

**LIVIA BRAVO MAIA**

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS EXAMES DE CITOLOGIA ESFOLIATIVA  
CONVENCIONAL E EM BASE LÍQUIDA PARA O RASTREAMENTO DE LESÕES  
INTRAEPITELIAIS ANAIS ASSOCIADAS À INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS  
HUMANO EM PACIENTES INFECTADOS PELO VÍRUS DA  
IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA**

**BRASÍLIA 2013**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**LIVIA BRAVO MAIA**

**Estudo comparativo entre os exames de citologia esfoliativa convencional e em base líquida para o rastreamento de lesões intraepiteliais anais associadas à infecção pelo papilomavírus humano em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana**

**Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.**

**Orientador: Prof. Dr. Paulo Gonçalves de Oliveira**

**Coorientador: Profa. Dra. Larissa Cardoso Marinho**

**BRASÍLIA 2013**

*Dedico este trabalho...*

Aos meus pais, Odete e Cleber. Meus sinceros agradecimentos por tudo que me proporcionaram. Amo vocês.

Aos meus irmãos Cleber Filho e Camila pela amizade e companheirismo.

Ao meu noivo e futuro marido, Eronides Batalha Filho pelo incentivo, dedicação e amor.

## **AGRADECIMENTOS**

Após quatro anos, são muitas as pessoas que tenho que agradecer.

A Deus, por me dar coragem e força para vencer os desafios, sabedoria para fazer as melhores escolhas, fé para crer que tudo daria certo e por me fazer acreditar que tudo vale a pena.

Aos meus pais, por tudo, não tenho palavras para agradecer. Graças a vocês sou quem sou hoje e cheguei até aqui. Amo vocês.

Aos meus irmãos, pelo incentivo, carinho e apoio nos momentos difíceis. Meus familiares, tios, tias, primos, primas, a minha avó, meu cunhado Juliano Batalha e a minha sogra Maria da Conceição, meus mais sinceros agradecimentos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Gonçalves de Oliveira, pela grande experiência, por ter depositado sua confiança e ter acreditado que conseguiria vencer essa etapa.

Aos pacientes, que constituem o maior sentido das ciências médicas. Seus dados proporcionaram a realização desta pesquisa. Em uma aplicação do preceito de amor ao próximo, transformaram seu próprio sofrimento em esperança de aperfeiçoar a terapêutica dos que vierem a ter doença semelhante.

Aos colegas do Centro de Anatomia Patológica do Hospital Universitário de Brasília, meus mais que sinceros agradecimentos, todos vocês, todos mesmo, ao longo desses anos tiveram papéis importantes na minha formação acadêmica e pessoal.

Aos funcionários da pós-graduação, em especial Gledson Alessandro Ribeiro da Silva pela paciência e atenção em todos esses anos.

Ao mestre dos mestres Dr. Mário Augusto Pinto de Moraes.

Aos funcionários dos ambulatórios de infectologia e coloproctologia em especial Regiane Gomes e Sonia Silva pela força e incentivo.

Aos médicos professores e residentes dos ambulatórios de infectologia que contribuíram encaminhando os pacientes.

À minha coorientadora e amiga Profª. Dra. Larissa Cardoso Marinho por ter estado presente em todos os momentos desse trabalho, da minha formação profissional e pessoal.

À Prof. Dra. Fabiana Pirani Carneiro por ter estado ao meu lado nessa pesquisa, incentivando-me a continuar nas horas do desânimo e pelo papel importante na minha formação como patologista.

Ao Prof. Dr. Leopoldo Luiz dos Santos Neto pela atenção durante esses anos.

À querida Tércia Maria Lousa de Castro Mendes que foi fundamental no final desse trabalho com a realização da imunocitoquímica.

Ao meu chefe Dr. Alexandre Cavalca Tavares, que desde sempre acreditou e permitiu meu crescimento no CAP-HUB.

Meus mais sinceros agradecimentos a Dra. Tânia Wanderley e a todos seus familiares por permitirem que eu faça parte da família com tanto carinho. Eterna “mãezona” e mestre, que me mostrou o amor pela citopatologia e contribui de forma mais que especial para que esse trabalho fosse realizado.

A Lêda Maria Santos Rufino pela amizade e acolhimento nesses últimos anos, sua amizade foi fundamental para tornarem meus dias em Brasília mais leves, graças a você conheci as melhores pessoas, Daniela Matos, Diogo Thomson, Victor Rufino e Ricardo Andrade, obrigado por fazerem parte da minha vida.

A todos os amigos que estiveram presentes e compartilharam momentos bons e ruins, em especial a Ana Emília Borges de Azevedo, Luisa Raggi, Peron Fernandes, Isabela Ridolfi, Adaiane Bassini, Mirian Nascimento, Lislely Calixto, Juca Moreno, Igor Teixeira, Filipe Barra, Rafael Pena e Isabela Peres.

Ao laboratório Sabin, Diagnose e a FAP-DF pelo financiamento de parte desse trabalho.

Ao meu noivo, futuro marido, amigo e companheiro, sem palavras para agradecê-lo. Você esteve desde sempre me incentivando, me admirando e me amando. Tenho certeza que você teve um papel mais que especial para que eu chegasse até aqui. Muito obrigado, eu te amo.

Esta tese obedece:

Às normas de referências bibliográficas adaptadas do *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

## SUMÁRIO

Listas de siglas e abreviaturas

Listas de figuras

Listas de tabelas

Resumo

Summary

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	20
2.1 Tumores do canal anal e ânus.....	20
2.1.1 Definição .....	20
2.1.2 Histórico .....	21
2.1.3 Anatomia e histologia da região anal.....	21
2.1.4 Classificação dos tumores .....	23
2.1.5 Nomenclatura das lesões anais .....	23
2.1.5.1 Citopatologia .....	23
2.1.5.2 Histopatologia.....	24
2.2 Papilomavírus Humano.....	25
2.2.1 Etiopatogênese do HPV .....	25
2.2.2 História natural da neoplasia intraepitelial anal .....	25
2.2.3 Papel do HPV na carcinogênese .....	26
2.2.3.1 O vírus HPV .....	27
2.2.3.2 Expressão do genoma do HPV .....	27
2.2.3.3 Interação do vírus HPV com o vírus do HIV .....	29
2.3 Rastreamento, seguimento e tratamento .....	30
2.3.1 Toque retal.....	33
2.3.2 Citologia Anal.....	34
2.3.2.1 Citologia esfoliativa convencional.....	35
2.3.2.2 Citologia esfoliativa em base líquida .....	36
2.3.3 Anuscopia de alta resolução .....	36
2.3.4 Métodos moleculares de detecção do DNA – HPV.....	37

2.3.5.1 Hibridização com sondas ( <i>Southern blot</i> , <i>Dot blot</i> e captura híbrida).....	37
2.3.4.2 Teste de hibridização <i>in situ</i> (ISH) .....	38
2.3.4.3 Reação de cadeia de polimerase (PCR) .....	38
2.3.4.4 Chipes de DNA.....	39
2.3.4.5 Imuno-histoquímica/imunocitoquímica .....	39
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>40</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	40
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>41</b>
4.1 Pacientes.....	41
4.2 Coletas.....	42
4.3 Análises macroscópicas e biópsia da região anal .....	43
4.4 Análises da citologia convencional e em base líquida.....	44
4.5 Análise molecular para detecção do HPV.....	44
4.6 Análise histopatológica das biópsias da região anal.....	45
4.7 Análise estatística .....	45
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>47</b>
5.1 Detalhamentos das amostras em relação ao questionário referente às características dos pacientes.....	47
5.2 Descrição e comparação dos achados citológicos pelos métodos de citologia convencional e em base líquida .....	48
5.3 Distribuições de frequência das características dos pacientes e a prevalência de CC positiva .....	50
5.4 Distribuições de frequência das características dos pacientes e a prevalência de CBL positiva .....	52
5.5 distribuição dos achados morfológicos de acordo com os diagnósticos propostos (Sistema de Bethesda) .....	54
5.5.1 Diagnósticos citológicos na CC e CBL negativos .....	56
5.5.2 Diagnósticos citológicos na CC e CBL de ASC-US .....	57
5.5.3 Diagnósticos citológicos na CC e CBL de LSIL.....	58
5.5.4 Diagnósticos citológicos na CC e CBL de ASC-H e HSIL .....	59

5.6 Comparação dos resultados da anuscopia de alta resolução e biópsia relacionados aos achados citológicos .....	61
5.7 Frequência e prevalência de infecção por HPV pelo Pappilock® .....	64
5.8 Tipos e frequência do HPV (Pappilock®) relacionados com os diagnósticos na CC e CBL .....	66
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>71</b>
6.1 Métodos utilizados .....	71
6.2 Dados clínicos e epidemiológicos .....	72
6.3 Concordâncias entre os métodos de diagnósticos (CC e CBL).....	74
6.4 Frequências das variáveis estudadas e as prevalências de CC e CBL positivas.	75
6.5 Achados morfológicos de acordo com os diagnósticos propostos (Sistema de Bethesda) .....	77
6.6 Anuscopia /biópsia relacionados aos achados citológicos.....	78
6.7 Infecção por HPV pelo método Pappilock®.....	80
6.8 Rastreamento e Perspectiva.....	83
6.9 Limitações do Estudo .....	85
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>86</b>
<b>8 REFERENCIAS .....</b>	<b>88</b>
<b>9 APÊNDICES .....</b>	<b>96</b>
9.1 Apêndice A.....	96
9.2 Apêndice B.....	97
9.3 Apêndice C.....	98
9.4 Apêndice D.....	100
9.5 Apêndice E.....	102
9.6 Apêndice F .....	103
<b>10 ANEXOS .....</b>	<b>105</b>
10.1 Anexo A .....	105
10.2 Anexo A .....	105

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

**AP-1:** Proteína ativadora -1

**ASC-H:** Do inglês *Atypical Squamous Cell - cannot exclude HSIL* (Células escamosas atípicas, não podendo excluir lesão intraepitelial de alto grau)

**ASC-US:** Do inglês *Atypical Squamous Cell - cannot Undetermined Significance HSIL* (Células escamosas atípicas de significado indeterminado)

**ATPase:** Enzima que converte o trifosfato de adenosina em difosfato de adenosina

**CAP** - Centro de Anatomia Patológica

**CBL:** Citologia em base líquida

**CC:** Citologia convencional

**CEC:** Carcinoma escamoso

**CIS:** Carcinoma *in situ*

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**DNA-HPV:** Genoma do HPV

**DST:** Doença sexualmente transmissível

**E:** Do inglês *early* (precoce)

**ed:** Edição

**EUA:** Estados Unidos da América

**et al:** e colaboradores

**G0:** Fase de quiescência do ciclo celular

**G1:** Fase pré-síntese do ciclo celular

**G2:** Fase pré-mitótica do ciclo celular

**HE:** Hematoxilina e eosina

**HUB:** Hospital Universitário de Brasília

**HIV:** vírus da imunodeficiência humana

**HPV:** Papilomavírus humano

**HSIL** – Do inglês *High Grade Squamous Intraepithelial Lesion* (Lesão intraepitelial escamosa de alto grau)

**IARC:** Do inglês *International Agency for Research on Cancer*

**IC:** Intervalo de confiança

**INCA:** Instituto Nacional do Câncer

**ISH:** Hibridização *in situ*

**K:** coeficiente Kappa

**kDa:** quiloDalton

**L:** Do inglês *late* (tardio)

**LCR:** Do inglês *Long Control Region* (região controladora longa)

**LSIL** – Do inglês *Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion* (Lesão intraepithelial escamosa de baixo grau)

