

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

ASSOCIAÇÃO ENTRE FATORES LIGADOS À IMUNODEPRESSÃO E O
DIAGNÓSTICO DE LESÕES PRECURSORAS DO CÂNCER ANAL EM
PACIENTES HIV-POSITIVOS.

Bolsista: Jane Anne Nunes Lira, FAPEAM

MANAUS

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL
PROJETO PIBIC: PIB-S/0010/2009
ASSOCIAÇÃO ENTRE FATORES LIGADOS À IMUNODEPRESSÃO E O
DIAGNÓSTICO DE LESÕES PRECURSORAS DO CÂNCER ANAL EM
PACIENTES HIV-POSITIVOS.

Bolsista: Jane Anne Nunes Lira
Orientador: Prof. Msc. Ivan Tramuja da Costa e Silva

MANAUS
2010

COLABORADORES

Prof. Dr. Luiz Carlos de Lima Ferreira – Patologista (FMT-AM)

RESUMO

Introdução: O câncer anal e suas lesões precursoras estão intimamente relacionados à infecção continuada pelo papilomavírus humano (HPV). Infecções pelo vírus são comuns em indivíduos HIV+ e/ou anorreceptivos. Vários fatores imunossupressores têm sido relacionados com o aumento da incidência desse tipo de câncer. Todavia pouco se sabe sobre a influência desses fatores em pacientes atendidos na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMT-AM). Visando contribuir para a melhor compreensão desse fato, esse estudo objetiva avaliar a influência de fatores imunodepressores no diagnóstico de lesões precursoras do câncer anal em pacientes HIV+ na FMT-AM. **Métodos:** 399 pacientes HIV+ e HIV- foram atendidos de Jan 2007 a Dez 2008. Destes, 203 indivíduos foram distribuídos em 3 grupos de estudo: HSH/HIV+ (Homens HIV-positivos que fazem sexo com homens), MHIV+ (Mulheres HIV-positivas) e GR- (grupo controle). Coletaram-se amostras celulares e de tecido anal para exames histológicos, bem como para a pesquisa de DNA de HPV, CMV (citomegalovírus), EBV (vírus Epstein-Barr) e HSV (Vírus do Herpes Simples); dos prontuários de pacientes HIV+ obtiveram-se dados referentes à contagem de linfócitos T/CD4+ (LTCD4), à carga viral do HIV (CV) e ao tempo de uso de HAART (terapia anti-retroviral de alta potência). Para a análise estatística, foram utilizados tabelas de contingência e testes não-paramétricos de amostras independentes (Teste χ^2 , Teste G e Teste exato de Fisher); foram considerados significativos os valores de $p \leq 0,05$. **Resultados:** A frequência de resultados histopatológicos positivos para ASIL (lesão intraepitelial escamosa anal) de alto (HSIL) ou baixo grau (LSIL) foi de 32,5% para toda a amostra estudada. Nos três grupos estudados foi maior, 49,5%, entre HSH/HIV+ ($p < 0,0001$). Detectou-se DNA de HPV em 61,8% dos indivíduos analisados; ASIL foi mais prevalente no grupo de pacientes positivos para HPV de alto ou baixo risco (42,1%) que no grupo de pacientes HPV-negativos (12,7 %, $p < 0,05$). Dos pacientes com $LTCD4 \leq 500 \times 10^6/l$, 50,6% apresentaram ASIL, enquanto nos com $LTCD4 \geq 501 \times 10^6/l$ a prevalência foi de 23,5% ($p < 0,05$). ASIL foi mais frequente nos pacientes HIV+ com $CV \geq 30.001$ cópias de RNA/ml (58,33%) em relação aos com CV inferior ($p < 0,05$). O tempo de uso e os tipos de HAART não se associaram significativamente com ASIL ($p > 0,05$). Dentre as outras comorbidades virais investigadas apenas o HSV relacionou-se estatisticamente com a presença de ASIL ($p < 0,05$). **Conclusões:** Nos pacientes estudados, houve significativa associação de ASIL com a condição de portador do HIV, com $LTCD4 \leq 500 \times 10^6/l$ e $CV \geq 30.001$. A presença de DNA de HPV, de alto ou baixo risco, associou-se fortemente à presença de ASIL, sendo o HSV um importante cofator. Por outro lado, não houve significância estatística entre o tempo de uso e os tipos de HAART com ASIL.

Palavras-chave: imunossupressão; carcinoma anal; HAART; HPV; HIV.

ABSTRACT

Introduction: Anal cancer and its precursor lesions are closely related to continued human papillomavirus (HPV) infection. HPV is commonly observed in HIV+ individuals, with/without anoreceptive sexual habits. Some immunosuppressive factors have been linked to the growing incidence of this cancer. However little is known about the influence of these factors in patients treated at the Tropical Medicine Foundation of Amazonas (FMT-AM). This study aims to evaluate the influence of immunosuppressive factors in the diagnosis of anal cancer precursor lesions among HIV patients treated at FMT-AM. **Methods:** 399 HIV-positive and HIV-negative patients were treated from Jan 2007 to Dec 2008. 203 out of the original patients were divided into three groups: MSM/HIV+ (HIV-positive men who have sex with men), MHIV+ (HIV-positive women) and GR- (control group). Anal tissue samples and anal swabs were collected for histological examination as well as for the detection of DNA of HPV, CMV (cytomegalovirus), EBV (Epstein-Barr virus) and HSV (Herpes Simplex Virus). Data relating to T/CD4+ lymphocyte count (TCD4L), the HIV viral load (VL) and the time of use and type of HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy) were obtained from medical records of HIV+ patients. Statistical analysis was performed using contingency tables and nonparametric tests for independent samples (χ^2 test, G test and Fisher's exact test). Statistical significance was considered if $p \leq 0.05$. **Results:** The frequency of positive for ASIL (anal squamous intraepithelial lesion) histopathological results, either of high (HSIL) or low-grade (LSIL), was 32.5% for the entire sample. It was higher (49.5%) among MSM/HIV+ in comparison to the other two groups studied ($p < 0.0001$). HPV DNA was detected in 61.8% of the subjects analyzed. ASIL was more prevalent (42.1%) in patients positive for HPV (either high or low risk) than in the group of HPV-negative patients (12.7%, $p < 0.05$). 50.6% of patients with $TCD4L \leq 500 \times 10^6/l$ showed ASIL compared with 23.5% of those with $TCD4L \geq 501 \times 10^6/l$ ($p < 0.05$). ASIL was more frequent in HIV+ patients with $VL \geq 30,001$ RNA copies/ml (58.33%) than those with lower VL ($p < 0.05$). The time and type of HAART use was not significantly associated with ASIL ($p > 0.05$). Among the other viral comorbidities investigated only the presence of DNA for HSV was statistically correlated with the presence of ASIL ($p < 0.05$). **Conclusions:** In the patients studied, ASIL was significantly observed in HIV+ with $TCD4L$ counts $\leq 500 \times 10^6/l$ and $VL \geq 30,001$. The presence of HPV DNA, either high or low risk, was strongly linked to the presence of ASIL, and HSV was an important cofactor. Nonetheless, no statistical significance was observed between ASIL and either the time of use or the types of HAART utilized.

Keywords: immunosuppression; anal carcinom; HAART; HPV; HIV.

LISTA DE SIGLAS

ASIL	Lesão intraepitelial escamosa anal
ABC	Abacavir
AZT	Zidovudina
AZT+3TC	Zidovudina + Lamivudina
ATV	Atazanavir
CD4A	Contagem de linfócitos T/CD4+ menor ou igual a $200 \times 10^6/l$
CD4B	Contagem de linfócitos T/CD4+ entre 201 e $500 \times 10^6/l$
CD4C	Contagem de linfócitos T/CD4+ maior ou igual a $501 \times 10^6/l$
CMV	Citomegalovírus
CV	Carga viral do HIV
CV0	Carga viral do HIV indetectável
CVA	Carga viral do HIV menor ou igual a 30.000 cópias de RNA por ml
CVB	Carga viral do HIV maior ou igual a 30.001 cópias de RNA por ml
ddI	Didanosina

DDIEC	Didanosina de absorção entérica
d4T	Estavudina
DST	Doença sexualmente transmissível
EBV	Vírus Epstein-Barr
EFV	Efavirenz
FMT-AM	Fundação de Medicina Tropical do Amazonas
GR-	Pacientes, de ambos os sexos, não pertencentes a grupos de risco para o desenvolvimento do câncer anal
HAART	Terapia anti-retroviral de alta potência
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPV	Vírus do Papiloma Humano
HPVa	Vírus do Papiloma Humano de baixo risco
HPVb	Vírus do Papiloma Humano de alto risco
HSIL	Lesão intraepitelial escamosa anal de alto grau
HSH/HIV+	Homens HIV-positivos que fazem sexo com homens ou com homens e mulheres
HSV	Vírus do Herpes simples

IDV	Indinavir
LPV/r	Lopinavir/ritonavir
LSIL	Lesão intraepitelial escamosa anal de baixo grau
LTCD4	Contagem de linfócitos T/CD4+
MHIV+	Mulheres HIV-positivas
NIAA	Neoplasia intraepitelial anal de alto grau
NVP	Nevirapina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RTV	Ritonavir
SQV	Saquinavir
TDF	Tedofovir
3TC	Lamivudina

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características epidemiológicas da amostra.....	40
Tabela 2 - Achados histológicos anais <i>versus</i> características epidemiológicas da amostra.....	41
Tabela 3 - Achados histológicos anais observados nos grupos de Estudo.....	42
Tabela 4 - Achados histológicos anais e a co-infecção anal por HPV nos grupos de estudo	43
Tabela 5 - Associação entre achados histológicos anais e a contagem de Linfócitos T/CD4+, carga viral do vírus da imunodeficiência humana e o tempo de HAART em pacientes HIV+.....	44
Tabela 6 - Co-infecção por CMV, EBV e HSV e a presença de ASIL ou não na amostra estudada.....	45
Tabela 7 – Tipo de HAART <i>versus</i> achados histológicos anais.....	46

