

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

ESTUDO DA VARIAÇÃO DA DENSIDADE DAS CÉLULAS
DENDRÍTICAS DA REGIÃO ANAL DE PACIENTES HIV POSITIVOS
PORTADORES DE CONDILOMA ACUMINADO ANAL E/OU PERIANAL
OU COM DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO DE INFECÇÃO PELO HPV
ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE COLOPROCTOLOGIA DA
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DO ESTADO DO AMAZONAS
(FMTAM)

Bolsista: José Anchieta de Carvalho Júnior, FAPEAM

MANAUS
2009

ESTUDO DA VARIAÇÃO DA DENSIDADE DAS CÉLULAS
DENDRÍTICAS DA REGIÃO ANAL DE PACIENTES HIV POSITIVOS
PORTADORES DE CONDILOMA ACUMINADO ANAL E/OU PERIANAL
OU COM DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO DE INFECÇÃO PELO HPV
ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE COLOPROCTOLOGIA DA
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DO ESTADO DO AMAZONAS
(FMTAM)

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
PIB-S/0045/2008
ESTUDO DA VARIAÇÃO DA DENSIDADE DAS CÉLULAS
DENDRÍTICAS DA REGIÃO ANAL DE PACIENTES HIV
POSITIVOS PORTADORES DE CONDILOMA ACUMINADO
ANAL E/OU PERIANAL OU COM DIAGNÓSTICO
HISTOLÓGICO DE INFECÇÃO PELO HPV ATENDIDOS NO
AMBULATÓRIO DE COLOPROCTOLOGIA DA FUNDAÇÃO DE
MEDICINA TROPICAL DO ESTADO DO AMAZONAS (FMTAM)

Bolsista: José Anchieta de Carvalho Júnior, FAPEAM
Colaboradora: Jacqueline Pereira Pinheiro
Orientador: Prof. MSc. Adriana Gonçalves Daumas Pinheiro
Guimarães

MANAUS
2009

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas – UFAM, ao Departamento de Apoio à Pesquisa – DAP e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa, financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, foi desenvolvida em parceria com serviço de coloproctologia e patologia da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMTAM e o Departamento de Estatística da Faculdade de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas – UFAM.

RESUMO

O condiloma acuminado é a patologia anal mais freqüente em indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), sendo causado pelo papiloma vírus humano (HPV), possuindo relação com o câncer anal. Caracteriza-se por ser uma doença sexualmente transmissível, com incidência aumentada em homossexuais masculinos. A integridade do sistema imunológico desempenha papel importante na susceptibilidade à infecção pelo vírus HPV, sendo a imunidade celular local, representada pelos linfócitos e células de Langerhans, fator decisivo na susceptibilidade e na regressão das lesões. As células dendríticas representam as principais células apresentadoras de antígeno da pele (APC). Elas detectam antígenos na epiderme, migram para os linfonodos que drenam a região e os apresenta aos linfócitos T, conferindo, desta forma, a resposta imune cutânea. A diminuição das CD presentes nos indivíduos infectados pelo vírus HIV tem sido relacionada a eventos como o agravamento da displasia, neoplasias escamosas, terapia imunossupressora e surgimento de outros tumores, por causar o enfraquecimento da resposta imune celular contra o HPV e a NIC, facilitando o desenvolvimento do câncer. O estudo em questão objetivou analisar a variação da densidade das células dendríticas (DC) da mucosa anal de pacientes HIV positivos portadores de condiloma acuminado anal e/ou perianal ou com diagnóstico histológico de infecção pelo HPV atendidos no Ambulatório de Coloproctologia da Fundação de Medicina Tropical do estado do Amazonas (FMTAM), relacionando a variação da densidade das células dendríticas da mucosa anal e região perianal com a ocorrência de neoplasia intra-epitelial anal (NIA), além de analisar os níveis periféricos dos linfócitos T CD4+ nos pacientes com condiloma e/ou com diagnóstico histológico de infecção pelo HPV

infectados pelo HIV. Para participarem do estudo, os pacientes receberam informações sobre os objetivos do projeto, benefícios e riscos da pesquisa. Os resultados foram tratados estatisticamente, onde a densidade das células dendríticas, o grau de displasia anal, os níveis periféricos de CD4⁺ e os estágios clínicos pacientes HIV positivos portadores de condiloma acuminado anal e/ou perianal ou com diagnóstico histológico de infecção pelo HPV foram apresentados em gráficos e tabelas de frequência. Os testes estatísticos utilizados na análise dos dados categorizados foram o qui-quadrado de *Pearson*. Utilizou-se também o risco relativo (RR) para medir a relação fator de risco-doença. O nível de significância utilizado nos testes estatísticos foi de 5%.

Palavras-chave: condiloma acuminado, HIV, HPV, neoplasia intraepitelia anal, células dendríticas.

ABSTRACT

The condilomata acuminata is the most frequent anal pathology in HIV infected individuals, being caused by HPV; it has a direct relation with anal cancer. It is characterized for being a sexual transmitted disease commonly found among between male homosexuals. The immune system integrity has an important role in HPV infection susceptibility, with most emphasis on the local cell immunity, represented by the lymphocytes and Langerhans cells, important factors for the lesion regression. Dendritic cells represent the major antigen presenting cells of the skin. They detect the antigen, migrate to the local lymphonodes and present the antigen to T lymphocyte cells. The low number of dendritic cells found in patients with HIV is related to events such as the worsening of dysplasia, squamous neoplasia, immunosuppressor treatment and the appearance of new tumors. Objectives: Analyze the density variation of dendritic cells (DC CD1a+ e DC DC-SIGN+) found in the anal mucosa of HIV infected condilomata acuminata patients, also in patients that didn't receive any kind of treatment and in patients that received high potency antiretroviral treatment, from the Coloproctology Service at Fundação de Medicina Tropical (FMTAM). For that purpose, patients that fill in the criteria of the study were selected, treated or redirected to the Coloproctology Service at FMTAM in the time period of July, 1st of 2008 until June, 30th of 2009. After counting the structures, the collected data were analyzed on Microsoft Office Excel 2007. The results were statistically analyzed and presented through graphics and frequency tables. The statistic tests used on the study are Pearson's χ^2 and the Relative Risk (RR), to measure the risk-disease factors. The significant level used upon the statistic tests were of 5%.

Key-words: condilomata acuminata, HIV, HPV, intraepithelial neoplasia, dendritic cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Reto e canal anal – secção longitudinal.....	24
Figura 2 – Taxa de incidência da aids/100.000 habitantes.....	26
Figura 3 – Fluxograma de execução de tarefas.....	39
Figura 4 – Mucosa anal com classificação horária e lesão acetobranca às 10 e 01 horas.....	41
Figura 5 – Contagem de pontos de interesse.....	45
Figura 6 – Estruturas de interesse.....	46
Figura 7 – Planilha contendo os volumes relativos das células dendríticas.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos pacientes com infecção pelo HIV.....	17
Tabela 2 – Doenças definidoras de aids segundo os critérios modificados do CDC.....	18
Tabela 3 – Doenças definidoras de aids segundo o critério Rio de Janeiro – Caracas.....	18
Tabela 4 – Drogas anti-retrovitais (e siglas).....	20
Tabela 5 – Opções de esquema terapêutico com as drogas anti-retrovitais.....	20
Tabela 6 – Início da terapia anti-retroviral.....	21
Tabela 7 – Classificação dos tipos de HPV de acordo com o potencial oncogênico.....	25
Tabela 8 – Classificação histopatológica das amostras anorretais.....	42
Tabela 9 – Distribuição das variáveis quanto à presença de NIA.....	55
Tabela 10 – Distribuição das variáveis em relação à presença de infecção pelo HPV.....	59
Tabela 11 – Distribuição, segundo exame histopatológico, da mediana das DC CD1a+ e DC-SIGN+ dos pacientes atendidos na FMTAM.....	61

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Distribuição dos pacientes segundo sexo dos pacientes HIV positivos atendidos na FMTAM.....	52
Gráfico 2 – Distribuição dos pacientes quanto ao estado civil dos pacientes HIV positivos atendidos na FMTAM.....	53
Gráfico 3 – Idade de início da atividade sexual nos pacientes HIV positivos atendidos na FMTAM.....	54
Gráfico 4 – Distribuição dos pacientes com diagnóstico de HPV em relação a orientação sexual atendidos no ambulatório de coloproctologia da FMTAM.....	57

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	14
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
2.1.	Noções anatômicas sobre o canal anal.....	24
2.2.	O papel do vírus HPV na displasia/câncer anal.....	25
2.3.	Epidemiologia e papel do HIV na displasia/câncer.....	27
2.4.	A imunidade e as células dendríticas.....	29
2.5.	As células dendríticas e a infecção pelo HIV.....	32
3.	OBJETIVOS.....	37
3.1.	Objetivo Geral.....	37
3.2.	Objetivos Específicos.....	37
4.	METODOLOGIA.....	38
4.1.	Modelo de estudo.....	38
4.2.	Universo de estudo.....	38
	4.2.1. População de referência.....	38
	4.2.2. População de estudo.....	38
4.3.	Composição da amostra.....	39
4.4.	Análise dos resultados.....	39
4.5.	Critérios de elegibilidade.....	39
	4.5.1. Critérios de inclusão.....	39
	4.5.2. Critérios de exclusão.....	40
4.6.	Procedimentos.....	41

4.6.1.	Fluxograma de execução.....	41
4.6.2.	Coleta.....	41
4.6.3.	Protocolos de estudo.....	41
4.6.4.	Exame proctológico.....	42
4.6.4.1.	Anuscopia com magnificação de imagem (AMI).....	42
4.6.5.	Diagnóstico histológico.....	44
4.6.6.	Análise imunohistoquímica.....	45
4.6.7.	Determinação da densidade de volume (Vv) das células dendríticas.....	47
4.6.8.	Diagnóstico sorológico do HIV.....	50
4.6.9.	Contagem dos linfócitos TCD4+ e determinação da carga viral.....	50
4.7.	Considerações éticas.....	51
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
6.	CONCLUSÕES.....	65
7.	REFERÊNCIAS.....	66
8.	ANEXOS.....	75
	Anexo A – Cronograma de atividades.....	75
	Anexo B – Protocolo de estudo.....	76
	Anexo C – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).....	77
	Anexo D – Requisição de exame histopatológico.....	79
	Anexo E – Parecer de Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos.....	80

1. INTRODUÇÃO

O condiloma acuminado é uma infecção causada pelo papiloma vírus humana (HPV), que se apresenta como a doença sexualmente transmissível de origem viral mais incidente, podendo ocorrer em qualquer fase da vida, sendo mais prevalente em jovens (ALMEIDA FILHO et al, 2005). É a patologia anal mais comum em pacientes infectados pelo vírus HIV. A incidência da doença varia de 15,7 a 62%, sendo maior em homossexuais masculinos (MANZIONE, 2003).

O papilomavírus humano (HPV) é um vírus DNA com tropismo epitelial (pele e mucosas) pertencente ao gênero Papilomavirus, ao grupo Papovavirus e à família Papovaviridae, com aproximadamente duzentos diferentes sorotipos identificados (ALMEIDA FILHO et al, 2005). Dos mais de 80 tipos de HPV, 30 incidem no trato anogenital (BREESE et al, 1995). A infecção pelos tipos 16 e 18 é a mais associada ao câncer e neoplasia intra-epitelial (NIA) do colo uterino. Os tipos 31, 33 e 35 têm risco médio para câncer e os tipos 6 e 11 podem causar NIA leve, a exemplo do descrito para o trato genital (MANZIONE, 2004). A presença de múltiplos tipos virais, incluindo os de alto risco, é comum nas verrugas anogenitais (VANDEPAPELIERE et al, 1997) e os métodos de detecção do DNA do HPV são menos efetivos que a biópsia dirigida para diagnóstico da doença (VARNAI et al, 2006; GUILLAUD et al, 2005).

A incidência do câncer anal corresponde a 1,5% dos tumores do aparelho digestivo e a 2-4% das neoplasias malignas do intestino grosso (STEARNS et al, 1980; RYAN et al, 2000). Predominava no sexo feminino na proporção de 5:1 (MOSCICKI, et al, 1999). Entretanto após o surgimento da aids, esse tipo de tumor tem a frequência 25-50 vezes maior nos infectados pelo HIV, quando comparados com a população soronegativa, o que demonstra

mudança importante na epidemiologia dessa neoplasia (RYAN et al, 2000; MODESTO et al, 1994). Esse aumento vem sendo observado desde os anos 80, especialmente entre praticantes de sexo anal receptivo (LYTWYN et al, 2005) e parece estar intimamente relacionado com a infecção pelo HPV (FRISCH et al, 1999; GERVÁZ, et al, 2003).

A neoplasia intraepitelial anal (NIA) é consequência da infecção crônica pelo HPV na região perianal e está relacionada à carga viral elevada. Entretanto, a NIA de alto grau ou III parece ter baixo potencial para transformação maligna em doentes imunocompetentes e incidência aumentada em imunodeprimidos, particularmente entre os homens HIV positivos adeptos do sexo anal receptivo, homens que fazem sexo com homens (HSH), mesmo após a introdução dos esquemas com drogas anti-retrovirais de alta potencial (ARV ou HAART) (PALEFSKY et al, 2005; PIKETTY; KAZATCHKINE, 2005).

Alguns fatores têm sido associados ao aumento da NIA em pacientes portadores de condiloma anal: pacientes HIV positivos adeptos do sexo anal receptivo, imunodeficiência, estadiamento clínico avançado do HIV, verrugas anais acima da linha denteada, contagem de linfócitos TCD4+ $<500/\text{mm}^3$ e o tipo de HPV. Alguns relatos descreveram a incidência da NIA como ocorrente em 15 a 60% dos pacientes com condiloma, dos quais 29% apresentariam NIA de alto grau ou carcinoma in situ (MANZIONE, 2003). Nadal (2006) citou como fatores de risco para o aparecimento do câncer anal a imunodepressão provocada pelo HIV, a associação com infecção pelo HPV, a presença dos linfócitos TCD4+ abaixo de $100/\text{mm}^3$ e carga viral elevada do HIV, imunodepressão iminente, e a presença de displasias. Além desses, outros fatores também podem estar presentes, tais como trauma, inflamação local e tabagismo.

Daumas (2007) descreveu entre pacientes HIV positivos e em pacientes sob HAART com DST prévia prevalência significativamente superior de NIA em relação ao grupo HIV negativo, com taxas de 63,2%, 68,0% e 13,6% respectivamente.

A integridade do sistema imunológico desempenha papel importante na susceptibilidade individual à infecção pelo HPV, no desenvolvimento e na regressão das lesões, sendo a imunidade celular local, representada pelos linfócitos e células de Langerhans, fator decisivo na susceptibilidade e na regressão das lesões (ALMEIDA FILHO et al, 1994).

O HPV de forma isolada não parece suficiente para a carcinogênese, e a progressão tumoral que ocorre em pequena porcentagem de indivíduos, pode ser estimulada por mutágenos químicos ou físicos (MANZIONE, 2004). Com o aumento da incidência do câncer anal em pacientes com aids, o HIV tem sido descrito como co-fator que o HPV necessita para induzir à NIA e ao carcinoma (MODESTO; GOTTESMAN, 1994). O HIV determinaria imunodepressão local, causando resposta imune inata deficiente à infecção viral, elevando as taxas de NIA e câncer na área genital e perianal (ARANY et al, 1998). A prevalência NIA induzida pelo HPV aumenta entre pacientes HIV positivos enquanto a contagem dos linfócitos TCD4⁺ diminui (VARNAI et al, 2006). Entretanto, a razão da transformação tumoral dessas lesões permanece incerta (NADAL, 2006).

As células dendríticas (DC), como as de Langerhans, detectam antígenos na epiderme, se tornam ativadas e migram para as estações linfonodais, onde os apresenta aos linfócitos T, iniciando, desta forma, a resposta imune cutânea.

Durante o processo migratório, a expressão de MHC I, MHC II, como o HLA-DR, moléculas co-estimuladoras, CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2) e CD4 aumentam nas DC, enquanto diminui a ligação e o processamento de novos antígenos exógenos, sendo então consideradas DC maduras, que expressam ainda CXCR4 e CCR7 que direcionam a migração até as áreas T dos tecidos linfáticos, auxiliadas pelas quimiocinas linfonodais CCL19 e CCL21 (ZIMMER et al, 2002; KAWAMURA et al, 2005).

A ativação depende do interferon (IFN-gama) e fator de necrose tumoral (TNF-alfa), produzidos pelos linfócitos natural killer (NK) (GUILLAUD et al, 2005). Todavia, as

interações entre DC e NK podem se alterar em situações nas quais a imunodeficiência esteja presente (ANDREWS et al, 2005). Segundo Nadal (2006) DC ativadas são estáveis, resistentes aos fatores supressores relacionados ao tumor e mostram capacidade aumentada de induzir resposta imune.

A eficiência da transmissão do HIV-1 via DC, parece estar associada aos níveis de DC-SIGN expressos na mucosa, na qual os vírus devem atravessar a camada epitelial para acessar as DC DC-SIGN+ na região subepitelial da lâmina própria, o que pode ser facilitado por traumatismos, ferimentos e tratamentos com progesterona (JAMESON et al, 2002), além da influência do ciclo menstrual, ectopia cervical, circuncisão e predisposição genética (KAWAMURA et al, 2005).