**M:** Fase mitótica do ciclo celular

**MSM:** Do inglês *man who have sex with other man* (homem que pratica sexo com outro homem)

**n:** amostra

**NIA:** Neoplasia intraepitelial anal

**NIC:** Neoplasia intraepitelial cervical

**OMS:** Organização Mundial da Saúde

**p:** nível de significância

**p.:** página

**pb:** pares de base

**PCR:** Reação de polimerase em cadeia

**RNA:** ácido ribonucleico

**RP:** Razão de prevalência

**S:** Fase de síntese do ciclo celular

**TBS:** Sistema de Bethesda

**URR:** Do inglês *upstream regulatory region*

**X<sup>2</sup>:** qui-quadrado

## LISTAS DE FIGURAS

- Figura 1** - Fluxograma para o rastreamento citológico das lesões anais.....32
- Figura 2** - Critério de exclusão: lesões condilomatosas visíveis à ectoscopia .....41
- Figura 3** - A1: escovas utilizadas para as coletas da citologia convencional, biologia molecular e em meio líquido. A2: tubos para acondicionamento da CC. A3: meio líquido da ThinPrep®. A4: anuscópio descartável.....42
- Figura 4** – A3: meio líquido da ThinPrep® A4: anuscópio descartável.....43
- Figura 5** - B1: espátula utilizada para aplicação do ácido acético e lugol. B2: Ectoscopia anal. B3: anoscopia de alta resolução.....43
- Figura 6** - Esfregaços de canal anal em base líquida demonstrando células glandulares (C1) e células escamosas nucleadas (C2). Papanicolaou 400 X.....57
- Figura 7** - Células com discreto aumento nuclear em meio à paraceratose, diagnosticados como ASC-US na CC (D1e D2) e na CBL (D3 e D4). Papanicolaou 400 X .....57
- Figura 8** - Lesões de baixo grau (LSIL) com presença de coilocitose, alterações na relação núcleo/citoplasma, cromatina irregular e hiper cromatismo nuclear, vistos na CC (E1 e E2) e CBL (E3 e E4). Papanicolaou 400 X.....58
- Figura 9** - Lesões de baixo grau (LSIL) com presença de coilocitose, alterações na relação núcleo/citoplasma, cromatina irregular e hiper cromatismo nuclear, vistos na CBL (E5 e E8). Papanicolaou 400 X .....59
- Figura 10** - Lesões alto grau (HSIL) com presença de células com alterações na relação núcleo/citoplasma, cromatina irregular e hiper cromatismo nuclear, vistos na CC (F1 e F4) e CBL (F5 e F6). Papanicolaou 400 X. HE .....60

**Figura 11** - Lesões alto grau (HSIL) com presença de células com alterações na relação núcleo/citoplasma, cromatina irregular e hipercromatismo nuclear, vistos na CBL (F7 e F8). Papanicolaou 400 X .....61

**Figura 12** - Anuscopia normal (G1) e anuscopia alterada com áreas brancacentas após aplicação do ácido acético (G2).....63

**Figura 13** - H1 e H2: Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau, neoplasia intraepitelial anal de grau I - NIA I. Hematoxilina e Eosina 400 X.....64

**Figura 14** - I: Lesão intraepitelial escamosa de alto grau, neoplasia intraepitelial anal de grau III - NIA III. HE 400 X. ....64

## LISTAS DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Distribuição dos pacientes .....	47
<b>Tabela 2</b> - Frequência dos diagnósticos de acordo com os métodos citológicos .....	49
<b>Tabela 3</b> - Concordância entre os diagnósticos citológicos pela CC e CBL .....	49
<b>Tabela 4</b> - Distribuição de frequências das variáveis estudadas com análise de Regressão de Poisson Múltipla (33 pacientes) na CC .....	51
<b>Tabela 5</b> - Distribuição de frequências das variáveis estudadas com análise de Regressão de Poisson Múltipla (33 pacientes) na CBL .....	53
<b>Tabela 6</b> - Frequência das alterações morfológicas de acordo com o diagnóstico citológico pela CC .....	54
<b>Tabela 7</b> - Frequência das alterações morfológicas de acordo com o diagnóstico citológico pela CBL .....	56
<b>Tabela 8</b> - Relação dos resultados da CC com anoscopia/biópsia .....	62
<b>Tabela 9</b> - Relação dos resultados da CBL com anoscopia/biópsia .....	63
<b>Tabela 10</b> - Resultados da biologia molecular para HPV relacionados com os achados da CC .....	65
<b>Tabela 11</b> - Resultados da biologia molecular para HPV relacionados com os achados da CBL .....	65
<b>Tabela 12</b> - Tipos e frequência do HPV (Pappilock®) relacionados com os diagnósticos na CC .....	66

<b>Tabela 13</b> - Tipos e frequência do HPV (Pappilock®) relacionados com os diagnósticos na CBL .....	67
<b>Tabela 14</b> - Tipos de HPV na biologia molecular e suas frequências relacionadas aos resultados da CC .....	68
<b>Tabela 15</b> - Tipos de HPV na biologia molecular e suas frequências relacionadas aos resultados da CBL.....	69
<b>Tabela 16</b> - Prevalência dos subtipos de HPV diagnosticados pela biologia molecular.....	70
<b>Tabela 17</b> – Anusopia/ biópsia e múltiplas infecções para HPV .....	70

## RESUMO

Estudo comparativo entre os exames de citologia esfoliativa convencional e em base líquida para o rastreamento de lesões intraepiteliais anais associadas à infecção pelo papilomavírus humano em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana. [tese]. Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Brasília; 2013.

**INTRODUÇÃO:** O carcinoma escamoso anal tem um papel importante na morbimortalidade em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Similarmente ao câncer cervical, as neoplasias intraepiteliais anais tem forte associação com a infecção pelo papillomavírus humano (HPV), além de ser passível de ser rastreado pelos métodos citológicos. A citologia esfoliativa convencional (CC) é de fácil execução, não agressiva e de baixo custo operacional. A citologia em base líquida (CBL) é uma técnica citológica que vem sendo utilizada por oferecer leituras mais purificadas, embora seja mais dispendiosa. São poucos os estudos que comprovem a eficácia do rastreamento do câncer anal, porém, tal prática vem sendo discutida e incentivada nos grupos considerados de risco ao desenvolvimento das neoplasias intraepiteliais anais. **OBJETIVO:** Avaliar a concordância das citologias esfoliativas convencional e meio líquido no rastreamento nas lesões precursoras do câncer do canal anal e comparar os achados dos padrões anuscópicos, histopatológicos e de genotipagem associados aos métodos de citologia. **MÉTODOS:** Estudo comparativo em pacientes de ambos os sexos, maiores de 18 anos e infectados pelo HIV. Todos os pacientes foram submetidos a exame clínico com toque retal, seguido da anoscopia de alta resolução e biopsia das lesões suspeitas. Foram obedecidos os critérios de Bethesda para classificação das lesões citológicas. Foram calculados os índices de concordância entre os métodos citológicos e sua correlação com os achados dos demais exames de rastreamento. **RESULTADOS:** Nas CC as amostras demonstraram os seguintes diagnósticos: 54,5% negativos, 12,1% ASC-US, 18,1% LSIL e 15,1% HSIL. Pelo método CBL as amostras demonstraram os seguintes diagnósticos: 54,5% de negativos, 9,0% de ASC-US, 3,0% de ASC-H, 30,0% de LSIL, 3,0% de HSIL. A concordância diagnóstica entre os dois métodos utilizados apresentou significância estatística ( $p < 0,05$ ) com teste Kappa de 0,8778 (quase perfeita) e intervalo de confiança de 95% (0,7136 a 1,000). Do total de 33 casos, 28 foram concordantes. Dos 18 casos de CC e CBL negativos, em 15 (15/18) a anoscopia foi igualmente negativa. Assim, observa-se que capacidade do teste CC identificar corretamente aqueles pacientes com biópsia positiva foi de 75,0%, com intervalo de confiança de 95% variando de 34,9% a 96,8% e, para CBL, 85,7%, com intervalo 95% de confiança variando de 34,9% a 96,8%. Quanto à genotipagem, os diagnósticos de LSIL na CC e CBL foram os que apresentaram maior positividade para os diversos subtipos do HPV. Os mais comuns do subtipo de alto risco na CC foram o 16 e o 68 e, na CBL, o 16, 18 e 68 e os de baixo risco mais comuns foram os subtipos 44/55 para ambos os métodos. Foi observada significância estatística quando associado múltiplas infecções para HPV com os achados histopatológicos. **CONCLUSÃO:** Concluimos que a citologia esfoliativa convencional e a em base líquida demonstraram ser igualmente eficazes, podendo ser utilizadas no auxílio do rastreamento das lesões precursoras do câncer anal.

**Palavras-chave:** câncer do canal anal; citologia convencional; citologia em base líquida; rastreamento, papiloma vírus humano, lesões intraepiteliais anais.

## SUMMARY

Comparative study between conventional and liquid-based cytology in the screening of anal squamous intraepithelial lesions associated with human papillomavirus infection in HIV-positive patients [PhD thesis]. Faculdade de Ciências Médicas; Universidade de Brasília; 2013.

**INTRODUCTION:** The anal squamous carcinoma plays an important role in morbidity and mortality of HIV-positive patients. Similar to cervical cancer, anal intraepithelial neoplasia is strongly associated with HPV infection and can be diagnosed by cytological methods as well. The conventional cytology (CC) is easy to perform, non-aggressive and a low cost test. The liquid-based cytology (LBC) is a technique that has been used for offering more clear samples results, although it is more expensive. There are few studies that prove the effectiveness of screening for anal cancer, however, this practice has been discussed and encouraged in groups considered at risk for anal cancer. **OBJECTIVE:** To evaluate the agreement of conventional and liquid-based cytology in the screening of anal squamous intraepithelial lesions and compare the anoscopic results, histopathological and genotyping with both methods of cytology. **METHODS:** Comparative study of patients, more than 18 years old, infected by HIV. All patients were underwent clinical examination with digital rectal examination, followed by high-resolution anoscopy and biopsy of suspicious lesions. We used Bethesda criteria for classification of cytological lesions. The concordance between cytological methods was calculated and analyzed their relation with the findings of other screening tests. **RESULTS:** The CC samples had the following diagnoses: 54.5% negative, 12.1% of ASC-US, 18.1% of LSIL and 15.1% of HSIL. The LBC samples had the following diagnoses: 54.5% negative, 9.0% of ASC-US, 3.0% of ASC-H, 30.0% of LSIL, 3.0% HSIL. The diagnostic agreement between the two methods was statistically significant ( $p < 0.05$ ) with Kappa test 0.8778 (almost perfect) and confidence interval of 95% (0.7136 to 1.000). Of total 33 cases, 28 were concordant. Of Eighteen negative cases of LBC and CC, in 15 (15/18) the anoscopy was equally negative. Thus, we observe that CC can correctly identify those patients with positive biopsy in 75.0%, with a confidence interval of 95% ranging from 34.9% to 96.8%, and LBC, 85.7 %, with 95% confidence interval ranging from 34.9% to 96.8%. In the molecular biology, the LSIL diagnostic in the CC and LBC had higher positivity for the various subtypes of HPV. The most common high-risk subtype in the CC were 16 and 68, and in the LBC, 16, 18 and 68 and the most common low-risk subtypes were 44/55 for both methods. Statistical significance was observed when combined with multiple HPV infections with histopathologic findings. **CONCLUSION:** We conclude that conventional and liquid-based cytology shown to be equally effective and can be used both as screening for preneoplastic anal lesions.

**Keywords:** anal cancer, conventional cytology, liquid-based cytology, screening, human papillomavirus, anal intraepithelial lesion.

