# UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
# PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA 2011/2012

**Análise da expressão sérica de FoxP3 em pacientes HIV positivos portadores de neoplasia intraepitelial anal atendidos na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, na cidade de Manaus**

**Acadêmica: Isabelle Gracinda Santos Aguiar**

**Orientadora: Adriana Gonçalves Daumas Pinheiro Guimarães**

**Manaus-AM**
**Setembro 2012**

# UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
# PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA 2011/2012

**Análise da expressão sérica de FoxP3 em pacientes HIV positivos portadores de neoplasia intraepitelial anal atendidos na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, na cidade de Manaus**

**Acadêmica: Isabelle Gracinda Santos Aguiar**

**Orientadora: Adriana Gonçalves Daumas Pinheiro Guimarães**

Relatório final de projeto de pesquisa do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), apresentado ao Departamento de Apoio à Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas (DAP/UFAM).

**Manaus-AM**
**Setembro 2012**

# LISTA DE GRÁFICOS


| | | |
|---|---|---|
| **Gráfico 1** | Detecção de células TCD4+ | **18** |
| **Gráfico 2** | Detecção de células $CD25^{+}FoxP3^{+}$ | **19** |
| **Gráfico 3** | Níveis de linfócitos $TCD4^{+}$ nos grupos caso e controle | **24** |
| **Gráfico 4** | Correlação entre os níveis periféricos dos linfócitos $TCD4^{+}$ e patologia anal | **26** |
| **Gráfico 5** | Níveis de linfócitos Treg nos grupos caso e controle | **27** |

# LISTA DE TABELAS


| | | |
|---|---|---|
| **Tabela 1** | Classificação Clínica e Laboratorial dos Pacientes com Infecção pelo HIV | **8** |
| **Tabela 2** | Valores estimados | **12** |
| **Tabela 3** | Visão geral dos pacientes dos grupos caso e controle | **21** |
| **Tabela 4** | Características específicas do grupo caso | **22** |
| **Tabela 5** | Análise dos níveis de RLU do grupo caso | **23** |
| **Tabela 6** | Análise dos diagnósticos histopatológicos | **24** |
| **Tabela 7** | Relação entre laudo histopatológico e linfócitos $TCD4^{+}$ | **26** |
| **Tabela 8** | Relação entre laudo histopatológico e linfócitos Treg | **28** |

# SUMÁRIO


**1. Introdução** 6
**1.1 A epidemiologia da Neoplasia Intraepitelial e do Câncer Anal** 6
**1.1.1 A importância da infecção pelo HIV e da aids** 7
**1.1.2 O papel da terapia antirretroviral (TARV) na progressão da NIA/câncer** 8
**1.2 Células Dendríticas (DCs) e Células T reguladoras (Treg)** 9
**2. Justificativa** 10
**3. Objetivos** 11
**3.1 Geral** 11
**3.2 Específicos** 11
**4. Metodologia** 11
**4.1 Modelo de estudo** 11
**4.2 Universo amostral** 11
**4.2.1 Cálculo da amostra** 12
**4.2.2 Critérios de Inclusão** 13
**4.2.2.1 Grupo caso** 13
**4.2.2.2 Grupo controle** 13
**4.2.3 Critérios de Exclusão** 14
**4.2.3.1 Para ambos os grupos** 14
**4.2.3.2 Especificamente para o grupo controle** 14
**4.3 Materiais e métodos** 14
**4.4 Procedimentos** 15
**4.4.1 Coleta** 15
**4.4.2 Fluxograma de Execução** 15
**4.4.2.1 Anuscopia com Magnificação de Imagens (AMI) e obtenção das amostras teciduais** 15
**4.4.2.1.1 Detecção do HPV por Captura Híbrida** 16
**4.4.2.1.2 Diagnóstico histológico** 17
**4.4.2.2 Coleta de amostra sanguínea** 17
**4.4.2.2.1 Imunofenotipagem de linfócitos TCD4+CD25+FoxP3+** 17
**4.5 Análise dos Resultados** 19
**4.5.1 Tratamento Estatístico** 19
**4.6 Considerações Éticas** 20
**4.7 Financiamento** 20
**5. Resultados e discussão** 20
**6. Conclusões** 29
**7. Referências bibliográficas** 29

# 1. Introdução

## 1.1 A epidemiologia da Neoplasia Intraepitelial e do Câncer Anal

O câncer anal é incomum na população geral, com uma incidência de 0,8 casos para cada 100.000 habitantes, sendo até cinco vezes mais incidente em mulheres e após a sexta década de vida (FRIEDMAN et al., 1998; LOIOLA, 2007).

Após a epidemia de aids, a prevalência do câncer anal entre homens que fazem sexo com homens (HSH) tornou-se maior que a do câncer cervical, antes do emprego da técnica do Papanicolau para o seu rastreamento (PALEFSKY e HOLLY, 1995), sendo impulsionada de 35/100.000 HSH não portadores do vírus da imunodeficiência Humana (HIV) a até 80/100.000 nos HSH HIV positivos com baixos níveis circulantes dos linfócitos $TCD4^{+}$ (MARTINS, 2005; VOLBERDING, 2000), passando, nestes grupos, a ser mais prevalente na terceira e quarta décadas de vida (FRIEDMAN et al., 1998).

O epitélio displásico ou portador de lesões intraepiteliais escamosas é caracterizado pela presença de graus progressivos de anomalias de diferenciação celular e de maturação, ocorridas desde a membrana basal até a superfície celular. Essas alterações são classificadas em leve ou neoplasia intraepitelial escamosa de baixo grau (NIA I), cujas alterações ocupam 1/3 da sua espessura do epitélio escamoso, podendo apresentar células atípicas, mas não mitoses atípicas; moderado ou neoplasia intraepitelial escamosa de grau moderado (NIA II), com alterações ocupando 1/2 da espessura do epitélio, onde células atípicas podem ser vistas, mas não figuras mitóticas; severo ou neoplasia intraepitelial escamosa de grau severo (NIA III), onde há extensa destruição da arquitetura de todo epitélio, presença de atipias citoplasmáticas, nucleares e mitoses, e por fim podendo evoluir para o carcinoma in situ e o invasivo escamoso, que apresenta infiltração da lâmina própria por aglomerados de células tumorais (ABRAMOWITZ et al., 2007; APGAR, 2003; BANDEIRA et al., 2001).

A importância clínica em graduar a gravidade das lesões displásicas, ou intraepiteliais, reside no fato do risco do desenvolvimento do carcinoma escamoso aumentar conforme a neoplasia intraepitelial evolui para graus mais severos. Todo carcinoma escamoso cevical desenvolve-se de neoplasia intraepitelial cervical severa (NIC III) e, apesar da compreensão da história natural da lesão intraepitelial escamosa anal (ASIL) não estar concluída, é aceito que a neoplasia intraepitelial de grau severo

(NIA III) preceda o câncer anal escamoso pelas similaridades apresentadas com o câncer cervical (MARTINS, 2005).

Inúmeros fatores têm sido imputados no desfecho NIA/câncer, com importâncias díspares entre os estudos, em especial os relacionados aos fatores sócio-comportamentais, dentre eles a multiplicidade de parceiros sexuais, o tabagismo, as doenças sexualmente transmissíveis (DST) e a prática do sexo anal receptivo (AR) (DALING et al.,1987; KREUTER et al., 2005). Fatores biológicos como a presença de NIA, o número de células dendríticas na mucosa e a presença de imunodepressão sistêmica são também apontados (SOBHANI et al., 2002; YAGHOOBI et al., 2010).

Frisch, Biggar, Goedert (2000) sugeriram que a interação da infecção viral sistêmica pelo HIV e local (anal ou cervical) pelo HPV aumenta o risco de desenvolvimento do câncer anal. Critchlow et al. (1998) defendem que a co-infecção HPV-HIV aumenta o risco de câncer anal através do comprometimento da imunidade e consequente reativação da infecção por HPV, fator este que possibilita a contínua instalação de anormalidades no sistema imune local e predispõe a mucosa anal à NIA III.

### 1.1.1 A importância da infecção pelo HIV e da aids

O câncer é uma significante causa de mortalidade em pessoas com HIV. Segundo Spamo et al. (2002) *apud* Fernandez (2003), 30% a 40% desses pacientes irão desenvolver alguma doença maligna durante a vida. O câncer anal é descrito nesta população como “malignidade associada a aids” ou “câncer oportunista” (MELBYE et al., 1994; FERNANDEZ, 2003), ocorrendo cerca de duas décadas mais cedo nestes indivíduos em relação ao grupo controle (NADAL et al., 2006).

Pacientes infectados pelo HIV podem ser classificados pelos níveis plasmáticos de linfócitos $TCD4^{+}$ e pela ocorrência das doenças definidoras de aids, conforme mostrado na tabela 1.

