

SANDRA DE ANDRADE HERÁCLIO¹
THÁIS ANTUNES DE ARAUJO²
ALEX SANDRO ROLLAND SOUZA³
KRISTIANE CAHEN¹
SERGIO FERREIRA LIMA JUNIOR⁴
PAULO ROBERTO ELEUTÉRIO DE SOUZA⁵
MELANIA MARIA RAMOS AMORIM³

Prevalência da lesão HPV induzida em canal anal de mulheres com neoplasia intraepitelial cervical 2 e 3: um estudo de corte transversal

Prevalence of HPV-induced lesions in the anal canal among women with cervical intraepithelial neoplasia 2 and 3: cross-sectional study

Artigo Original

Palavras-chave

Papillomaviridae
Canal anal/lesões
Canal anal/citologia
Neoplasia intraepitelial cervical

Keywords

Papillomaviridae
Anal canal/injuries
Anal canal/citology
Cervical intraepithelial neoplasia

Resumo

OBJETIVO: Determinar a prevalência da lesão anal induzida por HPV em mulheres com neoplasia intraepitelial cervical grau 2/3 (NIC2/3). **MÉTODOS:** Estudo transversal, realizado no período de dezembro de 2008 a junho de 2009, no Estado de Pernambuco, nordeste do Brasil. Foram incluídas no estudo apenas mulheres com diagnóstico de NIC2/3 confirmado por biópsia e excluídas aquelas que não realizaram exame na primeira visita. As amostras para identificação do DNA de HPV anal por PCR e citologia anal foram coletadas com escovinha endocervical. A biópsia anal foi realizada nos casos de citologia anal anormal ou alterações maiores na anoscopia de alta resolução (AAR). **RESULTADOS:** Das AARs, 32,1% (n=37/115) foram normais e 63,5% (n=73/115) exibiram epitélio acetobranco. Vinte e dois por cento das citologias anais (n=26/115) foram anormais. Dentre elas, 12,2% (14/26) corresponderam à lesão intraepitelial anal de baixo grau e 3,4% (n=4/26), a lesão intraepitelial anal de alto grau. Foram realizadas 22 biópsias, das quais 13,7% (n=3/22) tiveram diagnóstico de neoplasia intraepitelial anal (NIA2) e 9% (n=2/22), NIA 3. Identificou-se 72,1% (n=83/115) de DNA do HPV nas amostras. **CONCLUSÃO:** Mulheres com NIC2/3 apresentam elevada prevalência de infecção por HPV e lesão HPV induzida em canal anal.

Abstract

PURPOSE: To determine the prevalence of HPV-induced lesions in the anal canal of women with cervical intraepithelial neoplasia (CIN) grade 2/3. **METHODS:** A cross-sectional study was carried out from December 2008 to June 2009, in Pernambuco, northeastern Brazil. Only women with grade 2/3 CIN were included, and those who could not undergo anoscopy during their first visit were excluded. A cytobrush was used for sample collection in order to identify HPV DNA through PCR and anal cytology. An anal biopsy was obtained in cases of abnormal anal cytology or major alterations in high resolution anoscopy (HRA). **RESULTS:** Thirty-two percent (n=37/115) of HRA were normal and 63.5% (n=73/115) showed acetowhite epithelium. Twenty-two percent (n=26/115) of anal cytologies were abnormal. Among the latter, 12.2% (n=14/26) were low-grade anal intraepithelial lesions and 3.4% (n=4/26) were high-grade anal intraepithelial lesions. Twenty-two anal biopsies were performed, 13.7% of which (n=3/22) were grade 2 anal intraepithelial neoplasia (AIN2) and 9% (n=2/22) were grade 3 AIN. Th HPV DNA was identified in 72.1% of cases (n=83/115). **CONCLUSION:** Women with CIN grade 2/3 showed a high prevalence of anal HPV infection and HPV-induced lesions.

Correspondência

Sandra de Andrade Heráclio
Rua dos Coelhos, 300 – Boa Vista
CEP: 50070-550
Recife (PE), Brasil

Recebido

23/01/2015

Aceito com modificações

13/07/2015

DOI: 10.1590/S0100-720320150005279

Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira – IMIP – Recife (PE), Brasil.