## 1 INTRODUÇÃO

O carcinoma do canal anal e ânus é relativamente raro na população em geral (menos de 1 caso/100 mil habitantes). Essa incidência, porém, é maior em pacientes do sexo masculino portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) em homens que praticam sexo anal com outros homens (MSM). (1, 2) A incidência do câncer do canal anal e ânus nesse grupo, nos Estados Unidos (EUA), é de 42 a 137 por 100 mil habitantes, e foram previstos para o ano de 2012, 6.230 novos casos em homens e mulheres, e 780 mortes. (3)

No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), em 2009 foram diagnosticados 1.078 casos de câncer anal, sendo 539 em homens. O número de mortes por esse tipo de câncer no ano de 2010 foi de 274 casos, sendo 98 em homens e 176 em mulheres. (4) As internações por câncer de reto, ânus e canal anal vêm aumentando no sistema único de saúde (SUS) brasileiro nos últimos anos. (5)

Outros grupos também apresentam maior incidência e são definidos como de risco: indivíduos de ambos os sexos praticantes de sexo anal receptivo, indivíduos sexualmente promíscuos, portadores de doenças sexualmente transmissíveis (DST) tais como infecções causadas pelo papilomavírus humano (HPV), sífilis, HIV, gonorreia, vírus do grupo herpes simples tipo II e *Chlamydia trachomatis*. Também são considerados de risco portadores de lesões anais crônicas benignas que cursam com inflamação por longo tempo (fístulas e fissuras anais), indivíduos transplantados em uso de drogas imunossupressoras, usuários de drogas injetáveis e tabagistas. (6, 7)

O tipo histológico do câncer mais comumente encontrado no canal anal e no ânus é o carcinoma escamoso, o mesmo encontrado no colo de útero. (1, 7) Da mesma forma que o câncer do colo uterino, o câncer do canal anal está intimamente relacionado com a infecção pelo HPV, que também apresenta predileção pela junção escamocolunar, possibilitando a realização do exame citológico, que é de fácil execução e baixo custo operacional. O objetivo do exame é detectar alterações displásicas do canal anal e no ânus: neoplasia intraepitelial anal (NIA), podendo ser de alto grau (NIA II e III/carcinoma *in situ*) e baixo grau (NIA I/lesões condilomatosas). (1, 8)

O aumento do número de casos do câncer do canal anal e ânus – o que ensejou vários estudos – indica que programas de rastreamento e seguimento deveriam ser implantados, recomendando-se o exame citológico (convencional ou em base líquida) como rastreamento precoce dessas lesões. (1, 9)

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

O câncer do canal anal tem baixa incidência, correspondendo a 1,5% de todos os tumores detectados no trato digestivo nos Estados Unidos. (6) No Brasil, de acordo com o INCA, a incidência é reportada junto com o câncer colorretal e o câncer nesse seguimento é o 4º tipo mais detectado em nosso país. (6)

Desde 2002 nota-se aumento da incidência do câncer anal em todo o mundo. Esse aumento dos casos ocorre principalmente na população do gênero masculino, constituída por homossexuais e bissexuais, particularmente aqueles infectados pelo HIV, e nos pacientes imunossuprimidos por medicamentos. Há também relatos de elevada ocorrência entre homens e mulheres com atividades sexuais promíscuas. (10)

Atualmente, a etiologia parece estar associada com a participação do papilomavírus humano (HPV) na gênese desse tumor. Dados epidemiológicos, baseados em estudos controlados, têm demonstrado que, na maioria dos casos, esse tipo de neoplasia decorre de infecções adquiridas na mucosa anal, transmitidas por meio de relações sexuais pelos tipos de HPV já reconhecidamente relacionados com o câncer do colo uterino. (10)

A evolução do câncer do colo de útero, na maioria dos casos, dar-se-á de forma lenta, passando por fases pré-clínicas detectáveis e curáveis. Apesar da semelhança que existe entre essas neoplasias, ainda não é sabido no câncer anal o tempo de evolução e a associação com outros fatores relacionados com a coinfeção pelo HIV. (1)

Assim como o câncer de colo de útero, o câncer do canal anal é potencialmente uma doença passível de prevenção, pois seu agente causador é conhecido e detectável por meio de diversos exames. (1)

O objetivo do manejo clínico é identificar e tratar lesões de alto grau e diminuir o risco de desenvolvimento das neoplasias invasoras. (11)

### 2.1 TUMORES DO CANAL ANAL E ÂNUS

#### 2.1.1 Definição

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define como tumores do canal anal e ânus aqueles que surgem ou são predominantemente localizados no canal anal, podendo apresentar-se principalmente como adenocarcinomas ou carcinomas escamosos associados à

infecção viral pelo papilomavírus humano (HPV). (12) São eles caracterizados pela invasão local e agressividade, incluindo infiltração da musculatura esfíncteriana.

Os tumores no canal anal são mais frequentes em mulheres, enquanto que os que surgem nas bordas do ânus são mais comuns nos homens. Dentre os tumores que acometem o canal anal e ânus, o carcinoma escamoso é o mais comum, sendo responsável por 85% dos casos. (12)

### **2.1.2 Histórico**

A primeira descrição da lesão anal pré-invasiva não distinguiu a região anal do canal anal. Essas lesões, inicialmente cutâneas, foram descritas como Doença de Bowen e carcinoma *in situ*. Em 1962 houve a necessidade de distinguir os tumores que se originam das regiões anal da perianal, com fulcro em sua diferença biológica e seu comportamento clínico. Após a observação da presença de carcinoma *in situ* adjacente a uma verruga anal, feita por Oriel e Whimster em 1971, foi sugerida a relação da Doença de Bowen com infecção viral. (11)

Em 1981, Fenger e Bichel publicaram o primeiro estudo de alterações displásicas do canal anal. Em 1986, os mesmos autores descreveram a presença de displasia e carcinoma *in situ* adjacentes à maioria dos carcinomas anais, mostrando que as lesões anais compartilham um padrão de HPV oncogênico visto nas lesões cervicais e outras áreas do trato anogenital baixo. (11)

Somente após a documentação do subtipo 16 do HPV no câncer cervical que se tornou plausível a associação do HPV com o câncer e lesões pré-cancerosas anais. Essa relação foi confirmada em 1995 com a documentação dos tipos oncogênicos do HPV. (11)

### **2.1.3 Anatomia e histologia da região anal**

O canal anal fisiológico ou cirúrgico é tradicionalmente definido como a porção terminal do intestino grosso, que se estende desde o nível do assoalho pélvico (anel anorretal ou junção da porção puborretal do músculo elevador do ânus com o esfíncter anal externo) até a margem anal. Neoplasias originadas em diferentes regiões como margem anal ou região perianal eram classificadas igualmente como lesões do canal anal. Tal fato estimulou uma padronização da nomenclatura entre clínicos e cirurgiões devido a características inerentes a história natural das diferentes localizações. Em 2007, a *American Colorectal Surgeons*

propôs uma nova terminologia baseada em regiões de referência que poderiam ser facilmente visualizadas pelo examinador, além disso, introduziram uma nova área de transição. Tais recomendações foram largamente adotadas e aceitas pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) para estadiamento do câncer anal. Dessa forma, o canal anal passou a ser referido como ‘região anal’ e dividido em três partes sendo estas; canal anal, região perianal e pele. (13)

Assim definido macroscopicamente, o canal anal corresponde ao segmento que é envolto pelo esfíncter anal interno, possuindo cerca de 4 cm de comprimento. Tem seu início na junção anorretal e a junção muco-cutânea como seu final. A linha pectínea está localizada aproximadamente em seu ponto médio. A zona de transição instituída compreende área 6 a 10 mm proximal à linha pectínea ou linha denteada com cerca de 4 a 5 mm de extensão onde o epitélio do reto é substituído pelo epitélio *urothelium-like*, local em que podem ser encontradas células escamosas sobre o epitélio colunar.

Lateralmente o canal anal relaciona-se com a fossa ísquio-anal, anteriormente limitado pelo corpo perineal, local que separa canal anal do terço inferior da vagina nas mulheres e do bulbo peniano ou uretra membranosa nos homens. O topo da junção anorretal é chamado de flexura perineal, região que forma um ângulo agudo posteriormente produzido pela inserção do músculo pubo-retal.

O canal anal possui uma camada de epitélio que recobre o tecido subepitelial altamente vascularizado e duas camadas musculares sendo uma circular e outra, mais externa, em disposição longitudinal. Assim, o canal anal é circundado pelos esfíncteres anal externo e interno. O esfíncter externo é longitudinal e constituído de musculatura esquelética voluntária. O músculo interno consiste em musculatura lisa controlada pelo sistema nervoso autônomo e se continua com a musculatura lisa do retossigmoide. A partir de aproximadamente 2 cm da borda anal até a junção anorretal, encontramos de 6 a 10 colunas longitudinais na mucosa tendo cada uma artéria e veia. A borda inferior destas colunas formam conjuntamente uma linha, chamada de linha denteada ou linha pectínea. O pecten, nesta região, apresenta-se como epitélio transicional. (13)

Histologicamente o canal anal é dividido conforme o epitélio de revestimento em: zona colorretal – revestida por mucosa glandular; zona de transição – epitélio escamoso e glandular e porção distal – epitélio escamoso.

Também podem ser observadas células mucinosas, células endócrinas e melanócitos. (14)

#### 2.1.4 Classificação dos tumores

De acordo com a OMS, os tumores do canal anal são classificados de acordo com estruturas anatômicas e histológicas, como: 1 - carcinoma escamoso, incluindo condiloma acuminado, displasias planas e carcinoma escamoso invasor e suas variantes; 2 - Adenocarcinoma, incluindo adenocarcinoma da glândula anal, adenocarcinoma mucinoso relacionado a fístulas e adenocarcinoma intraepitelial ou Doença de Paget; 3 - neoplasias neuroendócrinas, incluindo tumores carcinoides, carcinoma de pequenas células, carcinoma neuroendócrino não pequenas células de alto grau; 4- melanoma maligno; 5 - tumores mesenquimais, e 6 - linfoma. (12)

#### 2.1.5 Nomenclatura das lesões anais

A dificuldade para a definição histopatológica das lesões pré-cancerosas anais decorre da semelhança morfológica entre elas; e a padronização da nomenclatura é importante, especialmente como guia para manejo correto dessas lesões. No tocante às lesões anais pré-cancerosas, quando associadas com o HPV, ainda persistem controvérsias acerca de sua nomenclatura. (11)

##### 2.1.5.1 Citopatologia

Existe alto grau de semelhança entre os epitélios do canal anal e do colo uterino, o que faz com que a nomenclatura das lesões citológicas anais fosse baseada nas classificações das lesões cervicais. (1)

O termo displasia foi introduzido na década de 1950 para designar atipia epitelial cervical intermediária entre epitélio normal e carcinoma *in situ* (CIS). A displasia recebeu uma categorização adicional em três grupos: leve, moderada e grave, dependendo do grau de comprometimento da espessura epitelial por células atípicas. Posteriormente, em 1968, o termo neoplasia intraepitelial cervical (NIC) foi introduzido para indicar atipias restritas ao epitélio. As neoplasias intraepiteliais foram divididas em graus I, II, III. (20) A NIC I correspondia à displasia leve, a NIC II a displasia moderada e a NIC III a displasia grave e CIS.

Na década de 1980 as alterações anatomopatológicas, tais como atipias coilocíticas ou condilomatosas, associadas à infecção pelo HPV, foram cada vez mais identificadas.

Coilocitos são células atípicas com uma cavitação perinuclear no citoplasma que indica alterações citopáticas devidas à infecção viral pelo HPV. Isso levou ao desenvolvimento de um sistema histopatológico simplificado em dois graus. Assim, em 1990, foi proposta uma terminologia baseada em dois graus da doença — NIC de baixo grau, que correspondia a anomalias compatíveis com o efeito citopático pelo HPV e NIC I; e NIC de alto grau, que correspondia às NIC II e III. As lesões de alto grau foram consideradas precursoras das neoplasias invasoras. (15)

Em 1988, o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos realizou um simpósio para propor um novo esquema de registro dos resultados da citologia cervical (Relatório do Simpósio de NIC, 1989). (16) As recomendações desse simpósio e a revisão posterior realizada em 1991 ficaram conhecidas como Sistema de Bethesda (TBS). As características principais dessa proposição foram a criação do termo lesão intraepitelial escamosa (SIL – *Squamous Intraepithelial Lesion*) e um esquema de dois grupos, que compreendia lesão de baixo grau (LSIL – *Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion*) e alto grau (HSIL – *High Grade Squamous Intraepithelial Lesion*). A classificação de TBS denomina alterações condilomatosas (HPV) e NIC I com o LSIL, enquanto HSIL compreende NIC II e III.