Na mucosa vaginal, as células DC-SIGN+ não são detectadas dentro do epitélio escamoso. Já no reto, as células DC-SIGN+ que co-expressam o receptor CD4 do HIV-1 formam uma banda estreita logo abaixo do lúmen epitelial, separadas apenas pelo tênue epitélio colunar simples, sendo, portanto, facilitado o acesso do vírus a estas células (JAMESON et al, 2002). Os artigos são uníssonos em afirmar o maior risco de transmissão do HIV-1 através do intercuro retal (JAMESON et al, 2002; VOELER, 1991).

De acordo com Sobhani et al (2002) na infecção pelo HPV em pacientes HIV negativos com condiloma anal, as DC aumentam nas camadas basais do epitélio escamoso invadido e diminuem nos pacientes HIV positivos, não havendo relação com sexo, idade, presença de infecção anal múltipla ou comportamento sexual, estando, provavelmente, relacionada à presença do vírus. O achado ajuda a explicar a elevada recidiva dos condilomas nos pacientes HIV positivos. A presença de infecção pelo HIV, numa análise multivariada, foi o único fator de risco para a diminuição das células dendríticas (SOBHANI et al, 2004).

Em um estudo nacional realizado em 2006, Nadal e colaboradores descreveram a diminuição da frequência das células dendríticas em pacientes HIV positivos com câncer anal

sem relação com o prognóstico. A função dessas células infiltrando os carcinomas anais e atuando na resposta inflamatória ainda é pouco conhecida. A ativação destas células, em pacientes HIV positivos, parece ser inadequada por provável bloqueio desencadeado por fator tumoral, como o TGF-beta-1 produzido por tumores de pele e determina a imobilização das DC, impedindo sua migração para os linfonodos, reduzindo assim o número de células T que infiltrariam o tumor, evitando sua regressão (WEBER et al, 2005). Não se sabe se a ocorrência determina ou apenas acompanha a evolução para a NIA e o câncer (NADAL, 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.

Linfócitos		A	B	C
CD4/mm³	%	Assintomáticos Infecção aguda LPG	Sintomáticos Menos A e C	Doenças indicadoras de AIDS (1997)
> 500 mm³	29%	A1	B1	C1
200 A 499 mm³	14-28%	A2	B2	C2
< 200 mm³	< 14%	A3	B3	C3

Tabela 1 – Classificação dos pacientes com infecção pelo HIV

Adaptado de Barret e Gallant. Tratamento Clínico da Infecção pelo HIV 2001-2002.

Observações: Os pacientes das classes A3, B3, C1, C2 e C3 devem ser notificados como AIDS. Estas categorias são excludentes. Uma vez classificado como B ou C, o paciente não poderá ser reclassificado quando cessarem os sintomas. LPG = linfadenopatia generalizada persistente.

Segundo Bazin et al (2005) são considerados portadores de aids os pacientes que apresentam as doenças definidoras (Tabelas 2 e 3) com quaisquer níveis de TCD4+ ou os contagem inferior a 200/mm³, mesmo sem relato de infecção oportunista.

Candidíase de esôfago, traquéia, brônquios ou pulmão
Citomegalovirose disseminada ou coriorretinite
Criptococose extrapulmonar
Criptococose com diarreia persistente por mais de 30 dias
Herpes simples monocutâneo por mais de 30 dias, ou de brônquios, pulmão ou trato gastrointestinal
Histoplasmose disseminada
Isosporíase com diarreia persistente por mais de 30 dias
Leucoencefalopatia multifocal progressiva
Linfoma primário de cérebro
Linfoma não-Hodgkin de células B, de células grandes ou pequenas não clivadas ou de células grandes, imunoblástico
Sarcoma de Kaposi em pacientes com menos de 60 anos
Micobacteriose (não-tuberculosa)
Sepse recorrente por Salmonella não-tifóide
Pneumonia por Pneumocystis carinii
Toxoplasmose cerebral
Pneumonias bacterianas recorrentes, mais de dois episódios em 12 meses
Câncer cervical invasivo
Síndrome consumptiva: emagrecimento de $\pm 10\text{kg}$, diarreia crônica e febre por mais de 30 dias.

Tabela 2 - Doenças Definidoras de Aids segundo os Critérios Modificados do CDC

Legenda: CDC: Center for Diseases Control and Prevention.

Sinais/Sintomas/Doenças	Pontos
Sarcoma de Kaposi	10
Tuberculose disseminada/extrapulmonar/pulmonar não cavitária	10
Candidíase oral ou leucoplasia pilosa	5
Tuberculose pulmonar cavitária ou não-especificada	5
Herpes-zóster em indivíduo de até 60 anos de idade	5
Disfunção do sistema nervoso central	5
Diarreia por um período igual ou superior a um mês	5
Febre igual ou superior a 38°C , por um período igual ou superior a um mês	2
Caquexia ou perda de peso corporal superior a 10%	2
Astenia por um período igual ou superior a um mês	2
Dermatite persistente	2
Anemia e/ou linfopenia e/ou trombocitopenia	2

Tosse persistente ou qualquer pneumonia (exceto tuberculose)	2
Linfadenopatia maior ou igual a 1cm, maior ou igual a dois sítios extra-inguinais, por um período igual ou superior a um mês	2

Tabela 3 - Doenças Definidoras de Aids segundo critério Rio de Janeiro-Caracas

Fonte: MS – Coordenação Nacional de DST e Aids – Revisão da definição nacional de casos de AIDS em indivíduos com 13 anos de idade ou mais, para fim de vigilância epidemiológica.

A ampliação do acesso da população aos esquemas HAART foram responsáveis pela queda da mortalidade e morbidade associada a aids na maioria dos países, porém a incompleta restauração do sistema imunológico, associada à prolongada exposição aos vírus oncogênicos e a instabilidade genômica, podem resultar em prejudicada vigilância imune e subsequente elevação da incidência de tumores (FERNANDEZ, 2003). De fato, apesar da expectativa de influência favorável sobre a evolução da NIA e da diminuição da sua incidência, a HAART não demonstrou efeito sobre a incidência da NIA e da infecção pelo HPV; e tampouco conseguiu diminuir a incidência das lesões condilomatosas (RETAMOZO-PALACIOS et al, 2004).

De acordo com Daumas (2007), os níveis séricos dos linfócitos TCD4+ apresentaram correlação positiva forte com o volume relativo das células dendríticas DC-SIGN+ do canal anal de pacientes HIV positivos portadores de NIA acentuada.

As drogas anti-retrovirais são classificadas em três grupos (Tabela 4) e a terapia inicial utiliza a associação de drogas, geralmente com dois Inibidores Nucleosídeos da Transcriptase Reversa (INTR) e uma droga dentre as duas classes restantes (Tabela 5) (RAMOS FILHO, 2005).

Inibidores Nucleosídicos da Transcriptase Reversa (INTR)
Abacavir (ABC)
Didanosina (ddl)
Emtricitabina (FCT) ¹
Estavudina (d4T)
Lamivudina (3TC)
Tenofovir (TDF) ²
Zalcitabina (ddC) ³
Zidovudina (AZT, ZDV)
Inibidores Não-nucleosídicos da Transcriptase Reversa
Delavirdina (DLV) ³
Efavirenz (EFV)
Nevirapina (NVP)
Inibidores da Protease (IP)
Amprenavir (APV) ⁴
Atazanavir (ATZ)
Fosamprenavir (F-APV) ¹
Indinavir (IDV)
Lopinavir/ritonavir (LPV/r)
Nelfinavir (NFV)
Ritonavir (RTV) ⁵
Saquinavir (SQV) ⁴

Tabela 4 – Drogas anti-retrovirais (e siglas)

Adaptado de RAMOS FILHO, C. F., 2005. Tratamento Infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV).

1- Não disponível no Brasil.

2- Estritamente falando, o tenofovir é um inibidor nucleotídico (e não nucleosídico) da transcriptase reversa.

3- Droga em desuso.

4- Inibidores de protease que só devem ser empregados com reforço farmacológico com baixas doses de ritonavir.

5- Em desuso se empregado em dose plena, como único IP do esquema.

Grupo Farmacológico	1ª Escolha	2ª Escolha
2 ITRN	ZDV + 3TC	d4T+3TC ¹
ITRNN	EFV ²	NVP
IP	LPV/r ou ATZ	NFV ³ ou SQV/r ⁴

Tabela 5 - Opções de Esquemas Terapêuticos com Drogas Anti-retrovirais

Adaptado de RAMOS FILHO, C. F., 2005. Tratamento Infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV).

- 1- Em situações excepcionais, o TDF e o ABC podem ser utilizados em substituição ao ZDV ou ao d4T, e o primeiro daqueles deverá ser obrigatoriamente associado ao 3TC e ao EFV.
- 2- O EFV é contra-indicado em gestantes.
- 3- O NFV não deve ser indicado em caso de carga viral > 100.000 cópias/mL.
- 4- O SQV/r é a única opção de IP para pacientes em uso de rifampicina. Nos casos de pacientes em uso de rifampicina, que não toleram EFV nem SQV/r, ou em caso de hepatopatia grave, é possível o uso de ZDV (ou d4T) associado ao 3TC e ao abacavir.

O início da terapia deve ser iniciada antes do aparecimento de sintomas e das quedas pronunciadas de linfócitos TCD4+. A carga viral deve ser considerada em pacientes com níveis superiores a 200 células/mm³ (Tabela 6). Outros fatores como a disponibilidade da droga, o desejo do paciente em iniciar a terapia, o acesso a determinações laboratoriais, a velocidade de queda dos linfócitos TCD4+ e fatores circunstanciais (como doenças coexistentes) devem ser avaliados (RAMOS FILHO, 2005).

Contagem de Linfócitos TCD4+ (por mL)	Indicação
> 350	Não tratar
Entre 350 e 201	Considerar tratamento
≤ 200	Iniciar tratamento
Sintomáticos*	Iniciar tratamento

Tabela 6 – Início da terapia anti-retroviral

Adaptado de RAMOS FILHO, C. F., 2005. Tratamento Infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV).

* Iniciar quimioprofilaxia para infecções oportunistas com sulfametoxazol/trimetoprima.

Desta forma, o presente estudo buscará analisar a variação da densidade das células dendríticas (DC CD1a+ e DC DC-SIGN+) da mucosa anal de pacientes portadores de condiloma acuminado ou com diagnóstico histológico de HPV infectados pelo HIV, a relação

com o estadiamento clínico do HIV, a associação com a NIA e fatores relacionados a recidivas do condiloma na mucosa anal e região perianal, na principal instituição pública de apoio a pacientes HIV positivos de Manaus-AM.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Noções Anatômicas sobre o canal anal

O canal anal representa a porção terminal do aparelho digestivo e tem a função de controlar a eliminação dos subprodutos do processo digestório. Mede cerca de 2,5 cm e inicia-se à altura da linha pectínea, do latim *pecten*, pente ou crista de galo, e termina no orifício anal ou ânus, sendo revestido por pele completa que se abre na região perineal em forma de fenda longitudinal (DINIZ, 1999).

O ânus é precedido, por um segmento revestido por pele modificada desprovida de pêlos, o anoderma, até a linha pectínea (Figura 1). O epitélio de revestimento do canal anal varia conforme sua localização anatômica, sendo do tipo estratificado escamoso abaixo da linha pectínea e colunar simples acima desta (NETTER, 1999).

Variadas afecções proctológicas acometem a região suprapectínea, estando anatomicamente situadas no reto, mas comportando-se como pertencentes ao canal anal, e estando dentro dos limites musculares deste (DINIZ, 1999).

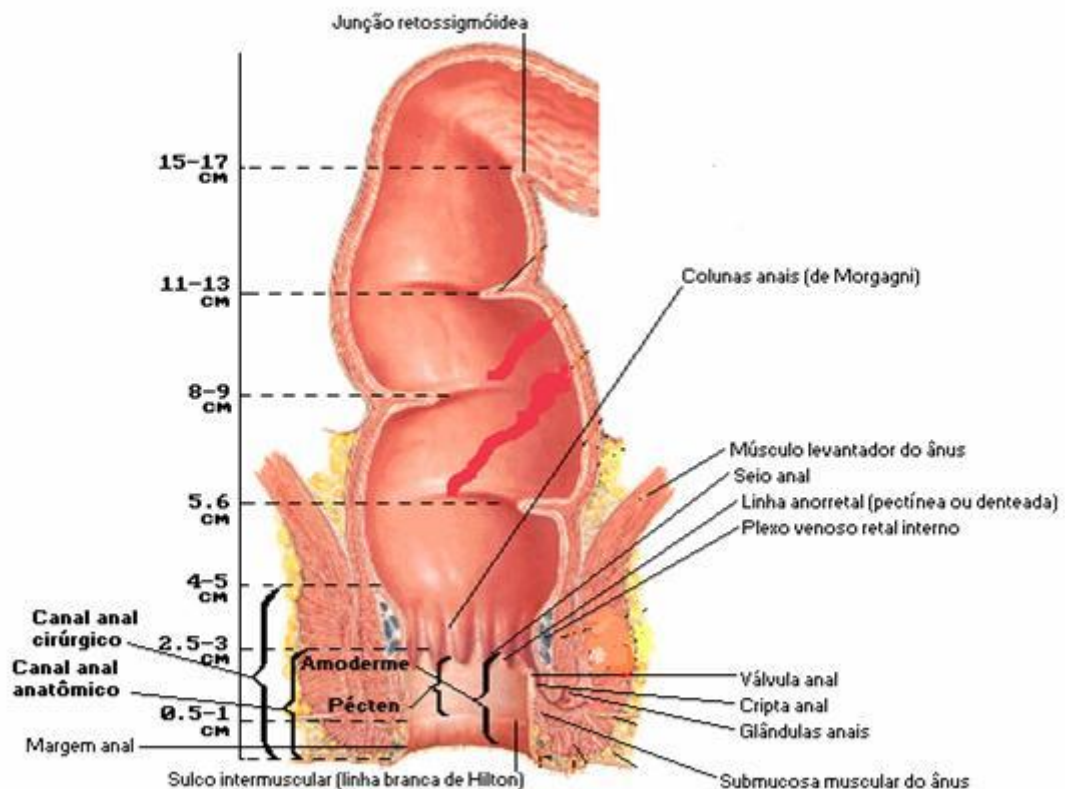


Figura 1 – Reto e canal anal – secção longitudinal
 FONTE: MODIFICADO DE NETTER (1999).

2.2 O papel dos vírus HPV na displasia/câncer anal

Os papilomavírus são pequenos vírus pertencentes a família *Papovaviridae* podendo ser encontrados no epitélio de várias espécies, inclusive no homem, sendo nestes chamados de Papilomavírus humano, ou simplesmente HPV (DOORBAR, 2005).

A família *Papovaviridae* é grande, com mais de uma centena de tipos virais identificados, dos quais ao menos 30 tipos são capazes de infectar o trato genital humano de ambos os sexos. Os tipos são classificados baseados na homologia entre as seqüências de nucleotídeos, e nas freqüências de associação com neoplasias epiteliais de alto grau e com o

carcinoma cervical, ou seja, conforme seu potencial oncogênico (tabela 7) (DOORBAR, 2005).

CLASSIFICAÇÃO DE RISCO	TIPOS DE HPV
Alto risco	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82
Provável alto risco	26, 53, 66
Baixo risco	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108
Risco indeterminado	34, 57, 83

Tabela 7 – Classificação dos tipos de HPV de acordo com o potencial oncogênico
 FONTE: MUNOZ et al, 2003.

O tipo 16 do HPV é o mais prevalente no câncer anal e os tipos 6 e 11 estão mais frequentemente associados às verrugas anogenitais benignas. A associação entre tipos virais é frequentemente observada na maioria dos carcinomas anais escamosos, principalmente nos pacientes HIV positivos anorreceptivos (MARTINS, 2004).

O genoma do HPV é composto por uma fita dupla de DNA circular com aproximadamente 8.000 pares de bases classificados de acordo com suas funções durante o processo de replicação viral, sendo dividido em regiões precoces (*early regions*), de E1 a E7 que controlam a transcrição e a transformação celular, regiões L1 e L2 ou tardias (*late regions*), atuantes na síntese de proteínas estruturais do capsídeo viral, e região longa (*long control regions* ou LCR), envolvida na modulação dos processos de replicação no hospedeiro. As regiões E1 e L1 parecem ser as mais conservadas, com ORFs (*open reading frame* – região aberta de leitura) fundamentais a sobrevivência de todos os papilomavírus.

Os HPV são essencialmente epiteliotróficos e necessitam romper a barreira epitelial através de fissuras na pele, dos folículos pilosos ou da exposição prolongada à água, para invadirem as células da camada basal.

Habitualmente, as células não infectadas da camada basal migram para a superfície celular e se diferenciam com a formação de grãos envelopados de queratina além de secretarem lipídios no intuito de formar uma barreira protetora contra invasões (MADISON, 2003).

2.3 Epidemiologia e o papel do HIV na displasia-câncer

Em todo o mundo a infecção pelo vírus do HIV estendeu-se primariamente como resultado da exposição sexual através das superfícies mucosas (JAMESON *et al*, 2005).

No Brasil existem mais de 362.364 casos de aids relatados. Dentre os do sexo masculino 14,9% são declaradamente homossexuais e 10,3% bissexuais. No Amazonas, desde 1980, foram notificados 2831 casos, com 270 casos novos em 2004, sendo o estado com a segunda incidência mais elevada do país (INCA, 2005; BRASIL, 2005).