¹Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira – IMIP – Recife (PE), Brasil; Laboratório de Saúde Pública de Pernambuco – LACEN/PE – Recife (PE), Brasil.

²Curso de Graduação em Medicina, Faculdade Pernambucana de Saúde – FPS – Recife (PE), Brasil.

³Programa de Pós-Graduação *stricto sensu*, Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira – IMIP – Recife (PE), Brasil.

⁴Programa de Pós-graduação (Mestrado) em Biologia Aplicada à Saúde, Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE – Recife (PE), Brasil.

⁵Centro de Apoio à Pesquisa, Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE – Recife (PE), Brasil.

Conflito de interesses: não há.

Introdução

A infecção pelo *human papillomavirus* (HPV) é a principal causa de câncer de colo uterino e um dos fatores associados ao aumento na incidência de câncer do canal anal^{1,2}. Autores sugerem um aumento significativo do risco de câncer em ânus, vagina e vulva após o diagnóstico de neoplasia cervical³.

Dos vários tipos de HPV, os de alto risco expressam as proteínas E6/E7 da região precoce do genoma que alteram a regulação do ciclo celular normal, com consequente instabilidade genética e inibição de apoptose, ou morte celular programada^{4,5}. Ainda, ao infectar a célula, integram-se ao genoma do hospedeiro, estando associado a 90% das lesões intraepiteliais de baixo e alto grau e a 98% dos carcinomas de colo. Aqueles não se integram ao genoma do hospedeiro, ficam na forma episomal dentro do núcleo e utilizam a maquinaria celular para autoreprodução.

A infecção pelo HPV é limitada pela resposta imunológica do hospedeiro e apresenta uma taxa de regressão de 80% em 16 meses, inclusive nos casos de infecção por tipos oncogênicos do vírus⁶. Todavia, das mulheres infectadas, aproximadamente 3 a 10% desenvolvem infecção persistente ao longo dos anos, constituindo um grupo de risco para neoplasia epitelial invasiva⁷. Esse processo é geralmente precedido por uma longa fase de doença pré-invasiva ou precursora, com alterações limitadas às camadas do epitélio⁸, que, identificadas e tratadas corretamente, possibilitam a cura. Estudos de coorte têm evidenciado que a presença e persistência do DNA-HPV são necessárias para o desenvolvimento de neoplasia na região anogenital^{7,9}.

A infecção pelo HPV tem caráter multicêntrico acometendo em uma mesma pessoa vários sítios simultâneos⁹ e na mulher a presença do HPV no canal anal ocorre por contiguidade, mesmo que não haja coito anal¹⁰. A incidência de câncer anal é de aproximadamente 1,2 e 1,3 por 100.000 habitantes em homens e mulheres, respectivamente. Observa-se um aumento na incidência do câncer anal nos últimos 30 anos em vários continentes, principalmente nos chamados grupos de risco¹¹. A história natural do câncer anal e suas lesões precursoras, em pessoas negativas para o vírus da imunodeficiência humana (HIV), sugere uma incidência maior em mulheres que em homens, principalmente quando presentes neoplasias intraepiteliais cervicais, vulvares¹² e infecção pelo vírus do HPV⁹.

A neoplasia intraepitelial anal (NIA) é considerada biologicamente similar à neoplasia intraepitelial cervical (NIC) e pode evoluir para câncer invasivo¹³. Não existem, porém, evidências suficientes na literatura sobre a evolução da NIA em mulheres HIV negativas.

No Brasil, poucos estudos relatam a prevalência de lesões precursoras no canal anal em mulheres portadoras de neoplasia intraepitelial genital. Nesse grupo de mulheres, observou-se uma prevalência que varia de 10 a 19,5% de lesão anal^{14,15}. Ressalta-se que todas as lesões anais de alto grau foram associadas a lesões intraepiteliais genitais de alto grau ou ao carcinoma invasivo de colo¹⁵.