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	JUSTIFICATIVA.....	14
3	OBJETIVOS.....	15
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
4.1	O Câncer Anal.....	16
4.2	Infecção pelo HPV.....	16
4.3	Imunossupressão causada pelo HIV.....	17
4.4	A era HAART.....	18
4.5	Co-infecções virais e o desenvolvimento do câncer humano.....	19
5	METODOLOGIA.....	21
5.1	Tipo de estudo.....	22
5.2	Universo do Estudo.....	21
5.3	Amostra populacional estudada.....	21
5.4	Critérios de Inclusão e Exclusão.....	21
5.5	Materiais de Coleta.....	22
5.6	Amostras.....	23
5.7	Procedimentos.....	23
5.8	Análise dos resultados.....	29
5.9	Análise estatística.....	31
6	RESULTADOS.....	32
6.1	Características epidemiológicas da amostra.....	32
6.2	Achados histológicos anais <i>versus</i> características epidemiológicas da amostra.....	32
6.3	Distribuição de ASIL nos grupos de estudo.....	32
6.4	HPV <i>versus</i> diagnóstico de ASIL.....	33
6.5	Contagem de linfócitos T/CD4+ e carga viral do HIV <i>versus</i> o diagnóstico de ASIL.....	33
6.6	Detecção de CMV, HSV e EBV por PCR em biópsias positivas para ASIL.....	33
6.7	Tempo do uso de HAART <i>versus</i> o diagnóstico de ASIL.....	34
6.8	Tipo de HAART <i>versus</i> ASIL.....	34
7	DISCUSSÃO.....	35
8	CONCLUSÃO.....	39
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
10	ANEXOS.....	55

1 INTRODUÇÃO

O câncer anal possui incidência relativamente pouco freqüente na população, representando aproximadamente 2% apenas de todos os cânceres colorretais (KEIGHLEY; WILLIAMS, 1998). Tem-se observado, no entanto, um aumento da incidência dessa neoplasia em alguns grupos populacionais, considerados "de risco", tais como: indivíduos anorreceptivos, de ambos os sexos (DALING *et al.*, 1982; DALING *et al.*, 1987), portadores de lesões anais crônicas que evoluam com inflamação, como hemorróidas, fissuras e fístulas (HOLLY *et al.*, 1989; PRIETO; VASQUEZ, 1997); portadores de doenças sexualmente transmissíveis, tais como sífilis, gonorréia, infecção pelos vírus do herpes simples tipo II (HSV), da imunodeficiência adquirida (HIV), do papiloma humano (HPV) e infecção pela *Chlamydia trachomatis* (DALING, 1987; FRISCH *et al.*, 1997; CHIN-HONG; PALEFSKY, 2002); tabagistas (FRISCH *et al.*, 1999; DALING, 1992); imunodeprimidos - transplantados (CARTER, 1993) e doentes portadores de câncer anal relacionado a fatores genéticos (PRIETO; VASQUEZ, 1997).

O comportamento do câncer anal é similar ao do câncer de colo de útero, pois, assim como este, o câncer anal está associado à infecção crônica pelo vírus do papiloma humano - HPV, é precedido por lesão precursora não maligna, a lesão intraepitelial escamosa anal – ASIL (correspondente à lesão intraepitelial escamosa cervical – CSIL – do câncer cervical); demonstra predileção pela zona de transição celular de células escamosas para glandulares; e possui aspectos biológicos e histopatológicos comuns com o câncer de colo uterino (MELBYE; SPROGEL, 1991; PALEFSKY; BRATCHER, 2008; SCARPINI *et al.*, 2008).

Com clara associação com os tipos de HPV de alto risco, as neoplasias intraepiteliais anais de alto grau (NIAA) são prováveis precursoras de tumores anais invasivos (KREUTER *et*

al., 2005). O risco de progressão pode estar ligado à gravidade da displasia (COLQUHOUN *et al.*, 2003) e, embora ainda não haja comprovação incontestada, o tratamento dessas lesões preveniria a progressão para carcinoma (KREUTER *et al.*, 2005; MATHEWS *et al.*, 2004).

O HPV é transmitido geralmente pela pele ou por contato sexual. Infecta as células epiteliais escamosas, levando a diversas alterações oncogênicas ao integrar seu DNA viral ao genoma do hospedeiro. Seus principais produtos protéicos, as proteínas E6 e E7, atuam desregulando o ciclo celular: a proteína E6 estimula a ubiquitinação e a degradação da p53 e a proteína E7 liga-se à proteína gerada pelo gene Rb, liberando o fator de transcrição E2F, ações que podem dar início à transformação celular e desenvolvimento neoplásico (ROBINS; COTRAN, 2005). Os principais tipos de HPV associados com a infecção anogenital, displasia e malignidade são o 16, 18, 31, 33 e 35 (MARTIN; BOWER, 2001).

Estudos demonstram que pacientes HIV-positivos são duas a nove vezes mais propensos a ter infecção pelo HPV que pacientes HIV negativos (SOBHANI *et al.*, 2000; PALEFSKY *et al.*, 1998; SUN *et al.*, 1997), independente de práticas sexuais (DROBACHEFF *et al.*, 2003). Esses indivíduos, face à imunossupressão, devido à menor taxa de linfócitos T/CD4+, apresentam-se mais propensos aos efeitos da infecção continuada pelo HPV (CAUSSY *et al.*, 1990), estando sob risco 30 vezes maior de evoluir para o câncer anal (SOBHANI *et al.*, 2004). Se tiverem hábitos anorreceptivos, entretanto, este risco pode ficar 60 vezes maior (PIKETTY *et al.*, 2003).

Critchlow *et al.* (1995), em estudo de coorte com homens homossexuais, HIV-positivos e negativos, encontraram um risco relativo de 7,5 para o desenvolvimento de lesão intraepitelial escamosa anal de alto grau (HSIL) em homens HIV-positivos com contagem de linfócitos T/CD4+ (LTCD4) menor que $500 \times 10^6/l$. Palesfsky *et al.* (1998), comparando indivíduos com a

LTCD4 maior que $500 \times 10^6/l$, entre $200-500 \times 10^6/l$ e menor que $200 \times 10^6/l$, relataram um risco relativo de HSIL maior naqueles com a taxa abaixo de $200 \times 10^6/l$. O que corrobora com a idéia de que quanto maior a imunossupressão, maior o risco de malignidades anais.

A introdução da terapia anti-retroviral de alta potência (HAART) tem demonstrado, de um lado, que prolonga a vida de pacientes HIV-positivos, mas de outro, que pode aumentar a prevalência de lesões pré-neoplásicas. Há recentes evidências de que a HAART restaura a função imune (aumentando a taxa de LTCD4e diminuindo a carga viral do HIV), prevenindo infecções oportunistas e neoplasias, apesar de não ter demonstrado esse mesmo efeito sobre lesões intraepiteliais escamosas anais (MARTIN; BOWER, 2001).

Face ainda aos fatores de risco relacionados ao carcinoma anal, apesar de o vírus do papiloma humano ter sido identificado como o principal agente causador de neoplasia intraepitelial anal, principalmente o HPV 16 (WONG *et al.*, 2010), sua infecção provavelmente não é por si só suficiente para provocar mudanças que possam vir a resultar em neoplasias. Outros agentes podem atuar sinergicamente com o HPV nesta transformação para câncer. Sobhani *et al.* (2004) observaram, por exemplo, em estudo comparativo de pacientes HIV-positivos e HIV-negativos, que o risco de carcinoma anal invasivo em pacientes infectados pelo HPV está aumentado em indivíduos HIV-positivos com co-infecção anal secundária a sífilis, gonorréia, vírus Epstein-Barr (EBV), citomegalovírus (CMV) ou vírus herpes simples (HSV).

De forma geral, qualquer imunossupressão sistêmica poderá influir no desenvolvimento de neoplasias malignas anais (FRAZER *et al.*, 1986).

2 JUSTIFICATIVA

A prevalência estimada de lesões precursoras do câncer anal nos pacientes HIV-positivos acompanhados na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMT-AM) era, ao início deste trabalho, de cerca de 60%.

Entretanto, a prevalência de infecção anal pelo HPV ainda não era conhecida nesta população nem tampouco a influência de fatores indicativos de imunossupressão, como as taxas sorológicas de linfócitos T/CD4+, a carga viral do HIV e a presença de outras co-infecções virais (CMV, EBV, HSV) sobre a condição de portador de infecção anal pelo HPV ou portador de lesões intraepiteliais escamosas anais.

Muitos pacientes HIV-positivos acompanhados na instituição estão sob tratamento com HAART e experimentando sobrevidas duradouras. Até bem recentemente não estavam sendo seguidos do ponto de vista coloproctológico quanto à prevenção do câncer anal. Não havia informações locais se a duração de uso e o tipo de HAART utilizado pelos pacientes influiriam no achado de ASIL.

Este estudo pretendeu analisar, nos pacientes HIV-positivos acompanhados na FMT-AM, a associação entre fatores indicativos de imunossupressão e a probabilidade de presença de infecção anal por HPV de alto risco e de lesões precursoras do câncer anal. Procurou identificar quais os grupos de pacientes encontram-se sob maior risco de apresentar câncer anal e qual o tipo de abordagem diagnóstica a ser empregada nestes indivíduos.