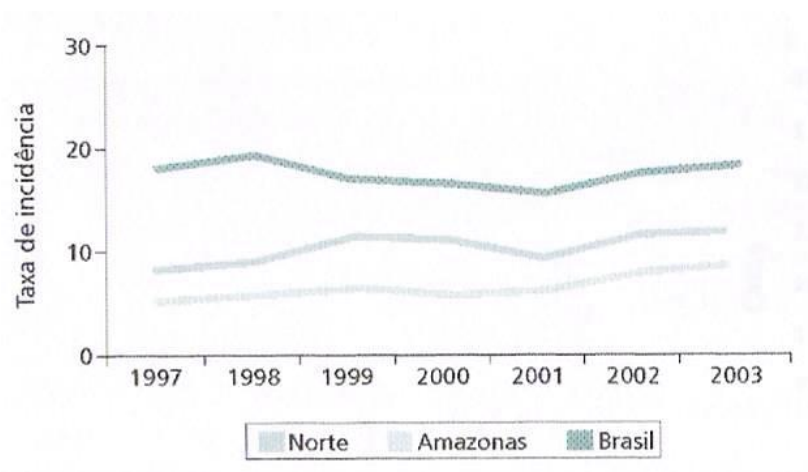


Figura 2 - Taxa de incidência de aids/100.000 habitantes

FONTE: BRASIL, 2005.

A incidência de câncer anal foi descrita por Melbye *et al* (1994) como vinte vezes mais freqüente em indivíduos HIV positivos. No programa de registros de casos de câncer em 11 estados dos Estados Unidos o risco do câncer anal entre mulheres HIV positivas foi de 6,8 e de 37.9 entre homens, mas quando se considera apenas indivíduos com menos de 30 anos o risco para mulheres sobe para 134 e para 162.7 nos HSH HIV positivos (KLENCKE & PALEFSKY, 2003).

Num estudo de coorte para avaliar o efeito cumulativo da NIA III, se mostraram como fatores risco significativos ser HIV positivo com níveis de CD₄ menor que 200×10^6 células/litro, ser HIV negativo com HPV positivo para dois subgrupos de HPV, este com risco semelhante aos pacientes HIV positivos com níveis de CD₄ maior que 500×10^6 células/litro (PALEFSKY *et al*, 1998). Porém nos estudos de Ching-Hong *et al* (2005) apenas a infecção anal simples ou múltipla pelo HPV foi significativa.

Kreuklter *et al* (2005), descreveram displasia anal em 19,4% dos pacientes HIV positivos, sendo 30% de NIA III. A média de células TCD4+ nestes pacientes foi de 454,4cél/μl, com carga viral média de 5643 cópias/mL. A carga viral tem se mostrado ferramenta valiosa para a seleção de pacientes com risco elevado para o desenvolvimento da displasia anal (SOBHANI, 2004).

A imunidade sistêmica parece ser importante para a progressão da displasia. Palefsky *et al* (1997), observou que pacientes HIV positivos com baixos níveis de células TCD4+, portando infecção por mais de um tipo de HPV foram mais propensos a desenvolverem NIA III.

A progressão de NIA III para câncer, quando ocorre, parece requerer quase uma década para o seu desenvolvimento, tempo que antes do desenvolvimento do uso da terapia anti-retroviral de alta potência (*Highly Active Antiretroviral Therapy* - HAART) os pacientes

HIV positivo não dispunham, e os riscos relacionados a este desfecho não eram bem mensurados neste grupo devido à elevada mortalidade por infecções oportunistas. O aumento da displasia observada nos pacientes em uso de HAART parece ser atribuído a maior sobrevida destes pacientes e como decorrente da facilitação da progressão displasia, pela imunossupressão e ineficiente ação da HAART sobre o HPV.

Em pacientes seguidos em uso de HAART, a taxa de NIA III se modificou em 76%, havendo regressão a NIA I em 22% e a ASCUS em 2%. A progressão de NIA III a câncer neste grupo parece aumentar, porém longos seguimentos parecem necessários para sua documentação com segurança (PALEFSKY *et al*, 1998; HOLLY *et al*, 2001).

O sistema imune exerce importante controle das infecções, pacientes com deficiências neste sistema são particularmente susceptíveis, podendo desenvolver quadros infecciosos difusos e refratários, conforme observado em transplantados renais, HIV positivos e portadores de defeitos genéticos do sistema imune (DOORBAR, 2005).

No intuito de avaliar os fatores imunes associados à infecção pelo HPV têm sido estudadas as várias classes de linfócitos T responsáveis pela apresentação e reconhecimento dos antígenos virais (SOBHANI *et al*, 2004).

2.4 A imunidade e as Células Dentríticas

O sistema imune é composto por células e moléculas que desencadeiam resposta coletiva e coordenada à introdução de substâncias estranhas no organismo, sendo mediado pelos sistemas inato e adaptativo. O sistema inato tem como principais funções o

reconhecimento dos patógenos, a fagocitose, a apresentação de antígenos (Ag), a liberação de mediadores inflamatórios, e o recrutamento de células (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

As Células Apresentadoras de Antígenos (*Antigen Presenting Cells* - APC) são representadas por linfócitos B, células de Langerhan's, macrófagos e linfócitos epiteliais disponibilizados nas camadas do epitélio, sendo seu papel parte fundamental da resposta imune, pois após capturarem os antígenos, os processam e expressam em sua superfície, através do Complexo Principal de Histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex* - MHC) de classe II, apresentando-os aos linfócitos auxiliares TCD4+, desencadeando a resposta do hospedeiro ao invasor. (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

Uma das principais APC são as células dendríticas (CD) que residem em sítios de interação entre o indivíduo e o meio, como a pele a superfície mucosa e o sangue periférico e juntamente com outros linfócitos iniciam a resposta imune contra Ag inalados, ingeridos ou inoculados. As APC são disponibilizadas nas camadas do epitélio, concentrando-se na lâmina própria.

As formas imaturas das CD são levadas pela corrente sangüínea aos órgãos periféricos como a pele e mucosas, onde se instalam formando uma verdadeira rede de defesa. As CD da pele são denominadas células de Langerhans, possuem grande poder migratório através dos plexos subepidérmico onde formam uma rede extensa unidirecional e ascendente até os órgãos linfóides secundários (RANDOLPH *et al*, 2005).

Regularmente as CD circulam dos tecidos até os órgãos linfóides secundários, permitindo o encontro com patógenos na fase inicial de infecção (PACHIADAKIS *et al*, 2005; ABBAS & LICHTMAN, 2005; JAMESON *et al*, 2005). Na periferia as CD residentes capturam o antígeno, o fagocitam por macropinocitose ou endocitose. Antes de capturarem os Ag as CD residentes são consideradas imaturas por expressarem pouco MHC e moléculas co-

estimuladoras. Após o contato com o antígeno e durante o processo migratório a expressão tanto de MHC I e quanto de MHC II, moléculas co-estimuladoras, CD80, moléculas de adesão e CD86 ou B7-2, aumentam, sendo então consideradas CD maduras.

A molécula CD86 tem papel relevante no estímulo à células efectoras TCD4⁺ e TCD8⁺ (ABBAS & LICHTMAN, 2005; PACHIADAKIS *et al*, 2005).

Após capturarem o antígeno, as CD migram em direção à zona T dos órgãos linfáticos periféricos onde apresentam os antígenos capturados às CD interdigitantes, na zona T, que em resposta à citocinas e moléculas co-estimuladoras expressas por estas APC ativam macrófagos, fundamentais à resposta aguda infecciosa (ABBAS & LICHTMAN, 2005). As APC são consideradas imunoestimuladoras, pois estimulam linfócitos T virgens (LORÉ *et al*, 2005).

Dois tipos de CD têm sido caracterizados no sangue periférico, as mielóides e as plamocitóides, classificadas de acordo com seu fenótipo e morfologia. As CD mielóides são APC clássicas, pois apresentam os produtos antigênicos degradados as células TCD4⁺ e TCD8⁺, que secretam citocinas pró-inflamatórias como a IL-12 essenciais ao desenvolvimento da resposta imune efetiva. As CDS mielóides também produzem interferon I quando infectadas por vírus, em menos quantidade do que as CD plamocitóides consideradas produtoras naturais de interferon (PACHIADAKIS *et al*, 2005).

As CD plasmocitóides podem apresentar antígenos, mas sua eficiência parece ser inferior a CD mielóides. Pachiadakis *et al* (2005) em seu artigo de revisão descrevem que uma capacidade 10 a 50 vezes menor, destas células em expandir células TCD4⁺ e TCD8⁺. Ambas CD secretam IL-10 e IL-12, e a relação entre estas pode definir a resposta imune como predominantemente TH1 ou TH2. A definição desta resposta parece estar também relacionada

à quantidade de antígenos e dos ligantes dos receptores *TOLL-like* nos patógenos (PACHIADAKIS *et al*, 2005; ABBAS & LICHTMAN, 2005).

No Brasil, ainda nenhum trabalho foi disponibilizado sobre a frequência das CD nas camadas do epitélio do canal anal. Sobhani *et al* (2004), encontraram em Paris, França uma média de 15 a 19cél/mm² na camada basal da população geral, de 24 a 27,4cél/mm² em pacientes com condiloma anal e de 13 a 16cél/mm² nos pacientes com NIA III ou câncer anal, podendo chegar a zero. O acompanhamento dos pacientes mostrou uma tendência à diminuição das CD após a excisão de condilomas anais, passando a média das CD de 9 a 19cél/mm² no grupo sem displasia e de 6 a 7cél/mm² nos pacientes com displasia severa ou câncer (SOBHANI *et al*, 2004).

A diminuição das CD tem sido relacionada a eventos como o agravamento da displasia, neoplasias escamosas, terapia imunossupressora e de outros tumores; onde o epitélio glandular metaplásico parece inibir a migração das CD, tornando a área desprotegida (UCHIMURA *et al*, 2004).

Tay *et al*, 1987 avaliando subpopulações de CD em pacientes com Neoplasia Intra-epitelial Anal (NIA) constatou a diminuição de seus níveis, principalmente das S 100, causando um enfraquecimento da resposta imune celular contra o HPV e a NIC, facilitando o desenvolvimento do câncer.

Na vigência de invasão mucosa pelo HPV, às CD aumentam sua frequência podendo ser visualizadas em grande número nas camadas basais do epitélio escamoso invadido, não havendo relação com sexo, idade, presença de infecção anal múltipla ou comportamento sexual; estando provavelmente relacionada à presença do vírus (SOBHANI *et al*, 2002).

2.5 As Células Dendríticas e a infecção pelo HIV

Embora as CD sejam permissivas a infecção por uma variedade filogenética de vírus, sua capacidade de suportar a replicação viral é relativamente pequena, contribuindo pouco para a produção de novos *vírions* (PACHIADAKIS *et al*, 2005).

A ligação do HIV na mucosa anal às APC ocorre através dos receptores CD₄ e do receptor de quimiocina. A proteína gp120 do envelope viral liga-se inicialmente ao CD₄ e secundariamente a quimiocina, CCR5 e CXCR4, causando uma alteração na conformação do gp41 expondo a região do peptídeo de fusão que se ligará a membrana celular do hospedeiro. Após as etapas intranucleares de transcrição do RNA viral e a formação da estrutura básica do HIV, a gp120 e 41 são expressas na membrana celular do hospedeiro, levando a brotação do *vírião* maduro e a sua liberação para infectar outra célula. A infecção de uma nova célula pode ocorrer também pela forma direta quando o broto do *vírião* ainda não se formou, onde uma célula que expresse receptor CD4 e co-receptor de quimiocina pode ligar-se a célula do hospedeiro infectada permitindo a transferência do genoma do HIV (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

Vários receptores diferentes de quimiocina servem como co-receptores para a penetração do HIV nas células, e diversas proteínas, como o receptor de leucotrieno B₄, podem mediar a infecção do HIV nas células. A especificidade do vírus para diferentes co-receptores estão baseadas no gp120, onde mutações nesta área podem alterar o tropismo celular. O CCR5 que é usado pelo vírus na fase inicial da infecção, sendo substituído pelo CXCR4 nos estágios mais tardios. (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

As ICAM -3, que são moléculas de adesão que aderem a não-integrinas, sendo nas CD denominadas DC-SIGN, ligam-se com alta afinidade a proteína do envelope do HIV-1 e HIV-

2. Uma vez ligado a DC-SIGN o vírus pode ser transmitido às células alvo que expressam CD4 e co-receptores virais, quimiocinas. Na mucosa vaginal as DC-SIGN⁺ não são detectadas dentro do epitélio escamoso, exceto em raros CD sub-epiteliais, já no reto, as DC-SIGN⁺ que co-expressam o HIV-1, co-receptor CD4 CCR5 formam uma banda estreita abaixo do lúmen epitelial (JAMESON *et al*, 2005).

A eficiência da transmissão do HIV-1 parece estar associada aos níveis de DC-SIGN expressos na mucosa. Na exposição vaginal, os vírus devem de alguma forma atravessar a camada epitelial para acessar as CD DC-SIGN⁺ no sub-epitélio da lâmina própria, o que pode ser facilitado por tratamentos com progesterona que atenuam estas camadas do epitélio. No reto as DC CD4 CCR5⁺ DC-SIGN⁺ são separadas do lúmen apenas pelo epitélio colunar simples, sendo, portanto, facilitado o acesso do vírus a estas células. Os artigos são uníssonos em afirmarem que o risco de transmissão do HIV-1 é maior no intercuro retal (JAMESON *et al*, 2005; VOELER, 1991).

As CD são infrequentemente infectadas pelo HIV-1, mas os vírus se ligam a elas eficientemente podendo reter um estado infeccioso prolongado. A habilidade da CD em ligar-se ao HIV-1 e de transmiti-lo aos receptores celulares positivos, parece também estar relacionada as DC-SIGN (JAMESON *et al*, 2005). Como as CD são uma das primeiras células a encontrarem o vírus na superfície mucosa, levantou-se a possibilidade desta molécula de adesão ter impacto na transmissão sexual do HIV.

DC-SIGN⁺ tem sido demonstrada interagindo com ICAM-3, expressa em células T não ativas mediando a ligação da CD com a célula T, sendo possível também que a DC-SIGN⁺ atue como porteiro, sendo capaz de capturar, processar e apresentar antígenos peptídicos ou o vírus intacto às células TCD4⁺ desta região (JAMESON *et al*, 2005).

A infecção das CD pelo HIV prejudica sua capacidade de estimular células T devido à inibição da secreção de citocinas, principalmente a IL-12 e pela perda da capacidade de maturação por deficiência de expressão de moléculas co-estimuladoras e do MHC, retardando a resposta imune (PACHIADAKIS *et al*, 2005, LORÉ *et al*, 2002; SOBHANI *et al*, 2004). A IL-10 foi encontrada aumentada na mucosa de pacientes HIV positivos com infecção pelo HPV e a regressão da infecção nestes pacientes parece ser relacionada ao aumento de citocinas configurando uma resposta predominantemente TH1 (PALEFSKY & HOLLY, 2003).

A imunossupressão aumenta o risco de desenvolvimento de NIA III, mas uma vez estabelecida a displasia, fatores genéticos como os induzidos pelas proteínas E6 e E7 do HPV, parecem desempenhar um papel mais direto na progressão da displasia ao câncer (DOORBAR *et al*, 2005), e uma vez instaladas estas mutações, a reconstrução do sistema imune não proporcionaria a regressão do quadro. As células displásicas apresentam também uma desregulação das vias necessárias à apresentação do antígeno, como a TAP 1 (PALEFSKY & HOLLY, 2003; 2005).

O aumento dos níveis de TCD4+ em pacientes utilizando a HAART não parece se acompanhar da reconstrução da resposta imune específica ao HPV, como ocorre com outros patógenos (PALEFSKY & HOLLY, 2003).

O risco aumentado da neoplasia associada ao HPV é conhecido em pacientes imunossuprimidos, porém os mecanismos de interação HPV-HIV necessitam ser melhor compreendidos devido ao grande número de pacientes duplamente infectados (PALEFSKY, HOLLY, 2003; 2005).

As células TCD4+ refletem o efeito sistêmico do HIV no sistema imune, mas a relação entre imunossupressão e aumento do risco de detecção do HPV parece complexa, já que a

importância desta na persistência da infecção pelo HPV, CIN e NIA parece variar de acordo com a etiologia da imunossupressão, idade, grupos de risco e acurácia dos testes e marcadores utilizados na identificação dos tipos de HPV (PALEFSKY & HOLLY, 2005).

Nos pacientes HIV positivos existe correlação entre a quantidade de HPV e os níveis de TCD4+, com aumento do risco da infecção quando os níveis de TCD4+ estão inferiores a 200 células/mm³, indicando que o sistema imune exerce um papel importante no controle da replicação do HPV.

A imunossupressão entre adultos HIV positivos, exceto em mulheres jovens, é mensurada pelos níveis de células TCD4+ e esta associada à alta prevalência de NIC e NIA e rápida progressão para NIA III. A força desta relação parece mais relacionada aos níveis de células TCD4+ do que com a carga viral do HIV, refletindo uma maior importância da imunodisfunção para este desfecho (PALLEFSKY & HOLLY, 2003).

Pallefsky e Holly, (2003), em sua revisão concluem que a manutenção dos estudos em pacientes em uso de HAART deve permanecer por permitirem melhor análise da progressão da displasia em longo prazo, dos efeitos de seu uso cumulativo, e da comparação do estudo entre jovens e adultos.

Há pouco mais de uma década o câncer anal tem sido pesquisado com ênfase, impulsionado pelo assustador aumento de sua prevalência nos pacientes imunossuprimidos e pelos novos conhecimentos advindos sobre a imunidade relacionada aos vírus e aos tumores, trazendo novamente a esperança de cura pela modulação da imunidade, através do controle da migração das CD e o desenvolvimento de vacinas terapêuticas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Analisar a variação da densidade das células dendríticas (DC CD1a+ e DC DC-SIGN+) da mucosa anal de pacientes portadores de condiloma acuminado anal e/ou perianal ou com diagnóstico histológico de infecção pelo papiloma vírus humano (HPV) infectados pelo HIV, em pacientes virgens de tratamento e nos em uso da terapia antiretroviral de alta potencia (HAART), atendidos no Ambulatório de Coloproctologia da Fundação de Medicina Tropical do estado do Amazonas (FMTAM).