Este estudo teve como objetivo determinar a prevalência da lesão HPV induzida na mucosa anal em mulheres com NIC de alto grau (NIC2/3) em um centro de referência do Nordeste do Brasil.

Métodos

Realizou-se um estudo observacional, do tipo corte transversal, no ambulatório de patologia do trato genital inferior (PTGI) do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), no período de dezembro de 2008 a junho de 2009. O cálculo do tamanho da amostra foi realizado empregando-se o Programa STATCALC do Epi-Info versão 7.0 para Windows, prevendo-se uma frequência de infecção por HPV de 35% em mulheres com neoplasia intraepitelial cervical de alto grau¹⁶; para um nível de confiança de 95% e uma precisão absoluta de 8%, encontrou-se um número de 115 mulheres.

Foram incluídas, exclusivamente, mulheres com diagnóstico de neoplasia intraepitelial cervical grau 2 e 3 confirmado por exame histopatológico de biópsia do colo uterino. Foram excluídas mulheres portadoras de doenças mentais, carcerárias, as que tinham realizado quimioterapia ou radioterapia prévias para neoplasias genitais e não realizaram exames na primeira visita. As mulheres incluídas no estudo concordaram voluntariamente em participar e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição (nº 1.324).

Foram selecionadas 118 mulheres, por amostragem consecutiva, e destas, 3 recusaram a participar do estudo, restando 115 para integrar a pesquisa. Após a inclusão no estudo, procedeu-se ao preenchimento do formulário para caracterização da população com perguntas sobre características biológicas, sociodemográficas, sexuais, reprodutivas e de hábitos. Em seguida, foi realizado exame ginecológico, investigação para infecções pelo HIV (teste Elisa), coleta de material anal para PCR, citologia anal, anoscopia de alta resolução e biópsia quando necessário. As mulheres com anormalidades nos exames foram acompanhadas e tratadas na própria instituição.

A obtenção de material para citologia anal e pesquisa de DNA do HPV foi realizada por escova endocervical

umedecida com solução fisiológica. A extração de DNA procedeu-se a partir de 500 µL de secreção vaginal, utilizando o *Wizard Genomic DNA Purification kit* (PROMEGA®). As amostras foram tratadas com RNase, levadas a banho-maria a 50°C para desnaturação dessa proteína e mantidas a temperatura de -20°C. A infecção por HPV foi diagnosticada por meio de dois conjuntos de *primers consensus*. Para cada paciente, foram realizadas duas reações, uma utilizando-se os *primers MY09* e *MY11* e outra os *primers GP05+* e *GP06+*. A confirmação da qualidade do DNA extraído foi realizada pelo par de *primers* de globina¹⁷.

O material citológico anal foi obtido com escova endocervical, fixado em etanol a 95% e corado posteriormente pelo método de Papanicolaou. Os resultados foram categorizados com o emprego dos critérios morfológicos adotados pelo sistema Bethesda¹⁸. Os resultados classificados como insatisfatórios por artefato de dessecação ou escassa celularidade foram excluídos no momento da análise dos dados. A anuscopia de alta resolução foi realizada em todas as mulheres, em seguida à coleta de material para citologia anal. Utilizou-se anuscópio descartável fechado, o qual foi introduzido no canal anal após aplicação de lidocaína tópica a 2%. O estudo da mucosa foi realizado com colposcópio de marca DF Vasconcelos, com objetivas de aumento de 25 vezes. As imagens colposcópicas foram analisadas após aplicação de ácido acético a 5% e solução de lugol a 2%. Na presença de áreas anormais sugestivas de NIA, foi efetuada biópsia, mesmo sem o resultado do exame citopatológico¹⁹.