O TBS de 1991 não incluiu outras localizações. Contudo, existem paralelos entre estudos cervicovaginais e anorretais, e a terminologia desse sistema foi então empregada na descrição da citologia anorretal. Em 2001 o TBS foi reavaliado. (17)

#### 2.1.5.2 Histopatologia

Em 1986 foi introduzida a terminologia de neoplasia intraepitelial do canal anal (NIA), semelhante às lesões cervicais. Essas lesões foram igualmente divididas em 3 graus: NIA I, II e III. Em meados da década de 1990, a *International Agency for Research on Cancer* nomeou lesões intraepiteliais escamosas de baixo (NIA I) e alto grau (NIA II/III), através da avaliação do risco do desenvolvimento de câncer induzido pela infecção do HPV, como alternativa à classificação em NIA. Em relação aos espécimes cirúrgicos originados da região anal ou perianal, a terminologia anatômica segue a definição proposta pela AJCC. (11)

## 2.2 PAPILOMAVÍRUS HUMANO

### 2.2.1 Etiopatogênese do HPV

Estudos epidemiológicos identificaram diversos pacientes susceptíveis à infecção pelo HPV. São eles: pacientes HIV positivos, homens jovens com atividade sexual precoce, longa e promíscua, portadores de verrugas genitais e não usuários de preservativos. (18) As altas prevalências do HPV nos grupos considerados de risco estão relacionadas principalmente ao comportamento sexual.

Atualmente foram descritos mais de 100 subtipos de HPV, dentre os quais cerca de 40 deles estão associados com a infecção do trato genital inferior. (19) Os subtipos dos HPV oncogênicos são: 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58, 35, 59, 56, 51, 39, 68, 73, 82, 53, 66, 70. Os não oncogênicos são: 6, 11, 40, 42, 43, 44/55. Alguns estudos demonstram o mesmo perfil de risco para ambas as infecções. (20)

A prevalência do HPV oncogênico na região anal em pacientes HIV positivos é de cerca de 65,6%. O subtipo oncogênico mais comum é o HPV 16, mas outros tipos como 58, 52, 51 e 18 são frequentemente encontrados. Atualmente, vários subtipos de HPV vêm sendo reportados e há variável mudança de sua prevalência, dependendo de uma região geográfica específica. (18)

Em homens HIV positivos, é comum a infecção por múltiplos HPV oncogênicos, chegando essa prevalência a 57%. Em pacientes com CD4 abaixo de 200 mm<sup>3</sup>, observa-se uma chance maior de infecção pelos tipos oncogênicos. (1)

### 2.2.2 História natural da neoplasia intraepitelial anal

A história natural das lesões anais ainda é incerta, mas, acredita-se que a NIA seja lesão precursora do carcinoma anal. Muito embora as lesões de alto grau pareçam ter baixo potencial para transformação maligna em pacientes imunocompetentes, espera-se que tenha incidência aumentada em pacientes imunodeprimidos. (21, 22) Estudos que têm tentado comparar a incidência das NIA em pacientes portadores ou não de HIV tem sugerido outros fatores que poderiam se comportar como risco em sua história natural, além da influência isolada da imunossupressão. Essa evolução de NIA para lesões invasoras nesse grupo de pacientes também é incerta ainda, mesmo sabendo que a lesão intraepitelial anal de alto grau é precursor direto do câncer anal. (1, 22, 23)

Dentre os vários agentes etiológicos que causam doenças na região anal em pacientes HIV positivos, o HPV é o mais comum. Existe a possibilidade de progressão das NIA para carcinoma invasor, entretanto, o vírus por si só não é suficiente para carcinogênese e progressão tumoral. Os fatores ligados ao desenvolvimento das NIA, tanto de alto como de baixo grau, e a incidência elevada de recidivas dessas lesões não estão completamente esclarecidas. A prevalência do HPV em lesões anogenitais de pacientes HIV positivos não é suficiente para explicar a grande proporção de NIA neste grupo. (9, 22) Alguns fatores associados à grande incidência de NIA em pacientes portadores do HPV são a alta carga viral do HPV 16, a presença de HIV juntamente com contagem de CD4 inferior a 200/mm e presença de múltiplos tipos de HPV na infecção por este agente. (23)

As diferenças da história natural entre lesões precursoras do câncer anal e cervical podem justificar a ausência do claro benefício do rastreamento. É sabido que cerca de metade das lesões cervicais intraepiteliais de alto grau regredem espontaneamente. Apesar da grande incidência de lesões anais de alto grau nos grupos de risco, não observamos incidência de neoplasia anal na mesma proporção. Em MSM HIV positivo, recente metanálise mostrou taxa de incidência de câncer anal na proporção de 0,16% das NIA de alto grau. (8, 24)

Apesar da incerteza em relação à história natural das NIA, estudos observacionais relataram incidência de NIA de alto grau entre 15% e 54% no período de 2 a 4 anos. (23)

### **2.2.3 Papel do HPV na carcinogênese**

A carcinogênese é um processo de múltiplas etapas que envolvem tanto mudanças genéticas quanto epigenéticas, culminando na ativação de proto-oncogenes e/ou inativação dos genes supressores de tumor. (25) A passagem da célula pelas diversas fases do ciclo celular é realizada de forma rígida por genes controladores do ciclo. Uma célula maligna difere de uma célula normal, principalmente pela sua independência desse controle, sendo necessário um acúmulo de mutações nos cromossomos para tal transformação. (26) Alguns subtipos de HPV, nos últimos anos, têm sido responsabilizados pelo desenvolvimento de malignidade nas regiões que comumente infectam, compreendendo, na mulher, o períneo, vulva, vagina, colo de útero e região anal; e nos homens, pênis, uretra, bolsa escrotal e região anal. (27, 28) Além das áreas comumente descritas na literatura, algumas das pesquisas têm mostrado a presença de HPV de alto risco oncogênico e sua possível associação com desenvolvimento de malignidade na região da orofaringe e cordas vocais. (29)

### 2.2.3.1 O vírus HPV

O papilomavírus humano é classificado na família *Papillomaviridae*, gênero *Papillomavirus*. (30, 31) São vírus não envelopados, de simetria icosaédrica, com 72 capsômeros e um genoma de ácido desoxirribonucleico (DNA) de fita dupla circular, constituindo-se de aproximadamente 6.800 a 8.400 pares de base (pb). (30, 32) A região *early* (E) é formada pelos genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7. É expressa em células infectadas não produtivas e células transformadas. Além disso, a região E codifica proteínas reguladoras virais. E1 tem relação com replicação viral, E2, com a transcrição e replicação, E4, com a maturação viral e alteração da matriz intracelular. E5, E6 e E7 estão envolvidos na transformação celular. (33, 34) A região *late* (L) é formada pelos genes L1 e L2, que codificam as proteínas do capsídeo e são expressas somente em células infectadas. A proteína L1, também chamada de proteína maior do capsídeo, apresenta sequência de resíduos de aminoácidos que é específica para o gênero. A proteína L2, também chamada de proteína menor do capsídeo, é altamente específica para o tipo. A presença de L1 é correlacionada à presença de HPV intacto nos tecidos, muito usada como alvo na identificação viral em métodos que utilizam biologia molecular. (35) Somando-se a isso, o genoma é dotado de uma região reguladora *Long Control Region* (LCR) ou *Upstream Regulatory Region* (URR), variando de 400 a 1000 pb, localizadas entre as regiões L1 e E6. Nessa região, existem sequências estimuladoras e repressoras da transcrição viral, além da origem da replicação. (34)

### 2.2.3.2 Expressão do genoma do HPV

O ciclo de vida produtiva do HPV é dependente da diferenciação celular. (36) A infecção inicial por HPV ocorre nas células localizadas nas camadas basais do epitélio escamoso estratificado. Após a entrada do HPV na célula, o genoma viral se estabiliza na forma de elementos extracromossômicos no núcleo e o número de cópias virais aumenta para aproximadamente 50 por célula. Ao se dividirem, essas células infectadas distribuem equitativamente o DNA viral entre as células-filhas. Uma das células-filhas migra da camada basal e inicia o programa de diferenciação celular. As demais células-filhas continuam dividindo-se na camada basal e servem de reservatório de DNA viral para as posteriores divisões celulares. (37, 38)

Na fase produtiva da infecção, as células basais sofrem aumento na taxa de proliferação. No tecido infectado, na medida em que as células se diferenciam, ocorre acúmulo de vírus replicados nas células superficiais. Ocorre nessa fase acúmulo do material proteico relacionado ao capsídeo e de ácidos nucleicos. À microscopia eletrônica, nas células infectadas por HPV, observa-se uma zona clara perinuclear que não possui organelas celulares. Ocasionalmente ela é preenchida por material granular fino que se compacta próximo à membrana nuclear. O núcleo aparece ora picnótico, ora repleto de vesículas. Nessas células observa-se maior quantidade de partículas virais livres (epissomos) que também podem se apresentar associados à cromatina. Se a membrana nuclear está íntegra, os vírions são observados no núcleo, mas se ela se rompe, podem ser observados no citoplasma. A replicação viral em altas taxas, a transcrição de genes tardios (L) e a produção de vírions estariam limitados à diferenciação celular. (35)

A integração do genoma viral parece ocorrer ao acaso. Se, por um lado, não há sítio preferencial de integração no genoma, por outro, há grande especificidade no local de clivagem do DNA circular do vírus, como no caso dos tumores malignos, nos quais a integração do DNA viral ocorre em razão da clivagem na região dos genes E1/E2, com consequente interrupção do controle transcricional exercido pelo gene E2 (39, 40). Os genomas virais com mutações em E1 (*Open Read Frame – ORF*) induzem à perda da capacidade de manutenção do estado epissomal do HPV, por uma deficiência na replicação viral, bem como na transcrição de genes de expressão tardia. (38) Após a infecção viral, os primeiros genes a se expressarem são os genes E1 e E2, cujos produtos estão envolvidos na replicação do genoma viral. Os genes E1 e E2 agem independentemente quanto aos sítios de ligações na origem de replicação (*URR*) do papilomavírus, porém, poderá ocorrer a interação das proteínas E1 – E2, de modo a formar um complexo multimérico que auxilia na replicação viral. (37, 39) O produto do gene E1, uma fosfoproteína nuclear de 68 kDa com atividade ATPase de DNA helicase, liga-se na origem de replicação do DNA viral e revela-se essencial para a replicação do papilomavírus. (41) A proteína codificada pelo gene E2 é um fator que regula a transcrição dos oncogenes E6 e E7. Além de atuar como forte fator transcricional, recentemente foi observado que a transcrição, a partir dos promotores da região E6 do HPV 16 e 18, é fortemente reprimida por essa proteína em queratinócitos humanos. (35, 42)

A proteína E6 do HPV de alto risco oncogênico associa-se à proteína p53, que regula a passagem pelas fases G1/S e G2/M. O gene E6 recruta as proteínas celulares, como é o caso das proteínas da família AP1 (E6-AP), que funciona como uma ubiquitina ligase – atua no complexo p 53, podendo impedir o efeito supressor da proteína no ciclo celular. (38) A função

principal do gene E7 do HPV de alto risco é desregular a maquinaria do ciclo celular da célula infectada principalmente pela indução da transição da fase G0/S. Isso é efetuado através da ativação de vários genes celulares pelo gene E7 e pela interação dessa proteína com as proteínas que regulam o ciclo celular. (43) A proteína E7 do HPV de alto risco oncogênico liga-se às proteínas da família pRb. Essa interação permite que E2F atue na ativação constitutiva dos fatores transcricionais, o que levaria à progressão do ciclo celular. A proteína E7 também forma complexos com ciclinas A e E, bem como provoca a inativação de p21 e p27. (43) Os genes E6 e E7 são considerados os genes de maior poder de transformação do papilomavírus humano. (35) Acredita-se que a expressão das proteínas E6 e E7 sejam responsáveis pelo início e manutenção do processo que leva ao câncer. (41, 44)