3.2. Objetivos Específicos

- Relacionar a variação da densidade das células dendríticas da mucosa anal e região perianal com a ocorrência de neoplasia intra-epitelial anal (NIA).
- Analisar os níveis periféricos dos linfócitos TCD4+e T CD8+ nos pacientes com condiloma infectados pelo HIV.

4. METODOLOGIA

4.1. Modelo de Estudo

Buscando estimar a relação entre o condiloma acuminado anal e/ou perianal ou com diagnóstico histológico de infecção pelo papiloma vírus humano (HPV), em pacientes infectados pelo vírus HIV com a variação da densidade de células dendríticas na mucosa anal, optou-se por um estudo do tipo observacional transversal de detecção de casos, com componente analítico.

4.2. Universo de estudo

4.2.1. População de Referência

O estudo tem como alvo a população de pacientes atendidos no ambulatório de coloproctologia da Fundação de Medicina Tropical FMTAM, no período compreendido entre 01 de julho de 2008 a 30 de junho de 2009.

4.2.2. População de Estudo

Foram estudados todos os pacientes HIV positivos portadores de condiloma acuminado anal e/ou perianal ou com diagnóstico histológico de infecção pelo papiloma vírus humano (HPV), encaminhados ao ambulatório de coloproctologia da FMTAM, pelos serviços de emergência, infectologia e dermatologia. Para participarem do estudo, os pacientes receberam informações sobre os objetivos do projeto, benefícios e riscos da pesquisa e

assinaram, voluntariamente após ter esclarecido suas dúvidas, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo C).

4.3. Composição da amostra

Para estimar a relação entre o condiloma acuminado anal e/ou perianal ou com diagnóstico histológico de infecção pelo papiloma vírus humano (HPV), com a variação da densidade de células dendríticas na mucosa anal de pacientes infectados pelo HIV, foram analisadas as amostras de biópsias teciduais de 65 pacientes coletadas no período de 01 de julho de 2008 a 30 de junho de 2009.

4.4. Análise dos resultados

Os resultados foram tratados estatisticamente, onde a densidade das células dendríticas, o grau de displasia anal, os níveis periféricos de CD4+ e os estágios clínicos de pacientes HIV positivos portadores de condilomas e/ou perianal ou diagnóstico histológico de infecção pelo papiloma vírus humano (HPV), foram compilados em gráficos e tabelas de frequência. Os testes estatísticos utilizados na análise dos dados categorizados foram o qui-quadrado de *Pearson*. Utilizou-se também o risco relativo (RR) para medir a relação fator de risco-doença. O nível de significância utilizado nos testes estatísticos foi de 5%.

4.5. Critérios de elegibilidade

4.5.1. Critérios de Inclusão

- a) pacientes previamente diagnosticados com HIV, de ambos os sexos, que apresentem condiloma anal e/ou perianal ou diagnóstico histológico de infecção pelo papiloma vírus humano (HPV), adeptos ou não do sexo anal receptivo atendidos no ambulatório de coloproctologia da FMTAM;
- b) pacientes de ambos os sexos, que apresentem condiloma anal ou perianal e/ou perianal ou diagnóstico histológico de infecção pelo papiloma vírus humano (HPV), adeptos ou não do sexo anal receptivo, que aceitem se submeter ao teste para HIV, cujo resultado seja positivo;
- c) maiores de 18 anos inclusive.

4.5.2. Critérios de Exclusão

- a) pacientes adeptos do sexo anal receptivo HIV negativos;
- b) menores de 18 anos, exclusive;
- c) neutropênicos ($< 100\text{cél/s} \times 10^6$);
- d) uso de ácido acetil salicílico regularmente nos últimos dez dias;
- e) plaquetas ($< 65000\text{cél/s} \times 10^6$).
- f) incapazes mentalmente;
- g) indígenas;
- h) grávidas;
- i) idosos;

- j) pacientes que preencherem os critérios de inclusão, mas que por quaisquer motivos não cumpriram todas as etapas do estudo, ou não quiseram participar do projeto, ou discordaram em assinar o TCLE (Anexo C).

4.6. Procedimentos

4.6.1. Fluxograma de execução

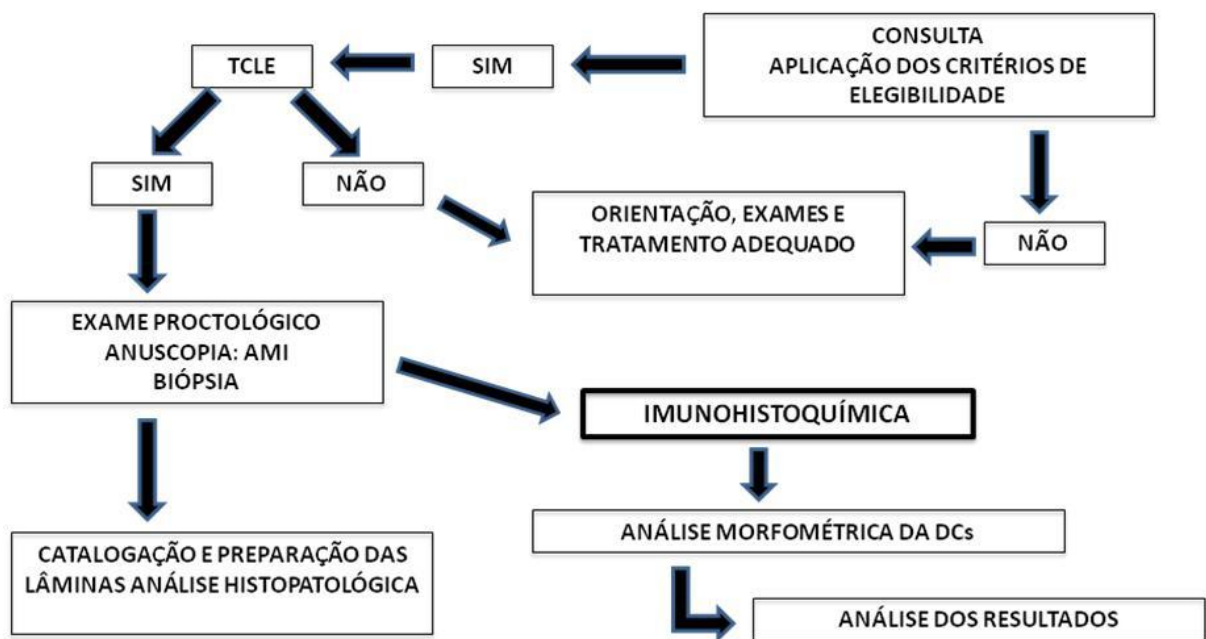


Figura 3 - Fluxograma de execução de tarefas.

4.6.2. Coleta

A coleta do material histológico anal foi realizada por médico especialista da equipe científica em todos os pacientes que preencherem os critérios definidos neste estudo encaminhados ao ambulatório de coloproctologia da FMTAM.

4.6.3. Protocolos de estudo

Os dados de identificação social e demográfica de todos os pacientes bem como os relativos aos resultados lançados nos prontuários dos pacientes e nos Protocolos foram compilados no Protocolo de Estudo (Anexo B) que alimentam o programa de dados eletrônicos da Plataforma Epi Info® (CDC, 2005).

O protocolo do paciente foi identificado por um número aleatório seqüencial obtido de tabela construída em planilha eletrônica (Excel®).

4.6.4. Exame Proctológico

O paciente foi examinado na posição de *Sims* modificada ou genupeitoral e submetido à inspeção desarmada e a palpação da região anal, perianal e inguinal.

4.6.4.1. Anuscopia com Magnificação de Imagem (AMI)

Todos os pacientes foram submetidos à AMI. O procedimento foi iniciado com um toque retal com dedo enluvado com uma pequena quantidade de geléia de lidocaína a 2% para lubrificação do canal anal, para procura de massas, fixações ou sangramentos, seguida da introdução do anoscópio descartável transparente.

Seguiu-se a inspeção da mucosa utilizando-se um colposcópio de aumento de 16 a 40 vezes, seguido da introdução de gaze embebida em ácido acético a 3% através do anoscópio que em seguida foi retirado. A gaze ficou em contato com as paredes do canal anal e pele da região perianal por 2 minutos, sendo então retirada sob a manobra de Valsalva.

O anoscópio foi reintroduzido para a realização do exame do canal anal sob magnificação de imagem. Os achados da AMI foram classificados em positivos ou negativos para lesões acetobranças, plano, elevado ou planoelevado e anatomicamente classificados quanto a sua altura a partir do orifício anal em orificial, anoderma, pectíneo e suprapectíneo e identificados quanto ao posicionamento horário circunferencial (1-12h), sendo considerada a comissura anal anterior como marcador da posição 12h (Figura 4).

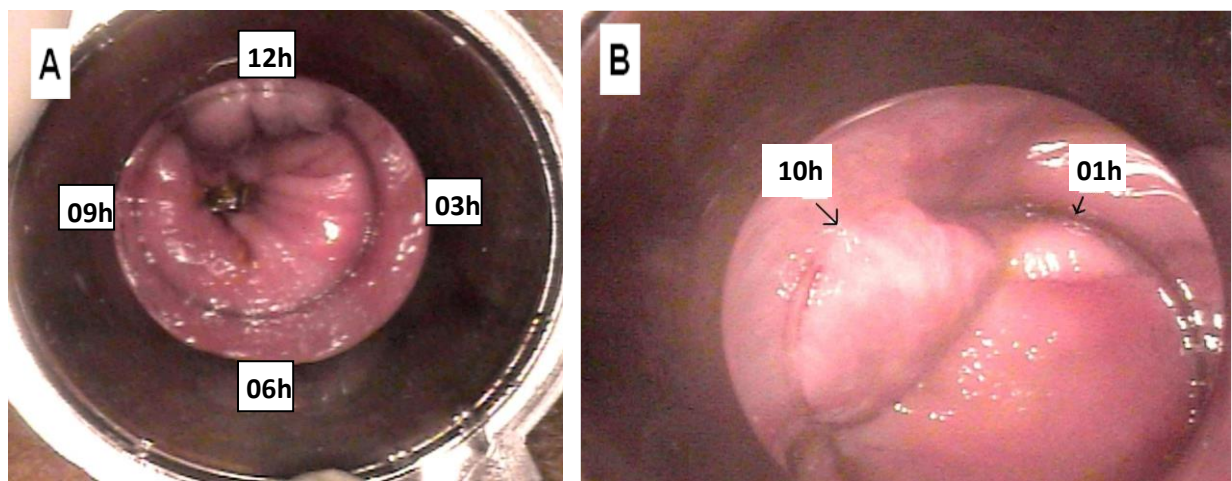


Figura 4 - Mucosa anal normal com classificação horária (foto A) e lesão acetobranca as 10 e 01h (foto B).

A área acetobranca predominante foi biopsiada sob infiltração de lidocaína a 2% com vasoconstrictor se abaixo da linha pectínea. O material foi acondicionado em frasco com solução fixadora de formalina tamponada a 10% de forma a imergir completamente a amostra, hermeticamente fechado, identificado com o número aleatório e encaminhado para estudo histopatológico e imunohistoquímico no Laboratório de Anatomia Patológica da FMT-AM.

Nos pacientes em que não se produziram colorações acetobranças pela aplicação do ácido acético, foi realizado biópsia na linha pectínea às 7h.

Os achados da AMI foram anotados na requisição de exame histopatológico (Anexo D), sendo o laudo descritivo apontados no verso deste formulário.

4.6.5. Diagnóstico histológico

No laboratório de anatomia patológica da FMTAM, as amostras foram conservadas em formol tamponado a 10%, por no máximo 24 horas e preparadas para a análise histológica e imunohistoquímica, sendo submetidas a processos de desidratação, fixação com zinco (*IHC Zinc fixative*, ref 550523, BD Pharmingen®) por 24 h às 48 horas, visando a melhora da recuperação antigênica (*BD Pharmigen*), inclusão em parafina, confecção dos blocos e secção do tecido em fatias com espessura de 4µ. A seção histológica foi montada em lâmina silanizada com extremidade fosca e corada pela técnica da hematoxilina-eosina (BEHMER, 1976).

Após cobertura com lamínula, as lâminas foram observadas à microscopia óptica à procura de alterações teciduais inflamatórias, citopáticas, como as produzidas pelo HPV, neoplasia intra-epiteliais anais (NIA) e neoplásicas, conforme discriminado (Tabela 8).

CLASSIFICAÇÃO DOS ACHADOS HISTOLÓGICOS	
NEG	Negativo para lesão intra-epitelial escamosa anal. Inclui alterações benignas inflamatórias, reacionais e metaplásicas
NIA I/II	Neoplasia intra-epitelial de baixo ou moderado grau
NIA III	Neoplasia intra-epitelial de alto grau ou severa
CEPisp	Carcinoma epidermóide <i>in situ</i>
CEPinp	Carcinoma epidermóide invasivo
ADCisp	Adenocarcinoma <i>in situ</i>
ADCinp	Adenocarcinoma invasivo

Tabela 8 - Classificação histopatológica das amostras anorretais

Fonte: Aggar; Zoschnick (2003); Sobhany et al. (2004); Abramovwitz et al. (2007).

O laudo exame histopatológico baseou-se na presença de hiperpapilomatose associada à hiperacantose e à presença de coilócitos. NIA I/II foi identificada pelo espessamento leve restrito ao terço inferior (NIA I) ou a metade do epitélio (NIA II), com perda da arquitetura, sem figuras de mitoses atípicas. NIA III na qual havia extensa destruição da arquitetura de todo epitélio, presença de atipias citoplasmáticas, nucleares e figuras de mitose, e por fim podendo evoluir para o carcinoma *in situ* e o invasivo escamoso as amostras que apresentam infiltração da lâmina própria por aglomerados de células tumorais (ABRAMOWIT *et al*, 2007; APGAR; ZOSCHNICK, 2003; BANDEIRA *et al*, 2001).

Quando foi necessária a realização de mais de uma biópsia em tecido brancacento num mesmo paciente, o exame que apresenta o maior grau de lesão tecidual é o selecionado para análise.

4.6.6. Análise imunohistoquímica

A coloração imunohistoquímica para a detecção das DC foi realizada em secções histológicas retiradas dos espécimes de biópsias anorretais não-brancacentas e brancacentas à AMI.

Após desparafinização com xilol e hidratação, conforme preconizado por Behmer *et al*. (1976), as lâminas foram dispostas num recipiente porta-lâminas de vidro temperado e submetidas à recuperação antigênica: imersão das lâminas em solução de citrato (água destilada 1000 ml, ácido cítrico 0,230g, pH 6.0) e colocação em banho-maria em água comum em microondas por 07 minutos em potência média. O processo foi pausado por 1,5 minutos e o recipiente completado com citrato para evitar o ressecamento das lâminas, que a seguir foram recolocadas por mais 07 minutos no microondas. Após o resfriamento natural o citrato foi desprezado e as lâminas imersas em PBS (10mM de fosfato de sódio a 0,9% e pH de 7,5), 02 banhos de 5 min cada. Bloqueio da peroxidase endógena: as lâminas foram submersas em

banho de 5 min em 100 ml de metanol com 1,72 ml de água oxigenada, seguido de 02 banhos de PBS de 5 minutos cada. Desprezou-se o PBS e dispôs-se as lâminas em solução com 5g de leite bovino desnatado diluído em 100 ml de PBS por 5 minutos, seguido por mais 1 banho com água destilada e 3 banhos de PBS de 05 minutos cada. Aplicação do anticorpo (Ac) primário: Colocou-se o Ac primário anti-CD1a (IgG1, κ , MTB1, ref. 235-L-CE, Novocastra®) que coraram as células dendríticas imaturas da epiderme e algumas subepiteliais, e o anti DC-SIGN (CD-209, rato IgG_{2b}, κ , ref. 551249, BD Pharmingen®) que coraram as DC imaturas subepiteliais que expressam DC-SIGN. Aplicou-se os referidos Ac sobre lâminas distintas de um mesmo paciente, diluídos em PBS na proporção de 1:30 e 1:50 respectivamente, diluição esta já validada através de testes realizados com controles positivos em pele saudável. Os Ac foram deixados em contato com o tecido da amostra, por toda a noite, em câmara-úmida à 4°C. No dia seguinte a reação foi retomada e as lâminas lavadas em PBS, 03 banhos de 5 minutos cada. Em seguida foram incubadas as lâminas com o AC secundário biotinilado pronto para o uso (Novocastra®, ref. 103) e (biotinilado de cabra anti-rato, Ig policlonal, ref. 550337, BD Pharmingen®) 1:150 por 60 minutos, seguida da aplicação de streptavidina (Novocastra®, ref 104) por 30 min. Lavou-se as lâminas 3 vezes em solução de PBS, por 05 minutos cada. Revelação e Montagem: as lâminas foram incubadas em diaminobenzidina (DAB) a 60 mg % à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, por 5 a 10 minutos ou até que se desenvolvesse um precipitado castanho-dourado tênue. As lâminas foram imersas em água destilada corrente, e realizou-se a contra-coloração com hematoxilina de *Harris*, por 1 minuto seguido de novo banho em água destilada. As lâminas, em seguida foram desidratadas em banhos rápidos progressivos de etanol a 50%, 70% e 80%, secadas naturalmente e montadas com bálsamo do Canadá® sob lamínulas.

