafinados não constavam nos arquivos do Serviço de Anatomia Patológica do HUUFMA e do IMOAB; amostras de lesão anal e/ou câncer anal de pacientes cujos laudos não forneceram informações pertinentes ao estudo; amostras de lesão e/ou câncer anal de pacientes que tiveram divergência de diagnóstico nos registros (livro de fluxo/prontuário/laudo histopatológico); pacientes com outros tipos tumorais que não fosse do tipo carcinoma de células escamosas.

Detecção do HPV

Os processos referentes à extração e quantificação de DNA, bem como amplificação do gene da β -globina por reação de cadeia em polimerase (PCR) e eletroforese foram realizados no laboratório e dependências no BioBanco de Tumores do Maranhão.

Após a revisão feita nas amostras pelo médico patologista, foram selecionados os blocos com representatividade tumoral (com mais de 50% da área total do fragmento). O processamento da amostra iniciou com a microtomia e os cortes seguiram para a desparafinização que consistiu na adição de 1ml de Xilol P.A (Vetec, RJ, Brasil) à amostra sendo esta homogeneizada vigorosamente em vórtex por aproximadamente 10 segundos. A mistura foi submetida à centrifugação a 14.000 rpm por 4 minutos. Esta etapa foi repetida por três ou quatro vezes. Caso a parafina ainda permanecesse, a amostra era aquecida a 55°C. O sobrenadante foi retirado e adicionado 1 mL de Etanol P.A (Vetec, RJ, Brasil) seguido de homogeneização em vórtex e centrifugação a 14.000 rpm por 6 minutos. Novamente 1 ml de Etanol foi adicionado à amostra, esta homogeneizada em vórtex e centrifugada a 14.000 rpm por 6 minutos. O sobrenadante foi retirado e a amostra centrifugada novamente a 14.000 rpm por 1 minuto para completa retirada do etanol. Os tubos foram abertos e incubados a 90°C no termomixer por 1 minuto para a evaporação do etanol se completar. Os cortes foram armazenados em tubos de 2,0 mL a 4°C aguardando a extração do DNA.

A extração do DNA genômico das amostras foi realizada com a utilização de kit de purificação QIAamp DNA FFPE Tissue kit (QIAGEN®), de acordo com o protocolo de extração sugerido pelo fabricante.

O processo de amplificação e genotipagem do genoma do HPV ocorreu em parceria com o Instituto do HPV, em São Paulo. Para detecção utilizou os *primers* SPF₁₀ que amplificam um fragmento de 65pb da região L1 dos HPV de baixo e de alto risco segundo um protocolo do kit INNO - LiPA HPV Genotyping Extra Amp. Após o produto é hibridizado e seu sinal padrão é revelado pela ação da estreptavidina conjugada com fosfatase alcalina. Esse procedimento é automatizado e realizado no Autoblott 300-H com programação específica.

O Banco de dados da pesquisa foi tabulado no aplicativo Microsoft Office® Excel 2010. Para cálculos de frequências, médias, medianas, desvio padrão, mínimo e máximo das variáveis utilizou-se o programa EpiInfo 7.

A análise descritiva das variáveis categóricas foi feita por meio da distribuição de frequências. Para as variáveis numéricas, foram utilizadas médias, mediana, desvio padrão, valor mínimo e máximo e intervalo de confiança. Tabelas e gráficos foram construídos após a análise descritiva.

Para a avaliação da relação entre os dados epidemiológicos e clínicos e a presença de HPV, foi utilizado o teste Qui-quadrado e o Teste Exato de Fisher, sendo os resultados considerados estatisticamente significativos 5% de probabilidade $p < 0,05$.