#### 2.2.3.3 Interação do vírus HPV com o vírus do HIV

É evidente na literatura a alta prevalência e incidência da infecção pelo HPV em pacientes HIV positivos antes mesmo da era da terapia antirretroviral. Recentes evidências sugerem que metade das infecções pelo HPV em mulheres HIV positivas tenha ocorrido através do contato sexual recente, enquanto a outra metade representa uma reativação do subtipo de HPV previamente adquirido. Dessa forma, foi observada clara relação com a diminuição progressiva dos níveis de CD4 e o aumento da detecção dos subtipos de HPV no ânus e no colo de útero, e que a imunossupressão avançada pode estar associada com aumento da replicação do HPV. Entende-se a importância do papel da coinfeção do HPV/HIV na patogênese das lesões intraepiteliais anogenitais, embora isso ainda não esteja exatamente claro. Mulheres HIV positivas apresentaram 5 a 7 vezes mais chance de desenvolver câncer anal e cervical em comparação com a população geral. (19)

Ao contrário do benefício da terapia antirretroviral na incidência do sarcoma de Kaposi e linfomas não Hodgkin, o seu efeito nas lesões anogenitais associadas ao HPV ainda é um tema de intenso debate. Estudos não vêm demonstrando efeito da TARV na positividade do HPV cervical, enquanto outros estudos têm mostrado uma alta taxa de regressão de lesões cervicais de alto grau com uso da TARV. Nas lesões intraepiteliais anais, o seu efeito é ainda menos conhecido. As incidências de câncer anal continuam altas a despeito da utilização da TARV. Paradoxalmente, o aumento da sobrevivência do HIV proporcionado pelo tratamento medicamentoso, tem exposto estes pacientes à elevada incidência das neoplasias anais. (23)

Ao analisarmos os diversos dados da literatura, podemos observar a relação na perda da resposta imune ao HPV na mucosa anal com o surgimento, persistência ou reativação de

lesões de alto grau que têm potencial de progredir para o câncer. Entretanto, essa progressão depende de outros fatores não imunes, como expressão do gene hospedeiro secundário à instabilidade cromossômica induzida pelo HPV. No que tange à interação direta do HPV com HIV, além da instabilidade cromossômica existe também uma ação da proteína HIV – 1 *tat* no HPV, ativando o seu controle e aumentando a expressão dos oncogenes E6 e E7. Entretanto, essa relação foi observada somente *in vitro*. (19)

### 2.3 RASTREAMENTO, SEGUIMENTO E TRATAMENTO

O objetivo do rastreamento do câncer é identificar e tratar as lesões precocemente, com o intuito de diminuir a mortalidade futura causada por esta doença. (1)

Embora não existam estudos randomizados que comprovem a eficácia dessa estratégia, o rastreamento do câncer anal vem sendo discutido e incentivado nos grupos considerados de risco ao desenvolvimento das NIA. A magnitude deste problema está na alta incidência das lesões precursoras do câncer anal em um grupo muito específico de pacientes, tornando-se um importante tema em saúde pública e motivo de intensos debates e controvérsias quanto à implementação da prevenção primária e secundária para as neoplasias anais. (45)

As estratégias não são homogêneas, entretanto é recomendado nos seguintes pacientes: HIV positivos, incluindo homens que praticam sexo com outros homens; homens HIV negativos que praticam sexo com outros homens; todos os homens e mulheres HIV positivos (independentemente de opção sexual); pacientes imunossuprimidos por transplantes ou drogas; mulheres com história de infecção pelo HPV no trato genital inferior; e todas as pessoas com vida sexual promíscua. (1)

Quanto à epidemiologia, diversos estudos têm mostrado a importante prevalência do HPV em MSM. (24) É importante ressaltar a prevalência de infecções pelo HPV fora do contexto da prática de sexo anal receptivo, presente entre mulheres e homens que praticam sexo com mulheres. Tal fato pode ser empiricamente explicado pela presença do HPV em toda região ano-genital, presença de autoinfecção através do estímulo digital e a íntima relação de sua prevalência com número de parceiros sexuais. (46)

Todos os pacientes de risco deveriam ser examinados, incluindo o toque retal, principalmente porque as lesões minimamente invasoras podem ser detectáveis ao toque mesmo antes de qualquer sinal ou sintoma. (1)

A sensibilidade da citologia anal é semelhante a citologia cervical na detecção de lesões intraepiteliais anais de alto grau, porém com menor especificidade devido a maior heterogeneidade dos grupos de risco em relação às pacientes com lesões cervicais. Outros fatores que podem ser limitantes na evidência do rastreamento são a falta de expertise na realização da anoscopia de alta resolução por profissionais envolvidos no seguimento e dificuldade e fase de padronização na interpretação dos resultados das citologias anais. A conduta quando identificado uma lesão de alto grau anal também é motivo de debate devido chances de dor, sangramento e estenose em excisões mais amplas na mucosa anal. (47)

O modelo do seguimento das lesões anais é semelhante ao modelo de seguimento do câncer de colo de útero, em que a citologia anal é usada para detecção de lesões precoces para encaminhamento dos pacientes para anoscopia de alta resolução com biópsia dirigida. (1)

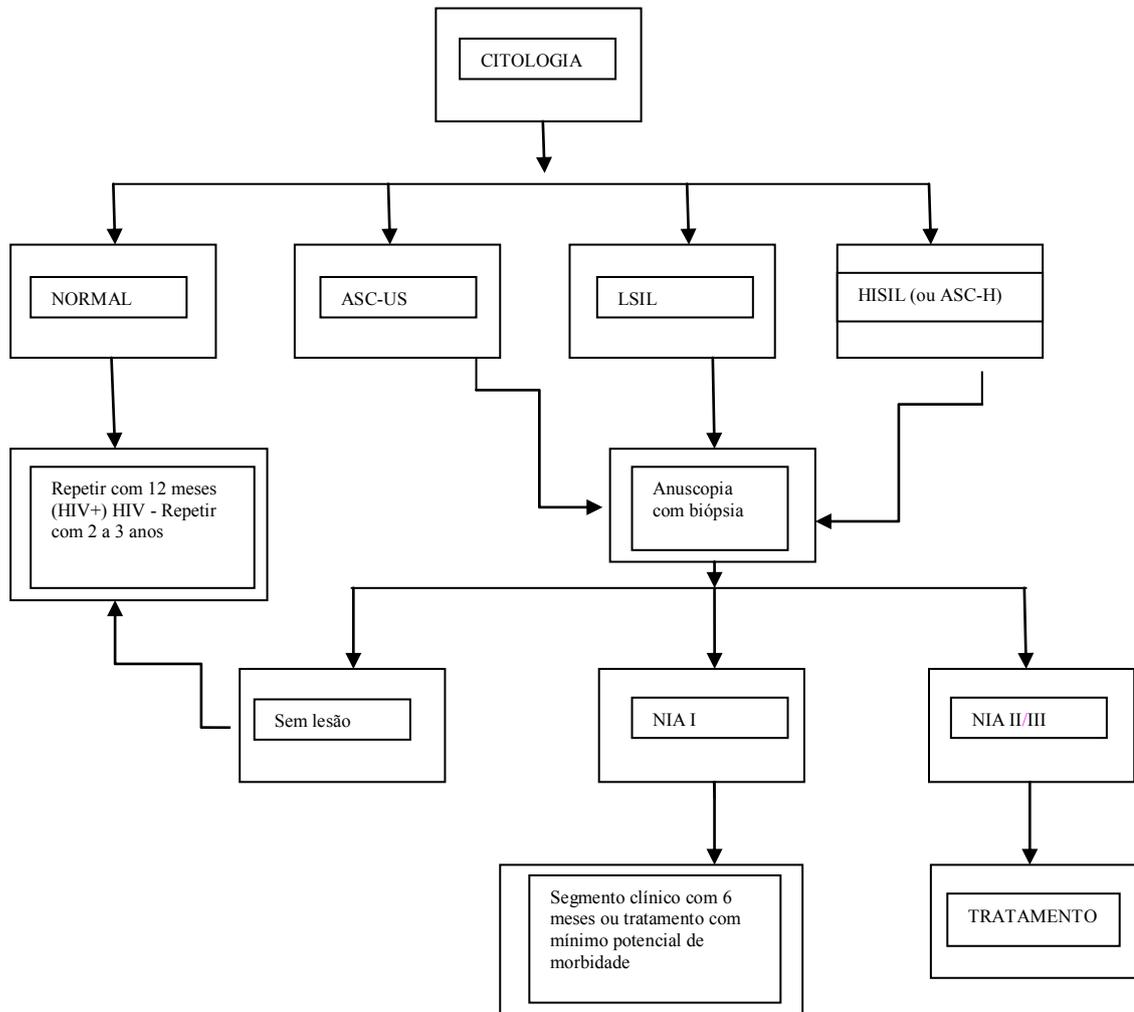
A aplicação dos princípios de manejo no seguimento clínico das NIC vem sendo defendida nas lesões anais. Constata-se que nas lesões cervicais e vulvares existem diversos tipos de tratamento: ablação (crioterapia, laser, eletrocoagulação e fulguração), excisão cirúrgica e terapias tópicas (imiquimod, cauterização com ácido tricloroacético ou 5-fluoracil). Todavia, ainda não está claro o efeito do tratamento e do seguimento desses pacientes em virtude da incerteza do benefício e da morbidade do tratamento. Novos estudos deverão ser realizados para melhor esclarecimento. (1) Contudo, ao longo dos últimos 3 anos, os tratamentos para lesões intraepiteliais anais tem emergido apresentando resultados positivos na diminuição do grau das lesões, o que representa um passo atrás na progressão destas para lesões invasoras. Porém, permanece ainda como desafio observar se a diminuição na taxa de conversão para lesões invasoras estão associadas a impacto na sobrevida por câncer da região anal. (48) O *imiquimod* tem sido largamente a droga mais estudada para verrugas genitais sendo específica para infecção pelo HPV. Outros tratamentos tópicos têm sido utilizados pela boa tolerabilidade quando utilizados em baixas doses por períodos prolongados. Sabe-se também, que de acordo com apresentação clínica das lesões, algumas terapias parecem ser inadequadas. Exemplo desse fato é a presença de lesões nodulares, que apresentam melhor resposta a tratamentos cirúrgicos. Outro fator na escolha da terapia é o grau da lesão intraepitelial, sendo que lesões de alto grau apresentam maior taxa de recidiva. Estudos comparando os diferentes métodos de tratamento são escassos e muitos estão em andamento. (48)

Em outubro de 2009, a vacina quadrivalente para o HPV foi aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para jovens e adultos jovens com idade entre 9 e 26 anos com objetivo de prevenir verrugas genitais causadas pelos os subtipos 6, 11 e lesões de alto

grau causadas pelos subtipos 16 e 18. O tratamento revelou-se seguro e imunogênico mesmo em pacientes HIV positivos. Estudos recentes têm testado sua eficácia em grupos considerados de risco. Notou-se, ainda, redução da infecção persistente por esses subtipos de HPV em pacientes não expostos previamente. (49)

A prevenção e a detecção precoce do câncer do canal anal e ânus provavelmente tem importante papel na sobrevida dos pacientes. Pacientes com cânceres localizados têm sobrevida de 5 anos em cerca de 80%, enquanto naqueles com lesões metastáticas essa sobrevida cai para cerca de 30%. A combinação de quimioterapia com radioterapia é o padrão-ouro para o tratamento nos cânceres anais invasores e localizados. (1)

Figura 1: Fluxograma para o rastreamento citológico das lesões anais.