Em cada reação foram utilizadas como controle negativo, lâminas do próprio paciente,

utilizando-se solução PBS em substituição ao anticorpo primário, e como controle positivo, um fragmento de pele humana que foi submetido ao mesmo processo das amostras dos pacientes.

4.6.7. Determinação da densidade de volume (V_v) das células dendríticas

No presente estudo, a densidade de volume (volume relativo) das células dendríticas encontradas na região epitelial e subepitelial da biópsia anal foi determinada por meio da contagem de pontos que tocam a estrutura de interesse em relação ao espaço de referência (HOWARD; REED, 1998) (Figura 5).

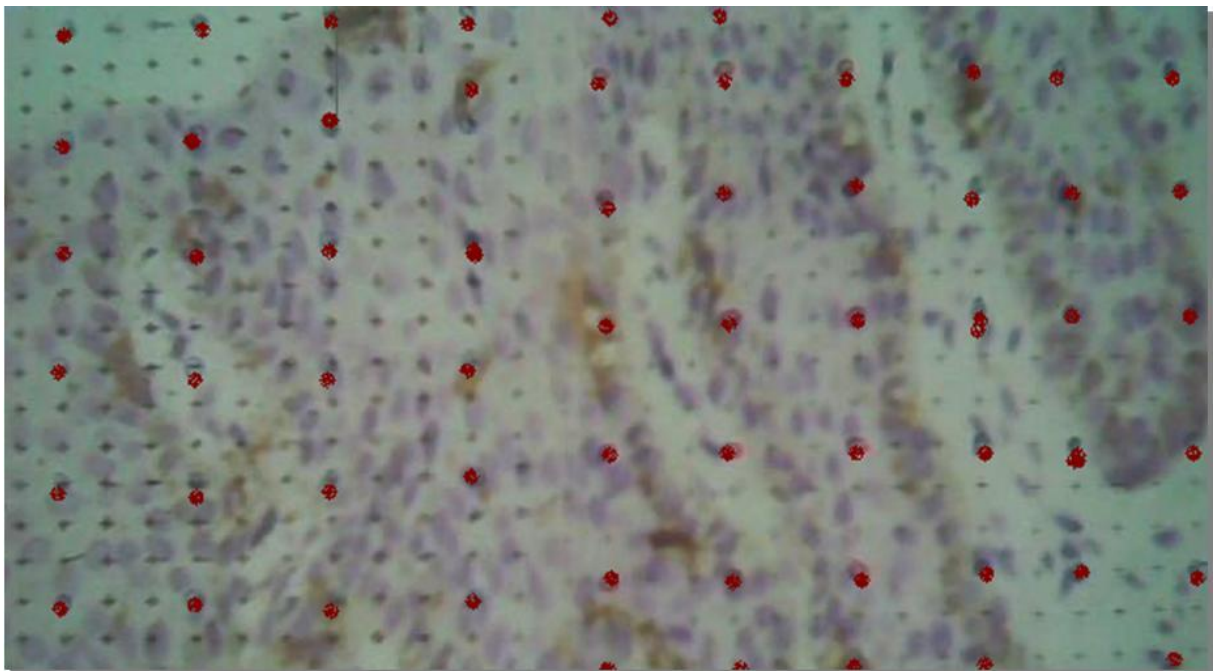


Figura 5 – Contagem de pontos de interesse
Foto cedida gentilmente pela Dra. Adriana Daumas.

As seções foram visualizadas diretamente na tela plana de um monitor de 15 polegadas e sobre a mesma foi disposto um sistema teste de pontos impresso em uma transparência. Um

microscópio ótico Axioplan HBO 50, Zeiss® foi acoplado a uma câmera digital Samsung®, SCC31 e utilizado o programa ATI multimedia center® para visualização das imagens.

O sistema teste era composto por 2080 pontos finos e 360 pontos grossos. Os pontos finos foram usados para a contagem de células DC CD1a⁺ e DC DC-SIGN⁺, enquanto que os pontos grossos foram contados sobre o espaço de referência (região epitelial e subepitelial da biópsia). O volume relativo foi encontrado a partir do cálculo disponibilizado (Figura 7).

As células por sua topografia e morfologia foram classificadas e codificadas numericamente em: células com coloração específica para CD1a dispostas no epitélio estratificado e ocasionalmente na região subepitelial (1), células do epitélio estratificado (2), células subepiteliais (3), células do epitélio simples colunar (5), estruturas glandulares (6), células com coloração específica para o DC-SIGN (7), e ainda as células com coloração acastanhadas localizadas na camada basal passíveis de serem confundidas com melanócitos (4) (Figuras 6A e 6B).

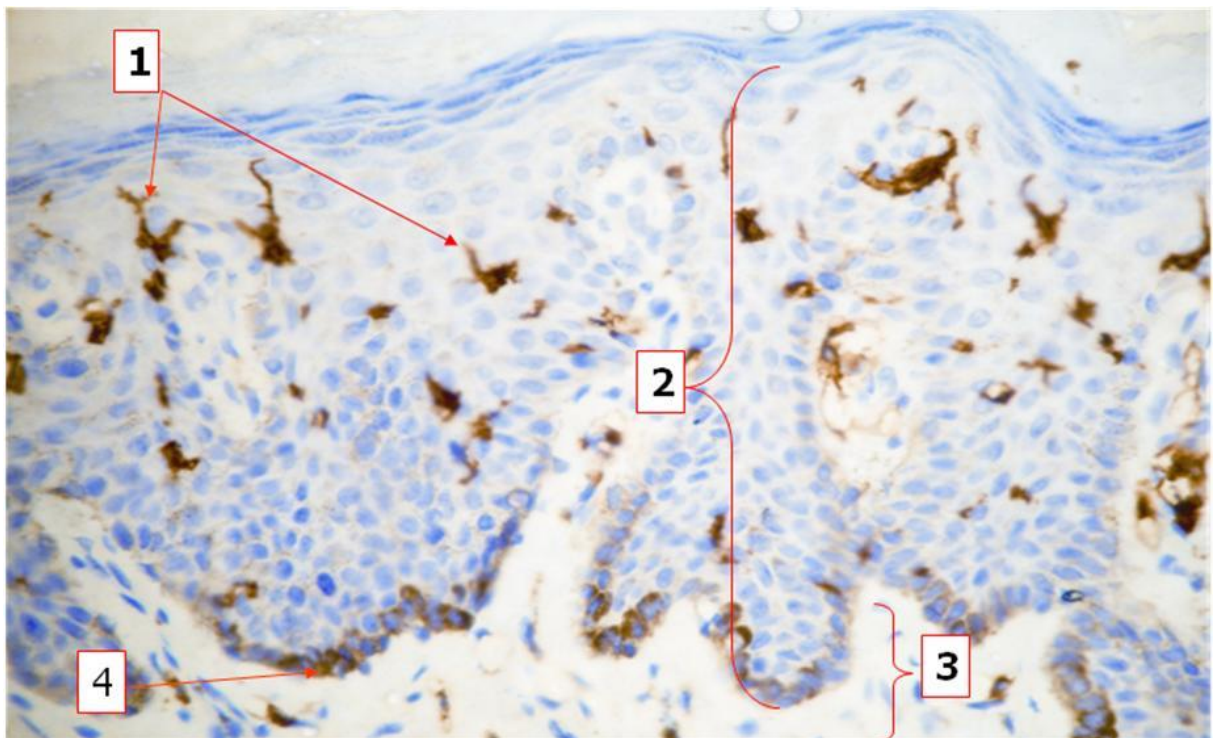


Figura 6A – Estruturas de interesse

Foto cedida gentilmente pela Dra. Adriana Daumas

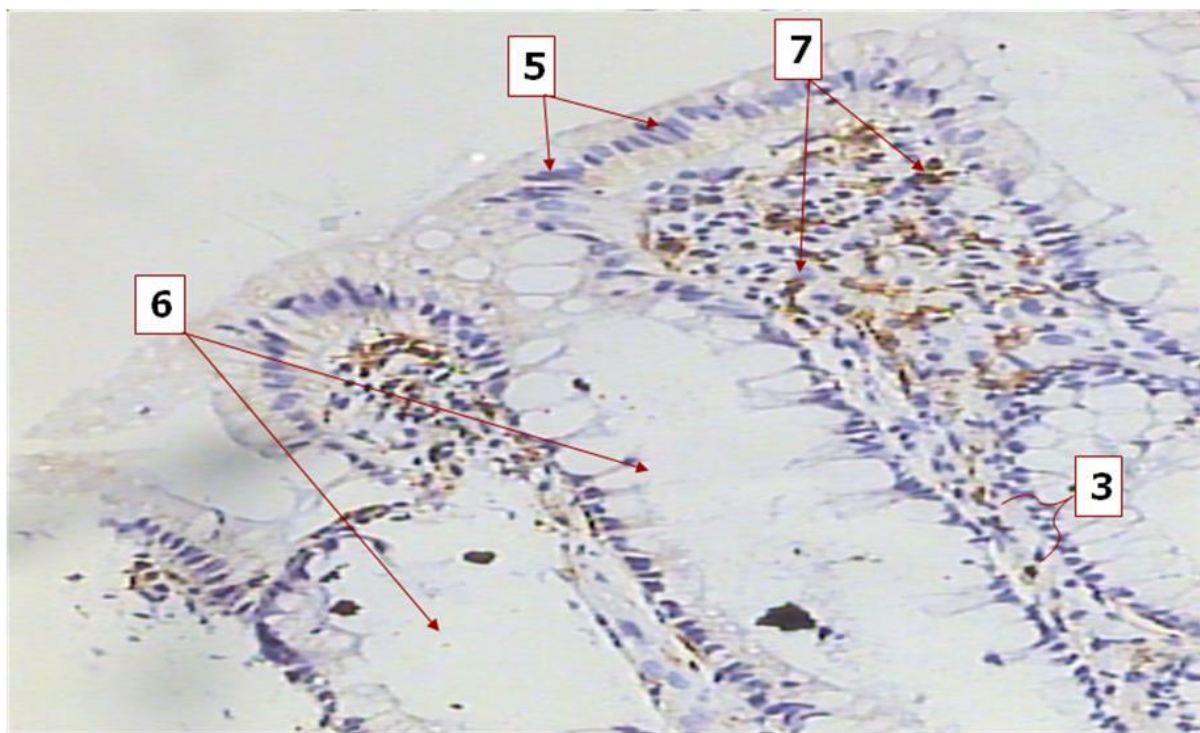


Figura 6B – Estruturas de interesse

Foto cedida gentilmente pela Dra. Adriana Daumas

Os pontos celulares, contados conforme a codificação numérica foram quantificados em no máximo de 07 campos consecutivos e no mínimo de 04 campos quando se atingir 200 células de interesse (DC CD1a+ e DC DC-SIGN+) (HOWARD; REED, 1998), sob aumento de ótico de 10 x.

A relação entre os pontos celulares mensurados foi utilizada na análise entre os grupos. As amostras dos pacientes submetidas à coloração imunohistoquímica foram classificadas como positivas para a expressão DC, quando do desenvolvimento de coloração amarronzada intensa específica, predominantemente observada no núcleo e no citoplasma.

A variação normal da frequência das DC a ser considerada neste estudo foi a calculada pela média da frequência de DC de pacientes sem infecção pelo HPV, NIA ou HIV sugerida nos laudos histológicos e na sorologia dos pacientes.

4.6.8. Diagnóstico sorológico do HIV

Realizou-se no Laboratório de Análises Clínicas da FMT-AM de acordo com a rotina estabelecida pelo mesmo, descrita a seguir:

- a) Assintomáticos para aids: realizou-se o teste de reação de ensaio imunoenzimático - ELISA;
- b) Sintomáticos para aids: realizou-se dois testes rápidos - Determine[®] e Rapid Check[®], sendo os casos discordantes confirmados pelo Unigold[®].

Nos dois casos, os resultados positivos foram confirmados pelas técnicas de imunofluorescência indireta (IFI). Para os resultados discordantes realizou-se o teste de *Western Blot*.

4.6.9. Contagem de linfócitos TCD4+ e determinação da carga viral

Coletou-se do prontuário individual dos pacientes com HIV/aids da FMTAM, os resultados mais recentes referentes à contagem dos linfócitos CD4+ realizados pela técnica da citometria de fluxo no aparelho BD FACSCalibur[®], e à determinação da carga viral do HIV-1 pelo ensaio NASBA Biomérieux[®]. As quantificações aceitas foram as coletadas no período máximo de 03 meses desde que não tenha ocorrido nenhum episódio de infecção oportunista no período, nos casos contrários, nova determinação foi realizada.

4.7. Considerações éticas

De acordo com a resolução n. 196 de 10 de outubro de 1996 e emendas, este estudo somente teve início após a aprovação do comitê de ética em pesquisa (TCLE) da FMTAM.

Os pacientes receberam os esclarecimentos quanto aos objetivos do estudo, riscos e benefícios da pesquisa. Os que concordaram, assinaram o TCLE (Anexo C), 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.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, foram analisados 65 pacientes, todos com diagnóstico positivo para o vírus HIV. Os pacientes foram encaminhados ao ambulatório de coloproctologia da Fundação de Medicina Tropical do Estado do Amazonas (FMTAM), provenientes do ambulatório de DST/aids.

Nas análises, buscou-se analisar os principais fatores comportamentais historicamente implicados na gênese do câncer anal, bem como os níveis periféricos dos linfócitos TCD4+ e a variação da densidade de células dendríticas da mucosa anal de pacientes portadores de condiloma acuminado anal e/ou perianal ou com diagnóstico histológico de infecção pelo papiloma vírus humano (HPV) em pacientes infectados pelo HIV.

Quanto ao gênero, 41/64 (64%) pacientes pertenciam ao sexo masculino e 23/64 (36%) ao sexo feminino.

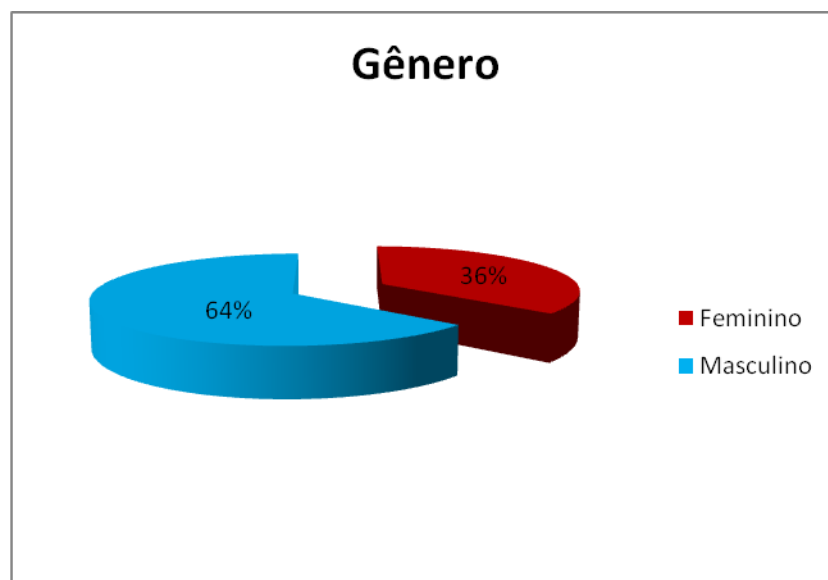


Gráfico 1 – Distribuição dos pacientes segundo sexo dos pacientes HIV positivos atendidos na FMTAM.

Na população em estudo, a média de idade do grupo com neoplasia intra-epitelial anal (NIA) foi de 35,8 anos, não possuindo diferença significativa entre os sexos (média de 35 anos para o sexo feminino e de 35,6 para o masculino). Dentro do grupo NIA I, a mediana foi de 27 anos, no grupo NIA III de 32 anos e de 36 anos para o grupo negativo para NIA, não havendo significância estatística entre os grupos ($p=0,195$).

Na análise do estado civil, 39/64 (60,9%) eram solteiros, 19/64 (29,7%) casados, 3/64 (4,7%) separados e um viúvo (1,5%). Daumas (2007) demonstrou ser a união estável um fator de proteção para a infecção pelo HIV ($OR=2,26$ e $p=0,040$ para os solteiros).

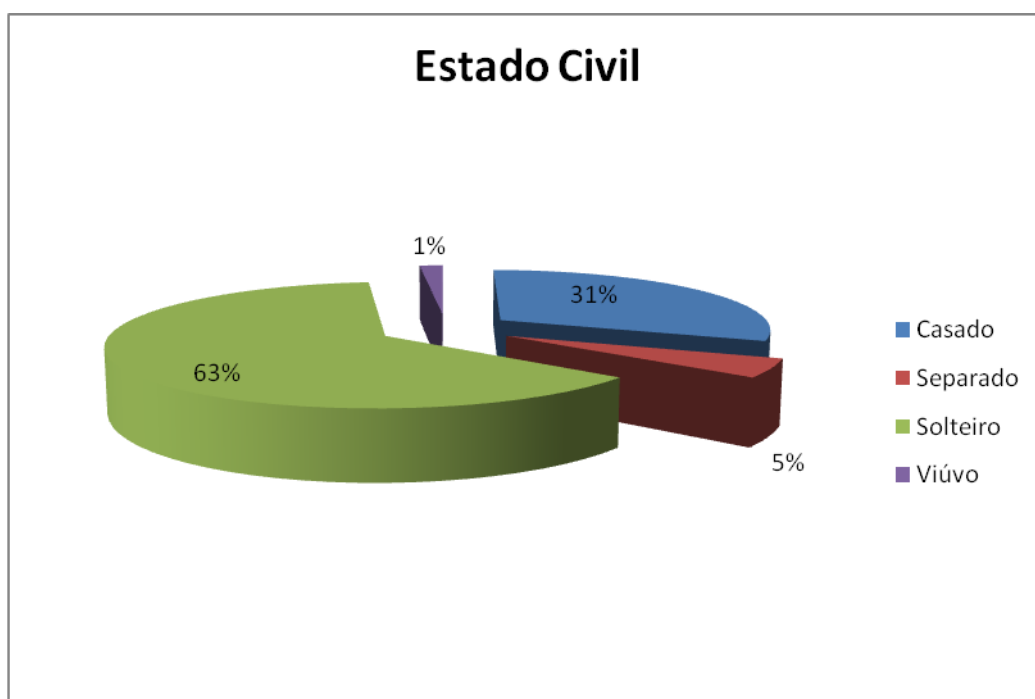


Gráfico 2 – Distribuição dos pacientes quanto ao estado civil dos pacientes HIV positivos atendidos na FMTAM.