As mulheres com achados na anuscopia de alta resolução (AAR) sugestivos de metaplasia com citologia anormal foram biopsiadas no retorno da consulta inicial. As biópsias foram realizadas no ambulatório com aplicação de anestésico local, utilizando-se pinça de Gaylor Medina¹⁹. As lesões que se sobrepunham aos plexos hemorroidários e situavam-se abaixo da linha pectínea foram retiradas no bloco cirúrgico para estudo histopatológico. Na categorização dos resultados histopatológicos, usou-se: epitélio normal ou inflamatório, epitélio com hiperplasia simples, infecção por HPV e neoplasia intraepitelial anal (NIA) graus 1, 2 e 3. Diante de discordância entre o resultado da citologia e histopatologia, foi considerado para análise o diagnóstico de maior gravidade. Na ausência de histopatológico, considerou-se apenas o resultado da citologia. Foram definidas como portadoras de lesão HPV induzida na mucosa de canal anal as mulheres com anormalidades no mínimo em dois dos exames realizados: anuscopia, citologia ou histopatologia.

A análise dos dados foi realizada utilizando o *software* estatístico Epi-Info versão 7. Inicialmente, foram obtidas tabelas de distribuição de frequência para as variáveis

categorizadas. Para as variáveis quantitativas, utilizaram-se medidas de tendência central (média e mediana) e dispersão (desvio padrão e percentis).

Resultados

No período do estudo, 234 mulheres foram rastreadas para sorologia para HIV. Destas, 115 foram diagnosticadas com neoplasia intraepitelial de alto grau (NIC2/3) e concordaram em participar. Todas eram negativas e aguardavam exérese da zona de transformação por cirurgia de alta frequência. Em relação às características biológicas e sociodemográficas, a idade mínima das mulheres foi de 17 e a máxima de 60 anos, com uma mediana de 31 anos. Setenta e oito por cento desse grupo estava na faixa etária de 17 a 40 anos. A maioria das mulheres (70,4%) era procedente de zona urbana; cursaram até o ensino fundamental (71,3%); afirmaram não ser da cor branca (63,5%) e informaram renda familiar de até um salário mínimo (88,7%) (Tabela 1).

Em relação às características sexuais e reprodutivas, a maior parte (88,7%) referiu início de atividade sexual até os 20 anos e, destas, 41,7% em idade inferior aos 16 anos. Observou-se que 79,8% tiveram até 5 parceiros e 51,3% relataram ter tido coito anal (Tabela 2). Quanto ao uso de contraceptivos, 71,1% das mulheres faziam uso de algum método; 71,6% referiram o uso de pílula e apenas 23,4% afirmaram usar preservativos. No que se refere a hábitos, 56,5% eram etilistas (Tabela 2).

Tabela 1. Distribuição das variáveis biológicas e sociodemográficas das mulheres com neoplasia intraepitelial cervical graus 2 e 3

Características	n	%
Idade (anos)		
17-40	90	78,3
41-60	25	21,7
Cor/Raça		
Branca	42	36,5
Não branca	73	63,5
Região		
Urbana	81	70,4
Rural	34	29,6
Estado civil		
Casada/União estável	58	50,5
Solteira	57	49,2
Escolaridade (anos)		
≤8	82	71,3
>8	33	28,7
Renda familiar (salário mínimo)		
≤1	102	88,7
>1	13	11,3

Tabela 2. Distribuição das variáveis sexuais, reprodutivas e de hábitos das mulheres com neoplasia intraepitelial cervical graus 2 e 3

Características	n	%
Início da atividade sexual (anos)		
≤20	102	88,7
>20	13	11,3
Número de parceiros		
≤5	92	79,8
>5	23	20,2
Relação sexual anal		
Sim	59	51,3
Não	56	48,7
Início da atividade sexual anal (anos)		
≤20	21	36,9
>20	38	63,1
Uso métodos contraceptivos		
Sim	81	71,1
Não	34	28,9
Pílula	58	71,6
Preservativo	19	23,4
Outros	4	5
Tabagista		
Sim	47	40,9
Não	68	59,1
Etilista		
Sim	65	56,5
Não	50	43,5
Uso de drogas		
Não	109	94,8
Sim	6	5,2

Tabela 3. Distribuição das variáveis de acordo com os resultados da anuscopia de alta resolução, citologia e histopatológico anal das mulheres com neoplasia intraepitelial cervical graus 2 e 3