List of abbreviations used

HPV – Human papiloma vírus; UJCC – American Joint Committee on Cancer; DNA – Dextroribonucleic acid; PCR– Polymerase chain reaction; FFPE – formalin fixed paraffin embedded; 5FU – 5fluorouracil; HR: High-risk; LR: Low-risk; SCCA – Squamous Cell Carcinoma Anal;

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

A contribuição individual de cada autor foi realizada da seguinte forma: LMBO e FCBVC idealizaram este estudo e foram responsáveis pela orientação e coordenação deste manuscrito, supervisionaram a coleta de dados, realizaram análise estatística, elaboraram o manuscrito inicial e aprovaram a versão final para publicação. SJAG participou do desing deste estudo, realizou o trabalho experimental e elaboração manuscrito projetado e coordenou o estudo, escreveu o relatório, blocos de parafina coletados, realizou testes de laboratório, analisados e interpretados os dados procuraram a literatura e produziu as figuras e tabelas; FFS realizou testes de laboratório; GCFM realizou análise histopatológica e a revisão crítica do manuscrito; SCMM, GEBS, MBCC analisaram e interpretaram os dados e realizaram a revisão crítica do manuscrito. JCM, JRS, LFG e IR

coletaram blocos de parafina, realizaram apoio experimental. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.

Authors' information

1– SJAG - Bióloga, Especialista em Análises Clínicas, Biobanco de Tumores do Maranhão, Universidade Federal do Maranhão (UFMA). 2–JCM, JRS, LFG and IR - Graduando em Ciências Biológicas, Biobanco de Tumores do Maranhão, Universidade Federal do Maranhão (UFMA). 3- LFG – Graduanda em Enfermagem Biobanco de Tumores do Maranhão, Universidade Federal do Maranhão (UFMA). 4– FFS - Biólogo, Mestre em Saúde do Adulto e da Criança, Biobanco de Tumores do Maranhão, Universidade Federal do Maranhão (UFMA). 5– SCMM - Farmacêutica–Bioquímica, Doutora em Biociências e Biotecnologia Aplicada a Farmácia, Biobanco de Tumores do Maranhão, Universidade Federal do Maranhão (UFMA). 6–GEBS - Médico patologista, Doutor em Patologia, Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), Instituto de Oncologia Aldenora Bello (IMOAB). 7–Médico patologista, Doutor em Patologia, Laboratório de Imunofluorescência do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (LIME/HUUFMA), Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, FMRP-USP. 8– Médica ginecologista, Doutora em Medicina (Ginecologia), Biobanco de Tumores do Maranhão, Departamento de Medicina III da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). 9–Bióloga Doutora em Biologia Humana e Experimental, Biobanco de Tumores do Maranhão, Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Maranhão (UFMA).10– Médica ginecologista, Doutora em Medicina (Mastologia),Biobanco de Tumores do Maranhão, Departamento de Medicina III da Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

Acknowledgements

Gostaríamos de agradecer a Fundação de Amparo a Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão (FAPEMA) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro da pesquisa.

References

- 1- Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV: **The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer.** J Clin Pathol (2002);**55**[4], 244-265.

- 2- Parkin DM, Bray F: **The burden of HPV-related cancers.** Vacci, 2006;24 Suppl 3:S11–25.

- 3- Kanodia S, Fahey LM, Kast WM: **Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response.** Curr Cancer DrugTargets, 2007. v. 7, p. 79-89.

- 4- Montaldo C, Mastinu A, Quartuccio M, Piras V, Denotti G, Pisano E, Orrù G: **Detection and genotyping of human papillomavirus DNA in samples from healthy Sardinian patients: a preliminary study.** J Oral Pathol Med, 2007. v. 36, p. 482-487.

- 5- Palefsky JM, Rubin M: **The epidemiology of anal human papillomavirus and related neoplasia.** Obstet Gynecol Clin North Am, 2009; 36:187–200.

6-Instituto Nacional do Câncer (Brasil). Estimativa 2014: **Incidência de câncer no Brasil**/Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2014.

7- Gervaz P, Hahnloser D, Wolff BG, Anderson SA, Cunningham J, Beart RW JR, Klipfel A, Burgart L, Thibodeau SN: **Molecular biology of squamous cell carcinoma of the anus: a comparison of HIV-positive and HIV-negative patients.**J Gastrointest Surg, 2004;**8**:1024-30.