Qualitativamente, o tabagismo foi mensurado, sendo 21/64 (32,8%) usuários da droga, porém sem risco elevado ou diferença significativa para o desenvolvimento de NIA, $RR=1$ e $p=0,66$. Daling et. al (1987) demonstrou risco para o desenvolvimento do câncer anal com RR de 7,7 em mulheres e 9,4 entre homens tabagistas, em relação ao grupo controle composto de pacientes com câncer de cólon. Essas afirmativas são compartilhadas por Kreuter et al.

(2005), mas discordantes dos estudos de Chin-Hong et al. (2005) , no qual a localização geográfica e o tabagismo não foram associados a NIA.

O uso de drogas ilícitas foi abordado, sendo a maconha a droga mais citada pelos usuários, seguida da cocaína e do crack. Dos 64 pacientes analisados, 55 (86%) negaram fazer uso de qualquer tipo de droga ilícita. Na análise estatística do fator em questão, obtivemos um $RR=1,57$, o que indica a possibilidade do uso de drogas ilícitas ser fator de risco, já que a exposição ao mesmo, aumentou o risco de surgimento de NIA, apesar do p valor não ter se mostrado significativo ao nível de 5%.

Quanto ao início da atividade sexual, 36% da população em análise referiu início da vida sexual antes dos 14 anos de idade, 51% entre 15 e 18 anos e 13% após os 18 anos. Não houve diferença significativa entre os grupos quando comparamos início da atividade sexual com NIA ($p=0,2814$).

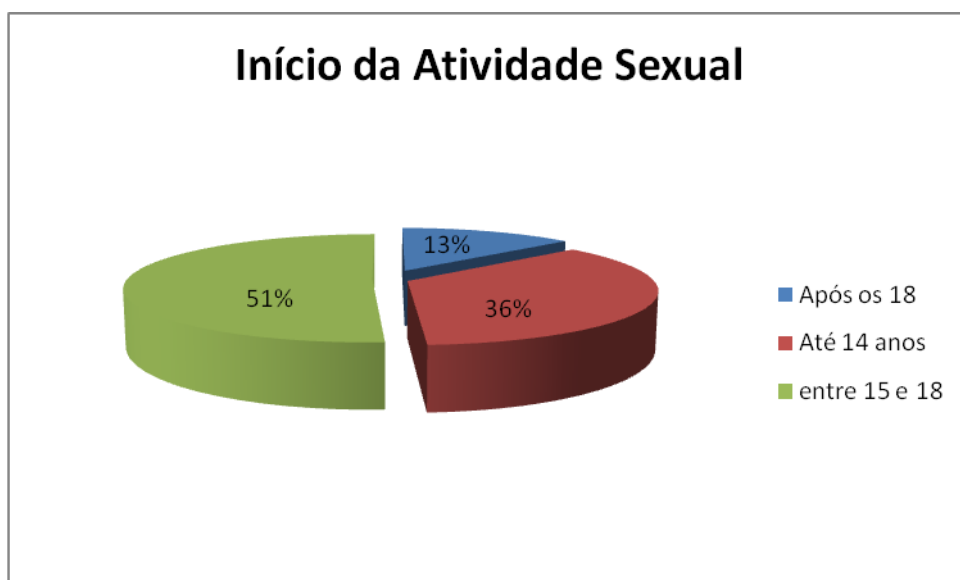


Gráfico 3 – Idade de início da atividade sexual nos pacientes HIV positivos atendidos na FMTAM

Na análise quanto à orientação sexual, 34/64 (53,1%) pacientes se declararam heterossexuais, 12/64 (18,7%) homossexuais e 18/64 (28,1%) bissexuais. Para a análise do

risco relacionado à prevalência de NIA, agrupou-se os pacientes em dois grupos: heterossexuais e homossexuais/bissexuais.

Na análise entre os grupos, 6/64 (9,37%) dos heterossexuais possuíam diagnóstico de NIA, sendo três portadores de NIA I e três portadores de NIA III. No grupo dos homossexuais/bissexuais, 18/64 (28,12%) possuíam diagnóstico de NIA, sendo 9 portadores de NIA I e 9 portadores de NIA III. Na análise estatística do fator em questão, obtivemos um $RR=3,4$ e $p=0,013$, o que indica risco elevado de NIA para o grupo bissexual ou homossexual. Daumas (2007) apontou a heterossexualidade como fator de proteção para o risco de contrair HIV ($OR=4,56$). Darling et al. (1987) encontraram entre pacientes com câncer anal escamoso, 47,1% de homossexuais masculinos, 28,6% de heterossexuais masculinos e 28,3% de mulheres heterossexuais com história de verrugas genitais. No mesmo estudo, a homossexualidade foi apontada como fator de risco para o câncer anal entre homens, com $RR=33,1$. Palefsky et al. (1997) descreveram resultados semelhantes.

Tabela 9 – Distribuição das variáveis quanto à presença de NIA

Variáveis	Lesão intra-epitelial anal						Total	p-valor*	
	NIA I		NIA III		Negativo				
	N	%	N	%	N	%			
Gênero									0,07482*
Masculino	11	26,83%	8	19,51%	22	53,66%	41		
Feminino	1	4,35%	4	17,39%	18	78,26%	23		
Idade (anos)									0,195*
Média ± DP	30,73 ± 8,79		35,67 ± 10,77		37,71 ± 11,80				
Mediana	27		32		36				
Amplitude	18 – 43		24 – 56		18 – 62				
Iniciação Sexual									0,2814*
Até 14 anos	7	33,33%	3	14,29%	11	52,38%	21		
Entre 15 e 18 anos	4	13,33%	5	16,67	21	70,00%	30		
Após 18 anos	1	12,50%	3	37,50%	4	50,00%	8		

HAART								<i>0,033*</i>
Sim	11	28,21%	5	12,82%	23	58,97%	39	
Não	1	4,00%	7	28,00%	17	68,00%	25	
Orientação Sexual								<i>0,013*</i>
Bissexual	6	33,33%	5	27,78%	7	38,89%	18	
Heterossexual	3	8,82%	3	8,82%	28	82,35%	34	
Homossexual	3	25,00%	4	33,33%	5	41,67%	12	
HPV								<i>0,5607*</i>
Positivo	11	21,57%	10	19,61%	30	58,82%	51	
Negativo	1	7,69%	2	15,38%	10	76,92%	13	
PCR HPV								<i>0,1755*</i>
Alto Risco	3	60,00%	0	0,00%	2	40,00%	5	
Baixo risco	1	9,09%	2	18,18%	8	72,73%	11	
Negativo	1	19,09%	1	19,09%	9	81,82%	11	
CD4 (x 10⁶ células/litro)								<i>0,5668*</i>
≤ 200	1	11,11%	3	33,33%	5	55,56%	9	
>200	8	17,39%	8	17,39%	30	65,22%	46	
Anorecepção								<i>0,3198*</i>
Sim	9	23,68%	8	21,05%	21	55,26%	38	
Não	3	11,54%	4	15,38	19	73,08	26	
Tabagismo								<i>0,6668*</i>
Sim	5	23,81%	3	14,29%	13	61,90%	21	
Não	7	16,67%	9	21,43%	26	61,90%	42	
Drogas								<i>0,3275*</i>
Sim	3	33,33%	2	22,22%	4	44,44%	9	
Não	9	16,67%	10	18,52%	35	64,81%	54	

p-valor em negrito itálico indica diferença estatística ao nível de 5%.

*Teste do qui-quadrado de Pearson.

Quanto a pratica do sexo anal receptivo (AR), 38/64 (59,3%) pacientes se declararam adeptos. Destes, 17 (44,7%) possuíam diagnóstico de NIA, sendo 9 portadores de NIA I e 8 portadores de NIA III, apresentando um RR=1,66, apesar do p valor ter se mostrado

insignificante ($p=0,3198$). Chin-Hong et al. descreveram elevada prevalência de NIA entre homossexuais HIV negativos AR, sendo 15% de NIA I e 5% de NIA III. Já para Sobhani et al. (2001;2004), a AR não se mostrou como fator de risco isolado para o desenvolvimento de NIA.

Quanto à ocorrência de HPV/condiloma, 51/64 (79,7%) apresentavam a patologia, e destes, 21 (41,18%) apresentavam NIA, sendo 11(21,57%) portadores de NIA I e 10(19,61%) portadores de NIA III. Na análise entre os grupos, os pacientes bissexuais foram os que apresentaram a maior prevalência de HPV/condiloma (94,44%), contra 91,67% homossexuais e 67,65% entre os heterossexuais, havendo diferença significativa entre os grupos ($p:0,038$).

Orientação sexual em relação ao diagnóstico de HPV

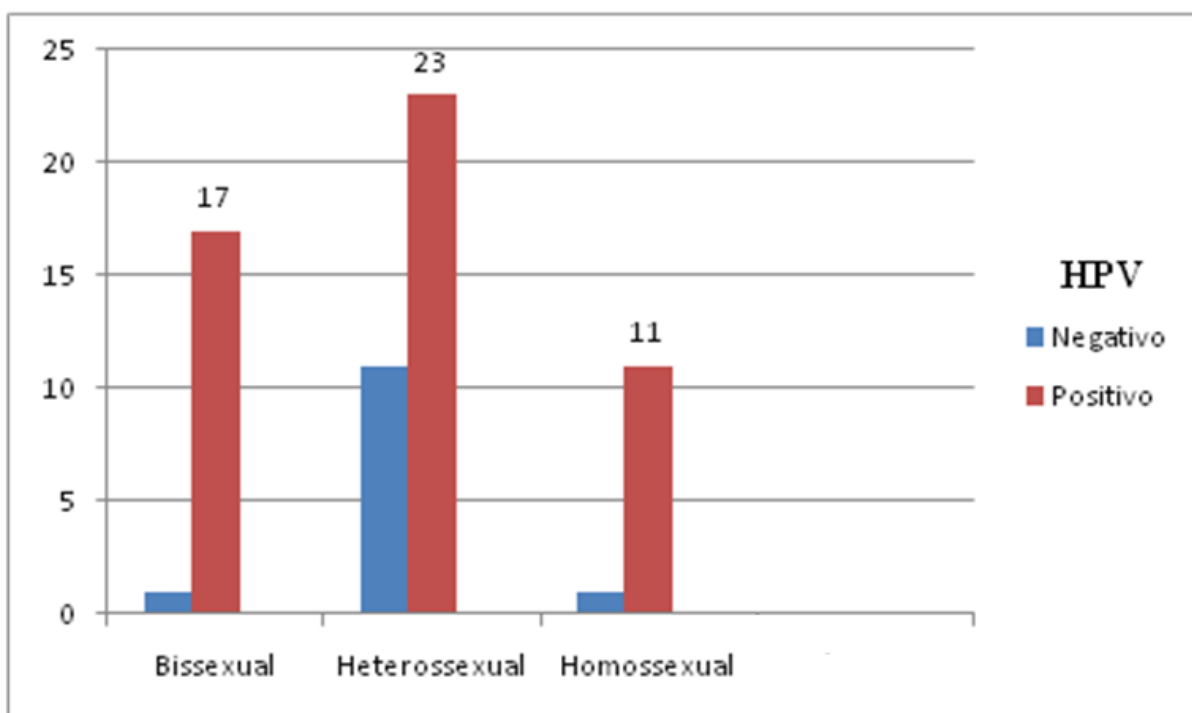


Gráfico 4 – Distribuição dos pacientes com diagnóstico de HPV em relação a orientação sexual atendidos no ambulatório de coloproctologia da FMTAM.

Palefsky et al.(1998), Sobhany et al. (2002, 2004), Abramowitz et al. (2007) afirmaram a importância da presença da infecção pelo HIV no desfecho da NIA. O efeito

deletério sobre a imunidade celular e ação sinérgica da co-infecção HIV-HPV, em que partes do HIV como a proteína *tat*, potencializaria a expressão de E6 e E7 do HPV foi apontado (VERNON et al.,1993). Neste estudo, 24/64 (37,5%) dos pacientes HIV positivos apresentavam NIA, e destes 12 (50%) eram portadores de NIA I e 12 (50%) portadores de NIA III. Dados corroborados por diversos autores, dentre eles Sobhani et al.(2004) e recentemente Daumas (2007) em estudo na mesma instituição.

Sobhani et al.(2004) apontam a co-infecção HIV-HPV com risco independente para o desenvolvimento de NIA severa e câncer anal, com OR de 3,67. Em nosso estudo, nos pacientes co-infectados pelo HPV, a prevalência de NIA foi de 41,18%, sendo 21,57% NIA I e 19,61% NIA III e RR=1,78, porém sem significância estatística ($p=0,5607$).

Quanto ao tipo do HPV no grupo estudado, utilizou-se a técnica de PCR para sua detecção de acordo com o potencial oncogênico, classificando-os em baixo risco e alto risco. Foram analisados apenas 27/64 (42,18%) dos pacientes. Destes, 11(40,74%) foram classificados em HPV de baixo risco e 5 (18,51%) em HPV de alto risco. Quando comparamos o tipo do HPV em relação à NIA, no grupo dos pacientes diagnosticados com HPV de alto risco, 3 (60%) apresentavam NIA I e nenhum apresentou NIA III. No grupo HPV de baixo risco, um paciente (9,09%) apresentou NIA I e dois (18,18%) apresentaram NIA III. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,1755$). Palefsky et al. (1998) descreveram a associação dos tipos 6 e 11 (baixo risco) com verrugas genitais; e Palefsky et al. (1991); Martins (2001) afirmaram a maior prevalência dos tipos 16 e 18 no câncer anal e NIA (NADAL et al., 2006).

Tabela 10 – Distribuição das variáveis em relação à presença de infecção pelo HPV

Variáveis	HPV/condiloma				Total	p-valor*
	Negativo		Positivo			
	N	%	N	%		
Estado Civil						0,09046*
Solteiro	5	12,82%	34	87,18%	39	
Casado	7	36,84%	12	63,16%	19	
Separado	1	33,33%	2	66,67%	3	
Viúvo	0	0,00%	1	100,00%	1	
Orientação Sexual						0,038*
Bissexual	1	5,56%	17	94,44%	18	
Heterossexual	11	32,35%	23	67,65%	34	
Homossexual	1	8,33%	11	91,67%	12	
CD4						1*
≤ 200	1	11,11%	8	88,89%	9	
>200	8	17,39%	38	82,61	46	
Nº de Parceiros no Ultimo Ano						0,1570*
≤ 2	12	25,00%	36	75,00%	48	
> 2	1	6,25%	15	93,75%	16	
Nº de Parceiros em 5 Anos						0,02531*
≤ 5	12	28,57%	30	71,43%	42	
> 5	1	4,55%	21	95,45%	22	

p-valor em negrito itálico indica diferença estatística ao nível de 5%.

*Teste do qui-quadrado de Pearson.

O uso de HAART também foi abordado em relação à NIA, 37,5% dos pacientes tiveram diagnóstico de NIA I ou NIA III. O não uso da HAART apareceu como fator de risco para o desenvolvimento de NIA (RR= 1,28) significativo (p=0,033). Palefsky e colaboradores descreveram, neste subgrupo, uma taxa de progressão à NIA III de 76% e de regressão à NIA I de apenas 22%, coincidente com o aumento da longevidade da população favorecida pela terapia antiretroviral (PALEFSKY et al., 1998; PALEFSKY et al., 2005; KLENCKE; PALEFSKY, 2003).

Os níveis sanguíneos de linfócitos TCD4+ foram determinados em 55(85,93%) dos 64 pacientes HIV positivos estudados. A média foi de $396,74 \times 10^6$ células/litro nos pacientes que faziam uso de HAART e de 400×10^6 células/litro no grupo de pacientes que não a utilizavam.

As taxas de NIA em relação aos níveis sanguíneos dos linfócitos TCD4+ foram avaliadas. Dentre os pacientes que apresentavam NIA, 24/64 (37,5%), 16/24 (66,6%) apresentavam níveis dessas células superiores a 200×10^6 células/litro. Dos pacientes que não apresentavam NIA, 40/64 (62,5%), 30/40 (75%) apresentavam níveis de linfócitos TCD4+ acima de 200×10^6 células/litro. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,5668$), semelhante ao estudo de Daumas (2007). Quando se considerou a taxa global de NIA e a ocorrência de linfócitos TCD4+ maior ou menor que 200×10^6 células/litro, o RR foi de 1,27, porém insignificante estatisticamente ($p=0,5668$). Dados estes discordantes dos estudos de Palefsky et al. (1998a) que descreveram numa coorte que níveis de linfócitos T CD4+ inferiores a 200×10^6 células/l foram significativos para o desfecho NIA III. Apesar de o estudo ter sido conduzido na era pré-HAART, seu resultados foram recentemente reafirmados (PALEFSKY; HOLLY, 2003). Abramowitz et al. (2007) encontraram níveis de linfócitos TCD4+ inferiores a 200×10^6 células/litro associados a condilomas, não a NIA, e Ching-Hong et al.(2005) também discordam da influência dessas células nas taxas de NIA.