**TABELA 1 - Classificação Clínica e Laboratorial dos Pacientes com Infecção pelo HIV**

| Células CD4/mm3 | Assintomáticos ou<br>Infecção aguda LPG | Sintomáticos<br>Menos A e C | Doenças indicadoras de AIDS (1997) |
|---|---|---|---|
| > 500 mm3 | A1 | B1 | C1 |
| 201 a 499 mm3 | A2 | B2 | C2 |
| < 200 mm3 | A3 | B3 | C3 |

Fonte: Adaptado de Brasil_Critérios de definição de casos de aids (2004).
Pacientes das classes A3, B3, C1, C2 e C3 devem ser notificados como AIDS.
Quando classificado como B ou C, o paciente não poderá ser reclassificado quando cessarem os sintomas.
Legenda: LPG = linfadenopatia generalizada persistente.

Segundo Bazin (2005) são considerados portadores de aids os pacientes que apresentam as doenças definidoras da doença com quaisquer níveis de $TCD4^+$ ou os com contagem de linfócitos $TCD4^+$ inferior a 200/$mm^3$, mesmo sem relato de infecção oportunista.

### 1.1.2 O papel da terapia antirretroviral (TARV) na progressão da NIA/câncer

A ampliação do acesso da população aos esquemas TARV foi responsável pela queda da morbimortalidade associada à aids na maioria dos países. Porém, a incompleta restauração do sistema imunológico, associada à prolongada exposição aos vírus oncogênicos e à instabilidade genômica, parecem resultar em prejudicada vigilância imune e subseqüente elevação da incidência de tumores (FERNANDEZ, 2003).

A implementação da TARV foi acompanhada do aumento das taxas de NIA atribuídas à maior sobrevida, facilitação da progressão pela imunossupressão e ineficiente ação da TARV sobre o HPV (PALEFSKY et al., 1998; ABRAMOWITZ et al., 2007). Segundo Doorbar (2005), apesar da imunossupressão aumentar o risco de desenvolvimento de NIA III, uma vez estabelecida a NIA, fatores genéticos como os induzidos pelas oncoproteínas E6 e E7 do HPV parecem desempenhar um papel mais direto na progressão da NIA ao câncer (DOORBAR, 2005), e uma vez instaladas as

mutações, a reconstrução do sistema imune pela TARV não se acompanha da reconstrução da resposta imune específica ao HPV, como ocorre com outros patógenos (PALEFSKY; HOLLY, 2003). Abramowitz et al. (2007) concluíram que a melhora da imunidade associada à era TARV não foi capaz de prevenir a recorrência das lesões relacionadas ao HPV.

### 1.2 Células Dendríticas (DCs) e Células T reguladoras (Treg)

As DCs imaturas estão presentes nos locais de interação do indivíduo com o meio externo, podendo ser encontradas em locais como trato respiratório e gastrointestinal, interstício da maioria dos órgãos parenquimatosos, órgãos linfóides e ainda nos epitélios da pele, onde são denominadas células de Langerhans (LCs) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Várias características das células de Langerhans (LCs) as colocam como as mais prováveis células-alvo do HIV, como a localização intraepitelial, a expressão constitutiva de CD4, suscetibilidade seletiva ao vírus R5 do HIV-1, capacidade de migrar para os linfonodos e habilidade de transmitir o HIV aos linfócitos $TCD4^+$ (KAWAMURA et al., 2005), sendo apontados como os mais importantes sítios de multiplicação do HIV, juntamente com as células T (KAWAMURA et al, 2003). Durante a infecção pelo HIV, os linfócitos $TCD4^+$, por expressarem antígenos (Ag) virais nas suas membranas, tornam-se alvo de destruição pela citotoxicidade dos linfócitos $TCD8^+$ e também aumentam a apoptose, levando à destruição em massa desta subpopulação de linfócitos. A supressão imunológica está associada à diminuição de IL-2, IFN- γ e TNFα, caracterizando o enfraquecimento da resposta TH1 (MACHADO et al., 2007).

De acordo com Margutti (2007, p. 22), “as células dendríticas possuem também um papel essencial na indução e manutenção dos mecanismos de tolerância”. As células T reguladoras (Treg) são geradas principalmente durante o processo de tolerância central, no timo, em que linfócitos imaturos autorreativos sofrem seleção negativa (deleção clonal ou edição do receptor) ou diferenciam-se em células Treg. Estas células migram para a periferia, onde asseguram a manutenção da tolerância, suprimindo as reações imunes indesejáveis (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Células $TCD4^+$ $CD25^+$ são frequentemente usadas para definir populações de células Treg, embora muitas outras populações com atividade regulatória tenham sido descritas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; WALKER, 2004).

As células $TCD4^+$ $CD25^+$ expressam um fator de transcrição chamado FoxP3, da família forkhead, que parece ser o gene controlador do desenvolvimento e função das células Treg. Nos humanos, mutações no FoxP3 causam uma doença conhecida

como IPEX, caracterizada por alta incidência de doenças auto-imunes, incluindo diabetes tipo-1, tireoidite, doença inflamatória intestinal, dermatite atópica e outras (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; YAGI et al., 2004). Em outro estudo, camundongos nocauteados para o gene IL-2 apresentaram Treg funcionalmente preservadas, porém com proliferação e sobrevivência prejudicadas na periferia (Fontenot et al., 2005 *apud* Margutti, 2007).

Frish; Biggar; Goedert (2000) sugerem que a supressão do sistema imune está relacionada ao risco de carcinoma *in situ* em pacientes infectados por HIV. Yaghoobi et al. (2010) corroboram os achados demonstrando que a diminuição das células $CD1a^{+}$ na mucosa anal é inversamente proporcional ao grau de neoplasia intraepitelial e câncer, e associada ao aumento de FoxP3 e de citocinas pró-inflamatórias, sugerindo que a redução das APCs no tecido anal apresenta papel fundamental na carcinogênese. Os níveis elevados de FoxP3 na mucosa anal sugerem a presença de células Treg inibindo a resposta imune.

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo principal avaliar a expressão periférica de FoxP3 em pacientes HIV positivos portadores de neoplasia intraepitelial anal atendidos na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, na cidade de Manaus.

## 2. Justificativa

Estudos realizados na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) demonstraram a crescente elevação das taxas de NIA nos pacientes HIV positivos (Daumas, 2007). Um dos fatores relevantes para o desfecho NIA/câncer anal é o comprometimento da resposta imunidade local e sistêmica através da geração de linfócitos e células dendríticas reguladoras. No Brasil, trabalhos descrevendo a relação entre a presença de NIA e o perfil imunológico de linfócitos Treg em indivíduos infectados pelo HIV são inéditos, bem como inexistem dados oficiais nacionais sobre a incidência de câncer anal em pacientes com aids (INCA, 2010).

Desta forma, o presente estudo buscou analisar a relação da expressão periférica de FoxP3 com os diferentes graus de severidade da NIA em pacientes HIV positivos atendidos na FMT-HVD, com o intuito de estabelecer a expressão de células regulatórias no sangue de pacientes com NIA e aumentar o conhecimento a cerca da

epidemiologia da doença, favorecendo o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o controle da doença.

## 3. Objetivos

### 3.1 Geral

Avaliar a expressão periférica de FoxP3 nos linfócitos T de pacientes HIV positivos atendidos na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado e a relação com o grau de neoplasia intraepitelial anal.

### 3.2 Específicos

Analisar a expressão periférica dos linfócitos $TCD4^{+}$ e correlacioná-la com os níveis de FoxP3;

Correlacionar os níveis dos linfócitos $TCD4^{+}$ com o grau de NIA;

Analisar possível correlação entre o HPV de alto risco com a elevação da expressão periférica de FoxP3.

## 4. Metodologia

### 4.1 Modelo de estudo

Trata-se de um estudo prospectivo, transversal, de detecção de casos.

### 4.2 Universo amostral

Foram estudados pacientes do sexo masculino com aids. A amostra foi composta por pacientes HIV positivos encaminhados ao Ambulatório de Coloproctologia da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), provenientes dos ambulatórios de DSTs/aids e dermatologia e pacientes HIV negativos que procurem a instituição por livre demanda, por apresentarem queixas proctológicas.

### 4.2.1 Cálculo da amostra

Para determinar o tamanho da amostra, n, utilizou-se um erro máximo de estimação (erro amostral) igual a 0,2 com um nível de confiança de 95%. A variância da população não é conhecida, portanto, admite-se que $p(1-p) \leq 1/4$, para todo p, entendendo-se p como a proporção populacional de homens HIV positivos que apresentaram a neoplasia intraepitelial anal (NIA), chegando-se ao cálculo da amostral:

$$n = \frac{z_{\gamma}^{2}}{4\varepsilon^{2}} = \frac{1{,}96^{2}}{4(0{,}2)^{2}} \cong 24$$

Como a média de consultas semanais é de 12, teremos uma média de 144 pacientes nos três meses de coleta. O total de pacientes do sexo masculino foi estimado na frequência observada no ambulatório que é constituída 80% por homens. No cálculo amostral levou-se em consideração as variáveis que indicam presença ou ausência de HIV e presença ou ausência de NIA. Em estudos prévios realizados na mesma Instituição, Daumas (2007) concluiu que 70% dos pacientes são HIV positivos e 52,8% apresentam NIA, sendo que destes, 66,7% são HIV positivos e 33,3 são HIV negativos. Com esta consideração, foi possível estimar o total de homens segundo a distribuição de ausência ou presença de HIV, e ausência ou presença de NIA.