Visou contribuir para a melhor compreensão de quais são os fatores de risco envolvidos na presença de lesões associadas ao câncer anal num grupo de pacientes sob risco muito aumentado de apresentar a doença.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Estudar a influência de fatores ligados à imunodepressão no diagnóstico de ASIL em pacientes HIV-positivos atendidos na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas

3.2 Específicos

- Avaliar a distribuição dos achados histológicos de biópsias anais realizadas nos diferentes grupos de pacientes estudados.
- Associar os achados histológicos anais observados com os possíveis resultados da PCR para HPV.
- Verificar a associação do tipo de HAART com a presença de ASIL ou câncer anal em indivíduos HIV+.
- Observar a associação do tempo de HAART com a presença de ASIL ou câncer anal em indivíduos HIV+.
- Comparar a presença de co-infecção por HSV, EBV e/ou CMV com a presença de ASIL ou câncer anal nos diferentes grupos de pacientes estudados.
- Contrapor os resultados da contagem de linfócitos T/CD4+ e da carga viral do HIV com a presença de ASIL ou câncer anal em pacientes HIV+.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 O Câncer Anal

O câncer anal é raro e representa de 1 a 2% de todos os tumores do cólon e de 2 a 4% de todos os tipos de câncer que acometem o intestino grosso. No Brasil, para o ano de 2009, a incidência de câncer anal foi estimada em cerca de 1.617 casos novos, 539 no sexo masculino, e 1.078 no sexo feminino (INCA, 2010).

Nakajima *et al.* (2001), analisando 58 pacientes com câncer anal, encontrou uma frequência maior desse tipo de câncer em pessoas com a faixa etária entre 60 e 64 anos, sendo a maioria do sexo feminino (70,7%), com a proporção de 2,4 mulheres para cada homem.

Histologicamente, os padrões de diferenciação mais comuns de câncer anal incluem o padrão basalóide, o adenocarcinoma e o carcinoma de células escamosas (espinocelular). Raramente outros tumores podem surgir no canal anal, como o carcinoma de pequenas células ou o melanoma (ROBINS; COTRAN, 2005). Segundo Shark *et al.* (1996), o tipo mais comum de câncer anal é o espinocelular, que acomete até 47% dos casos, seguido pelos tipos basalóide, adenocarcinoma e, mais raramente, melanoma ou adenocarcinoma mucinoso. Os carcinomas de células escamosas estão intimamente relacionados à infecção crônica pelo HPV (MATCZAK, 2001). Ocorrendo principalmente em homens HIV + com hábitos anorreceptivos (MELBYE *et al.*, 1994; GOEDERT *et al.*, 1998).

4.2 Infecção pelo HPV

O HPV está entre os agentes infecciosos que mais comumente são transmitidos por via sexual, sendo um importante fator de risco para o desenvolvimento de NIA e câncer anal (CHIN-

HONG; PALEFSKY, 2002). Estima-se que cerca de 75% dos indivíduos sexualmente ativos, com idade entre 15 a 49 anos, terão ao menos um subtipo de HPV genital durante a vida, dos mais de 200 diferentes subtipos já identificados. Muitos serão portadores assintomáticos do vírus, e apenas 1% deles terá lesões visíveis (MARTINS, 2001), representadas pelos condilomas acuminados, fator considerado de risco para a displasia anal (NADAL; MANZIONE, 2006).

A replicação do DNA do HPV depende da estrutura de replicação das células do hospedeiro. As principais proteínas virais consideradas de alto potencial oncogênico, E6 e E7, atuam interferindo na atividade de inibidores do ciclo celular, as proteínas p53 e pRb (HELT *et al.*, 2003), induzindo suas degradações. Mas além dessas ações, a proteína E7 pode ainda inativar a p21 e interferir na atividade de transcrição da p53 (ROBINS; COTRAN, 2005), e a proteína E6 pode apresentar outros efeitos, tais como o impedimento da senescência replicativa pela ativação da telomerase (MUNGER *et al.*, 2002; KLINGELHUTZ *et al.*, 1996).

Embora intimamente relacionada com o câncer anogenital, parece provável que a infecção pelo HPV seja apenas um agente iniciador do processo da carcinogênese humana e que mutações somáticas adicionais são essenciais para a transformação maligna. Tal impressão está relacionada ao fato de que apesar de alguns tipos de HPV estarem envolvidos na formação de cânceres, quando ceratinócitos humanos são transfectados *in vitro* com DNA dos tipos de HPV 16, 18 e 31, eles tornam-se imortalizados, porém não formam tumores em animais de experimentação (ROBINS; COTRAN, 2005).

4.3 Imunossupressão causada pelo HIV

O vírus da imunodeficiência humana infecta e mata, eventualmente, os linfócitos -T auxiliares CD4+, levando a uma profunda imunossupressão e a uma grande quantidade de infecções (ROBINS; COTRAN, 2005).

A infecção pelo HIV aumenta a reativação do HPV, com conseqüente aparecimento de possíveis lesões epiteliais pré-cancerosas (CAUSSY *et al.*, 1990). Diversos trabalhos confirmam essa idéia. Palefsky *et al.* (1998) estudando homens HIV+ e HIV- com hábitos anorreceptivos, encontrou uma prevalência de infecção por HPV (múltiplos tipos) de 73% em pacientes HIV+ e de 23% em HIV-.

Em um estudo de coorte comparando 158 indivíduos HIV+ com 147 HIV-, foi encontrada uma prevalência de neoplasia intraepitelial escamosa anal de alto grau 3 vezes maior no grupo de pacientes infectados pelo HIV. Esse achado foi relacionado não apenas à infecção por HPV de alto risco (16 e 18), mas também à imunossupressão causada pela baixa contagem de LTCD4 (CRITCHLOW *et al.*, 1995).

Em adição, Piketty *et al.* (2003), em pesquisa realizada nos EUA, estimaram ser a prevalência de câncer anal em indivíduos HIV+ igual a 70 por 100.000, na população de áreas urbanas de São Francisco, Washington e Londres.

4.4 A era HAART

Apesar de estudos demonstrarem a relação de HAART com o decréscimo de alguns tipos de cânceres humanos, como o sarcoma de Kaposi ou do linfoma não-Hodgkin (ELTOM *et al.*, 2002; LEDERGERBER *et al.*, 1999) o mesmo não se pode dizer do câncer anal ou de suas lesões precursoras (FRISCH *et al.*, 2000; MARTIN; BOWER, 2001).

Evidências mostram que a incidência do câncer anal tem continuado a aumentar desde a introdução de HAART. Em estudo realizado por Chiao *et al.* (2005) observou-se que, na era pré-HIV, a incidência de carcinoma de células escamosas do canal anal foi de 0,6 por 100.000 habitantes. Na era HIV, foi de 0,8/100.000 e, na era HAART, de 1.0/100.000.

No recente estudo de coorte multicêntrico de AIDS (MACS), foi relatada uma alta incidência de câncer anal em homens que fazem sexo com homens HIV+ (37 por 100.000 pessoas ano), apesar da introdução de HAART (D' SOUZA *et al.*, 2008).

4.5 Co-infecções virais e o desenvolvimento do câncer humano

Além da infecção pelo HPV, outras viroses podem contribuir para o desenvolvimento do câncer humano. Palefsky *et al.* (1991) relataram que o vírus do herpes simples (HSV) pode ser um importante cofator na patogênese do câncer anal. Esse vírus foi ainda relacionado ao câncer cervical por Smith *et al.* (2002).

O vírus Epstein-Barr (EBV) já foi encontrado infectando o epitélio cervical e, assim como o HSV, pode ser um potencial cofator para a carcinogênese nesta região (PALEFSKY *et al.*, 1991). O EBV tem sido encontrado em associação com quatro tipos de tumores humanos: a forma africana do linfoma de Burkitt, os linfomas de células B nos pacientes imunossuprimidos (especialmente HIV+ e transplantados), alguns casos de linfoma de Hodgkin e carcinomas da nasofaringe (DOLCETTI; MASUCCI, 2003).

O citomegalovírus (CMV) é outro agente infeccioso que tem sido relacionado à gênese do câncer cervical (QIAN *et al.*, 2005). Pode também estar associado ao adenocarcinoma colônico e a colites (HUANG; ROCHE, 1978; RENE *et al.*, 1988).

Todavia, pouco ainda se sabe sobre a atuação desses vírus na patogênese dos cânceres anogenitais, especialmente do carcinoma anal.

5 METODOLOGIA

5.1 Tipo de estudo

Estudo observacional transversal de detecção de casos.

5.2 Universo do Estudo

Indivíduos HIV+ ou HIV- atendidos no Ambulatório de Coloproctologia da FMT-AM.

5.3 Amostra populacional estudada

Dos 399 pacientes atendidos de Jan. 2007 a Dez 2008, foram estudados 203 pacientes distribuídos da seguinte maneira:

5.3.1 Homens HIV-positivos que fazem sexo com homens ou com homens e mulheres, doravante denominados HSH/HIV+;

5.3.2 Mulheres HIV-positivas (MHIV+);

5.3.3 Pacientes, de ambos os sexos, não pertencentes a grupos de risco para o desenvolvimento do câncer anal (GR-);

5.4 Critérios de Inclusão e Exclusão

5.4.1 Inclusão

5.4.1.1 HSH/HIV+

5.4.1.2 MHIV+ (com hábitos anorreceptivos ou não)

5.4.1.3 GR –

5.4.2 Exclusão

5.4.2.1 Pacientes menores de 18 anos de idade, exclusive

5.4.2.2 Pacientes indígenas

5.4.2.3 Pacientes especiais

5.4.2.4 Pacientes que preencheram as condições de inclusão, mas que não cumpriram quaisquer das etapas do exame proctológico e das de coletas de material.

5.4.2.5 Pacientes com exames coletados com resultados insatisfatórios ou rejeitados.

5.5 Materiais de Coleta

5.5.1 Escova citológica

Para realização de coleta de secreção anal para PCR para HPV, HSV, EBV e CMV.

5.5.2 Colposcópio

Colposcópio MEDPEJ® com aumento de imagem de 7 a 24X na distância focal de 30 cm, como anoscópio de magnificação de imagem.

5.5.3 Pinça de biópsia Prof. Medina

Para realização de biópsias de lesões anais acetobranças.