Buscou-se também, a análise da ocorrência do HPV/condiloma nos pacientes HIV positivos, quanto aos níveis sanguíneos dos linfócitos T CD4+. Dos 64 constituintes do grupo, 51 apresentaram detecção positiva do HPV. Destes, 15,68% apresentaram níveis dessas células inferiores a 200×10^6 células/litro. Entre os indivíduos não portadores do vírus/infecção pelo HPV, 7,69% apresentaram níveis de linfócitos TCD4+ abaixo de 200×10^6 células/litro ($p=1$ e $RR=1,07$).

Para análise da imunidade celular na mucosa anorretal, quantificou-se os volumes relativos das DC CD1a+ e das DC DC-SIGN+, bem como a razão DC CD1a+/DC DC-SIGN+ e o somatório dessas DC CD1a+ + DC DC-SIGN+, buscando possíveis alterações nas relações entre estas subpopulações celulares no grupo estudado (tabela 11).

Tabela 11 – Distribuição das subpopulações de DC segundo os grupos e subgrupos de pacientes atendidos na FMTAM.

Variáveis	CD1a ⁺		DC-SIGN ⁺		CD1a ⁺ +DC-SIGN ⁺		CD1a ⁺ /DC-SIGN ⁺	
	Mediana	N	Mediana	N	Mediana	N	Mediana	N
NIA								
NIA I	0,360	7	3,000	8	3,970	7	0,440	7
NIA III	0,750	11	1,340	10	2,550	10	0,575	10
Negativo	0,875	16	2,06	17	3,24	16	0,780	16
P	0,248**		0,147**		0,272**		0,282**	
HPV								
Positivo	0,765	30	1,910	31	2,535	30	0,515	30
Negativo	1,42	4	7,38	4	4,06	3	1,300	3
P	0,504**		0,070**		0,133**		0,452**	
PCR HPV								
Alto risco	1,560	3	1,570	3	2,390	3	0,500	3
Baixo risco	0,470	8	3,10	8	3,63	8	0,385	8
Negativo	2,35	3	7,38	4	4,06	3	1,300	3
P	0,375**		0,272**		0,500**		0,710**	

p-valor em negrito itálico indica diferença estatística ao nível de 5%.

*Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Do universo amostral de 64 pacientes, por problemas técnicos, a quantificação das subpopulações das células dentríticas foi bastante reduzida. Em relação às células DC CD1a+ foram contabilizadas 34 amostras, que quando comparadas em relação à presença de NIA, a população de DC CD1a+ apresentou mediana de 0,36 no grupo NIA I e de 0,75 no grupo NIA III (p=0,248). As diferenças não foram significativas ao nível de 5%. Sobhany et al. (2002; 2004) descrevem a diminuição acentuada das DC CD1a+ nos pacientes com NIA III,

Daumas (2007) descreveu a mediana destas células no grupo controle, pacientes HIV negativos, não infectados pelo HPV e sem NIA à histopatologia anorretal, como sendo de 2,46, e de 4,84 nos pacientes HIV + co-infectados pelo HPV e de 2,39 nos pacientes infectados pelo HIV que apresentavam NIA à histopatologia.

Nadal et al.(2006) encontraram diferença significativa de DC CD1a+ (25 a 50% inferior ao grupo controle) nos pacientes HIV positivos com câncer anal sem relação com o prognóstico, já que os pacientes com pior prognóstico apresentaram 25-75% mais DC CD1a+ em relação ao grupo com melhor prognóstico, apoiando os autores que defendem déficit de ativação e não numérico nestas células, pela produção de TGF-beta-1 pelos tumores (WEBER et al., 2005).

Segundo Daumas (2007) a mediana das as DC DCSIGN+ no grupo controle foi de 6,25 e de 4,04 no grupo HIV positivo sem HAART e de 7,53 para o grupo HAART. Neste estudo a análise foi possível em 35 pacientes. O grupo apresentou mediana de 3,0 no grupo NIA I e de 1,34 no grupo NIA III ($p=0,147$), valores inferiores aos descritos por Daumas (2007) no grupo de pacientes HIV positivos com NIA (4,48).

A mediana da razão DC CD1a+/DC DC-SIGN+ foi determinada em 33 pacientes, sendo 0,44 no grupo NIA I e de 0,58 no grupo NIA III (0,282). Daumas (2007) descreveu uma mediana de 0,40 no grupo controle, 0,57 nos pacientes HIV positivos com NIA. Apesar dos dados concordantes, ambos não foram significativos, com $p=0,282$ para o grupo com NIA e $p=0,452$ para o grupo com HPV.

A mediana do somatório DC CD1a+ + DC DC-SIGN+ foi possível de ser determinada em 33 amostras anorretais. Os valores da mediana foram de 3,97 no grupo NIA I e de 2,55 no grupo NIA III com $p=0,272$. Segundo Daumas (2007) a mediana destas células no grupo controle foi de 8,64. No grupo HIV positivo com NIA foi de 8,51 e no grupo com condiloma foi de 12,05. Apesar das diferenças não serem significativas, neste mesmo estudo Daumas

encontrou significância na contagem destas células no grupo HIV negativo com condiloma, demonstrando o estímulo à estas células, causado pelo HPV, quando o sistema imune encontra-se intacto (SOBBHANY et al., 2002, 2004).

Quando comparadas em relação à infecção pelo HPV, a população de DC CD1a+ apresentou mediana de 0,77 no grupo HPV positivo e de 1,42 no grupo HPV negativo ($p=0,504$). Os resultados foram concordantes com Daumas (2007) que descreveu a elevação da mediana para 4,84 nos pacientes HIV positivos co-infectados pelo HPV.

Em relação as DC DCSIGN+, a mediana encontrada foi de 1,91 no grupo HPV positivo e de 7,38 no grupo HPV negativo ($p=0,070$). Daumas (2007) também descreveu elevação da densidade para 9,51 nos pacientes co-infectados pelo HPV.

A mediana da razão DC CD1a+/DC DC-SIGN+ foi de 0,52 no grupo HPV positivo e de 1,30 no grupo HPV negativo ($p=0,452$). A elevação em relação ao grupo sem condiloma foi discordante do descrito por Daumas (2007), que não demonstraram a elevação nos pacientes HIV positivos com condiloma.

A mediana do somatório DC CD1a+ + DC DC-SIGN+ foi de 2,54 no grupo HPV positivo e de 4,06 no grupo HPV negativo ($p=0,133$). Não houve diferença significativa entre os grupos e não houve elevação da densidade destas células em relação ao grupo sem condiloma, discordando dos estudos de Daumas (2007).

Este estudo buscou, portanto analisar a variação do volume relativo das subpopulações de DC, nos grupos, quanto à presença de infecção pelo papiloma vírus humano (HPV) e a presença de NIA. A análise revelou aumento da mediana em todas as variáveis de DC estudadas, com exceção das variáveis “DC-SIGN+” e “CD1a+ + DC-SIGN+” no grupo HPV positivo, porém não houve significância estatística entre os grupos ($p>0,05$). O fato pode ser explicado pela discreta amostra de pacientes em cada subgrupo de estudo, sendo necessários estudos maiores para melhor conclusão dos fatos aqui apontados.

A carcinogênese anal envolve fatores ambientais, virais e genéticos. Dentre os fatores envolvidos, este estudo encontrou evidências de associação entre a orientação sexual e o uso de HAART nos pacientes HIV positivos, com fator de risco para o desenvolvimento da NIA severa.

6. CONCLUSÕES

- A prevalência de neoplasia intra-epitelial anal (NIA) nos pacientes HIV positivos foi de 37,5%, sendo 50% NIA I e 50% NIA III;
- O não uso de HAART apresentou-se como fator de risco para o desenvolvimento de NIA ($RR=1,28$ e $p=0,033$), com 4% dos pacientes apresentando NIA I e 28% NIA III;
- O uso de drogas ilícitas, apesar de apresentar $RR=1,57$, não apresentou diferença significativa ao nível de 5% ($p=0,3275$);
- Pacientes homossexuais e/ou bissexuais apresentam risco elevado ($RR=3,4$ e $p=0,013$) para desenvolvimento de NIA (58,33% NIA I e 61,11% NIA III) em comparação com paciente heterossexuais (8,82% NIA I e 8,82% NIA III);
- A prevalência de NIA I e NIA III não foi significativamente superior entre os adeptos do sexo anal receptivo com taxas de 23,68% e 21,05% respectivamente ($p=0,3198$);
- Na análise da variação das subpopulações de DC em relação à NIA, não houve diferença significativa entre as variáveis estudadas: presença de NIA e condiloma nos pacientes HIV positivos;
- Houve aumento na mediana da DC CD1a+ e na razão CD1a+/DC-SIGN+ nos pacientes HIV positivos, co-infectados pelo papiloma vírus humano, apesar de não haver diferença significativa entre os grupos;
- Pacientes HIV positivos apresentam risco elevado para o desenvolvimento de neoplasia intra-epitelial anal (NIA), em seus diversos níveis de severidade.

7. REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K. & LICHTMAN, Andrew H. Imunidade Inata, capítulo 12. In: Imunologia celular e molecular. Rio de Janeiro: Elsevier, tradução da 5ª ed., 2005, p. 283-306.

ABBAS, Abul K. & LICHTMAN, Andrew H. Mecanismos efetores da imunidade mediada por células, capítulo 13. In: Imunologia celular e molecular. Rio de Janeiro: Elsevier, tradução da 5ª ed., 2005, p. 307-326.

ABRAMOWITZ, L.; BENABDERRAHMANE, D.; RAVAUD, P.; WALKER, F.; RIOUX, C.; JESTIN, C.; BOUVET, E.; SOULÉ, Jean-Claude; 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, n.11, p.1457-65, 2007.

ALMEIDA FILHO, G. L.; CHULVIS DO VAL, I. C.; SILVEIRA, F. A. Infecção por papilomavírus (HPV), capítulo 92. In: Rotinas de Diagnóstico e Tratamento das Doenças Infecciosas e Parasitárias. São Paulo: Editora Atheneu, 2005, p.633-641.

ANDREWS, D. M.; ANDONIOU, C. E.; SCALZO, A. A.; VAN DOMMELEN, S. L.; WALLACE, M. E.; SMYTH, M. J. et al. Cross-talk between dendritic cells and natural killer cells in viral infection. Mol Immunol 2005; 42:547-55.

APGAR, B.S.; ZOSCHNICK L. The 2001 Bethesda System Terminology. American Family

Physician, v. 68, n. 10, p. 1992-8, nov. 2003.

ARANY, I.; EVANS, T.; TYRING, S. K. Tissue specific HPV expression and downregulation of local immune responses in condylomas from HIV seropositive individuals. *Sex Transm Infect* 1998; 74:349-53.

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.

BAZIN, A. R. Manifestações clínicas da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, capítulo 5. In: *Rotinas de Diagnóstico e Tratamento das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. São Paulo: Editora Atheneu, 2005, p.52-64.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde. Coordenação Nacional DST e Aids. *Boletim epidemiológico aids* - ano I, janeiro a julho de 2004. Brasília-DF, Disponível em: www.aids.gov.br.

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.

BREESE, P. L.; JUDSON, F. N.; PENLEY, K. A.; DOUGLAS JR, J. M. Anal human papillomavirus infection among homosexual and bisexual men: prevalence of type-specific infection and association with human immunodeficiency virus. *Sex Transm Dis* 1995; 22:7-14.

Centers for Disease Control and Prevention-CDC. EPI-INFO versão 3.3.2 for Windows.

Califórnia: 2005.

COSTA E SILVA, I.T.; FERREIRA, L. C. L. Lesões precursoras do câncer anal em receptores de transplantes renais acompanhados em Manaus (AM). 2006. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

DAUMAS, Adriana Gonçalves Pinheiro Guimarães. Análise morfométrica das células dendríticas na mucosa anal de pacientes HIV positivos e relação com a lesão intra-epitelial e o câncer. 2007. 112f. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

DINIZ, F. Flávio. Anatomia Cirúrgica, Canal Anal e Região Perianal, Capítulo 78. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, p. 537-40.

DOORBAR, John. The Papillomavirus Life Cycle. Journal of Clinical Virology. vol. 32S, p. S7 – S15, 2005.

FERNANDEZ, N.J. Data Review. 2003 - Cancer in HIV-infected population. Disponível em: < http://goliath.ecnext.com/coms2/browse_R_R042>. Acesso em 18 março 2008.

FRISCH, M.; FENGER, C.; VAN DEN BRULE, A. J.; SORENSEN, P.; MEIJER, C.J.; WALBOOMERS, J. M. et al. Variants of squamous cell carcinoma of the anal canal and perianal skin and their relation to human papillomaviruses. Cancer Res 1999; 59:753-7.

FUNDAÇÃO CENTRO DE ONCOLOGIA DO ESTADO DO AMAZONAS- FCECON. Incidência de tumores malignos. Departamento de Estatística Médica. In: informação

diretamente coletada no setor, Manaus. 25 janeiro 2008.

GERVAZ, P.; ALLAL, A.S.; VILLIGER, P.; BUHLER, L.; MOREL, P. Squamous cell carcinoma of the anus: another sexually transmitted disease. *Swiss Med Wkly* 2003; 133:353-9.

GUILLAUD, M.; ADLER-STORTHZ, K.; MALPICA, A.; STAERKEL, G.; MATISIC, J.; VAN NIEKIRK, D.; COX, D.; POULIN, N.; FOLLEN, M.; MACAULAY, C. Subvisual chromatin changes in cervical epithelium measured by texture image analysis and correlated with HPV. *Gynecol Oncol.* 2005; 99:S16-23.

HOLLY, Elizabeth A.; RALSTON, Mary L.; DARRAGH, Teresa M.; GREENBLATT, Ruth M.; JAY, Naomi and PALEFSKY, Joel M. Prevalence and Risk Factors for Anal Squamous Intraepithelial Lesions in Women, *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 93, nº 11, p. 843-9, Jun, 2001.

HOWARD, C.V.; REED, M.G. Three-dimensional measurements in microscopy. Unbiased stereology. 2. ed. Berlin: Springer Verlag & Bios Scientific Publishers, 1998.

JAMESON, B.; BARIBAUD, F.; POHLMANN, S.; GHAVIMI, D.; MORTARI, F.; DOMS, R.W.; IWASAKI, A. Expression of DC-SIGN by dendritic cells of intestinal and genital mucosae in humans and Rhesus macaques. **Journal of Virology**. v.76, n.4, p.1866-75, 2002.

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

KLENCKE, Barbara J. & PALEFSKY, Joel M. Anal Cancer: an HIV-associated Cancer. Hematology Oncology clinics of North America. vol. 17, p. 859-872, 2003.

LYTWYN, A.; SALIT, I.E.; RABOUD, J.; CHAPMAN, W.; DARRAGH, T.; WINKLER, B. et al. Interobserver agreement in the interpretation of anal intraepithelial neoplasia. Cancer 2005; 103:1447-56.

LORÉ, Karin; SÖNNERBORG, Andres; BROSTRÖM, Christina; GOH, Li-Ean; PERRIN; Luc; MCDADE, Hugh; STELLBRINK, Hans-Jürgen; GAZZARD, Brian; WEBER; Rainer; NAPOLITANO, Laura A.; KOOYK, Yvette and ANDERSSON, Jan. Accumulation of DC-SIGN+CD40+dendritic Cells With Reduced CD80 and CD86 Expression in Lymphoid Tissue During Acute HIV-1 Infection. AIDS, vol. 16, p. 683-692, 2002.

MADISON, K. C. Barrier function of the skin: "La Raison d'Etre" of the epidermis. Journal of Investigative Dermatology, vol. 121, p. 231-41, 2003.

MANZIONE, C.R.; NADAL, S.R.; CALORE, E.E. Postoperative follow-up of anal condyloma acuminata in HIV-positive patients. **Diseases of the colon and rectum.** v.46, n.10, p.1358-65, 2004.

MANZIONE, R. C.; NADAL, S. R.; CALORE, E. E. Postoperative Follow-Up of Anal Condylomata Acuminata in HIV-Positive Patients. Dis. Colon Rectum, v.46, n.10, p.1358-65, 2003.

MANZIONE, R.C.; NADAL, S. R.; CALORE, E. E. Oncogenicidade do Papilomavírus Humano e o Grau de Neoplasia Intra-epitelial Anal em Doentes HIV Positivo. *Rev Assoc Med Bras* 2004; 50(3): 282-5.

MARTINS, Ciro. HPV-induced Anal Displasia: What Do We Know and What Can We Do About It?. The Johns Hopkins University on Behalf of its Division of infectious Diseases and AIDS service. 2001. Disponível em: http://www.hopkins-aids.edu/publications/report/may01_3.html. Acessado em: 10/11/2008.

MODESTO, V.L.; GOTTESMAN, L. Doenças sexualmente transmitidas e manifestações anais da aids. *Clin Cir Am Norte* 1994; 74:1501-34.

MOSCICKI, A.B.; HILLS, N.K.; SHIBOSKI, S.; DARRAGH, T.M.; JAY, N.; POWELL, K. et al. Risk factors for abnormal anal cytology in young heterosexual women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8:173-8.