**TABELA 2 – Valores estimados**

| | NIA | sem NIA | Total |
|---|---|---|---|
| HIV+ | **41** | 5 | 46 |
| HIV- | 20 | **49** | 69 |
| Total | 61 | 54 | 115 |

Partiu-se para uma segunda etapa do cálculo do tamanho da amostra, na qual utilizamos a alocação proporcional. Tal método extrai dos subgrupos criados, um determinado número de pessoas a fim de representá-los na amostra final, considerando que o total entre casos e controles seja 41+49 = 90.

Temos então:

- Subgrupo 1: Homens HIV positivos com NIA (CASO)

$$n1 = n\left(\frac{N_1}{N}\right) = 24\left(\frac{41}{41+49}\right) \cong 11$$

- Subgrupo 2: Homens HIV negativos sem NIA (CONTROLE)

$$n2 = n\left(\frac{N_2}{N}\right) = 24\left(\frac{49}{41+49}\right) \cong 13$$

Portanto, o tamanho final da amostra será de:

$$n = \sum_{i=1}^{2} n_i = 24.$$

### 4.2.2 Critérios de Inclusão

#### 4.2.2.1 Grupo caso:

Pacientes do sexo masculino com aids, adeptos do sexo anal receptivo, aqui caracterizado pela prática de mais de 1x/mês pelo menos 04 meses por ano; portadores de NIA; com idade entre 14 e 60 anos, com consentimento de um dos pais ou responsável quando menores que 18 anos, provenientes dos ambulatórios de DSTs/aids e dermatologia ou por livre demanda.

#### 4.2.2.2 Grupo controle:

Pacientes do sexo masculino, com sorologia negativa para o HIV; ausência de NIA/câncer anal ao exame histopatológico; não adeptos do sexo anal receptivo; não adeptos do tabagismo, aqui definido como o uso do tabaco nos últimos 24 meses, ainda que de forma interrupta; com idade entre 18 anos completos até 60 anos; e ainda ausência de infecção pelo HPV, clamídia, herpes e gonococo na amostra anal; que procurem o ambulatório de coloproctologia por livre demanda por apresentarem queixas proctológicas.

### 4.2.3 Critérios de Exclusão

#### 4.2.3.1 Para ambos os grupos

a) Pacientes do sexo feminino;
b) Portadores de doenças infecciosas anorretais, exceto a infecção pelo papilomavírus humano (HPV), clamídia e gonorréia;
c) Portadores atuais de outras doenças oportunistas clinicamente e/ou laboratorialmente detectáveis relacionada à aids;
d) Outras doenças imunossupressoras;
e) Neutropênicos (< 500 céls x mm3);
f) Em uso de drogas com efeito anticoagulante nos últimos quinze dias;
g) Plaquetopênicos (< 75000 céls x mm3);
h) Incapazes mentalmente;
i) Portadores de quadro infeccioso bacteriano com repercussão clínica (sepse), ou em uso de antibioticoterapia;
j) Indígenas;
k) Transplantados de órgãos sólidos em uso de imunossupressores;
l) Portadores de neoplasia maligna não associadas ao HIV/aids; e
m) Pacientes com aids em uso de TARV por período inferior a 1 mês, ou que seu uso tenha sido irregular no último mês.

#### 4.2.3.2 Especificamente para o grupo controle

a) Adeptos do sexo anal receptivo, aqui caracterizado pela prática superior a 1x/mês por pelo menos 04 meses por ano;
b) Tabagistas nos últimos 24 meses, mesmo na forma interrupta;
c) Histórico de DST e/ou DST clinicamente ou laboratorialmente detectável;
d) Portadores de NIA, neoplasia maligna e/ou uso de drogas imunossupressoras; e
e) Portadores de doenças infecciosas anorretais.

### 4.3 Materiais e métodos

Os pacientes receberam os esclarecimentos quanto aos objetivos do estudo, riscos e benefícios da pesquisa. Os que concordaram, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), ficando-lhes assegurado o caráter

confidencial dos dados e o recebimento de uma cópia do TCLE contendo o telefone de contato e a assinatura do pesquisador responsável.

## 4.4 Procedimentos

### 4.4.1 Coleta

A inclusão dos pacientes na pesquisa foi feita de forma contínua, iniciando-se em agosto de 2011, obedecendo aos critérios de elegibilidade, até que se completasse a amostra. Na oportunidade, foi aplicado o protocolo de estudo, onde foram compilados os dados socioculturais dos pacientes.

### 4.4.2 Fluxograma de Execução

Desde a chegada do paciente ao Ambulatório de Coloproctologia, os eventos da pesquisa estão detalhados abaixo.

#### 4.4.2.1 Anuscopia com Magnificação de Imagens (AMI) e obtenção das amostras teciduais

Os pacientes selecionados foram submetidos à inspeção anal, seguida da coleta de material citológico para a detecção do HPV, clamídia e gonococo por captura híbrida II (Digene®). A coleta citológica foi feita através da rotação por 10x do swab sintético estéril (Dacron®) no canal anal, sobre a região pectínea (Roka et al., 2008), e o material foi encaminhado à análise por captura híbrida, realizada na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HDV).

Após o término do exame físico especializado com o toque retal, os pacientes foram submetidos à AMI, onde a pele perianal, o epitélio transicional e a mucosa foram inspecionados com colposcópio de aumento (16 a 40 x). Retirados eventuais resíduos fecais com solução fisiológica a 0,9%, foram biopsiadas as áreas suspeitas. Nos casos em que não houve lesões que sustentavam suspeitas clínicas, a biópsia foi realizada às 3h na linha pectínea. A amostra designada ao estudo histopatológico foi conservada em formalina tamponada a 10%, processada e submetida a exame histopatológico convencional no Laboratório de Anatomia Patológica da FMT-HDV.

#### 4.4.2.1.1 Detecção do HPV por Captura Híbrida

Os testes para detecção dos grupos de risco do HPV foram feitos por captura híbrida II, onde foram detectados os HPV de maior relevância designados segundo o potencial oncogênico no câncer anal. As amostras foram analisadas para os seguintes subtipos de HPV, de acordo com Roka et al. (2008):

a) baixo risco: 6, 11, 41, 42, 43;
b) alto risco: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68.

As amostras foram processadas de acordo com o protocolo do fabricante (DIGENE, 2008), e teve como princípio a detecção, via sonda, do ácido nucléico híbrido RNA-DNA específicos para os subtipos do HPV de baixo e alto grau previstos. O RNA-DNA híbrido foi marcado com anticorpo fluorescente que emite luz, que foi capturada pelo luminômetro como unidade de luz relativa (relative light units - RLU). O limite de ≥1 pg/ml RLU do HPV 16 foi utilizado como controle positivo. Além dos resultados negativo, positivo de baixo ou alto risco para o HPV, a carga viral também foi estimada pelos níveis da RLU.

Etapas de detecção por captura híbrida:

a) **Fase de Desnaturação:** Foram feitas alíquotas de 500µl de reagente de desnaturação no tubo com amostra e homogeneizadas no vortex. As amostras deveriam se tornar púrpuras, as tampas de pressão deveriam ser trocadas pelas roscas e o material incubado a 65ºc por 45 minutos;
b) **Fase de Hibridização:** Foram feitas alíquotas de 25µl de sonda e 75µl de amostra e colocadas no microtubo, cobertas com Plate Sealers e homogeneizadas a 1.100 rpm por 2 minutos. A coloração deveria se tornar amarela. Incubadas a 65ºC por 60 minutos;
c) **Fase de Captura dos Híbridos:** Todo o material foi transferido para a microplaca e centrifugado a 1.100 rpm por 60 minutos a 20-25ºC;
d) **Fase de Reação com o conjugado:** O conteúdo da microplaca foi desprezado, adicionou-se 75µl de reagente de detecção 1 em cada micropoço e incubou-se a 20-25ºC por 30 minutos. As microplacas foram lavadas 6 vezes;
e) **Fase de Amplificação de Sinais:** Adicionou-se 75µl de reagente de detecção 2 em cada micropoço e incubou-se a 20-25ºc por 15 minutos;
f) **Fase de leitura por quimioluminescência**: A microplaca foi introduzida no dml-2000 e realizou-se a leitura.