5.5.4 Prontuários de pacientes HIV+ da FMT-AM

Para coleta de informações a respeito dos pacientes HIV+ acompanhados no Ambulatório de DST-AIDS da FMT-AM: dados de identificação dos pacientes e os relacionados à contagem de células T CD4, à carga viral do HIV e ao tratamento com HAART utilizado em indivíduos com AIDS (início da terapia, tipo e dose das drogas utilizadas).

5.5.5 Protocolos de estudo

Os dados de identificação sócio-demográfica dos pacientes bem como os relativos aos fatores de risco (DST, Tabagismo, adição a drogas alucinógenas, multiplicidade de parceiros sexuais, recepção de transplante de rim, coração, ou fígado) e aos resultados lançados nos

prontuários dos pacientes, citados no item 3.5.4, foram compilados no Protocolo de Estudo, demonstrado no Anexo 8.1.

5.6 Amostras

5.6.1 Material celular esfoliado ou raspado do canal anal, por meio da escova citológica, armazenados em frascos de frasco de Eppendorf.

5.6.2 Espécimes do epitélio anal oriundos de biópsias anais realizadas sob controle anoscópico com imagem ampliada.

5.7 Procedimentos

5.7.1 Entrevista

Após ter concordado com o estudo, assinando Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 8.2), cada paciente foi entrevistado, respondendo a perguntas constantes do Protocolo de Estudo. Tal formulário serviu de base para coleta de dados que foram transportados para base de dados eletrônica derivada da plataforma Epi Info® (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2005).

5.7.2 Exame Proctológico

O paciente foi colocado na mesa de exames na posição de Sims modificada para exame proctológico, sendo submetido à inspeção da região anal e perianal. Os achados do exame físico foram anotados no Protocolo de Estudo.

5.7.3 Coleta Exfoliativa

Uma escova citológica saturadamente umedecida em soro fisiológico foi introduzida 3 cm para o interior do canal anal. Nesta situação, foi rodada 360° em torno de seu eixo por 10

vezes e, a seguir, foi retirada num movimento em espiral, exercendo-se leve pressão sobre as paredes do canal anal. A ponta da escova cervical foi então agitada no interior de frasco de Eppendorf contendo 1 ml de solução conservante (TRIS-HCL 50 mM pH8,0 e EDTA 1 mM). O frasco foi hermeticamente fechado e enviado ao Laboratório de Virologia para oportuna tipificação de HPV e determinação de infecção pelo HSV, EBV e CMV pela PCR. Foi armazenado à temperatura de -20°C até o momento dos exames biomoleculares.

5.7.4 Anoscopia com Magnificação de Imagem (AMI)

Todos os pacientes foram submetidos à AMI logo após a coleta citológica anal. O exame foi realizado com colposcópio de aumento de 7 a 24 X a 30 cm de distância focal. O procedimento foi iniciado com um toque retal com dedo enluvado besuntado em geléia de lidocaína a 2% para lubrificar o canal anal para a introdução de um anoscópio descartável de plástico. Uma gaze embebida em ácido acético a 3% foi colocada no interior do canal anal, por dentro do anoscópio, que foi a seguir retirado, ficando a gaze em contato com as paredes do canal anal por 2 min. A gaze foi então retirada e o anoscópio reintroduzido para a realização do exame do canal anal sob magnificação de imagem. Os resultados da AMI foram considerados positivos ou negativos para lesões acetobranças.

Na presença de lesões acetobranças, a topografia da(s) mesma(s) foi(ram) anotada(s) em relação à altura a partir do orifício anal (orificial, anoderma, pectínea, suprapectínea) e a situação horária na circunferência do canal anal (1 - 12 h), sendo considerada a comissura anal anterior a posição de 12 h. Lesões acetobranças eventualmente encontradas foram biopsiadas. Cada biópsia foi aposta a um pedaço quadrangular de papel filtro e acondicionada em frasco com solução fixadora de formalina tamponada a 10%. A amostra fixada em formalina tamponada, destinada ao estudo histopatológico, foi enviada para o Laboratório de Patologia da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas para a realização de exame histopatológico convencional. Os achados da

AMI foram anotados no Protocolo de Estudo. As AMI negativas para lesões acetobranças foram seguidas de biópsias anais 0,5 cm acima da linha pectínea às 7 h, que foram tratadas como citado acima para as biópsias de lesões acetobranças.

5.7.5 Detecção do vírus do herpes genital (HSV)

Foi realizada a detecção do HSV na secreção anal por meio de PCR, segundo a seguinte técnica:

5.7.5.1 Amostras: foram utilizadas as amostras extraídas pelo kit Qiagen, conservadas a -20°C;

5.7.5.2 Procedimentos:

5.7.5.2.1 Sistema: composto de 10,2 µl de água Milli-Q; 1,5 µl de Tampão 10x; 0,45 µl de MgCl₂ 50 mM; 0,3 µl de dNTP 10 mM; 0,75 µl do *primer* anterógrado HSV-GF (5 pmol); 0,75 µl do *primer* reverso HSV-1-2R (5 pmol); 0,15 µl da Enzima Taq polimerase 5 U/µl e 0,9 µl da amostra (DNA), totalizando um volume final de 15 µl;

5.7.5.2.2 Reação de PCR: foi realizada com 40 ciclos de amplificação em termociclador *Eppendorf–Mastercycler Gradient*, seguindo o programa: Dois minutos a 95°C (desnaturação inicial); Trinta segundos a 94°C (anelamento); Quarenta e cinco segundos a 60°C (síntese); e Dez minutos a 72°C para extensão final (SAHIN *et al.*, 2007).

5.7.5.2.3 Detecção dos produtos amplificados: os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2,0%, com brometo de etídeo, em tampão TEB (Tris borato e EDTA) 1x, 100 Volts. Utilizou-se o marcador 100 pb da *Invitrogen Life Technologies*. As amostras consideradas positivas, com bandas de 242 pb para HSV, foram visualizadas através da luz ultravioleta e fotografadas.

5.7.6 Detecção do vírus Epstein-Barr (EBV)

Foi realizada a detecção do EBV na secreção anal por meio de PCR, como no item 5.7.5.2, mas usando o *primer* com a seguinte composição: 0,75 µl do *primer* anterógrado HSV-GF (5 pmol) e 0,75 µl do *primer* reverso EBV-R (5 pmol).

5.7.7 Detecção do citomegalovírus (CMV)

Foi realizada a detecção do CMV na secreção anal por meio de PCR, como no item 5.7.5.2, mas usando o *primer* com a seguinte composição: 0,75 µl do *primer* anterógrado HSV-GF (5 pmol) e 0,75 µl do *primer* reverso CMV-R (5 pmol)

5.7.8 Tipificação de HPV

Para realização da PCR para HPV tipo-específico, o DNA da amostra citológica coletada foi extraído, amplificado, seqüenciado e analisado, conforme abaixo.

5.7.8.1 Recuperação de DNA

Para a recuperação do DNA, foram adicionados 400 µl de "TPK" a 400 µl da amostra coletada descrita no item anterior. A solução de "TPK" consiste em uma mistura de 900 µl de TE (Tris HCl 50mM + EDTA 1 mM pH 8,0) + 100 µl de Tween + 20 µl de proteinase K 10 mg/ml. Essa mistura foi levada ao banho-maria a 55°C por 1 hora e depois fervida por 10 minutos.

5.7.8.2 Amplificação do DNA por PCR

A amplificação por PCR foi realizada com os *primers* específicos MY11 e MY09, que têm como alvo a região L1, porção altamente conservada de diversos tipos de HPV que promovem a amplificação de fragmentos de 450 pares de bases de pelo menos 25 tipos distintos de HPV que infectam o trato genital (MANOS *et al.*, 1989). As reações de PCR foram realizadas com 35 ciclos de amplificação em aparelho termociclador *Eppendorf- Mastercycler Gradient*, seguindo o programa: 1 minuto à 95°C para desnaturação, 1 minuto à 55°C para anelamento e 1 minuto à 72°C para a síntese. Realizados os 35 ciclos, seguiram-se 5 minutos a 72°C para extensão (BAUER; MANOS, 1998). Paralelamente à PCR, que utiliza os *primers* MY09 e MY11, foi feita a reação de

amplificação para controle do DNA da amostra em estudo, no qual foram utilizados os *primers* que amplificam uma região de microssatélite do cromossomo 15 de 170 pb (pares de bases).

5.7.8.3 Sistema de Reação de PCR

O sistema foi composto de: 17,5 µl de água Milli-Q; 5,0 µl de Tp 10x (500 mM KCl e 100 mM Tris-HCl (pH 8,5)); 8,0 µl de MgCl₂ 25 mM; 10 µl do *pool* de dNTP (200 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato) 2,5 mM; 2,0 µl do *primer* MY09 (35pmol); 2,0 µl do *primer* MY11 (35pmol); 0,5 µl da Enzima Taq polimerase 5U/µl e 5,0 µl da solução contendo a amostra de DNA, totalizando um volume final de 50 µl [Otimizado de Bauer & Manos (1998)].

5.7.8.4 Eletroforese em Gel de Agarose

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio (1,0 µg/ml) por vinte minutos, visualizados sob luz ultravioleta e fotografados em equipamento da Pharmacia Biotech, Image Master® VDS FTI-500.

5.7.8.5 Purificação das Amostras

As amostras que revelam a amplificação do fragmento de 450 pb foram submetidas à purificação em colunas "QIAquick® PCR Purification Kit - QIAGEN" para seqüenciamento.

5.7.8.6 Reação de Seqüenciamento

As amostras foram seqüenciadas usando-se apenas o *primer* MY11 ou o MY09, em seqüenciador automático MegaBace 1000 (Amersham Biociences). Para o seqüenciamento utilizou-se o seguinte sistema de reação: 5,0 µl do DNA; 4,0 µl do pré-mix DYEnamic ET-terminator Kit; 1,0 µl do *primer* MY11 ou MY09, 50 pmol/µl, utilizando-se o seguinte programa: 95°C por 25 segundos, 95°C por 15 segundos, 50°C por 20 segundos, 60°C por 1 minuto, repetidos por 30 ciclos de amplificação.