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.; HORTA, S.H.C.; CALORE, E.E.; MANZIONE, C.R. Resultado do tratamento do carcinoma espinocelular anal e do seu precursor em doentes HIV-positivos. **Rev Assoc Med Bras.** v.53, n.4, p.365-9, 2007.

NADAL, R.S.; MANZIONE C.R. Papilomavírus Humano e o Câncer Anal. *Rev Bras*

Coloproct. v.26, n. 2, p.204-7, 2006b.

PACHIADAKIS, Loanis; POLLARA, Gabriele; CHAIN, Benjamin M. and NAUMOV, Nikolai. Is Hepatitis C Virus Infection of Dendritic Cells a Mechanism Facilitating Viral Persistence? *Lancet*, vol. 5, p. 296-304, May, 2005.

PALEFSKY, J.M.; HOLLY, E.A.; EFIRD, J.T.; COSTA, M.; NAOMI, J.; BERRY, J.M.; DARRAGH, T.M. Anal intraepithelial neoplasia in the highly active antiretroviral therapy era among HIV-positive men who have sex with men. **AIDS**, v.19, p. 1407-14, 2005.

PIKETTY, C.; DARRAGH, T.M.; COSTA, M. High prevalence of anal human papillomavirus infection and anal cancer precursors among HIV-infected persons in the absence of anal intercourse. **Ann Intern Med**. v.138, n.6, p.253-9, 2003.

PIKETTY, C.; KAZATCHKINE, M. D. Human papillomavirus-related lesion in anal intraepithelial neoplasia. *J Acquir Immune Defic cervical and anal disease in HIV-infected individuals in the Syndr*. 2005; 40:182-9.

RAMOS FILHO, C. F. Tratamento da Infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), capítulo 5. In: *Rotinas de Diagnóstico e Tratamento das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. São Paulo: Editora Atheneu, 2005, p.85-92.

RANDOLPH, Gwendalyn J.; ANGELI, Veronique and SWARTZ, Melody A. Dendritic-Cells Trafficking to Lymph Nodes Through Lymphatic Vessels. *Nature Reviews Immunology*. vol. 5, p. 617-28, 2005.

RETAMOZO-PALACIOS, M.; SOUSA, J. B.; SANTOS, J. B. Lesões anorretais em pacientes HIV positivos usuários de terapia anti-retroviral de alta efetividade. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40 (3): 286-289, mai-jun, 2007.

RETAMOZO-PALACIOS, M.; SOUZA, J. B.; SANTOS, J. B. Lesões anorretais em pacientes HIV positivos usuários de terapia anti-retroviral de alta efetividade. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 40 (3):286-289, mai-jun, 2007.

RYAN, D.P.; CAMPTON, C.C.; MAYER, R.J. Carcinoma of the anal canal. *N Engl J Med* 2000; 342:798-800.

SOBHANI, I.; VUAGNAT, A.; WALKER, F.; VISSUZAIN, C.; MIRIN, B.; HERVATIN, F.; MARMUSE, J.; CRÉMIEUX, A.; CARBON, C.; HENIN, D.; LEHY, T.; MIGNON, M. Prevalence of high-grade dysplasia and cancer in the anal canal in human papillomavirus-infected individuals. **Gastroenterology**. V.120, p.857–66, 2001.

SOBHANI, I.; WALKER, F.; ROUDOT-THORAVALL, F.; ABRAMOWITZ, L.; JOHANET, H.; HÉNIN, D.; DELCHIER, J.; SOULÉ, J. Anal Carcinoma: incidence and effect of cumulative infections. **AIDS**, v.18, p.1561-69, 2004.

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.

STEARNS, M.W.Jr.; URMACHER, C.; STERNBERG, S.S.; WOODRUFF, J.; ATTIYEH, F.

Cancer of the anal canal. *Curr Probl Cancer* 1980;4:144.

UCHIMURA, Nelson S.; RIBALTA, Julisa C. L.; FOCCHI, José; BARACAT, Edmund C. and

UCHIMURA, Taqueto T. Fatores Biocomportamentais e as Alterações no Número das Células de Langerhans. *RBGO*, vol. 26, nº 4, p. 289-294, 2004.

VANDEPAPELIERE, P.; BARRASSO, R.; MEIJER, C.J.; WALBOOMERS, J.M.;

WETTENDORFF, M.; STANBERRY, L. R.; LACEY, C. J. Randomized controlled trial of an adjuvanted human papillomavirus (HPV) type 6 L2E7 vaccine: infection of external anogenital warts with multiple HPV types and failure of therapeutic vaccination. *J Infect Dis.* 2005; 192 (12): 2099-107.

VARNAI, A.D.; BOLLMANN, M.; GRIEFINGHOLT, H.; SPEICH, N.; SCHMITT, C.;

BOLLMANN, R.; DECKER, D. HPV in anal squamous cell carcinoma and anal intraepithelial neoplasia (AIN) Impact of HPV analysis of anal lesions on diagnosis and prognosis. *Int J Colorectal Dis.* 2006; 21 (2): 135-42.

VOELER, B. AIDS and heterosexual anal intercourse. **Arch Sex Beha**, v.20, p.233-76, 1991.

WEBER, F.; BYRNE, S.N., LE, S.; BROWN, D.A.; BREIT, S.N.; SCOLYER, R.A. Transforming growth factor-beta(1) immobilizes dendritic cells within skin tumour and facilitates tumor escape from the immune system. **Cancer Immunol Immunother.** V.54, p.898-906, 2005.

8. ANEXOS

Anexo A – Cronograma de atividades

Nº	Descrição	Ago 2008	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2009	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
1	Projeto Piloto	R											
2	Revisão Bibliográfica	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
3	Entrevista e coleta do material celular anal		R	R	R	R	R						
4	Análise morfométrica das células dendríticas			R	R	R	R	R	R				
5	Elaboração do Relatório Parcial					R	R						
6	Análise estatística dos dados							R	R	R	R		
7	Elaboração do Resumo e Relatório Final										R	R	
8	Preparação da Apresentação Final para o Congresso											AR	AR

R – Atividades realizadas

AR – Atividades a serem realizadas

Anexo B – Protocolo de Estudo

PROTOCOLO DE ESTUDO

Números aleatórios									
Nome								Idade	
Sexo		Cor		Educação					
☐ Faio	☐ Leuco	☐ Melano	☐ Xanto	☐ 1º	☐ 2º	☐ 3º	☐ A		
Prontuário		Logradouro, Nome do Logradouro							
Nº		Complemento		Bairro					
CEP		Tel.-1		Tel.-2				Contato	
Orientação sexual					Anorrecepção				
☐ HSH	☐ HSHM	☐ HTR	☐ MSM	☐ MSMH	☐ Sim	☐ Não			
Nº parceiros sexuais no último ano				Idade de iniciação sexual					
☐ 0	☐ 1	☐ 2-9	☐ >10	☐ <15	☐ 15-19	☐ ≥20			
Outros fatores de risco					DST				
☐ TAB	☐ CA	☐ CG	☐ DR	☐ CSIL	☐ Gon	☐ Her	☐ Clam		
DST					Doenças associadas				
☐ Sif	☐ Outras	Citar:							
HAART					☐ CMV	☐ HSV	☐ EBV		
☐ Sim	☐ Não	☐ ≤3 anos	☐ 4-6 anos	☐ 7-9 anos	☐ ≥ 10 anos				
CD4					Carga viral				
☐ ≤ 200	☐ 201-500	☐ ≥ 501			☐ <30.000	☐ ≥30.000			
Histopatologia:	NEG	LSIL	HSIL	CEPis	CEPin	ADCis	ADCin		
Pap-a - algodão	NS	NEG	LSIL	ASC-H	ASC-US	CEPis	CEPin	ADCis	
	+	++	+++	++++					
Pap-a - poliéster	NS	NEG	LSIL	ASC-H	ASC-US	CEPis	CEPin	ADCis	
	+	++	+++	++++					
Pap-a - escova	NS	NEG	LSIL	ASC-H	ASC-US	CEPis	CEPin	ADCis	
	+	++	+++	++++					
AMI									
Plano vertical:	☐ Margem anal (A)	☐ Anodema(B)	☐ Pectínea(C)	☐ Suprapectínea(D)					
Plano horizontal:	☐ Horas	Morfologia lesão ACB:	☐ Puntiforme(f)	☐ Mosaico(g)	☐ Coalescente(h)				
☐ Plana(i)	☐ Planoelevada(j)	☐ Elevada(k)	☐ Branco acentuado(l)	☐ Branco tênue(m)	☐ Lixa d'água(n)				
2ª lesão:	Vertical:	A, B, C, D	Horizontal:	Horas	Morfologia lesão ACB:	f, g, h	i, j, k	l, m, n	
3ª lesão:	Vertical:	A, B, C, D	Horizontal:	Horas	Morfologia lesão ACB:	f, g, h	i, j, k	l, m, n	
P16 ^{INK4a} cito	NEG	Fraca (+)	Intensa (++)						
P16 ^{INK4a} histo	NEG6	Esporádica	Focal	Difusa					
PCR HPV	NEG	Baixo risco	Alto risco	Genótipo					
Contagem de células de Langerhans – dendríticas:									
Camada de maior concentração:									

Anexo C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



Universidade Federal do Amazonas

Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC 2008/2009

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estudo da variação da densidade das células dendríticas da região anal de pacientes portadores de condiloma acuminado infectados pelo HIV.

DESCRIÇÃO E OBJETIVO DO ESTUDO

O câncer anal é uma doença grave que acontece mais nas pessoas que fazem sexo anal sem camisinha, nas mulheres que já tiveram inflamação grave ou câncer de útero, nos transplantados, nos fumantes, nos que têm ou tiveram “doenças do sexo”, como verrugas próximas ao ânus (via) e ainda nos portadores de HIV/AIDS.

Estamos convidando você para participar da pesquisa **Estudo da variação da densidade das células dendríticas da região anal de pacientes portadores de condiloma acuminado infectados pelo HIV**. Você foi escolhido por ter um dos riscos ditos acima ou por ter vírus do HIV/AIDS. Na consulta, veremos se as células dendríticas (células da defesa do seu corpo) que estão no ânus (via) estão normais em você. Coletaremos estas células durante o exame no ânus (via) com um aparelho descartável (que se joga fora após o uso) para olhar por dentro. Colocaremos um ácido fraco com gaze e faremos biópsia (retirada de um pequenino pedaço) no local suspeito de doença e no local normal para controle, com uso de anestesia local, a qual pode arder levemente (ocorre freqüentemente), acelerar o coração (raramente ocorre) e dar mal estar (raramente ocorre). Por isso, é importante vir ao exame com um acompanhante adulto. Caso isso aconteça, você ficará em observação conosco até que a sensação ruim passe. Um pequeno sangramento também poderá ocorrer quando você for fazer o primeiro cocô.

Gostaríamos, com o trabalho, de conhecer quantas pessoas têm a inflamação grave no ânus (via) que pode virar câncer, e se as células de defesa do ânus (via) e do sangue estão diminuídas, facilitando a doença. Com isso, podemos criar um programa de exames para descobrir a doença no início, antes que ela vire câncer. Você precisará também responder perguntas íntimas sobre a sua doença, sexo anal, doenças do sexo e o quanto estudou. Não existem outros exames melhores ou com menos riscos. O material será examinado no laboratório do Hospital Tropical e você receberá os resultados na próxima consulta. Caso você passe mal ou tenha algum problema devido aos exames ou dúvidas quanto à pesquisa, procure a Dra. Adriana Daumas no telefone (92)3238-1711 ou no endereço Av. Pedro Teixeira, 25 Dom Pedro.

Você tem a liberdade e o direito de negar sua participação ou retirar seu consentimento (autorização) em qualquer momento, podendo mesmo assim continuar a

ser atendido. Em caso de ocorrer algum dano eventual à sua saúde durante o período de estudo, provocado pelos procedimentos que serão utilizados, previsto ou não no termo de consentimento, além do direito da assistência integral, você terá direito à indenização, conforme prevê a Resolução 196/96, V.6 – CNS.

Sua identidade (nome e rosto) será mantida em segredo pelo pesquisador e pela Fundação de Medicina Tropical. Os resultados da pesquisa serão analisados e colocados em tabelas, figuras, fotos ou gráficos e mostrados em palestras, conferências, periódico científico ou outra forma que leve o conhecimento para a sociedade e autoridades da área da saúde nacionais ou internacionais, de acordo com as normas (leis) de proteção nacional ou internacional.

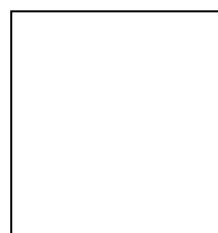
Os custos dos exames, das consultas e do tratamento serão de responsabilidade da Fundação de Medicina Tropical, você só precisará se deslocar, por meios próprios, até o local da consulta ou para o tratamento conforme a orientação que receberá durante a pesquisa. Você receberá uma cópia deste termo, e caso concorde em participar do estudo, será necessário que assine o termo de consentimento.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO:

Eu,, participante do estudo, recebi a explicação de que serei um(a) dos(as) participantes dessa pesquisa. Se eu não souber ler ou escrever, uma pessoa de minha confiança lerá este documento para mim, o qual assinarei através da impressão do meu polegar direito (impressão digital) no quadro abaixo.

E, por estar devidamente informado (a) e esclarecido (a) sobre o conteúdo deste termo, livremente, sem qualquer pressão por parte dos pesquisadores, expressei meu consentimento para minha inclusão nesta pesquisa.

.....
ASSINATURA DO PACIENTE OU REPRESENTANTE LEGAL



IMPRESSÃO DO POLEGAR DIREITO DO PACIENTE,
CASO ESTE NÃO SAIBA ESCREVER SEU NOME.

.....
LOCAL E DATA

PESQUISADOR RESPONSÁVEL PELO ACOMPANHAMENTO E INFORMAÇÕES AO PACIENTE:

NOME LEGÍVEL: ADRIANA DAUMAS PINHEIRO GUIMARÃES

FONE: (92)3621-6590

.....
ASSINATURA

Anexo D - Requisição de Exame Histopatológico

REQUISIÇÃO DE EXAME HISTOPATOLÓGICO – ANOSCOPIA COM MAGNIFICAÇÃO

UF	Cartão SUS	Código da Unidade de Saúde
Unidade de Saúde		
Município	Prontuário	

INFORMAÇÕES PESSOAIS

Nome Completo		Apelido	
Nome Completo da Mãe			
Identidade	Órgão emissor	UF	CPF
Data de nascimento	Idade	Cor	
Dados Residenciais – Logradouro			
Número	Complemento		
Bairro	Município	UF	
CEP	DDD	Telefone	Contato
Escolaridade:		☐ Analfabeto	☐ 1º G
		☐ 2º G	☐ 3º G

DADOS DA ANAMNESE

Fez o Pap-a alguma vez? ☐ Sim Quando? (ano) ☐ Não ☐ Não sabe

☐ DST Qual? ☐ Gon ☐ Sif ☐ Her ☐ Clam ☐ Outra: _____

☐ AR ☐ AD+ ☐ AD- ☐ AD? ☐ CA ☐ CG ☐ CSIL ☐ TAB ☐ TRA ☐ DR

☐ Doença associada Qual(is)? _____

CD4: _____ Carga viral: _____ Linfonodomegalia inguinal ☐

INSPEÇÃO PROCTOLÓGICA

☐ Soiling ☐ Pus ☐ Sangue ☐ Ferida anal ☐ Medicamento anal

Qual? _____

ANOSCOPIA MAG Neg ☐ + elevada (a) ☐ + plana (b) ☐

Posição Margem anal (c) ☐ Anoderma (d) ☐ Pectínea (e) ☐ Suprapectínea (f) ☐

Posição Vertical

Posição Horizontal 1h ☐ 2h ☐ 3h ☐ 4h ☐ 5h ☐ 6h ☐ 7h ☐ 8h ☐ 9h ☐ 10h ☐ 11h ☐ 12h ☐

2ª lesão: 3ª lesão: Obs: _____

Data da Coleta _____ Coletor(a): assinatura e carimbo _____

Instituição onde foi realizada a coleta _____

Anexo E – Parecer de Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos



Fundação de Medicina Tropical do Amazonas
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
Av. Pedro Teixeira, 25 – Dom Pedro
Cep: 69040-000
Manaus – Amazonas - Brasil



APROVAÇÃO Nº 1911

Registro CEP Nº 0889/2008

CAAE – 0010.0.114.000-08

Processo Nº0889/2008-FMT-AM

Projeto de Pesquisa: Estudo da variação da densidade das células dendríticas da região anal de pacientes portadores de condiloma acuminado infectados pelo HIV, atendidos no Ambulatório da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMT-AM)

Pesquisador responsável: Adriana Gonçalves Daumas Pinheiro Guimarães

Instituição Sediadora: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas

Instituição Vinculada: Não se aplica

Área Temática Especial: Não se aplica

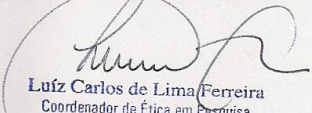
Patrocinador: FAPEAM(PIBIC)

Registro para armaz. de mat. Biológico humano: Não se aplica

Ao se proceder à análise relativo do Projeto em questão, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMT-AM), em sessão ordinária do dia 09 de julho de 2008 e de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Situação do Protocolo: APROVADO

Manaus, 09 de julho de 2008.



Luiz Carlos de Lima Ferreira
Coordenador de Ética em Pesquisa
FMT-AM

Obs: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c") conforme o Formulário de acompanhamento dos Projetos aprovados no CEP, disponível em nossa home Page.