8- Monk BJ, Tewari KS: **The spectrum and clinical sequelae of human papillomavirus infection.**Gynecol Oncol, 2007;**107**(2 Suppl 1):S6-13.

9- Tachezy R, Jirasek T, Salakova M, Ludvikova V, Kubecova M, Horak L et al: **Human papillomavirus infection and tumours of the anal canal: correlation of histology, PCR detection in paraffin sections and serology.** APMIS(2007);**115**(3):195-203

10- Calore EE, Nadal SR, Manzione CR, Cavaliere MJ, Vilela-Almeida L, Villa LL: **Expression of Ki – 67 can assist in predicting recurrences of low-grade anal intraepithelial neoplasia in AIDS.** Dis Colon Rectum,2001;**44**:534-537.

11- Palefsky JM, Holly EA, Ralston ML, Costa M, Greenblatt RM: **Prevalence and risk factor for anal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus HIV-positive and high-risk HIV-negative women.** J Infect Dis, 2001; **183**:383-91.

12- Magi JC, Rodrigues MRS, Guerra GML, Costa ACL, Formiga GJS: **O Papilomavírus humano (HPV) na forma subclínica como diagnóstico diferencial da etiologia do prurido anal.** Rev Bras Colo-proctol, 2003; **23**(4):273-7.

13- Alemany L, Saunier M, Alvarado-cabrero I, Quiros B, Salmeron J, Shin HR, Pirog EC, Guimera N, Hernandez-Suarez G, Felix A, Clavero O, Lloveras B, Kasamatsu E, Goodman MT, et al: **Human papillomavirus DNA prevalence and type distribution in anal carcinomas worldwide.** Int J Cancer, 2014.

14- Ouhoummane M, Steben F, Coutlé, Te Vuong, P. Forest, C. Rodier, R. Louchini, E. Duarte, P. Brassard: **Squamous anal cancer: Patient characteristics and HPV type distribution N.** Cancer Epidemiology, 2013. **37**:807–812

15- Guimarães AP, Matos D, Segreto R, Forones NM: **Carcinoma Espinocelular de Canal Anal: análise de 11 casos.** Arq. Gastroenterologia, v. **38**, n. 1, p. 9 - 13, Janeiro/Março, Julho/Setembro, 2001.

- 16-Neto JRT, Prudente ACL; Santos RL: **Estudo demográfico do câncer de canal anal e ânus no estado de Sergipe**. Rer Bras Coloproct, 2007;**27**(2): 190-195.
- 17- Aguiar MTM , Bosso NCC, Leal CBQS , Lira CF, Cabral LAO , Cordeiro Silva AMT, Saddi: **Clinicopathological aspects and prevalence of human papillomavirus in anal cancer**. J. Coloproctol, 2014.vol.34 no.2 Rio de Janeiro Apr./June 2014
- 18- Soares **PC**, Ferreira **S**, VillaLL, MatosD: **Identification of human papillomavirus in patients with anal squamous cell carcinoma and its relation with the grade of cellular differentiation and staging**. Rev bras Coloproct, 2011;**31**(1): 8-16.
- 19- Silva ITC Araújo JR, Andrade RV, Cabral CR, Gimenez FS, Guimarães AG, Martins TC, Lopes LR, Ferreira LC: **Anal cancer precursor lesions in HIV-positive and HIV-negative patients seen at a tertiary health institution in Brazil**. Acta Cir Bras. São Paulo, 2011; v. 26, n. 1, Feb.
- 20- Nakajima GS, Santos RT, Alves VAF, Habrgama A: **Carcinoma de ânus: aspectos epidemiológicos, histológicos, imuno-histológicos e por hibridação in situ**. Arq Bras de Cir Dig, 2001;v. 14, p. 133 – 138.