Exames	n	%
Anuscopia		
Associação de imagens	1	0,9
Epitélio acetobranco	73	63,5
Normal	37	32,1
Pontilhado	3	2,6
Verruga	1	0,9
Citologia anal		
Atipias em células escamosas	8	7,0
Dentro normalidade	81	70,4
Insatisfatória	8	7,0
Lesão intraepitelial anal de alto grau	4	3,4
Lesão intraepitelial anal de baixo grau	14	12,2
Histopatologia		
Normal	9	40,9
Inflamatório	3	13,7
Hiperplasia simples do epitélio malpighiano	3	13,7
Infecção pelo HPV	1	4,5
NIA 1	1	4,5
NIA 2	3	13,7
NIA 3	2	9,0
DNA-HPV anal		
Positivo	83	72,2
Negativo	18	15,6
Indeterminado	14	12,2

NIA: neoplasia intraepitelial anal.

Todas as pacientes foram submetidas à coleta da citologia anal e anuscopia de alta resolução no mesmo dia. Dos esfregaços citológicos, 7% foram considerados insatisfatórios para análise. Das citologias satisfatórias (n=107), 22,6% foram anormais. Destas, 12,2% corresponderam a lesão intraepitelial anal de baixo grau (LIEAbg) e 3,4% lesão intraepitelial anal de alto grau (LIEAag). Foram realizadas 115 anuscopias de alta resolução das quais 32% tiveram resultados normais. Epitélio acetobranco foi a imagem atípica mais frequente (63,5%) (Tabela 3).

A biópsia anal foi realizada em 84,6% das mulheres e 15,4% das mulheres com citologia anormal declinaram da biópsia. Das pacientes biópsiadas, 31,7% apresentaram alterações, entre as quais 22,7% tiveram diagnóstico de lesão intraepitelial anal de alto grau. Em todas as participantes do estudo, realizou-se pesquisa para HPV anal com PCR, sendo que 12,2% amostras foram consideradas inadequadas. Das amostras adequadas, 72,2% foram positivas para HPV (Tabela 3).

Discussão

A maioria dos estudos sobre a neoplasia intraepitelial anal tem sido realizada em homens e mulheres HIV positivos e homossexuais. Estudos de neoplasia intraepitelial anal são escassos em mulheres sem evidente comprometimento do sistema imunológico, como as desta pesquisa, portadoras de NIC2/3. Na amostra, composta de 115 pacientes, verificou-se que 78,3% das mulheres estavam na faixa etária de 17 a 40 anos, eram predominantemente de área urbana, de escolaridade e poder aquisitivo baixos. Essas características biológicas e socioeconômicas refletem o perfil das usuárias do sistema de saúde pública brasileiro.

Em referência ao comportamento sexual, observou-se início precoce da coitarca e sexo não protegido em mais de 80% das mulheres, o que confirma os achados da literatura²⁰. Estudos demonstraram que baixa escolaridade está associada a início precoce da atividade sexual e sexo desprotegido e que mulheres praticavam sete vezes mais sexo sem preservativo que homossexuais²⁰. Essas atitudes tornam esse grupo de mulheres mais vulneráveis às infecções sexualmente transmissíveis (IST)²⁰ e os preconceitos

e tabus culturais limitam a abordagem dessa realidade pelos serviços de saúde²⁰.

A literatura é controversa com relação ao risco de desenvolvimento da NIA em mulheres que praticam coito anal. Estudo de caso-controle de base populacional para avaliar fatores que contribuam para o aumento da incidência de câncer anal demonstrou risco aumentado para câncer anal nas mulheres que referiram essa prática²¹. Por outro lado, dois estudos de corte transversal para determinar a prevalência de NIA em mulheres com neoplasia genital, realizados no Brasil, não demonstraram haver associação significativa entre intercurso anal e NIA^{14,15}. Confirmando esses achados, pesquisadores têm identificado DNA de HPV em pessoas que negaram essa prática. Logo, a presença de infecção por HPV no canal anal não está exclusivamente vinculada ao coito anal²¹⁻²³. Esses autores sugerem que o vírus HPV migraria por contiguidade de outros sítios genitais, ou poderiam ser veiculados por dedos ou outros objetos para o canal anal, causando infecção persistente, e promoveriam a lesão pré-câncer.