Cancer Cytopathology, 2011

Considerando a semelhança que existe entre a mucosa do canal anal e a vaginal (junção escamocolunar), os critérios usados para a análise citológica da mucosa vaginal

poderiam ser transpostos para a anal. Assim, classificando e considerando as lesões neoplásicas, o exame citológico apresenta vantagens não só no sentido de diagnosticar e graduar a lesão, seja ela uma lesão inicial ou invasiva, como também para detectar uma lesão pré-maligna ou recidivada. (1, 50)

Visto que a implementação deste rastreamento ainda é motivo de intensos debates, surgem outros aspectos que poderiam colocar em questão seu benefício ainda incerto, como o impacto psicossocial. O processo de todo exame envolve muitas dimensões pessoais relacionados à sexualidade. A anoscopia de alta resolução se mostrou de grande desconforto e muitas vezes dolorosos para os pacientes, além de, após tal experiência os pacientes passarem por importante período de ansiedade e estresse com a espera de uma possível má notícia. Muitas vezes diferentes resultados entre lesões cancerosas e pré-cancerosas em amostras citológicas ou histopatológicas resultam em um difícil entendimento dos pacientes podendo agravar o nível de preocupação dos mesmos quanto ao surgimento de câncer. Os frequentes retornos para repetição dos exames durante o programa proposto podem criar um grau de aversão a tal rotina. Logo, diferentes níveis de educação, experiências pessoais, estado psicológico são potenciais agravantes ou moderadores do impacto psicossocial do rastreamento do câncer anal e lesões pré-neoplásicas, estimulando a necessidade do maior entendimento destas questões pelo médico assistente e individualização da relação médico-paciente. (51)

### **2.3.1 Toque retal**

É um exame de fácil execução e pode ser realizado ambulatoriamente. Seu principal objetivo é o diagnóstico das lesões invasoras ainda assintomáticas. (1)

O toque retal é etapa essencial do exame clínico para exclusão de câncer. Este deve ser realizado antes da anoscopia de alta resolução para identificação de massas firmes e extensas. Todo o canal anal pode ser examinado com esta técnica sendo que sua porção mais proximal está no máximo a 6 cm da borda anal, região do anel anorretal. O exame é precedido da visualização direta da margem anal e da pele perianal com paciente podendo ser posicionado de diferentes formas como decúbito lateral direito, esquerdo, litotomia ou pronado. Tipicamente o mesmo é posicionado em decúbito lateral esquerdo e posição fetal. (52)

### 2.3.2 Citologia Anal

A citologia anorretal ou citologia anal se tornou uma ferramenta mais comum na avaliação nas lesões intraepiteliais anais causados pela infecção pelo HPV, principalmente na população de risco. Dessa forma otimização de sua técnica necessita ser padronizada para melhores resultados e sua comparação. Assim como na citologia cervical, a técnica para coleta do material é ponto crítico para qualidade da amostra para representar toda morfologia do epitélio. A instrução do paciente também se faz etapa importante para boa amostragem como evitar enemas e coito anal receptivo 24 horas antes do exame. Quanto ao posicionamento, o decúbito lateral esquerdo tem sido preferido, e diferentes tipos de materiais como *swab* não possuem diferença demonstrada em estudos. A autocoleta pode aumentar a acessibilidade e aceitabilidade para rastreamento das lesões intraepiteliais anais principalmente em grupos de risco que apresentam maior sensibilidade a tal método. A coleta pelo médico exige o mínimo treinamento e prática para adequabilidade da amostra.

Quanto à preparação da amostra, tanto citologia em base líquida e convencional, necessitam de coloração pelo método de Papanicolaou. Alguns estudos têm comparado às duas técnicas, porém, sem grandes diferenças entre os resultados quando realizados por clínicos experientes. (53)

De forma geral, a sensibilidade e especificidade da citologia anorretal dependem em parte do tipo de preparação, da definição dos resultados anormais e da população em estudo. Em uma revisão sistemática dos resultados de citologia anal, pacientes HIV positivos apresentam grande sensibilidade para detecção de lesões intraepiteliais anais, porém com baixa especificidade. (53)

Embora a citomorfologia anal seja similar a cervical, algumas diferenças estão presentes como a presença de numerosas células escamosas anucleadas nos esfregaços anais. Os coilócitos verdadeiros também são infrequentes nos esfregaços anais. Isso pode ser explicado pela queratinização citoplasmática dificultando a formação das características perinucleares que distinguem o coilócito. Em contraste com o colo uterino, alterações degenerativas são mais comuns e alterações reativas e reparativas são menos comuns em esfregaços anais, exceto na presença de infecções por agentes como herpes vírus. (54)

As lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (LSIL) refletem a infecção pelo HPV e as alterações morfológicas encontradas nos esfregaços anais são alterações nucleares em células escamosas superficiais e intermediárias. Essas alterações nucleares incluem aumento, variável hiper cromasia, alterações na cromatina e membrana nuclear irregular.

Outras alterações podem incluir coilócitos, queratinização citoplasmática e bi e multinucleação. As atípicas em células escamosas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásico (ASC-US) são resultados de infecção também pelo HPV que não conseguimos aplicar rigorosamente os critérios de LSIL. (54)

Lesão intaepitelial escamosa de alto grau (HSIL) são alterações morfológicas do efeito da transformação da transcrição ativa do HPV nos genes E6 e E7. Origina-se na zona de transição e usualmente se manifestam como células pequenas e imaturas tipo metaplásicas isoladas ou em pequenos grupamentos. Hiper Cromasia nuclear é usual, com variação no tamanho nuclear, forma, membrana nuclear com contornos irregulares e alterações na relação núcleo / citoplasma. O núcleo pode ser pálido. O citoplasma é variável, podendo ser denso ou queratinizado. São frequentes nas amostras anais os diagnósticos de LSIL e HSIL no mesmo esfregaço. No diagnóstico de atípicas em células escamosas de significado indeterminado não se podendo afastar lesão de alto grau (ASC-H), as alterações são sugestivas, porém não conclusivas para HSIL. (54)

O carcinoma escamoso anal é similar ao do colo uterino, com variável número de células malignas, frequentemente com células queratinizadas. (54)

### 2.3.2.1 Citologia esfoliativa convencional

O exame citológico é prática utilizada na clínica ginecológica desde o início do século XX, quando Schauenstein (1908) e Rubin (1910) descreveram as lesões pré-cancerosas do colo uterino. Em 1928, Papanicolaou e Babés relataram a presença de células cancerosas no esfregaço de colo uterino e sugeriram a possibilidade de o método citológico vir a ser utilizado no diagnóstico do câncer do colo uterino (apud Gompel, 1997). A citologia esfoliativa é realizada a partir de um esfregaço simples, colhido com escova ou espátula de madeira ou metálica, que, quando friccionadas sobre a superfície do colo uterino, podem recolher células de todas as camadas do epitélio. Essas células podem fornecer informações importantes sobre eventuais lesões, permitindo não só o diagnóstico, como também o acompanhamento de pacientes previamente tratadas, no sentido de identificar possíveis recidivas. Existem também alterações citopáticas preditivas da ação viral, bem como de lesões inflamatórias, neoplásicas e displásicas, que podem ser avaliadas por esse método. (55)

A coleta citológica convencional é de fácil execução, não agressiva, de baixo custo operacional. A baixa sensibilidade da técnica pode ser atribuída a diferentes fatores: coleta

inadequada da amostra, baixa celularidade, artefatos técnicos de dessecação, material fecal e erro na técnica ou interpretação subjetiva dos achados morfológicos. (56, 57)

Palefsky et al., em 2009, mostraram sensibilidade de 87% na detecção das lesões precursoras na citologia convencional (CC) em pacientes homens HIV positivos, e de 55% em homens não HIV positivos que praticam sexo com outros homens (MSM). (58) A especificidade foi de 42% em homens HIV positivos e de 81% em HIV negativos MSM. A taxa de falso-negativo e falso-positivo na CC anal ocorre principalmente pela falta de experiência dos patologistas. Segundo o Colégio Americano de Patologistas, de todos os casos de NIA de alto grau, apenas 65% foram diagnosticadas corretamente contra 85% das NIC. (1)

#### 2.3.2.2 Citologia em base líquida

A citologia em base líquida (CBL) foi proposta em 1991 por Hutchinson. Dispendiosa, é uma nova técnica citológica que vem sendo utilizada por oferecer leituras mais purificadas, livres de detritos celulares e restos fecais. Esse método é considerado como importante alternativa à citologia convencional, especialmente pela menor perda celular no preparo da amostra e de melhor distribuição, menor quantidade de material fecal na coleta anal e menor chance de artefato de dessecação. (53, 56) As células são fixadas em meio líquido, ocorrendo preservação de proteínas, o que possibilita a análise molecular da amostra. (7, 57, 59, 60)

A literatura é controversa quanto à acurácia do método. Estudo recente revelou que a amostra cervicovaginal colhida em base líquida não demonstra aumento de sensibilidade quando comparada ao método convencional. (61) Porém, grande parte dos estudos mostra uma queda no número de casos insatisfatórios e aumento de sensibilidade na detecção de anormalidades citológicas quando se compara CC e CBL com o exame histopatológico. (62) Ademais, os meios líquidos possibilitam a realização de testes complementares de biologia molecular, como PCR, captura híbrida, *microarrays* e imunocitoquímica. (63, 64)

#### 2.3.3 Anuscopia de alta resolução

A anuscopia de alta resolução é semelhante à colposcopia cervical que tem objetivo de determinar a presença, extensão ou ausência de lesões associadas ao HPV através do exame sistemático de toda junção escamo-colunar, canal anal e pele perianal. Este exame permite

biópsia e até a remoção de lesões intraepiteliais de alto grau. Palefsky et al., em 2012, demonstraram que o mesmo princípio básico da aplicação de ácido acético e lugol podem ser utilizados em toda a superfície do canal anal, para detectar lesões acetobranças suspeitas a serem biopsiadas. (1, 52)

A anoscopia de alta resolução requer treinamento extensivo e experiência para obter melhores resultados. Existe uma longa curva de aprendizado para aquisição da prática no reconhecimento visual das mínimas alterações e coordenação. Sua disponibilidade ainda é limitada devido ao número de clínicos que realizam tal procedimento, infraestrutura e treinamento requerido sendo então reservada principalmente para população de alto risco e até o momento não pode ser vista como uma verdadeira ferramenta para o rastreamento enquanto sua técnica esteja sendo apurada. (52)

Todos os pacientes com alterações citológicas deverão ser encaminhados para a anoscopia. Esse exame possui sensibilidade de 90% e uma especificidade de 19%. Quando associado ao exame citológico há uma melhor especificidade nos diagnósticos das lesões anais. (6)

### **2.3.4 Métodos moleculares de detecção do DNA-HPV**

Em virtude da baixa sensibilidade dos métodos morfológicos e sorológicos, a biologia molecular para detecção do HPV apresentou grandes avanços nos últimos anos. As técnicas de biologia molecular detectam diretamente o ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA) dos agentes infecciosos, apresentando alta acuidade, o que permite o diagnóstico seguro. (65) A detecção direta do DNA do HPV constitui o método mais confiável para identificar o vírus. (66)

O FDA ainda não aprovou nenhum método molecular para a região anal (1)

#### **2.3.4.1 Hibridização com sondas (*Southern blot*, *Dot blot* e captura híbrida)**

Todos os métodos são baseados na análise do DNA celular total. A técnica denominada *Southern blot* foi o primeiro método adotado. Durante muitos anos foi considerado padrão-ouro para identificar o HPV, já que sua especificidade e sua sensibilidade são elevadas. A sensibilidade da técnica de *Dot blot* é menor que a de *Southern blot*. Atualmente, os *kits* para captura híbrida 1 e 2, produzidos pela empresa Digene®, possuem boa acurácia, sendo utilizado na prática clínica. (67, 68) O sistema Digene® de captura

híbrida 2 para HPV de alto risco é solução hibridizadora que utiliza anticorpos na captura dos híbridos que são detectados por quimioluminescência através da amplificação de sinais para detectar 13 tipos de DNA de HPV de alto risco. Os tipos de HPV detectados são: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 59, 59 e 68. Esse teste não determina o tipo específico presente no espécime.