21- Salati AS, Kadi AA: **Anal cancer – a review**. Int J Health Sci (Qassim). Jun 2012; 6(2): 206–230.

22- Frisch M, Glimelius B, van den Brule AJ, Wohlfahrt J, Meijer CJ, Walboomers JM, Goldman S, Svensson C, Adami HO, Melbye M: **Sexually transmitted infection as a cause of anal cancer**. N Engl J Med, 1997 Nov 6;**337**(19):1350-8.

23- Daling JR, Madeleine MM, Johnson LG, et al: **Human papillomavirus, smoking, and sexual practices in the etiology of anal cancer**. Cancer,2004; 101:270–80.

24- Abramowitz L, Jacquard AC, Jaroud F, et al: **Human papillomavirus genotype distribution in anal cancer in France: the EDiTH V study**. Int J Cancer, 2011;**129**:433–9.

25- Giraldo P, Jacyntho C, Costa C, Iglesias M, Gondim C, Carvalho F, et al: **Prevalence of anal squamous intra-epithelial lesion in women presenting genital squamous intra-epithelial lesion**. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2009;**142**(1):735.

26- Varnai AD, Bollmann M, Griefingholt H, et al: **HPV in anal squamous cell carcinoma and anal intraepithelial neoplasia (AIN)**. Impact of HPV analysis of

anal lesions on diagnosis and prognosis. Int J Colorectal Dis 2006;**21**:135–142.

27- Yu T, Ferber MJ, Cheung TH, Chung TK, Wong IF, Smith DI: **The role of viral integration in the development of cervical cancer.**Cancer Genet Citogenet,2005;**158**(1):27-34.

28- Giuliano AR, Nielson CM, Flores R, et al: **The optimal anatomic sites for sampling heterosexual men for human papillomavirus (HPV) detection: the HPV detection in men study.** J Infect Dis, 2011; 196:1146 –52.

29- Silva DSM, Silva AMN, Brito LMO, Gomes SRL, Nascimento MDSB, Chein MBC: **Rastreamento do câncer do colo do útero no Estado do Maranhão, Brasil.** Ciênc Saud Coletiva, 2014. vol.19 no.4 Rio de Janeiro Apr.

30- Ramamoorthy S, Yu-Tsueng Liu Y-T, Luo L, Miyai K, LuQ, Carethers JM: **Detection of Multiple Human Papillomavirus Genotypes in Anal Carcinoma.** *Infectious Agents and Cancer*, 2010,**5**:17

31- de Vuyst H, Clifford GM, Nascimento MC, Madeleine MM, Franceschi S: **Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and**

intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: ameta-analysis. Int J Cancer, 2009;**124**(7):1626–1636.

32- Rodel F, Wieland U, Fraunholz I, Kitz J, Rave-Frank M, Wolff HA, Weiss C, Wirtz R, Balermipas P, Fokas E, Rodel C. **Human papillomavirus DNA load and p16INK4a expression predict for local control in patients with anal squamous cell carcinoma treated with chemoradiotherapy.** Int J Cancer, 2014.

33- Komloš KF, Kocjan BJ, Košorok P, Rus T, Toplak J, Bunič M, Poljak M: **Acta Distribution of HPV genotypes in Slovenian patients with anal carcinoma: preliminary results.** Dermato venerol Alp Pannonica Adriat, 2011 Sep;**20**(3):141-3.

34-Kagawa R, Yamaguchi T, Furuta R: **Histological features of human papilloma virus 16 and its association with the development and progression of anal squamous cell carcinoma.** Surg Today, 2006;36 pp. 885–891.

35- Laytragoon-Lewin N, Nilsson PJ, Castro J, Gharizadeh B, Nyren P, Glimelius B, Elmberger G, Turesson I, Svensson C: **Human papillomavirus (HPV), DNA aberrations and cell cycle progression in anal squamous cell carcinoma patients.** Anticancer Res. 2007 Nov-Dec;27(6C):4473-9.