5.7.8.7 Precipitação do Produto da Reação de Seqüenciamento

Após a reação de seqüenciamento realizou-se a precipitação. Ao produto da PCR de seqüenciamento foi adicionado 1 µl de acetato de amônia e 40 µl de etanol absoluto. Este sistema foi

misturado utilizando-se o agitador por alguns minutos e incubado por vinte minutos à temperatura ambiente. A placa foi envolvida em papel alumínio para evitar a incidência de luz. Após a incubação, a placa foi centrifugada a 4.000 rpm por quarenta minutos, em centrífuga refrigerada 5804R da *Eppendorf*. O sobrenadante foi descartado.

5.7.8.8 Eletroforese para Seqüenciamento

A decodificação de seqüência nucleotídica do fragmento amplificado foi realizada em seqüenciador automático *MegaBace 1000 (Amersham Biociences - Pharmacia)*. A eletroforese capilar em gel de poliacrilamida foi feita com base na metodologia padrão do fabricante. Para injeção utilizou-se 3 KV por 80 segundos; e a corrida foi a 6 KV por 200 minutos, sob uma temperatura de 44 °C.

5.7.8.9 Alinhamento das Amostras Seqüenciadas

Para o alinhamento das seqüências de nucleotídeos obtidas foi utilizado o programa de computador *CLUSTAL W (BioEdit)*.

5.7.8.10 Análise das Sequências Nucleotídicas

Para confirmação e identificação do tipo do HPV, foi realizada uma comparação de todas as seqüências nucleotídicas das amostras seqüenciadas, submetendo-as ao Banco de Dados Mundial de Nucleotídeos - *GeneBank*, utilizando-se o programa BLAST através do site: www.ncbi.nlm.nih.gov.

5.7.9 Análise Histológica

No Laboratório de Patologia da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, os espécimes fixados em solução de formalina tamponada a 10% foram incluídos em blocos de parafina e seccionados em fatias de 4 μ . A seção histológica foi montada em lâmina de microscópio e corada pela hematoxilina-eosina. Após cobertura com lamínula, as lâminas, assim preparadas, foram observadas à microscopia ótica à procura da presença de lesões teciduais próprias de infecção anal pelo HPV. Cada lâmina histológica foi lida por três patologistas diferentes, e somente foram emitidos laudos quando houve concordância diagnóstica entre os três

patologistas em observação conjunta das lâminas duvidosas em microscópio com ótica compartilhada.

Os achados histopatológicos foram assim definidos, de acordo com os critérios estabelecidos pelo Sistema de Bethesda 2001 (2001 Terminology, 2004): INS – insatisfatório; NEG – negativo para lesão intraepitelial escamosa anal (representando alterações celulares benignas, incluindo inflamação, alterações reacionais e metaplasia escamosa); LSIL – lesão intraepitelial escamosa anal de baixo grau; HSIL – lesão intraepitelial escamosa anal de alto grau; CEPis – carcinoma epidermóide *in situ*; CEPin – carcinoma epidermóide invasivo; ADCis – adenocarcinoma *in situ*; e ADCin – adenocarcinoma invasivo.

Em casos de mais de uma biópsia realizada num mesmo indivíduo, o resultado com maior lesão tecidual foi o utilizado para análise.

Os resultados histopatológicos foram considerados padrão-ouro para a confirmação da presença de lesões anais citopáticas HPV-dependentes.

5.8 Análise dos resultados

5.8.1 Variáveis

Para a análise dos resultados, as seguintes variáveis foram estudadas:

5.8.1.1 Resultado do exame histológico

Modalidades estudadas: INSp, NEGp, CAc, LSILp, HSILp, CEPisp, CEPinp, ADCisp, ADCinp.

5.8.1.2 Resultado da PCR-HPV

Modalidades estudadas: Negativa para a presença de HPV (HPV-); HPV de baixo risco (HPVa); HPV de alto risco (HPVb); tipo específico de HPV detectado (HPV-n: sendo “n” o número do sorotipo detectado).

5.8.1.3 Resultado da PCR-HSV

Modalidades estudadas: Negativa para a presença de HSV (HSV-); Positiva para a presença de HSV (HSV+);

5.8.1.4 Resultado da PCR-HBV

Modalidades estudadas: Negativa para a presença de EBV (EBV-); Positiva para a presença de EBV (EBV+);

5.8.1.5 Resultado da PCR-CMV

Modalidades estudadas: Negativa para a presença de CMV (CMV-); Positiva para a presença de CMV (CMV+);

5.8.1.6 Indicativos de Imunodepressão

Modalidades estudadas: CD4A (contagem de LTCD4 menor ou igual a 200 células/mm³); CD4B (contagem de LTCD4 entre 201 e 500 células/mm³); CD4C (contagem de T/CD4+ maior ou igual a 501 células/mm³); CV0 (carga viral não detectável); CVA (carga viral menor ou igual a 30.000 cópias de RNA por ml); CVB (carga viral maior ou igual a 30.001 cópias de RNA por ml).

5.8.1.7 Dados sobre HAART

Modalidades estudadas: Negativa para o uso de HAART (HAART-); Positiva para o uso de HAART; Tipo de HAART e dosagem; Tempo de uso de HAART.

5.9 Análise estatística

Os dados do “Protocolo de Estudo” foram transferidos para planilha eletrônica montada na plataforma Microsoft Excel®. A planilha foi construída de forma a poder ser lida e interpretada pelo programa estatístico Epi Info®, versão 3.3.2 (EPI INFO™, 2005). Na análise de dados utilizou-se ainda o programa BioEstat 5.0 (2007).

O teste do qui-quadrado, o teste G e o teste de Fisher, foram aplicados aos dados categóricos dispostos em tabelas de contingências. As características epidemiológicas foram analisadas descritivamente pelos seus percentuais e intervalos de confiança de 95% (IC95%). Foram considerados significantes os valores de p menores ou iguais a 0,05 (5%).

6 RESULTADOS

Nesta pesquisa, projetou-se estudar uma amostra populacional de 300 pessoas distribuídas igualmente nos três grupos eleitos de estudo. Apesar de terem sido atendidos 399 pacientes, no período de estudo de realização deste trabalho, após a aplicação de critérios de inclusão e exclusão, foram efetivamente estudados 203 indivíduos, assim distribuídos: 101 HSH/HIV+, 49 MHIV+ e 53 GR-.

6.1 Características epidemiológicas da amostra

As características epidemiológicas da amostra estudada encontram-se na Tabela 1.

6.2 Achados histológicos anais *versus* características epidemiológicas da amostra

A Tabela 2 demonstra a associação entre os achados histológicos anais e as características epidemiológicas da amostra estudada. Percebe-se que entre os pacientes diagnosticados com ASIL (32,5%), a maioria eram homens (51) ($p < 0,05$) de compleição faioderma (46), com ensino médio completo (34) e da faixa etária de 31 a 50 anos (31).

6.3 Distribuição de ASIL nos grupos de estudo

A freqüência de resultados histopatológicos positivos para ASIL (Tabela 3) foi a seguinte: 32,5% (66/203; IC95% = 26,1% - 39,4%) para toda a amostra estudada; 49,5% (50/101; IC95% = 39,4% - 59,6%) para os HSH/HIV+; 28,6% (14/49; IC95% = 16,6% - 43,3%) para as MHIV+ e 3,8% (2/53; IC95% = 0,5% - 13%) para o grupo GR- ($p < 0,0001$).

6.4 HPV versus diagnóstico de ASIL

A pesquisa de DNA de HPV pela PCR pôde ser realizada em 123 dos 203 participantes do estudo.

A Tabela 4 mostra a associação entre os achados histológicos anais e os da detecção de HPV em relação à população analisada. Observa-se que ASIL foi mais prevalente no grupo de pacientes positivos para HPV de alto ou baixo risco (42,1%; 32/76 IC 95% = 30,9% - 54%) que no grupo de pacientes HPV-negativos (12,7 %; 6/47 IC 95% = 4,8% - 25,7%).

6.5 Contagem de linfócitos T/CD4+ e carga viral do HIV versus o diagnóstico de ASIL

Dados sobre a contagem de LTCD4 e/ou a carga viral do HIV puderam ser obtidos dos prontuários de 54 pacientes HIV+.

Na Tabela 5 está disposta a relação entre a contagem de linfócitos TCD4+ (LTCD4) e o diagnóstico ou não de ASIL. Percebe-se que houve maior prevalência de ASIL entre os pacientes com LTCD4 $\leq 500 \times 10^6/l$ (45/53), especialmente naqueles com celularidade entre 201 e $500 \times 10^6/l$ (34/53). Nesta tabela encontra-se ainda a associação entre a carga viral do HIV (CV) e a presença ou não de ASIL. Observa-se que quando comparados os valores de carga viral do HIV em relação à presença de ASIL, esta foi mais freqüente no grupo de pacientes HIV+ com valores de CV > 30.000 cópias de RNA/ml ($p < 0,05$).

6.6 Detecção de CMV, HSV e EBV por PCR em biópsias positivas para ASIL

A detecção de DNA de Citomegalovírus (CMV) e de DNA do vírus Epstein-Barr (EBV) foi realizada em 187 dos 203 pacientes estudados, ao passo que a detecção do HSV foi realizada

em 183. Na Tabela 6 encontram-se os dados da detecção desses vírus pela PCR em relação aos achados histológicos anais. É possível observar que apenas a co-infecção anal por HSV foi estatisticamente relacionada ao diagnóstico de ASIL ($p < 0,05$), embora CMV e EBV tenham sido detectados em algumas amostras anais com esse achado histológico.