#### 2.3.4.2 Teste de hibridização *in situ* (ISH)

Tem como objetivo investigar a presença do DNA de HPV incluído em núcleos das células infectadas, em um corte histológico a fresco, fixado ou até em esfregaços celulares. Apesar de o ISH ser menos sensível do que o teste *Blot*, ele permite investigar amostras histológicas e realizar estudos retrospectivos. Assim, o ISH é técnica morfológica e molecular mista, que possibilita a avaliação quantitativa, assim como a demonstração do vírus nas células neoplásicas ou normais. Por isso, poderia ser considerada a técnica de escolha para a detecção do DNA viral, mas seu elevado custo faz com que seja desaconselhada em grandes estudos. (68)

#### 2.3.4.3 Reação de cadeia de polimerase (PCR)

Esse método foi desenvolvido por Mullis, em 1987. É técnica enzimática sofisticada que possibilita a amplificação em pelo menos um milhão de vezes de sequência de DNA na amostra do exame. Pode ser aplicada em DNA extraído de tecido fresco ou fixado. Atualmente, é a técnica mais sensível de que se dispõe. Pode ser processada rapidamente (2-3 horas), porém requer notável habilidade e deve ser realizada em laboratórios que disponham de meios especializados de contenção, a fim de se prevenir a contaminação das amostras previamente amplificadas. Tal contaminação pode levar a resultados falso-positivos. A tecnologia do PCR também é bastante flexível, permitindo uma série de modificações que possibilitam seu emprego na análise de uma grande variedade de amostras. Entre as principais técnicas resultantes de modificações da reação de cadeia de polimerase, pode-se citar o RT-PCR, *nested PCR*, *multiplex PCR*, PCR a partir de *primers* randômicos e PCR em tempo real. (68)

#### 2.3.4.4 Chipes de DNA

*Microarrays* de DNA, chipe de DNA, chipe biológico ou biochipe são nomes dados a mais nova técnica para análise dos ácidos nucleicos. Consiste em lâminas de vidro nas quais fragmentos de fita única (sondas) são fixados e imobilizados de forma ordenada e especificada, chamadas de células de sondas e que contêm milhões de cópias de um segmento gênico em particular. O princípio baseia-se na propriedade de hibridização por complementaridade dos ácidos nucleicos. (69) É um método diagnóstico por genotipagem, realizado *in vitro*, que é capaz de identificar qualitativamente e semiquantitativamente 24 subtipos de HPV, sendo 6 de baixo risco e 18 de alto risco. (70) O Papillocheck® é o método que utiliza tal tecnologia.

#### 2.3.4.5 Imunoistoquímica/imunocitoquímica

A realização de imunocitoquímica tem sido recentemente utilizada em estudos, na tentativa de melhorar a sensibilidade do exame cervicovaginal. (71, 72) Poucos estudos focaram outros sítios além da cérvix. Estes, porém, mostraram similaridade na biologia associada ao HPV.

A maioria dos trabalhos prévios utilizou o anticorpo p16INK4a, marcador de células displásicas e carcinoma, mostrando que seu uso, quando feito na mesma lâmina do esfregaço corado pelo Papanicolaou, potencializa a sensibilidade do exame. (73) A expressão do p16 está fortemente associada a alterações displásicas de alto grau, cerca de 99%. (11) Dentre os biomarcadores usados para definição de lesões associadas ao HPV, somente o p16 foi reconhecido como biomarcador no contexto da biologia do HPV. Este reflete a ativação do *E6/E7 – driven cell proliferation*. O ProEx C e o Ki 67 possuem dados insuficientes na literatura para serem recomendados de forma independente para detecções das lesões associadas ao HPV. (74)

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a concordância das citologias esfoliativas convencional e em meio líquido no rastreamento de lesões precursoras do câncer do canal anal em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Correlacionar os achados entre as citologias esfoliativas convencional e em meio líquido com: sexo, idade, contagem de células CD4, tempo de infecção pelo HIV, uso da terapia antirretroviral, prática de sexo anal, número de parceiros por ano, etilismo e tabagismo.

3.2.2. Avaliar a morfologia das alterações citológicas e a aplicação dos critérios de Bethesda nas lesões intraepiteliais anais.

3.2.3. Realizar a anoscopia de alta resolução para detecção de lesões subclínicas e guiar biópsias.

3.2.4. Correlacionar as alterações da anoscopia de alta resolução e achados histopatológicos com os diagnósticos citológicos.

3.2.5. Relacionar os tipos e subtipos do HPV com as lesões intraepiteliais anais, utilizando esfregaços citológicos e tipagem viral por meio de genotipagem.

3.2.6. Relacionar os tipos e subtipos do HPV com as lesões intraepiteliais anais diagnosticadas nas biópsias.

3.2.7. Determinar o subtipo de HPV mais incidente nesse grupo de pacientes correlacionado com os diagnósticos citológicos.

3.2.8. Averiguar a relação entre múltiplas infecções por diferentes subtipos de HPV com os achados citológicos e histopatológicos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 PACIENTES

Estudo comparativo tendo como universo da pesquisa pacientes oriundos dos ambulatórios de doenças infecto-parasitárias do Hospital Universitário de Brasília (HUB), de ambos os sexos, maiores de 18 anos.

O critério de inclusão foi o diagnóstico de certeza da infecção pelo HIV. O critério de exclusão foi à presença de lesão tumoral ou condilomatosa visível à inspeção da região perianal (figura 2). Os pacientes foram encaminhados pelos ambulatórios de doenças infecto-parasitárias para o ambulatório de coloproctologia e abordados no sentido de concordarem em participar desse estudo e assinarem o termo de consentimento esclarecido e informado (TCLE) (Apêndice A).

O presente projeto foi apresentado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos da Universidade de Brasília (UnB) (Anexo A).

Inicialmente foi realizada entrevista para preenchimento do questionário (Apêndice B).



Figura 2 – Critério de exclusão: lesões condilomatosas visíveis à ectoscopia. Fonte: O autor (2012)

## 4.2 COLETAS

Os pacientes se posicionavam em decúbito lateral esquerdo e não havia qualquer solicitação de preparo para realização dos exames.

As coletas das amostras anais foram feitas no ambulatório de coloproctologia do HUB pelo médico patologista responsável pela pesquisa. Para amostras de citologia convencional, foi utilizada escova do tipo endocervical (Kolplast Comercial Industrial de Brasil Ltda.) e para citologia em meio líquido, kits coletores da ThinPrep®. Para análise molecular com *microarrays*, foi utilizado o Kit PAPPILLOCHECK® (GREINER BIO-ONE®).

Para a coleta citológica, a técnica utilizada foi a introdução das escovas por cerca de 4 cm da borda anal, fazendo movimentos de rotação em sentido horário de 3 a 4 vezes. (9) As ordens das coletas foram alternadas em cada paciente, variando entre citologia convencional e citologia em meio líquido. Em seguida, foi feita a coleta molecular para o *microarrays*.

Na coleta convencional (duas amostras) a escova foi esfregada nas lâminas de vidro por toda a superfície. As lâminas foram depositadas em frascos plásticos contendo álcool a 70%. Os esfregaços em meio líquido e a coleta para a biologia molecular (ThinPrep® e Papillocheck®) foram acondicionados em fixadores específicos fornecidos pelos fabricantes (figura 3 e 4).

Os materiais provenientes da coleta dos exames citológicos foram transportados, processados e corados pelo método de Papanicolaou no Centro de Anatomia Patológica (CAP) do HUB. O meio líquido foi processado em uma citocentrífuga apropriada (ThinPrep) no laboratório PHDiagnóstico em São Paulo. A biologia molecular por *microarrays* foi feito no laboratório Sabin localizado em Brasília.

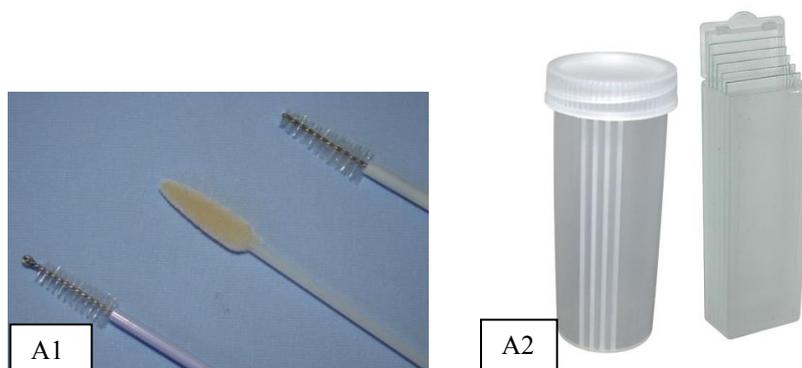


Figura 3 – A1: escovas utilizadas para as coletas da citologia convencional, biologia molecular e em meio líquido. A2: tubos para acondicionamento da CC. Fonte: O autor (2012)



Figura 4 – A3: meio líquido da ThinPrep®. A4: anuscópio descartável. Fonte: O autor (2012)

#### 4.3 ANÁLISE MACROSCÓPICA E BIÓPSIA DA REGIÃO ANAL

Todos os pacientes foram submetidos a exame de inspeção da região perianal e anal, toque retal, com aplicação de anestésico local (Xilocaína® gel) seguido da visualização do canal anal com anuscópio descartável (Kolplacir), colposcópico convencional (CP 14 MICROEM) e aplicação de ácido acético a 5% para visualização das lesões acetobranças e lugol (lesões subclínicas). As lesões suspeitas foram biopsiadas e em seguida cauterizadas com ácido tricloroacético a 80%, preparado na farmácia de manipulação do HUB (figura 5).

Os materiais biopsiados foram colocados em frascos identificados e fixados em solução de formalina tamponada a 10% e encaminhadas para o CAP. O material foi processado, emblocado em parafina, cortado com 4 micra de espessura e corado com hematoxilina e eosina.

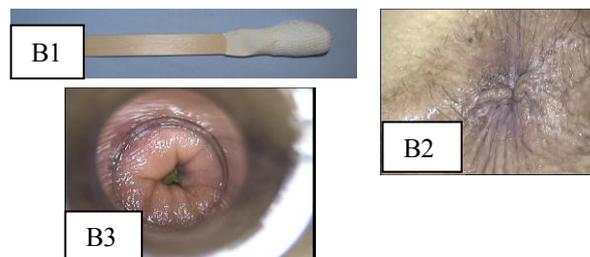


Figura 5 – B1: espátula utilizada para aplicação do ácido acético 5% e lugol. B2: Ectoscopia anal. B3: anuscopia de alta resolução. Fonte: O autor (2012)

#### 4.4 ANÁLISES MORFOLÓGICAS POR CITOLOGIA CONVENCIONAL E EM BASE LÍQUIDA

A análise foi feita em microscópio óptico convencional, em aumentos de 200, 400 e 1000x, com a finalidade de observar os tipos celulares e suas alterações.

Os exames citológicos foram avaliados por três observadores que são patologistas experientes em citologia cervicovaginal e que desconheciam as alterações clínicas e anuscópicas dos pacientes analisados. Foi preenchida uma tabela para avaliar a presença ou não dos seguintes achados: células glandulares, células metaplásicas, mais de 50% de células anucleadas (CA+50%), menos de 50% de células anucleadas (CA-50%), cromatina grosseira (CG), membrana nuclear irregular (MNI), alteração na relação núcleo/citoplasma, (N/C) paraceratose (P), paraceratose atípica (PA), coilocitose (COI), inflamação (INF), flora(F) e material fecal (MF).