No que concerne ao estilo de vida, mulheres que vivem em áreas urbanas estão inseridas num contexto cultural que estimula o consumo regular de bebida alcoólica, tabaco e outras drogas. O álcool, por sua vez, consumido de maneira abusiva²⁴, estimula a prática de comportamentos sexuais de risco, como, por exemplo, o sexo desprotegido. Ademais, estudos sugerem associações significativas entre câncer de colo uterino e infecção por HPV para usuárias de álcool, tabaco e outras drogas^{21,25}. Todavia, em mulheres com HPV anal e/ou câncer anal, essa associação permanece incerta.

Devido às similaridades existentes entre epitélio do colo do útero e canal anal²⁶, adotou-se a tríade clássica para diagnóstico da lesão precursora do câncer do colo uterino também para o rastreio do câncer de canal anal: citologia, anoscopia de alta resolução e biópsia. No presente estudo, a citologia anal foi alterada em 22,6% dos esfregaços. Esse percentual foi maior que o relatado em uma amostra de mulheres portadoras de neoplasia vulvar e cervical²⁷, em que anormalidades citológicas foram identificadas em 9% dos casos. Podemos atribuir essa diferença à padronização da técnica de colheita da citologia anal²⁸. Outra hipótese seria a presença de um viés de seleção, considerando que grande parte das neoplasias intraepiteliais vulvares apresenta uma outra via carcinogênica associada ao líquen escleroso. Estudos têm demonstrado que a citologia anal tem uma alta sensibilidade (98%) para detecção de neoplasia intraepitelial anal, porém uma baixa especificidade (50%) para prever a severidade da lesão^{29,30}. Também foi observado que a concordância entre citologia e histologia anal em geral é fraca, porém é moderada quando se trata de lesões de alto grau^{28,30}. Destacamos que a validação dos testes diagnósticos não foi objetivo deste estudo; sugerimos que novas pesquisas sejam realizadas com esse

propósito. Optou-se apenas por uma avaliação descritiva dos resultados.

Autores sugerem que a AAR pode ser um método superior à citologia para o rastreio do câncer anal³⁰. Contudo, esse posicionamento ainda é controverso quando consideramos que a biópsia do canal anal, etapa constituinte do procedimento da anoscopia, apresenta algumas dificuldades, com relação tanto à execução quanto à interpretação dos achados histopatológicos¹⁹. Quando os exames da tríade clássica concordam entre si, há maior segurança diagnóstica. Contudo, existe possibilidade de erros na categorização da neoplasia anal, e estudos recentes têm sugerido ferramentas adicionais a serem utilizadas na avaliação das lesões precursoras com a finalidade de aumentar a precisão do diagnóstico das lesões de alto grau. Entre essas ferramentas, temos, por exemplo, os testes de DNA para HPV, testes para os oncogenes mRNA E6/E7³¹ e os marcadores para proteína Ki67, proteína p16, ou as minicromossômicas 3, 4, 6 e 7.

O presente estudo encontrou elevado percentual (72,1%) de HPV anal em mulheres com neoplasia cervical, soronegativas para HIV. Estudo realizado em um grupo de 40 mulheres com neoplasia cervical grau 3, para identificar a prevalência anal de HPV por meio de captura híbrida, identificou 35% das amostras positivas¹⁶. Em outro estudo que incluiu um grupo de mulheres portadoras de neoplasias genitais, utilizando PCR para pesquisa de DNA de HPV, observou-se 51% das amostras positivas²⁷. Atribuímos o percentual elevado de detecção de DNA HPV em nosso estudo ao fato de termos incluído apenas mulheres com neoplasia cervical e a colheita do material para PCR ter sido realizada imediatamente após o diagnóstico histopatológico de NIC2/3, no período, portanto, de maior prevalência do vírus nessa região.