#### 4.4.2.1.2 Diagnóstico histológico

As amostras permaneceram no formol tamponado por um período mínimo de 12 horas e máximo de 48 horas, e foram então submetidas à desidratação, inclusão em parafina, confecção dos blocos e secção em fatias de 4µ. A seção histológica foi montada em lâmina de vidro com extremidade fosca, coradas pela técnica da hematoxilina-eosina (Behmer et al., 1976) e observadas à microscopia ótica à procura de alterações inflamatórias, citopáticas, displásicas e/ou neoplásicas. Os laudos histopatológicos foram revisados através de uma reunião de consenso envolvendo no mínimo dois patologistas, sendo um deles *senior*.

### 4.4.2.2 Coleta de amostra sanguínea

A amostra sanguínea de 8 mL foi coletada, armazenada em frasco com anticoagulante e transportada em isopor térmico para o HEMOAM para a realização de hemograma e citometria de fluxo para células T reguladoras (Treg).

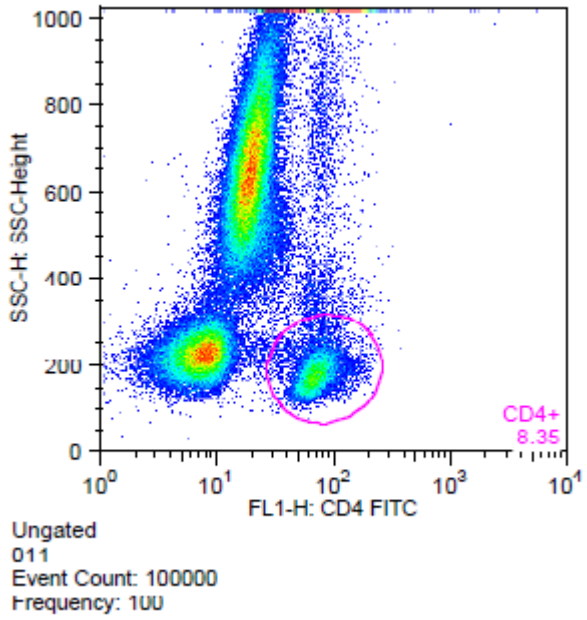
#### 4.4.2.2.1 Imunofenotipagem de linfócitos $TCD4^{+}CD25^{+}FoxP3^{+}$

Os tubos foram preparados, e os anticorpos de superfície foram adicionados no tubo MIX: Anti-CD4 + FITC – 1 µL Anti-CD25 + APC – (BD – 10 µL; Invitrogen – 3 µL). 100 microlitros de sangue total foram cuidadosamente adicionados diretamente no fundo de cada tubo, previamente identificado, evitando respingos na parede dos tubos. Após, foram homogeneizados em vórtex, incubados por 20 minutos em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Foram adicionados 2mL de solução de lise eritrocitária 1X (FACS Lysing solution®), sob homogeneização simultânea em vórtex. Foram incubados por mais 10 minutos em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, e a seguir centrifugados (1.300 rpm, 7 minutos, temperatura ambiente). Desprezou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se com 2mL de PBS-W e homogeneizou-se em vortex, centrifugou-se (1.300 rpm, 7 minutos, temperatura ambiente). O sobrenadante foi novamente desprezado. Ressuspendeu-se com 2mL de PBS-P e homogeneizou-se em vortex. Em seguida, foi incubado e centrifugado novamente. Desprezou-se o sobrenadante. Repetido mais uma vez o procedimento e, após desprezado mais uma vez o sobrenadante, diluiu-se o FoxP3 (1:10 em PBS-P) e adicionou-se 100 µL no tubo MIX. Homogeneizou-se em vortex, incubou-se (20 minutos, temperatura ambiente, ao abrigo da luz), ressuspendeu-se com 2mL de PBS-W e homogeneizou-se em vortex. Centrifugou-se novamente sob as mesmas condições. Desprezou-se o

sobrenadante. Ressuspendeu-se em 300 µL de PBS-W ou MFF. Procedeu-se à leitura.

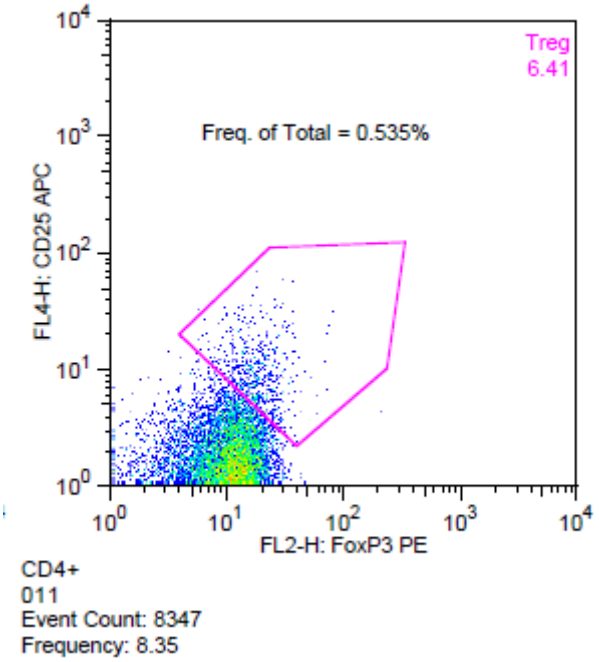
Utilizamos a citometria de fluxo para a imunofenotipagem das células Treg em sangue periférico, através de marcadores para a detecção de células $TCD4^+$ $CD25^+$ $FoxP3^+$. Após a imunofenotipagem, os gráficos foram gerados através do programa FlowJo (versão 9.4). Primeiramente, foram identificadas as células $TCD4^+$ (gráfico 1) através da análise do tamanho usual da população dos linfócitos (SSC), no eixo y, e da marcação pelo fluorocromo $CD4^+$ FITc (*Isotiocianato de Fluoresceína*, marca *BD® Biosciences*), no eixo x. Desta forma, foi selecionada a população de linfócitos $TCD4^+$, que a seguir foi estudada isoladamente para a identificação das células $CD25^+FoxP3^+$.

**GRÁFICO 1 – Detecção de células $TCD4^+$**




Para a detecção da população das células Treg (gráfico 2), foram utilizadas duas marcações: $CD25^+$ APC (*Aloficocianina*, marca *BD® Biosciences*), no eixo y, e $FoxP3^+$ PE (Ficoeritrina, marca *BD® Biosciences*), no eixo x. Assim, foi possível identificar as células $TCD4^+$ $CD25^+$ $FoxP3^+$, correspondentes às células Treg.

**GRÁFICO 2 – Detecção de células $CD25^{+}FoxP3^{+}$**




## 4.5 Análise dos Resultados

### 4.5.1 Tratamento Estatístico

Os dados foram registrados em um banco de dados e alimentados prospectivamente. Inicialmente foram utilizados métodos de análises descritivas. Os resultados foram tratados estatisticamente, onde as variáveis categóricas foram submetidas a contagem e percentagens. As variáveis contínuas foram avaliadas através da média, mediana e desvio-padrão. As comparações entre os grupos foram feitas através do teste de *Mann-Whitney* ou *ANOVA*, conforme o mais indicado. As diferenças entre os subgrupos foram consideradas significantes quando o p valor foi ≤ 0,05. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se os programas *GraphPad Prism* versão 5.0 e *Minitab*® versão 1.4-2003.

### 4.6 Considerações Éticas

Em obedecimento a resolução número 196 de 10 de outubro de 1996 e emendas, este estudo somente teve início após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD).

### 4.7 Financiamento

Os custos foram absorvidos pelo financiamento do PPSUS como parte da tese de doutoramento da orientadora deste projeto, através do programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da UEA/FMT-HDV e pelo laboratório de Citometria de Fluxo do HEMOAM.

## 5. Resultados e discussão

No presente estudo, foram coletadas as amostras de 30 pacientes do sexo masculino. No curso deste estudo, 09 pacientes não puderam permanecer na análise, sendo 05 excluídos do grupo caso por não apresentarem NIA ao exame histopatológico inicial e 01 por amostra insatisfatória para conclusão diagnóstica. No grupo controle, 02 pacientes também apresentaram amostra insatisfatória e 01 paciente apresentou HPV de baixo risco ao exame de captura híbrida, o que configura critério de exclusão para este grupo. Foram, portanto, analisados 21 pacientes, sendo 09 pacientes do grupo caso (HIV positivos com neoplasia intraepitelial anal) e 12 do grupo controle (HIV negativos sem neoplasia intraepitelial anal).

Os pacientes foram encaminhados ao ambulatório de coloproctologia da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), oriundos dos ambulatórios de DSTs/aids e dermatologia. Os pacientes do grupo controle foram encaminhados à Instituição por possuírem queixas proctológicas diversas.

Ao comparecerem ao ambulatório, foi aplicado um questionário clínico-epidemiológico a todos os pacientes candidatos à pesquisa (tabela 3). A análise descritiva destes dados demonstrou média de 31,33 anos para o grupo caso e 44,17 anos para o grupo controle (p: 0,0299), compatível com dados oficiais nacionais do Ministério da Saúde, que descreveram 75% dos casos de aids no país como ocorrentes na faixa etária comportada entre 25 e 49 anos (BRASIL, 2006).