6.7 Tempo do uso de HAART *versus* o diagnóstico de ASIL

Dos pacientes HIV+ estudados que faziam uso de HAART, foi possível obter dados sobre o tempo de uso de 67 (33%) pacientes. Destes, 36 (53,7%) tinham tempo de uso menor ou igual a 3 anos, 13 (19,4%) de 4 a 6 anos, 10 (14,9%) de 7 a 9 anos, e 8 (11,9%) usavam HAART há 10 anos ou mais.

A Tabela 5 mostra a associação entre o tempo de HAART e os achados histológicos anais. Observa-se que não houve significância estatística entre o tempo de uso de HAART e o diagnóstico ou não de ASIL, ainda que este achado tenha sido mais freqüente entre os pacientes com um longo tempo de HAART (≥ 7 anos).

6.8 Tipo de HAART *versus* ASIL

Dados sobre modalidades de HAART foram possíveis de ser obtidos de 87 pacientes. A tabela 7 apresenta a relação entre os tipos de HAART e os achados histológicos anais. Observa-se que ASIL de alto ou baixo grau foi mais prevalente entre os pacientes que faziam uso dos medicamentos AZT + 3TC (Zidovudina e Lamivudina) e EFV (Efavirenz) – 15 casos de ASIL, mas não houve significância estatística entre os dados ($p > 0,05$).

7 DISCUSSÃO

Em geral, ASIL é considerada o precursor de carcinoma anal e tem sido mais encontrada em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (WONG *et al.*, 2010) e indivíduos anorreptivos (PIKETTY *et al.*, 2003). No presente estudo, ASIL foi 13 vezes mais freqüente em homens HIV+ com hábitos anorreptivos do que em pacientes HIV- sem outros fatores de risco para o câncer anal, e 1,7 vezes mais freqüente do que em mulheres HIV+, anorreptivas ou não ($p < 0,05$). HSIL foi 11 vezes mais freqüente entre os homens HIV+ anorreptivos do que nos pacientes do grupo GR-. Em estudos semelhantes, porém comparando pacientes homossexuais HIV-positivos e negativos, Sayers *et al.* (1998) encontraram uma prevalência de ASIL 6,4 vezes superior no primeiro grupo e Palefsky *et al.* (1998) encontraram essa mesma prevalência 5 vezes maior no grupo de homossexuais HIV+. Em estudo de coorte realizado em Seattle, HSIL foi 3 vezes mais freqüente em pacientes HIV+ quando comparados a HIV- (CRITCHLOW *et al.*, 1995). Em virtude da comparação feita, no presente estudo, entre dois grupos de pacientes HIV-positivos com um grupo HIV-negativo sem nenhum outro fator de risco para o câncer anal, seus resultados referentes à prevalência comparativa de ASIL entre os grupos foram mais marcantes do que nos estudos citados, pois neles os pacientes HIV-negativos poderiam conter outros fatores de risco para o câncer anal.

O HPV tem sido implicado como fator significativo na carcinogênese anal (URONIS *et al.*, 2007). No presente estudo, DNA de HPV foi identificado por PCR em 84,2% de 38 amostras positivas para ASIL, e em 51,7% das 85 amostras que foram negativas para ASIL. Entre os casos de lesão intraepitelial escamosa anal, houve igual distribuição entre os tipos de HPV de alto ou baixo risco (dos 84,2% dos casos de ASIL positivos para HPV, 50% foram positivos para HPV

de baixo risco e 50% para HPV de alto risco). De maneira semelhante, relacionando HPV ao câncer anal e lesões precursoras, Wong *et al.* (2010) detectaram DNA de HPV de alto risco em 75% dos casos de neoplasia intraepitelial anal e Frisch *et al.* (1999) detectaram HPV de alto risco em 84% de casos de câncer anal com a diferença de que nestes, HPV de alto risco foi o mais encontrado. De maneira geral, HPV de baixo risco tem sido mais associado a casos de ASIL de baixo grau, bem como a condilomas anais (PALEFSKY *et al.*, 1991). Entretanto, casos de câncer anal já foram descritos em associação a HPV de baixo risco em pacientes HIV+ (CAUSSY *et al.*, 1990).

Referente à contagem de LTCD4 em indivíduos HIV+, ASIL foi 5,6 vezes mais freqüente no grupo de pacientes HIV+ com LTCD4+ menor ou igual a $500 \times 10^6/l$, sendo os índices de celularidade compreendidos entre 201 e $500 \times 10^6/l$, os mais comuns (64,1%). De forma semelhante, Kiviat *et al.* (1993), estudando indivíduos HIV+, encontraram um risco de ASIL maior entre aqueles com $LTCD4 < 500 \times 10^6/l$, 2,9 vezes maior que em pacientes com celularidade acima desse valor e Palefsky *et al.* (1998) acharam um risco relativo de 5,8 em pacientes com LTCD4 mais baixa ainda, $< 200 \times 10^6/l$. Esses estudos demonstram a relação entre a imunossupressão determinada pela baixa contagem de LTCD4 e a possibilidade do desenvolvimento de ASIL.

Indivíduos com cargas virais de HIV superiores a 30.001 cópias de RNA por ml mostraram-se mais propensos ao achado de ASIL. O estudo realizado por D'Araújo *et al.* (2005) observou que mulheres HIV+ com carga viral maior que 400 cópias/ml apresentaram chance 3,17 vezes maior de desencadear lesão intraepitelial escamosa cervical do que as com CV menor. Gimenez *et al.* (2008) não encontraram, em pacientes HIV-positivos, relação entre a presença de

lesões precursoras do câncer anal e CV de HIV acima ou abaixo de 10.000 cópias/ml. O presente estudo, por outro lado, encontrou relação estatística entre ASIL e CV elevada (≥ 30.001).

No que se refere às outras coinfeções virais investigadas, CMV e EBV foram identificados por PCR em, respectivamente, 12,9% e 19,3% das amostras pesquisadas, todavia não houve associação estatística com o diagnóstico de ASIL. Por outro lado, o achado de DNA de HSV nas amostras anais apresentou significância estatística quando relacionado aos três grupos de pacientes estudados, constituindo-se em fator de risco para o desenvolvimento de ASIL (Risco Relativo = 2,09; $p < 0,05$). Palefsky *et al.* (1998), igualmente, não encontraram associação significativa entre coinfeção por CMV ou EBV e o câncer anal, mas descreveram a presença de DNA de HSV por captura híbrida em 75% dos casos de neoplasia intraepitelial anal de alto grau e em 38% dos casos de câncer anal em sua pesquisa. Por outro lado, em estudo comparativo de pacientes HIV-positivos com HIV-negativos, Sobhani *et al.* (2004) demonstraram que o risco de HSIL ou carcinoma anal em pacientes infectados pelo HPV está aumentado em indivíduos HIV-positivos com coinfeção anal secundária não somente ao vírus do herpes simples, mas também ao vírus Epstein-Barr (EBV) e citomegalovírus (CMV) ($p < 0,0001$). De forma geral, esses vírus têm sido mais associados à patogênese do câncer cervical (PALEFSKY *et al.*, 1991; QIAN *et al.*, 2005; SMITH *et al.*, 2002), com poucos dados na literatura consultada sobre sua associação real ou não com o câncer anal.

Diversos trabalhos fazem referência a um aumento na frequência de ASIL ou câncer anal em pacientes sob HAART (MARTIN; BOWER, 2001; CHIAO *et al.* 2005; D' SOUZA *et al.*, 2008). No presente estudo, porém, não houve relação estatística entre tempo de uso de HAART e presença de ASIL, muito embora ASIL tenha sido mais observada em pacientes sob HAART por 7 ou mais anos.

Da mesma forma, não se observou associação significativa entre os tipos de HAART utilizados e o diagnóstico de ASIL, apesar de ASIL ter sido mais freqüente entre os indivíduos que faziam uso de AZT + 3TC (Zidovudina + Lamivudina) e EFV (Efavirenz), muito provavelmente por ter sido uma das associações de drogas mais utilizadas nos pacientes atendidos na FMT-AM. Essas drogas constituem um dos esquemas terapêuticos mais utilizados, que envolve inibidores da transcriptase reversa (análogos e não-análogos de nucleosídeo) sem incluir inibidores de protease. Não há dados, na literatura consultada, que tratem especificamente da relação entre modalidades de HAART e o desenvolvimento de carcinoma anal, apesar de haver relato sobre a associação entre inibidores de protease e casos de condiloma anal (PALÁCIO *et al.*, 2007).

8 CONCLUSÃO

A análise dos resultados obtidos neste estudo de pacientes atendidos na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas permitiram as seguintes conclusões:

1. ASIL foi encontrada em 32,5% dos pacientes, sendo sua presença mais significativa no grupo HSH/HIV+ em comparação com MHIV+ e GR-.
2. Houve significativa associação entre ASIL e a detecção de DNA de HPV (de alto ou baixo risco) em raspados anais.
3. Não houve indícios de associação entre o tempo de uso e as modalidades de HAART empregadas e o diagnóstico de ASIL.
4. Dentre as outras comorbidades virais investigadas apenas a presença de HSV se associou significativamente com o diagnóstico de ASIL.
5. A prevalência de ASIL foi significativamente mais elevada em pacientes com contagem de linfócitos TCD4+ $\leq 501 \times 10^6/l$ e nos com carga viral do HIV ≥ 30.001 cópias de RNA/ml.