Nosso estudo encontrou, entre as mulheres com neoplasia intraepitelial cervical de alto grau, 15,6% de lesão intraepitelial anal, o que está de acordo com a literatura^{15,32,33}. Podemos depreender que os mesmos fatores que contribuem para o desenvolvimento da neoplasia cervical contribuam também para o desenvolvimento da neoplasia anal, em função das similaridades embriológicas, anatômicas e epidemiológicas existentes entre as regiões^{9,26}.

Encontramos elevada prevalência de infecção por HPV e lesão HPV induzida em canal anal de mulheres com neoplasia cervical grau 2/3. A identificação de NIA 2 e 3 demonstra a importância do rastreio das lesões precursoras de câncer de canal anal nesse grupo.

Agradecimentos

Ao Programa Interinstitucional de Bolsa de Iniciação Científica (PIBIC) do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/Instituto de Medicina Integral “Prof. Fernando Figueira”.

Referências

- Koshiol J, Lindsay L, Pimenta JM, Poole C, Jenkins D, Smith JS. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia: a systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol*. 2008;168(2):123-37.
- Varnai AD, Bollmann M, Griefingholt H, Speich N, Schmitt C, Bollmann R, 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(2):135-42.
- Edgren G, Sparén P. Risk of anogenital cancer after diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia: a prospective population-based study. *Lancet Oncol*. 2007;8(4):311-6.
- Shai A, Brake T, Somoza C, Lambert PF. The human papillomavirus E6 oncogene dysregulates the cell cycle and contributes to cervical carcinogenesis through two independent activities. *Cancer Res*. 2007;67(4):1626-35.
- Balsitis SJ, Sage J, Duensing S, Münger K, Jacks T, Lambert PF. Recapitulation of the effects of the human papillomavirus type 16 E7 oncogene on mouse epithelium by somatic Rb deletion and detection of pRb-independent effects of E7 in vivo. *Mol Cell Biol*. 2003;23(24):9094-103.
- Oh JK, Ju YH, Franceschi S, Quint W, Shin HR. Acquisition of new infection and clearance of type-specific human papillomavirus infections in female students in Busan, South Korea: a follow-up study. *BMC Infect Dis*. 2008;8:13.
- Schlecht NF, Platt RW, Duarte-Franco E, Costa MC, Sobrinho JP, Prado JC, et al. Human papillomavirus infection and time to progression and regression of cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95(17):1336-43.
- Richart RM, Masood S, Syrjänen KJ, Vassilakos P, Kaufman RH, Meisels A, et al. Human papillomavirus. International Academy of Cytology Task Force summary. Diagnostic Cytology Towards the 21st Century: an International Expert Conference and Tutorial. *Acta Cytol*. 42(1):50-8.
- Crawford R, Grignon AL, Kitson S, Winder DM, Ball SL, Vaughan K, et al. High prevalence of HPV in non-cervical sites of women with abnormal cervical cytology. *BMC Cancer*. 2011;11:473.
- Nyitray AG. The epidemiology of anal human papillomavirus infection among women and men having sex with women. *Sex Health*. 2012;9(6):538-46.
- van der Zee RP, Richel O, de Vries HJC, Prins JM. The increasing incidence of anal cancer: can it be explained by trends in risk groups? *Neth J Med*. 2013;71(8):401-11.
- Santoso JT, Long M, Crigger M, Wan JY, Haefner HK. Anal intraepithelial neoplasia in women with genital intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol*. 2010;116(3):578-82.
- Scholefield JH, Castle MT, Watson NFS. Malignant transformation of high-grade anal intraepithelial neoplasia. *Br J Surg*. 2005;92(9):1133-6.
- Koppe DC, Bandeira CB, Rosa MR, Cambuzzi E, Meurer L, Fagundes RB. Prevalence of anal intraepithelial neoplasia in women with genital neoplasia. *Dis Colon Rectum*. 2011;54(4):442-5.