Com relação ao estado civil, consideraram-se casados, para fins deste estudo, aqueles pacientes que declararam ter uma união estável, e solteiros aqueles que não tinham relação estável, incluindo divorciados e viúvos. A análise do estado civil demonstrou que no grupo caso houve maior parcela de solteiros (88,89%), enquanto discreta maioria do grupo controle foi constituída por pacientes casados (58,33%). Daling et al. (1987) relataram associação entre estado civil e desenvolvimento de câncer anal. Em seus estudos, 24,4% de homens com câncer anal nunca haviam casado, em contraste com 7,9% de homens com câncer retal e 7,8% de homens com câncer de cólon.

Analisamos ainda a idade média de início sexual, que foi de 15,33 anos no grupo caso e de 16,50 anos para o grupo controle, não havendo diferença significativa entre os grupos (p: 0,3100). Quanto a média do número de parceiros sexuais nos últimos 5 anos, esta foi de 17,44 parceiros para o grupo caso e 4,33 para o grupo controle (p:0,0120). Daling et al. (2004) descreveram associação entre a multiplicidade de parceiros sexuais e o desenvolvimento de NIA/câncer, onde a ocorrência de mais de 15 parceiros sexuais durante a vida esteve associada a risco aumentado de câncer anal, independente da orientação sexual (OR: 3,9 para homens heterossexuais e 6,6 para homens não exclusivamente heterossexuais).

**TABELA 3 – Visão geral dos pacientes dos grupos caso e controle**

| | **Caso N=9** | | **Controle N=12** | | **p-valor*** |
|---|---|---|---|---|---|
| **Idade (anos)** | Md: 31,33<br>Sd: 7,98 | | Md: 44,17<br>Sd: 13,04 | | 0,0299 |
| **Estado Civil** | **Casado**<br>11,11% | **Solteiro**<br>88,89% | **Casado**<br>58,33% | **Solteiro**<br>41,67% | **N.A.** |
| **Início Sexual (anos)** | Md: 15,33<br>Sd: 4,18 | | Md: 16,50<br>Sd: 2,84 | | 0,3100 |
| **Nº de parceiros em 5 anos** | Md: 17,44<br>Sd: 16,09 | | Md: 4,33<br>Sd: 4,46 | | 0,0120 |

Legenda: Md: média; Sd: desvio-padrão; N.A.: não se aplica.
*Teste de Mann-Whitney**

Ainda relacionado ao questionário clínico-epidemiológico, compilamos na tabela 4 algumas das características exclusivas do grupo caso. Neste grupo, a média do tempo de diagnóstico de HIV que foi de 30,44 meses (05 a 119 meses). Maioria discreta destes pacientes ainda não utilizava a terapia antirretroviral (TARV) (55,56%). O tempo médio de utilização da medicação de 37,25 meses (3 a 119 meses).

Quanto à ocorrência de DST no grupo caso, todos os pacientes relataram terem sido infectados por ao menos um tipo de DST previamente, sendo o condiloma anal a infecção mais ocorrente (88,88%) e o herpes a menos citada por estes pacientes (11,11%) (tabela 4). Os estudos de Daumas (2007) mostraram que 74,5% do grupo HIV positivo relataram ao menos um tipo de DST, e OR de 6,83 entre os grupos de HIV positivos e negativos.

**TABELA 4 – Características específicas do grupo caso**

| | CASO N=9 | | | |
|---|---|---|---|---|
| **TEMPO DE HIV (meses)** | **Md** | | **Sd** | |
| | 30,44 | | 35,82 | |
| **USO DA TARV** | **SIM** | | **NÃO** | |
| | 44,44% | | 55,56% | |
| **TEMPO DE TARV (meses)** | **Md** | | **Sd** | |
| | 37,25 | | 54,76 | |
| **DST PRÉVIA** | **Condiloma** | **Gonorréia** | **Herpes** | **Sífilis** |
| | 88,88% | 22,22% | 11,11% | 22,22% |

Legenda: HIV: vírus da imunodeficiência humana; TARV: terapia antirretroviral; DST: doença sexualmente transmissível; Md: média; Sd: desvio-padrão.

Neste estudo, a co-infecção pelo HPV foi avaliada através da realização da captura híbrida de amostra citológica anal de todos os pacientes. Avaliamos a ocorrência de infecção por HPV nos pacientes do grupo caso, e na presença dele classificamos os subtipos de alto ou baixo risco oncogênico, além de estimar a carga viral pelos níveis de RLU. No grupo caso, 100% dos pacientes foram diagnosticados portadores do HPV de alto e baixo risco (tabela 5). No grupo controle, pacientes infectados pelo vírus foram excluídos do estudo (01 caso). Os achados são semelhantes aos descritos por Palefsky et al. (1998), que descreveram prevalência elevada do HPV (93%) em pacientes HIV positivos homossexuais com chance seis vezes maior da infecção nestes pacientes. Sobhani et al. (2001) descreveram maior

prevalência de HPV oncogênico nos pacientes HIV positivos (p:0,04). Analisando a associação, em um mesmo paciente, de HPV de alto e baixo risco oncogênico, nossos resultados foram superiores ao estudo de Orlando et al. (2009), que observaram 62,3% de associação dos tipos de HPV, provavelmente devido aos autores não terem estudado apenas pacientes HIV positivos.

**TABELA 5 – Análise dos níveis de RLU do grupo caso**

| | HPV N=9 | |
|---|---|---|
| | **Md** | **Sd** |
| **ALTO RISCO** | 231.819,89 | 272.813,17 |
| **BAIXO RISCO** | 357.173,78 | 251.588,13 |

Legenda: HPV: papilomavírus humano; Md: média; Sd: desvio-padrão.

Quanto à análise histopatológica, os diagnósticos do grupo controle foram agrupados em **normal**, que corresponde aos espécimes cujos laudos acusaram normalidade e ainda os casos de hemorróidas e hiperplasia isolada de células da camada basal; e **inflamatório,** em que foram agrupados os laudos de proctite crônica inespecífica e paraceratose. Dos 12 pacientes do grupo controle, 66,7% (n=8) apresentaram diagnóstico normal, enquanto 33,3% (n=4) tiveram diagnóstico inflamatório.

Para o grupo caso (n=9), apenas os pacientes com diagnóstico de NIA permaneceram no estudo, sendo 22,2% (n=2) diagnósticos de neoplasia intraepitelial anal de grau moderado (NIA II) e 77,8% (n=7) de neoplasia intraepitelial anal de alto grau (NIA III). Não houve diagnóstico de neoplasia intraepitelial de baixo grau (NIA I) ou de carcinoma (tabela 6). Nesta avaliação, o cálculo do p-valor não pode ser empregado devido a NIA ter constituído critério de exclusão do grupo controle. Nossos achados de NIA grave foram bastante superiores aos descritos por Kreuter et al. (2010) e a estudo prévio realizado na mesma instituição, por Costa e Silva et al. (2011), que descreveram, para o mesmo grupo, taxas de NIA I de 41,9% e de NIA III de 28,7%. Mais recentemente, Daumas et al. (2012) descreveram taxas mais elevadas de NIA grave (54,2%).

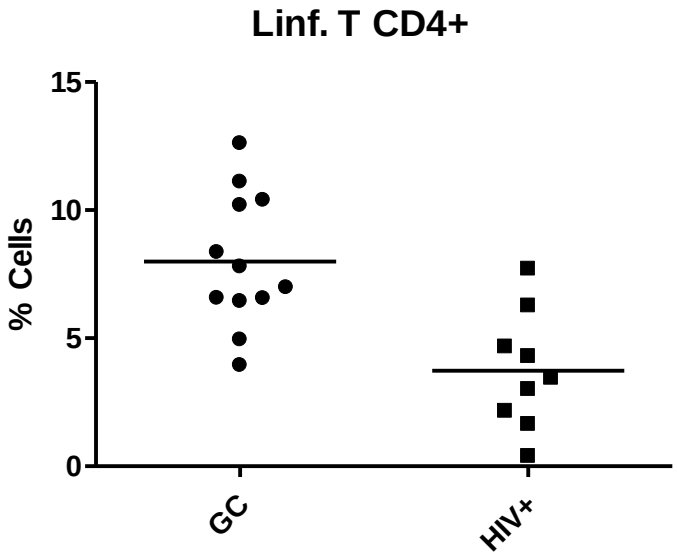
**TABELA 6 – Análise dos diagnósticos histopatológicos**

| | HISTOPATOLÓGICO GRUPO CASO | |
|---|---|---|
| | **N** | **%** |
| **NIA II** | 2 | 22,2 |
| **NIA III** | 7 | 77,8 |
| | **GRUPO CONTROLE** | |
| | **N** | **%** |
| **NORMAL** | 8 | 66,7 |
| **INFLAMATÓRIO** | 4 | 33,3 |

Legenda: NIA: neoplasia intraepitelial anal.