36- Boldrini NT, Freitas LB, Coutinho AR, Loureiro FZ, Spano LC, et al: **High-Grade Cervical Lesions Among Women Attending A Reference Clinic In Brazil: Associated Factors And Comparison Among Screening Methods.** PLoS ONE, 2014;9(7).

37- Fox PA, Seet JE, Stebbing J, Francis N, Barton SE, Strauss S, Allen-Mersh TG, Gazzardv, Bower M: **The value of anal cytology and human papillomavirus typing in the detection of anal intraepithelial neoplasia: a review of cases from an anoscopy clinic.** Sex Transm Infect 2005;81:142–146.
doi: 10.1136/sti.2003.008318

Illustrations and figures

Gráfico 01. Prevalência do HPV 16 e do HPV Oncogênico não 16 nas amostras de carcinoma anal de células escamosas coletadas nos serviços de patologia do HUUFMA e do IMOAB em São Luís – janeiro de 2001 a dezembro de 2011.

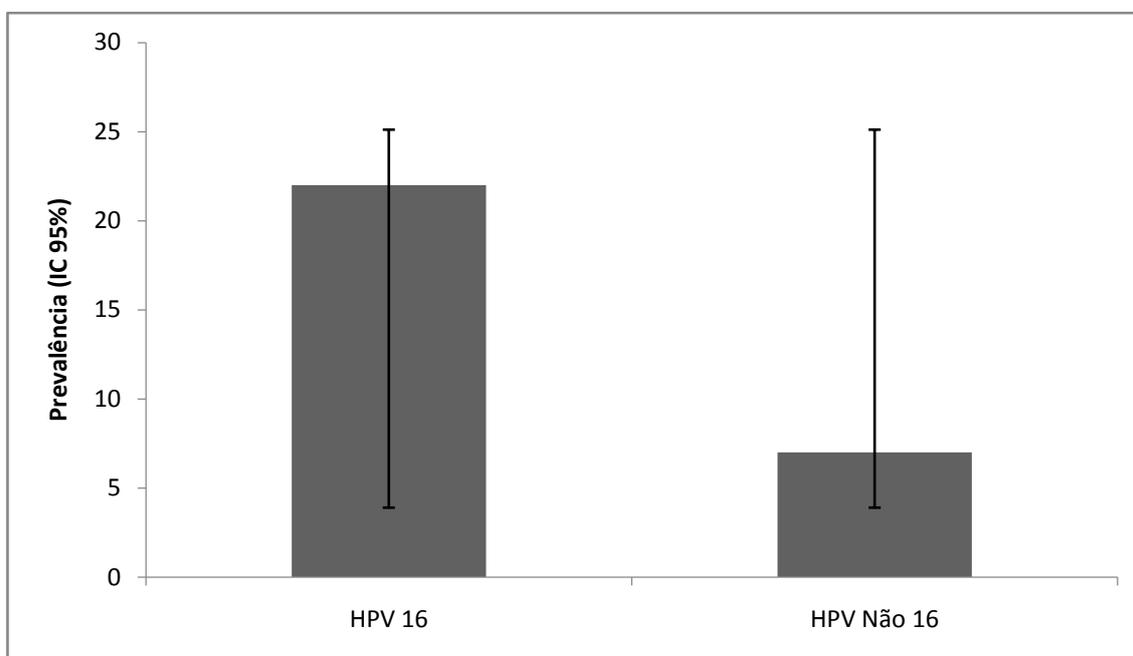
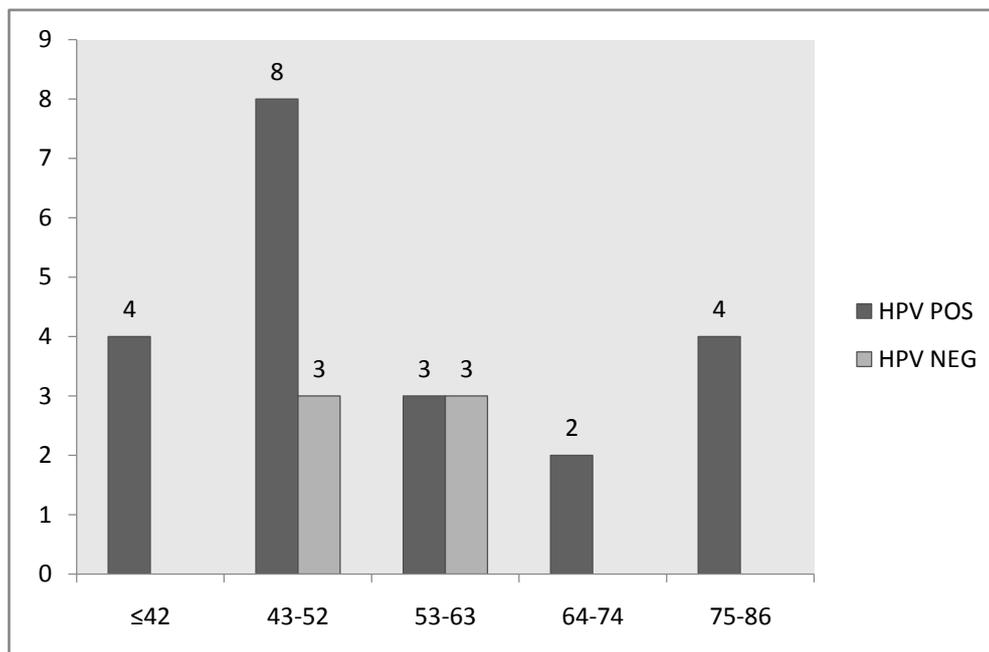