- 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.
- Véo CAR, Saad SS, Nicolau SM, Melani AG, Denadai MV. Study on the prevalence of human papillomavirus in the anal canal of women with cervical intraepithelial neoplasia grade III. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2008;140(1):103-7.
- Lima Júnior SF, Fernandes MC, Heráclio SA, Souza PR, Maia MM. [Prevalence of human papillomavirus genotypes: comparison between three detection methods in patients of Pernambuco, Brazil]. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2011;33(10):315-20. Portuguese.
- Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*. 2002;287(16):2114-9.
- Heráclio SA, Schettini J, Oliveira ML, Souza AS, Souza PR, Amorim MM. High-resolution anoscopy in women with cervical neoplasia. *Int J Gynecol Obstet*. 2015;128(3):216-9.
- Fernandes AM, Antonio DG, Bahamondes LG, Cupertino CV. Conhecimento, atitudes e práticas de mulheres brasileiras atendidas pela rede básica de saúde com relação às doenças de transmissão sexual. *Cad Saúde Pública*. 2000;16 Supl 1:S103-S12.
- Daling JR, Madeleine MM, Johnson LG, Schwartz SM, Shera KA, Wurscher MA, et al. Human papillomavirus, smoking, and sexual practices in the etiology of anal cancer. *Cancer*. 2004;101(2):270-80.
- Piketty C, Darragh TM, Da Costa M, Bruneval P, Heard I, Kazatchkine MD, et al. High prevalence of anal human papillomavirus infection and anal cancer precursors among HIV-infected persons in the absence of anal intercourse. *Ann Intern Med*. 2003;138(6):453-9.
- Marrazzo JM, Koutsky LA, Kiviat NB, Kuypers JM, Stine K. Papanicolaou test screening and prevalence of genital human papillomavirus among women who have sex with women. *Am J Public Health*. 2001;91(6):947-52.
- Dermen KH, Thomas SN. Randomized controlled trial of brief interventions to reduce college students' drinking and risky sex. *Psychol Addict Behav*. 2011;25(4):583-94.
- Roura E, Castellsagué X, Pawlita M, Travier N, Waterboer T, Margall N, et al. Smoking as a major risk factor for cervical cancer and pre-cancer: results from the EPIC cohort. *Int J Cancer*. 2014;135(2):453-66.
- Fritsch H, Aigner F, Ludwikowski B, Reinstadler-Zankl S, Illig R, Urbas D, et al. Epithelial and muscular regionalization of the human developing anorectum. *Anat Rec (Hoboken)*. 2007;290(11):1449-58.
- Park IU, Ogilvie JW Jr, Anderson KE, Li ZZ, Darragh L, Madoff R, et al. Anal human papillomavirus infection and abnormal anal cytology in women with genital neoplasia. *Gynecol Oncol*. 2009;114(3):399-403.
- Heráclio SA, Souza AS, Pinto FR, Amorim MM, Oliveira ML, Souza PR. Agreement between methods for diagnosing HPV-induced anal lesions in women with cervical neoplasia. *Acta Cytol*. 2011;55(2):218-24.
- Araim S, Walts AE, Thomas P, Bose S. The anal pap smear: cytomorphology of squamous intraepithelial lesions. *Cytojournal*. 2005;2(1):4.
- Nahas CS, Silva Filho EV, Segurado AA, Genevicius RF, Gerhard R, Gutierrez EB, et al. Screening anal dysplasia in HIV-infected patients: is there an agreement between anal pap smear and high-resolution anoscopy-guided biopsy? *Dis Colon Rectum*. 2009;52(11):1854-60.
- Silling S, Kreuter A, Hellmich M, Swoboda J, Pfister H, Wieland U. Human papillomavirus oncogene mRNA testing for the detection of anal dysplasia in HIV-positive men who have sex with men. *J Clin Virol*. 2012;53(4):325-31.
- Scholefield JH, Hickson WG, Smith JH, Rogers K, Sharp F. Anal intraepithelial neoplasia: part of a multifocal disease process. *Lancet*. 1992;340(8830):1271-3.
- Hessol NA, Holly EA, Efid JT, Minkoff H, Schowalter K, Darragh TM, et al. Anal intraepithelial neoplasia in a multisite study of HIV-infected and high-risk HIV-uninfected women. *AIDS*. 2009;23(1):59-70.