Através da análise por citometria de fluxo, foi realizada a imunofenotipagem das células TCD4$^+$ e T reguladoras (Treg) periféricas (CD4$^+$ CD25$^+$ FoxP3$^+$). Os níveis de células TCD4$^+$ foram estabelecidos através da porcentagem dessas células em relação aos linfócitos totais. Conforme esperado, houve diferença dos níveis de linfócitos TCD4$^+$ entre o grupo caso (md: 3,730%) e controle (md: 7,989%) (p:0,002) (gráfico 3). Abbas, Lichtman e Pillai (2008) afirmam que os linfócitos TCD4$^+$ são alvo da destruição pela citotoxicidade dos linfócitos TCD8$^+$, e Machado et al. (2007) descrevem a apoptose durante a infecção pelo HIV, por apresentarem antígenos virais em suas membranas, levando à destruição em massa desta subpopulação de linfócitos.

**GRÁFICO 3 – Níveis de linfócitos TCD4$^+$ nos grupos caso e controle**

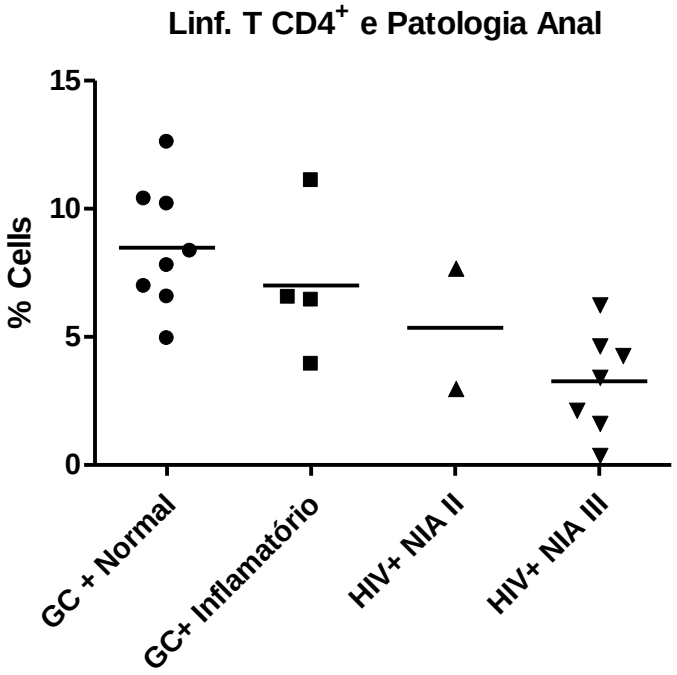



Legenda: GC: grupo controle; HIV+: grupo caso.
*Teste de Mann-Whitney*

Verificou-se, ainda, a associação entre os níveis periféricos de células TCD4$^+$ e a ocorrência de patologia anal, de acordo com os achados histopatológicos. Assim, avaliamos no grupo controle os pacientes com laudos histopatológicos normal e inflamatório (visto que NIA constituiu critério de exclusão para este grupo) e no grupo caso os pacientes com NIA II e NIA III (gráfico 4). Quando comparados o grupo controle de laudo histopatológico normal com o grupo caso apresentando NIA III, observamos diferença significativa entre os níveis destas células (p: 0,006). Da mesma forma, o grupo controle de laudo histopatológico inflamatório, quando comparado ao grupo caso com NIA III, também diferiu significativamente quando aos níveis de linfócitos TCD4$^+$ circulantes (p: 0,042). Não houve diferença significativa quando comparamos os laudos normal e inflamatório do grupo controle. Na análise dos casos de NIA II, a avaliação do p-valor não foi aplicável devido ao n amostral (n=2) ser insuficiente para que se estabeleçam comparações, impossibilitando maiores considerações a cerca deste subgrupo (tabela 7).

Estes achados são consistentes com Scott et al. (2008), que através de análise multivariada verificaram que células TCD4$^+$ abaixo de 200 céls/mm$^3$ constituíram fator de risco para NIA (OR: 2,6; p: 0.01). De forma concordante, Pokomandy et al. (2011) descreveram que a infecção pelo HPV oncogênico, em especial os subtipos de alto risco oncogênico (HPV 16 e o HPV 18), quando associados a baixos níveis de células TCD4$^+$, atuam como fator de risco para a ocorrência de NIA severa (OR: 14,18; IC: 3,51-57.32). Contrariamente, Yaghoobi et al. (2010) sugerem que o desenvolvimento de carcinoma anal é mais influenciado por alterações da imunidade local. Para estes autores, as células TCD4$^+$ não estiveram significativamente relacionadas à ocorrência de NIA III e câncer.

**GRÁFICO 4 – Correlação entre os níveis periféricos dos linfócitos TCD4$^+$ e patologia anal**




Legenda: GC: grupo controle; HIV+: grupo caso.
*Teste de Mann-Whitney*

**TABELA 7 – Relação entre laudo histopatológico e linfócitos TCD4$^+$**

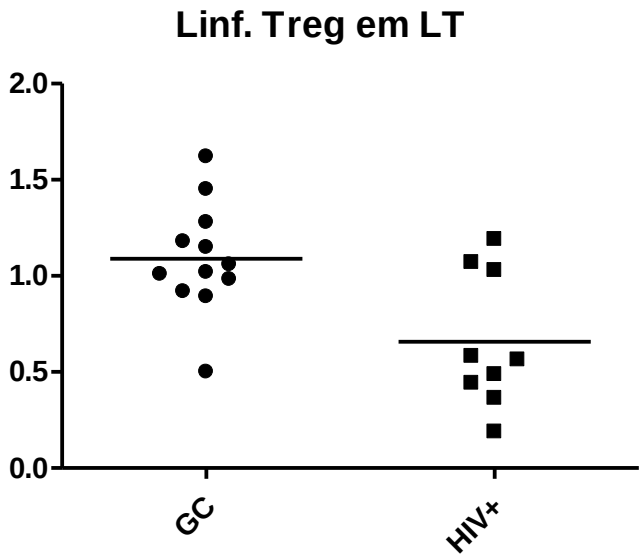
| LAUDO HISTOPATOLÓGICO vs. LINFÓCITOS TCD4$^+$ | |
|---|---|
| | **p-valor*** |
| **GC+ Normal vs GC-inflamatório** | 0,2828 |
| **GC+ Normal vs. HIV+ NIA II** | NA |
| **GC+ Normal vs HIV+ NIA III** | 0,0006 |
| **GC+ Inflamatório vs HIV+ NIA II** | NA |
| **GC+ Inflamatório vs HIV+ NIA III** | 0,0424 |
| **HIV+ NIA II vs HIV+ NIA III** | NA |

Legenda: GC: grupo controle; vs: versus; NIA: neoplasia intraepitelial anal; NA: não aplicável.
*Teste de Mann-Whitney**

Nesta pesquisa, os linfócitos Treg periféricos foram identificados através da detecção de células TCD4$^+$ CD25$^+$ FoxP3$^+$ pela citometria de fluxo e quantificados de forma percentual em relação aos linfócitos totais e aos linfócitos TCD4$^+$. A média das células Treg periféricas em relação aos linfócitos totais para o grupo caso foi de

0,657%, menor do que a observada no grupo controle (Md: 1,08%) (p: 0,036) (gráfico 5). A frequência das células Treg em relação aos linfócitos TCD4$^+$ não diferiram significativamente entre os grupos (p: 0,126).

**GRÁFICO 5 – Níveis de linfócitos Treg nos grupos caso e controle**




Legenda: GC: grupo controle; HIV+: grupo caso.
*Teste de Mann-Whitney*

Por fim, avaliamos a relação entre os níveis periféricos dos linfócitos Treg e os achados histopatológicos anais. Ao considerarmos as células Treg em relação aos linfócitos totais (tabela 8), a diferença foi significativa apenas entre o grupo controle com laudo histopatológico normal e grupo caso com NIA III (p: 0,028). Quando comparados os pacientes do grupo controle entre si (laudo histopatológico normal vs. inflamatório), bem como grupo controle com patologia inflamatória vs. grupo caso com NIA III, as diferenças não foram significativas (p: 0,367 e p: 0,230, respectivamente). Da mesma forma, o p foi considerado não-aplicável nas comparações envolvendo o grupo caso com NIA II, devido à pequena amostra do subgrupo (n=2). Quando avaliamos as células Treg em relação aos linfócitos TCD4$^+$, não foi verificada associação entre os níveis periféricos destas células e os diferentes graus de lesão do canal anal.