Tabela 1 - Características epidemiológicas da amostra

Tabela 2 - Achados histológicos anais *versus* características epidemiológicas da amostra

Variáveis	P-valor
<hr/>	

Tabela 3 - Achados histológicos anais observados nos grupos de Estudo

Variável	P-valor
-----------------	----------------

Tabela 4 - Achados histológicos anais e a co-infecção anal por HPV nos grupos de estudo

Variáveis	P-valor
-----------	---------

Tabela 5 Associação entre achados histológicos anais e a contagem de Linfócitos T/CD4+, carga viral do vírus da imunodeficiência humana e o tempo de HAART em pacientes HIV+

<=3anos	14	38.89%	22	61.11%	36	53.73%
>=10 anos	4	50.00%	4	50.00%	8	11.94%

Tabela 6 Co-infecção por CMV, EBV e HSV e a presença de ASIL ou não na amostra estudada

Variáveis	P-valor
-----------	---------

Tabela 7 – Tipo de HAART *versus* achados histológicos anais

0,1779*

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARAÚJO, A. C. L. de; MELO, V.H.de ; CASTRO, L.P.F. de et al. Associação entre a carga viral e os linfócitos T/CD4+ com as lesões intra-epiteliais do colo uterino em mulheres infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana. Rev. Bras. Ginecol. Obstet. Rio de Janeiro. vol.27 no.3 p 106-11. Mar. 2005
2. BAUER, H.M.; MANOS, M.M. PCR detection of genital human papillomavirus. In: Applications – Viral Pathogens; p. 407-13. 1998.
3. CARTER, P.S. Anal cancer: Current perspectives. Dig Dis. vol 11.no. 4-5. p 239-51. Jul. 1993.
4. CAUSSY, D.; GOEDERT, J.J.; PALEFSKY, J.M.; et al. Interaction of human immunodeficiency and papilloma viruses: association with anal epithelial abnormality in homosexual men. Int J Cancer. Vol 46. no. 2. p. 214-9. Aug. 1990.
5. CHIAO, E.Y.; KROWN, S.E.; STIER, E.A.; SCHRAG, D. A Population-Based Analysis of Temporal Trends in the Incidence of Squamous Anal Canal Cancer in Relation to the HIV Epidemic. J Acquir Immune Defic Syndr. vol 40. no 4. p. 451–5. Dec. 2005.
6. CHIN-HONG, P.V.; PALEFSKY, J.M. Natural history and clinical management of anal human papillomavirus disease in men and women infected with human immunodeficiency virus. Clin. Infect. Dis. vol 35. no 9. p. 1127-34. Nov. 2002.
7. COLQUHOUN, P.; NOGUERAS, J.J.; DIPASQUALE, B.; PETRAS, R.; WEXNER, S.D., WOODHOUSE, S. Interobserver and intraobserver bias exists in the interpretation of anal dysplasia. Dis Colon Rectum. vol 46. no 10. p. 1332-6. Oct. 2003.
8. CRITCHLOW, C.W.; SURAWICZ, C.M.; HOLMES, K.K., et al. Prospective study of high grade squamous intraepitheal neoplasia in a cohort of homosexual men: influence of HIV infection, immunosuppression and human papillomavirus infection. AIDS. Vol 9. no 11.p. 1255-

62.Nov.1995.

9. DALING, J.R.; WEISS, N.S.; KLOPFENSTEIN, L.L.; COCHRAN, L.E.; CHOW, W.H.; DAIFUKU, R. Correlates of homosexual behavior and the incidence of anal cancer. *JAMA*. vol 247.no14.p.1988-90.Apr.1982.

10. DALING, J.R.; WEISS, N.S.; HISLOP, T.G.; MADEN, C.; COATES, R.J.; SHERMAN, K.J.; ASHLEY, R.L.; BEAGRIE, M.; RYAN, J.A.; COREY, L. Sexual practices, sexually transmitted disease, and the incidence of anal cancer. *N. Engl. J. Med.* vol 317. no. 16. p. 973-7. Oct. 1987.

11. DALING, J.R.; SHERMAN, K.J.; HISLOP, T.G.; MADEN, C.; MANDELSON, M.T.; BECKMANN, A.M.; et al. Cigarettesmoking and the risk of anogenital cancer. *Am J Epidemiol.* vol 135. no 2. p. 180–9. Jan 1992

12. D'SOUZA, G.; WILEY, D.; LI, X.; et al. Incidence and epidemiology of anal cancer in the multicenter AIDS cohort study. *J. Acquir Immune Defic Syndr.* vol 48. no 4. p. 491-9. Aug. 2008.

13. DOLCETTI, R.; MASUCCI, M.G. Epstein-Barr virus: induction and control of cell transformation. *J Cell Physiol.* vol 196. no 2. p 207-18. Aug. 2003.

14. DROBACHEFF, c.; DUPONT, P.; MOUGIN, C.; BOUREZANE, Y. et al. Anal human papillomavirus DNA screening by Hybrid Capture II™ in human immunodeficiency virus-positive patients with or without anal intercourse. *Eur J Dermatol.* vol 13. no 4. p. 367–71. Jul-Aug. 2003.

15. ELTOM, M.A.; JEMAL, A.; MBULAITEYE, S.M., et al. Trends in Kaposi's sarcoma and non-Hodgkin's lymphoma incidence in the United States from 1973 through 1998. *J Natl Cancer Inst.* vol 94. no 16. p.1204–10. Aug. 2002.

16. FRAZER, I.H.; MEDLEY, G.; CRAPPER, R.M., et al: Association between anorectal dysplasia human papillomavirus and human immunodeficiency virus infection in homosexual men. *Lancet*. vol 2. no. 8508. p. 657-60. Sep. 1986.
17. FRISCH, M.; GLIMELIUS, B.; WOHLFAHRT, J.; ADAMI, H.O.; MELBYE, M. Tobacco smoking as a risk factor in anal carcinoma: an antiestrogenic mechanism? *J. Natl Cancer Inst*. vol 91. no 8. p. 708-15. Apr. 1999.
18. FRISCH, M.; GLIMELIUS, B.; VAN DEN BRULE, A.J.; et al. Sexually transmitted infection as a cause of anal cancer. *N Engl J Med*. vol 337. no 19. p.1350–8. Nov. 1997.
19. FRISCH, M.; BIGGAR, R.J.; GOEDERT, J.J. Human papillomavirus-associated cancers in patients with human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. *J Natl Cancer Inst*. vol 92. no 18. p.1500–10. Sep. 2000.
20. GIMENEZ, F. S.; COSTA E SILVA, I.T.; GUIMARÃES, A. G.D.P; et al. Prevalência de lesões precursoras do câncer anal em indivíduos HIV-positivos, atendidos na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, experiência inicial em Manaus. *Rev bras. Colo-proctol*. Rio de Janeiro. vol.28 no.1 Jan./Mar. 2008
21. GOEDERT JJ, COTE TR, VIRGO P, et al. Spectrum of AIDS-associated malignant disorders. *Lancet*. vol 351. no 9119. p. 1833-9. Jun. 1998.
22. HELT, A.M.; GALLOWAY, D.A; Mechanismos by which DNA tumor virus oncoproteins target the Rb family of pocket proteins. *Carcinogenesis*. vol 24. p. 159-169. Feb. 2003.
23. HOLLY, E.A.; WHITTEMORE, A.S.; ASTON, D.A.; AHN, D.K.; NICKOLOFF, B.J.; KRISTIANSEN, J.J. Anal cancer incidence: genital warts, anal fissure or fistula, hemorrhoids, and smoking. *J Natl Cancer Inst*. vol.81. no 22. p.1726-31. Nov. 1989.

24. HUANG, E.S.; ROCHE, J. K. Cytomegalovirus DNA and adenocarcinoma of the colon: evidence for latent viral infection. *Lancet*. vol 1. no 8071. p. 957-960. May 1978.
25. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. Estimativa 2009 - Estimativa da Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/anal>>. Acessado em: 26 Jan 2010
26. KEIGHLEY, M.R.B.; WILLIAMS, N.S. Cirurgia do ânus, reto e colo. 1ª edição. Vol 1. São Paulo: Editora Manole; 1998
27. KIVIAT, N.B.; et al. CRITHLOW, C.W.; HOLMES, K.K.; et al. Association of anal dysplasia and human papillomavirus with immunosuppression and HIV infection among homosexual men. *AIDS*. Vol 7.p. 43-49. 1993.
28. KLINGELHUTZ, A.J.; FOSTER, S.A.; MCDUGALL, J.K. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature*. Vol 380. no.6569. p.79-82. 1996.
29. KREUTER, A.; BROCKMEYER, N.H., HOCHDORFER, B.; WEISSENBORN, S.J., STUCKER, M.; SWOBODA, J.; ALTMAYER, P.; PFISTER, H.; WIELAND, U. Clinical spectrum and virologic characteristics of anal intraepithelial neoplasia in HIV infection. *J Am Acad Dermatol*. vol. 52. no 4. p. 603-8. Apr. 2005.
30. LEDERGERBER, B.; TELENTI, A.; EGGER, M. Risk of HIV related Kaposi's sarcoma and non-Hodgkin's lymphoma with potent antiretroviral therapy: prospective cohort study. *Swiss HIV Cohort Study*. *BMJ*. Vol 319. no 7201. p. 23–24. Jul. 1999.
31. MANOS, M.M.; TING, Y.; WRIGHT, D.K.; LEWIS, A.J.; BROKER, T.R.; WOLINSKY, S.M. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells*. Vol 7. p. 209–14. 1989.

32. MARTIN, F.; BOWER, M. Anal intraepithelial neoplasia in HIV positive people. *Sex. Transm. Infect.* vol 77. p. 327-31. Aug. 2001.
33. MARTINS, C.R. HPV-induced anal dysplasia: What do we know and what can we do about it? *Hopkins HIV Rep.* Vol 13 ..no. 3. p 3-5. 2001.
34. MATHEWS, W.C.; SITAPATI, A.; CAPERNA, J.C.; BARBER, R.E.; TUGEND, A.; GO, U. Measurement Characteristics of Anal Cytology, Histopathology, and High-Resolution Anoscopic Visual Impression in an Anal Dysplasia Screening Program. *J Acquir Immune Defic Syndr.* vol. 37. p. 1610-15. Dec. 2004.
35. MATCZAK, E. Human papillomavirus infection: an emerging problem in anal and other squamous cell cancers. *Gastroenterology.* vol. 120. p.1046-1048. 2001.
36. MELBYE, M.; SPROGEL, P. A etiological parallel between anal cancer and cervical cancer. *Lancet.* vol 338. p. 657-9. Sep. 1991.
37. MELBYE, M.; COTE, T.R.; KESSLER, L.; GAIL, M.; BIGGAR, R.J.; for the AIDS/Cancer Working Group. High incidence of anal cancer among AIDS patients. *Lancet.* vol. 343. no.8898 p. 636-639. Mar. 1994.
38. MUNGER, K.; HOWLEY, P.M. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res.* vol. 89. no 2. p .213-28. Nov. 2002.
39. NADAL, S.R.; MANZIONE, C.R. Papilomavirus Humano e o Câncer Anal. *Rev bras Coloproct.* vol. 26 . no. 2. p. 204-7. Rio de Janeiro. Apr-Jun. 2006.
40. NAKAJIMA, G. S; et al. Carcinoma de ânus: aspectos epidemiológicos, histológicos, imunohistológicos e por hibridação in situ. *Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva.* vol. 14. p. 133 - 8. Jul-Set. 2001.