Gráfico 03. Distribuição da presença ou ausência de DNA do HPV nas amostras carcinoma de células escamosas anal por faixa etária, São Luís, Maranhão, Brasil.



Tables and captions

Tabela 01. Características dos 27 pacientes com carcinoma anal de células escamosas, São Luís, Maranhão, Brasil janeiro de 2001 a dezembro de 2011.

	HPV (+) N=20	HPV(-) N=7	<i>p</i>
Sexo			0,1751 ^a
F	15	5	
M	05	2	
Localização			0,2386 ^a
Margem Anal	3	-	
Canal Anal	15	5	
Margem e Canal Anal	3	3	
Lesão predominante			0,7809 ^a
Ulceração	3	1	
Vegetação	2	-	
Ulceração + Vegetação	5	1	
Estenosante	1	-	
Sem informação	10	06	
Tamanho da lesão			0,3657 ^a
≤0,5	-	1	
0,6-2,0	6	2	
2,1-5,0	11	4	
≥5,1	03	-	
Agrupamento de Estádio UJCC/TNM			0,7542 ^a
Estadio I	-	1	
Estadio II	2	-	
Estadio III	9	-	
Estadio IV	-	-	
Sem Informação	9	06	
Comprometimento dos linfonodos			0,3133*
Sim	7	-	
Não	11	5	
Sem Informação	2	2	
Processo inflamatório			0,3017 ^a
Sim	3	2	
Não	12	2	
Sem Informação	6	4	

Valores significativos $p < 0,05$. ^aTeste Exato de Fisher. *Qui-quadrado

Tabela 02. Distribuição das frequências absolutas e relativas de genótipos distintos de HPV conforme a diferenciação celular nas amostras de carcinoma anal de células escamosas coletadas nos serviços de patologia do HUUFMA e do IMOAB em São Luís, Maranhão, Brasil – janeiro de 2001 a dezembro de 2011.

Potencial Oncogênico	Diferenciação celular					
	I (n=5/6)		II (n=16/20)		III (n=1)	
Genótipo de Alto risco	3	75%	9	90%	16	100%
Genótipo de Baixo Risco	1	25%	1	10%	-	-