**TABELA 8 – Relação entre laudo histopatológico e linfócitos Treg**

| LAUDO HISTOPATOLÓGICO vs. LINFÓCITOS Treg/LINFÓCITOS TOTAIS | |
|---|---|
| | **p-valor*** |
| **GC+ Normal vs GC- inflamatório** | 0,367 |
| **GC+ Normal vs. HIV+ NIA II** | NA |
| **GC+ Normal vs HIV+ NIA III** | 0,028 |
| **GC+ Inflamatório vs HIV+ NIA II** | NA |
| **GC+ Inflamatório vs HIV+ NIA III** | 0,230 |
| **HIV+ NIA II vs HIV+ NIA III** | NA |

Legenda: GC: grupo controle; vs: versus; NIA: neoplasia intraepitelial anal; NA: não aplicável.

*Teste de Mann-Whitney**

Epple et al. (2006) avaliaram os linfócitos Treg periféricos, tanto em números absolutos quanto em relação aos $TCD4^+$. Estes autores não encontraram diferença significativa no número absoluto de células Treg entre os pacientes do grupo controle e os pacientes HIV positivos, a despeito do uso de TARV, porém quando analisadas em relação às células $TCD4^+$, foi detectado pequeno aumento desta subpopulação em pacientes HIV positivos que não usavam TARV. Os autores descreveram ainda um aumento das células Treg da mucosa duodenal de pacientes HIV positivos que não utilizavam TARV, tanto em valores absolutos quanto em relação às células $TCD4^+$ (40% de Treg em relação a $TCD4^+$ no grupo HIV positivo sem tratamento e 1,2% no grupo controle, com reversão destes valores, ao nível do grupo controle, após 03 meses de supressão da replicação viral com uso regular da TARV). De forma similar, Yaghoobi et al. (2010) mostraram que a progressão a NIA III e câncer anal esteve relacionada ao prejuízo da imunidade local, decorrente da depleção de células imunes $CD1a^+$ e $CD3^+$ e do aumento da expressão de FoxP3 (linfócitos Treg) na mucosa anal de pacientes HIV positivos co-infectados pelo HPV ($p<0,04$).

Nossos resultados divergem dos estudos de Epple et al. (2006) e Yaghoobi et al. (2010), realizados na mucosa duodenal e anal, respectivamente. Em nossa avaliação, a média de células Treg foi significativamente menor no grupo caso (Md: 0,657) do que no grupo controle (Md: 0,108) (p: 0,036). As justificativas para estes achados se apoiam no fato de esta pesquisa ter sido realizada em ambiente sistêmico, e não no compartimento afetado pela patologia em estudo. Ressaltamos ainda o fato de os linfócitos Treg ($CD4^+$ $CD25^+$ $FoxP3^+$) constituírem uma subpopulação de linfócitos $TCD4^+$, reduzidos na infecção por HIV, o que poderia justificar os baixos níveis de Treg periféricos em relação aos linfócitos totais. Outra possibilidade é de que

o processo de NIA/câncer seja realmente mais influenciado por alterações da imunidade local do que sistêmica, conforme defendido por Yaghoobi et al. (2010). Estas lacunas apontam para a necessidade de estudos futuros comparativos entre as taxas de expressão de linfócitos Treg e de secreção de fatores tumorais no sangue periférico e na mucosa anal de indivíduos HIV positivos portadores de NIA e câncer.

## 6. Conclusões

A infecção pelo vírus HIV e o desenvolvimento de neoplasia intraepitelial anal (NIA) estiveram associados à idade mais precoce e à multiplicidade de parceiros sexuais.

As taxas de infecção pelo HPV de alto e baixo risco foram diretamente influenciadas pela ocorrência da co-infecção com o HIV.

Baixos níveis de linfócitos $TCD4^{+}$ estiveram relacionados à infecção por HIV e ao desenvolvimento de NIA II (p: 0,006) e NIA III (p: 0,042).

A média das células T reguladoras (Treg) periféricas em relação aos linfócitos totais foi menor no grupo caso (p: 0,036), estando associada à infecção por HIV e desenvolvimento de NIA.

## 7. Referências bibliográficas

ABBAS, Abul K.; Lichtman, Andrew H.; Pillai, Shiv. Imunologia Celular e Molecular. Tradução: Cláudia Reali e outros. 6a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

ABRAMOWITZ, L.; BENABDERRAHMANE, D.; RAVAUD, P.; WALKER, F.; RIOUX, C.; JESTIN, C.; BOUVET, E.; SOULÉ, J.C.; LEPORT, C.; DUVAL, X. Anal squamous intraepithelial lesions and condyloma in HIV-infected heterosexual men, homosexual men and women: prevalence and associated factors. AIDS. V.21, p.1457-65, 2007.

APGAR, B.S.; ZOSCHNICK, L. The 2001 Bethesda System Therminology. American Family Physician, v. 68, n. 10, p.1992-8, nov. 2003.

BANDEIRA, C.B., LIMBERGER, L.F., DAMIANI, P.A., ROSA, M., FERRAZ, R., CAMPO, L.S. Manejo das lesões suspeitas de neoplasia cervical. Revista Técnico-científica do Grupo Hospitalar Conceição, v.14, n.1, 2001.

BEHMER, O.A.; TOLOSA, E.M.C.N.; NETO, A.G.F. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. 1 ed. São Paulo: EDART, 1976.

BRASIL. Critérios de definição de casos de aids. Ministério da Saúde: Secretaria de Vigilâcia em Saúde; 2004. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/data/documents/storedDocuments/%7BB8EF5DAF-23AE-4891AD36-1903553A3174%7D/%7B2A9F7D1C-93E-4A04-838084ED432964A5%7D/criterios.pdf>. Acesso em: 20/03/2011.

BRASIL. Ministério da Saúde/SVS - Coordenação Nacional DST e Aids. Boletim epidemiológico aids. Disponível em: <www.aids.gov.br/data/documents/BOLETIM2006internet.PDF>. Acesso em 05/06/2012.

COSTA E SILVA, I. T., et al. Anal cancer precursor lesions in HIV-positive and HIV-negative patients seen at a tertiary health institution in Brazil. Acta Cir Bras, 26(1): 64-71, 2011.

CRITCHLOW, C.W.; HAWES, S.E.; KUYPERS, J.M.; GOLDBAUM, G.M.; HOLMES, K.K.; SURAWICZ, C.M.; KIVIAT, N.B. Effect of HIV infection on the natural history of anal human papillomavirus infection. AIDS 1998; 12: 1177-1184.

DALING, J.R.; WEISS, N.S.; HISLOP, G.; MADEN, C.; COATES, R.J.; SHERMAN, K. J.; ASHLEY, R.L.; BEAGRIE, M.; RYAN, J.A.; COREY, L. Sexual practices, sexually transmitted diseases, and the incidence of anal cancer. The New England Journal of Medicine, v. 317, n. 16, p. 973-7, 1987.

DALING, J.R.; MADELEINE, M.M.; JOHNSON, L.G.; SCHWARTZ, S.M.; SHERA, K.A.; WURSCHER, M.A.; Carter, J.J.; PORTER, P.L.; GALLOWAY, D.A.; McDOUGALL, J.K. Human papillomavirus, smoking, and sexual practices in the etiology of anal cancer. Cancer 2004; 101: 270–280.

DAUMAS, A.G.P.G. Análise Morfométrica das Células Dendríticas na Mucosa Anal de Pacientes HIVPositivos e Relação com a Lesão Intra-epitelial e o Câncer (dissertação). Manaus (AM): Universidade Federal do Amazonas; 2007.

DAUMAS, A.G.P.G. et al. Co-infection of Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, herpes simplex virus, human papillomavirus and anal intraepithelial neoplasia in HIV patients in Amazon, Brazil. J. Coloproctol., Rio de Janeiro, v. 32, n. 1, p. 18-25, jan./mar. 2012.

DIGENE BRASIL. Disponível em: <http://www.digene.com.br/menu/capturahibrida/textopro tocolohpv.asp>. Acesso em 01/04/2011.

DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. Journal of Clinical Virology. vol. 32S, p. S7 – 15, 2005.

EPPLE, H.J. et al. Mucosal but not peripheral FOXP3+ regulatory T cells are highly increased in untreated HIV and normalize after suppressive HAART. Blood 108: 3072–3078. 2006.

FERNANDEZ, N.J. Data Review. 2003 - Cancer in HIV-infected population. Disponível em: <http://goliath.ecnext.com/coms2/browse_R_R042>. Acesso em 15/03/2011.

FRIEDMAN, H.B.; SAAH A.J.; SHERMAN, M.E.; BUSSENIERS, A.E.; BLACKWELDER, W.C.; KASLOW, R.A. Human pappilomaviruses, anal squamous intraephitelial lesions, and human immunodeficiency virus in a cohort of gay men. J Infect Dis. v.178, p. 45-52,1998.

FRISH, 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. 2000; 92: 1500-1510.

INCA, 2010. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/revista_vol19_n2.pdf>. Acesso em: 21/04/2011 às 15:33.

JONULEIT, H.; SCHMITT, E.; SCHULER, G.; KNOP, J.; ENK, A.H. Induction of interleukin-10 producing, nonproliferating CD4 T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. J Exp Med. 192 (9): 1213-22, 2000.