41. PALÁCIOS, M.R.; DE SOUZA, J. B.; SANTOS, J.B. Anorrectal lesions in patients using highly active antiretroviral therapy. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. vol 40. no. 3. p. 286-289. May – Jun. 2007.
42. PALEFSKY, J.M.; HOLLY, E.A.; GONZALES, J.; et al. Detection of Human Papillomavirus DNA in Anal Intraepithelial Neoplasia and Anal Cancer. *Cancer Research*. vol.51. no. 3. p. 1014 -19. Feb. 1991.
43. PALEFSKY, J.M.; HOLLY, E.A.; RALSTON, M.L.; JAY, N. Prevalence and risk factors for human papillomavirus infection of the anal canal in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and high-risk HIV-negative homosexual men. *J. Infect. Dis.* vol. 177. no. 2. p. 361-7. Feb. 1998.
44. PALEFSKY, J.M.; HOLLY, E.A.; RALSTON, M.L.; et al. Anal squamous intraepithelial lesions in HIV-positive and HIV-negative homosexual and bisexual men: prevalence and risk factors. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum retroviral*. vol.17. no. 4. p. 320-6. Apr. 1998.
45. PALEFSKY, J.M.; HOLLY, E.A.; RALSTON, M.; et al. High incidence of anal high-grade squamous intra-epithelial lesions among HIV-positive and HIV-negative homosexual and bisexual men. *AIDS*. vol.12. no. 5. p.495–03. Mar. 1998.
46. PALEFSKY, J.M.; BRATCHER, J. Anogenital Human Papillomavirus coinfection and Associated Neoplasia in HIV- positive Men and Women. *The PRN Notebook*. 2008. 13. Available on line:<http://www.prn.org>
47. PIKETTY, C.; DARRAGH, T.M.; DA COSTA, M.; et al. High prevalence of anal human papillomavirus infection in anal cancer precursors among HIV-infected persons in the absence of anal intercourse. *Annals of Internal Medicine*. vol. 138. no. 6. p.453-9. Mar. 2003.
48. PRIETO, R.; VAZQUEZ, M. Anal epidermoid carcinoma: a rare incidence or a rare diagnosis? *Rev Esp Enferm Dig*. Vol 89. no. 2. p. 128-32. Feb. 1997.

49. QUIAN, Y.S.; LV, W.; SUJ, L.H.; WANG, J. Study on the relationship between genesis and development of cervical cancer and the infection of human papillomavirus type 16/18, human herpesvirus II and cytomegalovirus. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. vol. 26. no. 8. p. 622-5. Aug. 2005.
50. RENE, E.; MARCHE, C.; CHEVALIER, T.; et al. Cytomegalovirus colitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Dig. Dis Sci*. 33. no. 6. p. 741-50. Jun. 1988.
51. ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N; KUMAR, V. Robbins Cotran patologia: bases patológicas das doenças. Rio de Janeiro: Elsevier; p. 338 – 7, 993. 2005.
52. SAHIN, F., GERCEKER, D.; KARASARTOVA, D.; OZSAN, T.M. Detection of herpes simplex type 1 in addition to epstein-bar virus in tonsils using a new multiplex polymerase chain reaction assay. *Diag.. Microbiol. Inf. Dis*. vol. 57. p. 47-51. Jan. 2007.
53. SCARPINI, C.; WHITE, V.; MURALIDHAR, B.; et al. Improved screening for anal neoplasia by immunocytochemical detection of minichromosome maintenance proteins. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*. vol.17. no. 10. p. 2855 – 64. Oct. 2008.
54. SHARK. B; CUNNINGHAM, J.D.; KELSEN, D.P. Cancer of the canal anal region. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg AS, editors. *Cancer. Principles and practice of oncology*. 5.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven. 1997; 1234-48. *Surg*; 14: 115-7. 1996.
55. SMITH, J.S.; et al., Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer, *Journal of the National Cancer Institute*. vol. 94. no.21. p.1604 -13. Nov. 2002.
56. SOBHANI, I.; WALKER, F.; ROUDOT-THORAVALL, F., et al. Anal carcinoma: incidence and effect of cumulative infections. *AIDS*; vol. 18. no. 11. p. 1561-9. Jul. 2004.

57. SOBHANI, I; VUAGNAT, A.; WALKEER, F.; VISSUZAINÉ, C.; MIRIN, B. et al. Prevalence of high-grade dysplasia and cancer in the anal canal in human papillomavirus–infected individuals. *Gastroenterology*; vol. 120. no. 4. p. 857- 66. Mar. 2000.
58. SUN, X.W.; KUHN, L.; ELLERBROCK, T.V.; et al. Human papillomavirus infection in women infected with the human immunodeficiency virus. *N Engl J Med*; vol. 337. no. 19. p.1343 – 9. Nov. 1997.
59. WONG, A.K.; CHAN, R.C.; AGGARWAL, N.; SINGH, M.K.; NICHOLS, W.S.; BOSE, S. Human papillomavirus genotypes in anal intraepithelial neoplasia and anal carcinoma as detected in tissue biopsies. *Modern Pathology*. vol. 23. p. 144–150. 2010
60. 2001 TERMINOLOGY. Disponível: site NCI Bethesda System 2001. URL: <http://bethesda2001.cancer.gov/terminology.html>. Consultado em 13 dez. 2004.
61. URONIS, H.E.; BENDELL, J.C. Anal cancer: an overview. *Oncologist*. Vol.12. no. 5. p. 524–534. May. 2007.

10. ANEXOS

10.2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado para participar da pesquisa **O câncer anal e suas lesões precursoras em indivíduos HIV+ co-infectados pelo HPV em Manaus**. Você foi selecionado por ser portador do vírus da imunodeficiência adquirida humana (HIV), por ser homem que faz sexo com homem, ou por ser mulher com história de ferida no colo do útero provocada pelo vírus do papiloma humano (HPV). Sua participação neste estudo não é obrigatória. A qualquer momento você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a Fundação de Medicina Tropical do Amazonas.

O objetivo deste estudo é o de determinar a prevalência tanto da infecção anal pelo HPV quanto da presença de lesões benignas anais causadas pelo HPV que podem transformar-se em câncer com o passar do tempo. O que se visa com este estudo é coletar dados que dêem sustentação à criação de um programa de detecção precoce de lesões anais que possam evoluir para o câncer anal em pacientes sob maior risco de desenvolver a doença.

Sua participação nesta pesquisa consistirá em ter uma amostra de sangue coletada para a determinação da contagem de linfócitos T/CD4+ e da carga viral, em responder a um questionário a respeito das peculiaridades de sua doença infecciosa e a submeter-se a um exame do ânus e do reto. Neste exame, uma escovinha circular especialmente projetada para este fim será introduzida no canal anal para ser imediatamente retirada e colocada num frasco de transporte com líquido conservante em seu interior. A seguir, um anoscópio (um tubo cilíndrico) será introduzido no canal anal e o mesmo será observado com um aparelho que funciona como uma lente de aumento (Colposcópio). Após a aplicação local de uma solução fraca de ácido acético lesões mucosas que ficarem brancas serão biopsiadas sob anestesia local. Os frascos com as escovinhas e as biópsias, também colocadas em solução conservante, serão encaminhadas para exame, respectivamente, nos Laboratórios de Virologia e de Patologia da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas.

Os riscos relacionados com sua participação são muito pequenos e associados às biópsias anais, cuja anestesia prévia pode arder um pouco e de forma passageira. Um pequeno sangramento também poderá ocorrer que na grande maioria das vezes cessa espontaneamente.

Os benefícios relacionados com a sua participação não serão outros senão os ligados à prevenção do câncer anal, que incide mais freqüentemente em pessoas HIV+, em homens que fazem sexo com homens e em mulheres que já apresentaram feridas no colo do útero causadas pelo HPV, não havendo qualquer pagamento em dinheiro aos participantes do estudo. Você estará contribuindo também para o conhecimento de quantas pessoas, em Manaus, com as mesmas características que você, são portadores de lesões que, se não tratadas, poderão evoluir para o câncer anal. Em caso de haver algum dano eventual à sua saúde durante o período de estudo, provocado pelos exames necessários para realizá-lo, a responsabilidade recairá inteiramente sobre o pesquisador e a Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMT-AM), conforme prevê a Resolução 196/96 – CNS.

Se ocorrer algum prejuízo na participação da pesquisa, os pesquisadores envolvidos e a FMT-AM deverão indenizá-lo.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre a sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação. Os registros ou resultados dos testes relacionados aos estudos serão mostrados apenas a representantes da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, bem como a autoridades normativas nacionais ou internacionais, com o objetivo de garantir informações de pesquisas clínicas ou para fins normativos. Sua identidade permanecerá sempre em confidencialidade.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

Pesquisador: Dr. Ivan Tramuja da Costa e Silva

Tel.: 3233-9730

Tel.: 3238-1711; 3238-1767

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

Sujeito da pesquisa

Manaus, ____ de _____ de

200_.