KAWAMURA, T., GULDEN, F.O.; SUGAYA, M.; McNAMARA, D.T.; BORRIS, D.L.; LEDERMAN, M.M.; ORENSTEIN, J.M.; ZIMMERMAN, P.A.; BLAUVELT, A. R5 HIV productively infects Langerhans cells, and infection levels are regulated by compound CCR5 polymorphisms. PNAS. v.100, n.14, p.8401-06, 2003.

KAWAMURA, T., KURTZ, S.E., BLAUVELT, A.; SHIMADA, S. The role of Langerhans cells in the sexual transmission of HIV. Journal of Dermatological Sciense. v.40, p.147-55, 2005.

KREUTER, A.; BROCKMEYER, N.H.; HOCHDORFER, B.; WEINSSENBORN, S.J.; STÜCKER, M.; SWOBODA, J.; ALTMEYER, P.; PFISTER, H.; WIELAND, U. Clinical spectrum and virologic characteristics of anal intraepithelial neoplasia in HIV infection. Journal of American Academy of Dermatology. v.52, p.603-8, 2005.

KREUTER, A. et al. Anal carcinoma in human immunodeficiency virus-positive men: results of a prospective study from Germany. British Journal of Dermatology, 162, p. 1269-1277, 2010.

LOIOLA, A. Câncer anal, disponível em: <http://www.medstudents.com.br/content/resumos/resumo_medstudents20070629_01.doc >. Acesso em 18/03/2011.

MACHADO, P.R.L.; ARAÚJO, M.I.A.S.; CARVALHO, L.; CARVALHO, E.M. Mecanismos de resposta imune às infecções. Disponível em <www.anaisdedermatologia.org.br/artigo_imprimir.php?artigo_id=197>. Acesso em 18/3/2011.

MARCHETTI, B; ASHRAFI, G.H.; TSIRIMONAKI, E.; O'BRIEN, P.M.; CAMPO, M.S. The bovine papillomavirus oncoprotein E5 retains MHC class I molecules in the Golgi apparatus and prevents their transport to the cell surface. Oncogene, v.21, n.51, p.7808-16, 2002.

MARGUTTI, I. Efeito das células dendríticas na geração de células TCD4+CD25+Foxp3+(Dissertação). São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2007

MARTINS, C. HPV-induced anal displasia: what do we know and what can we do about it? Disponível em: <http://www.hopkins-aids.edu/publications/report/may01_3.html>. Acesso em: 20/3/2011.

MELBYE, M.; COTÉ, T.R..; KESSER, L.; GAIL, M.; BIGGAR, R.J. High incidence of anal cancer among AIDS pacients. Lancet, v.343, p.636-9, 1994.

MUÑOZ, N.; BOSCH, F.X.; SANJOSE, S.; HERRERO, R.; CASTELLSAGUE, X.; SHAH, K.V. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with

cervical cancer. New England Journal of Medicine, v.348, n.6, p.518-27, 2003.

NADAL, R.S.; CALORE, E.E.; CRUZ, S.H.A.; HORTA, S.H.C.; MANZIONE, C.R.; BIN, F.C.; CAPELHUCHNIK, P.; KLUG, W.A. Comparação das contagens das células de Langerhans de tecidos contendo carcinoma anal em doentes com e sem infecção pelo HIV. Rev Bras Coloproct. v.26, n.3, p.269-74, 2006a.

NADAL, R.S.; MANZIONE C.R. Papilomavírus Humano e o Câncer Anal. Rev Bras Coloproct. v.26, n. 2, p.204-7, 2006b.

ORLANDO, G., et al. Anal HPV genotypes and related displasic lesions in Italian and foreign born high-risk males. Vacine 27, A24-A29, 2009.

PALEFSKY, J.M.; HOLLY, E.A. Molecular virology and epidemiology of human papilomavirus and cervical cancer. Cancer Epidemiol Biomarks Prev, v.4, n.4, p.415-28, 1995.

PALEFSKY, J. M.; HOLLY, E.A.; RALSTON, Mary L.; JAY, Naomi. Prevalence and Risk Factors for Human Papillomavirus Infection of the anal canal in Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Positive and HIV-Negative Homosexual Men. The Journal of Infectious Diseases, 177, p.361-7, 1998a.

PALEFSKY, J.M.; HOLLY, E .; RALSTON, M.L.; JAY, N; BERRYZ, J.M.; DARRAGH, T.M. High incidence of anal high-grade squamous intra-epithelial lesions among HIV-positive and HIV-negative homossexual and bisexual men. AIDS, v.12, n.5, p.495-503, 1998b.

PALEFSKY, J.M.; HOLLY, E.A.; HOGEBOOM, C.J. RALSTON, M;L. DA COSTA, M.M.; BATTS, R. Virologic, immunologic, and clinical parameters in the incidence and progression of anal squamous intraephitelial lesions in HIV-positive and HIV-negative homosexual men. J Acquir Immune Defic-Syndr Hum Retrovirol, v. 17, p.314-9, 1998c.

PALEFSKY, J.M.; HOLLY, E.A.; RALSTON, M.L.;ARTHUR, S.P.; JAY, N.; BERRY, J.M.; DA COSTA, M.M.; BOTTS, R.; DARRAGH, T.M. Anal squamous intraephitelial lesions in HIV-positive and HIV-negative homosexual and bisexual men: prevalence and risk factors. J. Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol. v.17, p.320-6, 1998d.

PALEFSKY, J.M.; HOLLY, E.A. Immunosupression and co-infection with HIV. Journal of the National Cancer Institute Monographs, n.31, p.41-6, 2003.

POKOMANDY, A., et al. HAART and Progression to High-Grade Anal Intraepithelial Neoplasia in Men Who Have Sex with Men and are Infected with HIV. Clinical Infectious Disease, 52 (9): 1174-1181, 2011.

Roka F, Roka J, Trost A, Schalk H, Zagler C, Kirnbauer R, Salat A. Anal Human Papillomavirus Testing with Digene's Hybrid Capture 2 Using Two Different Sampling Methods. Dis Colon Rectum. 2008; 51: 61-66.

SCOTT, H., et al. Routine anal cytology screening for anal squamous intraepithelial lesions in an urban HIV clinic. Sexually Transmitted Diseases, 35 (2): 197-202, 2008.

SMED-SORENSEN, A; LORÉ, K.; VANSUDEVANN, J.; LOUDER, M.K.; ANDERSSON, J.; MASCOLA, J.R.; SPETZ, A.L.; KOUP, R.A. Differential susceptibility to human immunodeficiency virus type I infection of myeloid and plasmacytoid dendritic cells. J. Virol., v. 79, p. 8861-8869, 2005.

SOBHANI, I., et al. Prevalence of High-Grade Dysplasia and Cancer in the Anal Canal in Human Papillomavirus-Infected Individuals. Gastroenterology, v.120, n.4, p. 857-866, 2001.

SOBHANI, I.; WALZER, F.; APARICIO, T.; ABRAMOWITZ, L.; HENIN, D.; CREMIEUX, A.C.; SOULE, J.C. Effect of anal epidermoid cancer-related viruses on the dendritic (Langerhans') cells of the human anal mucosa. Clinical Cancer Research, v.8, p. 2862-69, 2002.

STEINBRINK, K.; WOLFL, M.; JONULEIT, H.; KNOP J.; ENK, A.H. Induction of tolerance by IL-10 treated dendritic cells. J Immunol. 159: 4772-80, 1997.

TUETTENBERG, Andrea et al. CD40 signalling induces IL-10-producing, tolerogenic dendritic cells. Experimental Dermatology 2010; 19 (1): 44-53.

TURVILLE, S.G.; CAMERON, P.U.; HANDLEY, A.; LIN, G.; POHLMANN, S.; DOMS, R.W.; CUNNINGHAM, A.L. Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. Nature Immunology, v.3, n.10, p.975-83, 2002.

VOLBERDING, P. Looking Behind: time for anal cancer screening. The American Journal of Medicine, v.108, p.674-5, 2000.

WALKER, Lucy S. K. CD4+ CD25+ Treg: divide and rule? Immunology 2004, 111 (2): 129-137.

YAGHOOBI, Mohammad et al. FoxP3 overexpression and CD1a+ and CD3+ depletion in anal tissue as possible mechanisms for increased risk of human papillomavirus-related anal carcinoma in HIV infection. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1463-1318.2010.02283.x/abstract>. Acesso em: 20/3/2011.

ZIMMER, M. I.; LARREGINA, A. T.; CASTILLO, C. M.; CAPUANO III, S.; FALO JR, L.D.; MURPHEY-CORB, M.L.; REINHART, T.A.; BARRATT-BOYES, S. M. Disrupted homeostasis of Langerhans cells and interdigitating dendritic cells in monkeys with AIDS. Blood, v. 99, n. 8, p. 2859-2868, 2002.