Para o estabelecimento do diagnóstico das lesões neoplásicas intraepiteliais, foram obedecidos os critérios de Bethesda (2001).

De acordo com os critérios de Bethesda, foi utilizada a designação de: carcinoma escamoso invasor (CEC); lesão intraepitelial escamosa de baixo (LSIL) e alto grau (HSIL); células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US), possivelmente não neoplásico ou não é possível afastar lesão de alto grau (ASC-US, ASC-H), negativo para lesão intraepitelial ou malignidade (NIL) e insatisfatório devido à celularidade ou artefatos técnicos. (57, 75) Como orientação do sistema de Bethesda, uma amostra considerada satisfatória deveria apresentar uma celularidade mínima de aproximadamente 2.000 células escamosas nucleadas e presença de células glandulares. (75)

#### 4.5 ANÁLISE MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE HPV

Foi utilizado método de biologia molecular para confirmar e determinar os subtipos de HPV presentes nas amostras (PapilloCheck® - Greiner Bio-One). *Microarrays* de DNA, chipe de DNA, chipe biológico ou biochipe são denominações a mais recente tecnologia para análise dos ácidos nucleicos. Consiste em lâminas de vidro nas quais fragmentos de fita única (sondas) são fixados e imobilizados de forma ordenada e específica, chamadas células de sondas, e que contêm milhões de cópias de um segmento gênico em particular.

O princípio baseia-se na propriedade de hibridização por complementaridade dos ácidos nucleicos. É um método diagnóstico por genotipagem realizado *in vitro*, que é capaz de

identificar qualitativamente e semiquantitativamente 24 subtipos de HPV, sendo 6 de baixo risco e 18 de alto risco. (72) Nos valores sugestivos de carga viral na amostra (SNR), considera-se resultado positivo quando maiores do que 20. Os resultados são expressos qualitativamente e semiquantitativamente (SNR) para os 24 subtipos de HPV de baixo e alto risco simultaneamente. O método tem sensibilidade analítica: 150 cópias/amostra. SNR menores que 100 indicam pequeno número de cópias virais por células, podendo significar infecção inicial ou fase de remissão espontânea. Elevadas taxas de SNR indicam alta probabilidade de recidiva. (72)

#### 4.6 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DAS BIÓPSIAS DO CANAL ANAL

Para classificação histopatológica foram utilizadas as nomenclaturas: lesão intraepitelial escamosa de baixo e alto grau, e neoplasia intraepitelial anal de grau I, II ou III. Os exames histopatológicos foram analisados por patologistas que fazem patologia do trato anogenital no CAP/HUB.

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Análise estatística foi realizada utilizando o programa SAS 9.2 - versão 2002-2008. Para testar concordância entre os diagnósticos da CC e CBL foi utilizado o coeficiente Kappa, interpretado de acordo com Shrout. (76)  $k \leq 0$ , ausente;  $k=0,01$  a  $0,19$ , fraca;  $0,20$  a  $0,39$ , discreta;  $k= 0,40$  a  $0,59$ , moderada;  $k = 0,60$  a  $0,79$ , substancial;  $k = 0,80$  a  $0,99$ , quase perfeita, e  $k=1$ , perfeita. (77)

A análise estatística consistiu na obtenção de frequências das variáveis de interesse; obtenção das prevalências com os respectivos intervalos de confiança das características dos pacientes em estudo, associados a CC e ao CBL positivos, e análise de regressão de Poisson múltipla com variância robusta, empregando como medida de efeito a razão de prevalência e seus respectivos intervalos de confiança.

A associação entre as variáveis foram obtidas através do teste de *qui* quadrado, uma vez que as tabelas apresentavam mais de 20% das frequências esperadas menores do que 5<sup>1</sup>.

O teste exato de Fisher foi utilizado em alguns casos como uma alternativa ao teste de *qui* quadrado, quando as suposições do teste de *qui* quadrado não são satisfeitas. Este teste foi utilizado para avaliar a relação das infecções de diversos subtipos de HPV e HPV de alto risco

com a positividade na citologia e biópsia, e entre o subtipo de HPV e a positividade da biópsia.

Os indicadores de validade foram utilizados para avaliar a capacidade dos testes (CC, CBL) e distinguir entre os pacientes que tinham biópsia positiva daqueles que tinham biópsia negativa. Para tal, indicadores de sensibilidade e especificidade foram calculados.

A significância estatística foi designada para  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

A população deste estudo consistiu de 33 pacientes infectados pelo HIV acompanhados no ambulatório de infectologia do HUB.

As variáveis estudadas nessa etapa da análise foram: sexo, idade, contagem de CD4, tempo de infecção pelo HIV, uso da terapia antirretroviral, coito anal receptivo, tempo decorrido deste o início da atividade de coito anal, número de parceiros/ano, tabagismo e etilismo.

### 5.1 DETALHAMENTOS DAS AMOSTRAS EM RELAÇÃO AO QUESTIONÁRIO REFERENTE ÀS CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES

Dos 33 pacientes presentes em nossa amostra, 69,7% eram do sexo masculino e 29 pacientes tinham mais de 30 anos (88,0%). Na contagem de células CD4, 5 pacientes apresentaram contagem menor que 200/mm<sup>3</sup> (15,1%), 13 pacientes apresentaram contagem de CD4 de 200 a 500/mm<sup>3</sup> (39,4%) e 15 (45,5%) pacientes apresentaram contagem maior que 500/mm<sup>3</sup>. Em relação ao tempo de infecção pelo HIV, 66,7% dos pacientes tiveram o diagnóstico do HIV havia mais de 5 anos. No uso da terapia antirretroviral (TARV), 85% dos pacientes relataram fazer uso regularmente da medicação. Em relação ao coito anal receptivo, 72,7% dos pacientes relataram essa prática. Dos pacientes estudados, 54,5% relataram ter 1 a 2 parceiros no ano. Em relação ao etilismo e tabagismo, 27,3% relataram o hábito do tabagismo e 30% relataram o hábito do etilismo. Os dados são descritos conforme tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição dos pacientes

<b>Variáveis</b>	<b>Número de Pacientes</b>	<b>%</b>
<b>Idade</b>		
18 – 30	4	12
> 30	29	88
<b>Sexo</b>		
Feminino	10	30,3
Masculino	23	69,7

(continua)

(continuação)

Tabela 1 – Distribuição dos pacientes

<b>Variáveis</b>	<b>Número de Pacientes</b>	<b>%</b>
<b>CD4</b>		
< 200	5	15,1
200 – 500	13	39,4
> 500	15	45,5
<b>Tempo Infecção HIV (anos)</b>		
1 – 5	11	33,3
> 5	22	66,7
<b>TARV</b>		
Não	5	15
Sim	28	85
<b>Coito Anal</b>		
Não	9	27,3
Sim	24	72,7
<b>Tempo de coito anal</b>		
0-10	19	57,6
>10	14	42,4
<b>Número de Parceiros</b>		
1 – 2	18	54,5
> 2	15	45,5
<b>Tabagismo</b>		
Não Fumante	24	72,7
Fumante	9	27,3
<b>Etilismo</b>		
Não	23	69,7
Sim	10	30,3

TARV – terapia antirretroviral

(conclusão)

## 5.2 DESCRIÇÃO E COMPARAÇÃO DOS ACHADOS CITOLÓGICOS PELOS MÉTODOS CONVENCIONAL E EM BASE LÍQUIDA

As 33 amostras de citologia anal foram avaliadas por dois métodos citológicos, dos quais foram realizadas as análises morfológicas e de categorização diagnóstica. Os métodos utilizados foram a citologia esfoliativa convencional (CC) e a citologia em base líquida (CBL). Os resultados foram classificados de acordo com os critérios do sistema de Bethesda (tabela 10).

Pelo método convencional as amostras tiveram como diagnósticos: 54,5% de negativos, 12,1% de ASC-US, 18,1% de LSIL e 15,1% de HSIL. Pelo método em base líquida as mostras tiveram os seguintes diagnósticos: 54,5% de negativos, 9,0% de ASC-US, 3,0% de

ASC-H, 30,0% de LSIL, 3,0% de HSIL, conforme tabela 2. Não foram encontrados casos insatisfatórios, carcinoma escamoso invasor ou lesões glandulares.

Tabela 2 – Frequência dos diagnósticos de acordo com os métodos citológicos

<b>DIAGNÓSTICO</b>	<b>CC</b>	<b>CBL</b>
N	n = 18 (54,5%)	n = 18 (54,5%)
ASC-US	n = 4 (12,1%)	n = 3 (9,0%)
ASC-H	n = 0	n = 1 (3,0%)
LSIL	n = 6 (18,1%)	n = 10 (30%)
HSIL	n = 5 (15,1%)	n = 1 (3,0%)
<b>Total</b>	<b>n = 33 (100%)</b>	<b>n = 33 (100%)</b>

N – negativo; CC – citologia convencional; CBL – citologia em base líquida; ASC-US – células escamosas atípicas de significado indeterminado; ASC-H – células escamosas atípicas, não podendo excluir lesão intraepitelial de alto grau; LSIL lesão intraepitelial de baixo grau; HSIL – lesão intraepitelial de alto grau

A concordância diagnóstica entre os dois métodos utilizados apresentou significância estatística ( $p < 0,05$ ) com teste Kappa de 0,8778 (quase perfeita) e intervalo de confiança de 95% (0,7136 a 1,000). Do total de 33 casos, 28 foram concordantes, como mostra a tabela 3.

Tabela 3 – Concordância entre os diagnósticos citológicos pela CC e CBL

<b>CC</b>	<b>CBL</b>					
	<b>N</b>	<b>ASC-US</b>	<b>LSIL</b>	<b>ASC-H</b>	<b>HSIL</b>	<b>TOTAL</b>
<b>N</b>	n = 17 (94,4%)		n = 1 (5,6%)			n = 18 (100%)
<b>ASC-US</b>		n = 3 (75,0%)	n = 1 (25,0%)			n = 4 (100%)

N – negativo; I – insatisfatório; CC – citologia convencional; CBL – citologia em base líquida; ASC-US – células escamosas atípicas de significado indeterminado; ASC-H – células escamosas atípicas, não podendo excluir lesão intraepitelial de alto grau; LSIL lesão intraepitelial de baixo grau; HSIL – lesão intraepitelial de alto grau. Kappa = 0,8778.

(continua)

(continuação)

Tabela 3 – Concordância entre os diagnósticos citológicos pela CC e CBL

CC	CBL					TOTAL
	N	ASC-US	LSIL	ASC-H	HSIL	
<b>LSIL</b>			n = 6 (100%)			n = 6 (100%)
<b>ASC-H</b>						
<b>HSIL</b>	n = 1 (20,0%)		n = 2 (40,0%)	n = 1 (20,0%)	n = 1 (20,0%)	n = 5 (100%)
<b>TOTAL</b>	n = 18 (54,5%)	n = 3 (9,1%)	n = 10 (30,4%)	n = 1 (3,0%)	n = 1 (3,0%)	n = 33 (100%)

N – negativo; I – insatisfatório; CC – citologia convencional; CBL – citologia em base líquida; ASC-US – células escamosas atípicas de significado indeterminado; ASC-H – células escamosas atípicas, não podendo excluir lesão intraepitelial de alto grau; LSIL lesão intraepitelial de baixo grau; HSIL – lesão intraepitelial de alto grau. Kappa = 0,8778.

(conclusão)

No grupo analisado foi observado que em doze amostras não houve concordâncias entre os diagnósticos citológicos pela CC e CBL. Destas, uma amostra foi considerada normal na CC e LSIL na CBL; um caso foi normal na CBL e HSIL na CC. Uma amostra foi diagnosticada como ASC-US na CC e LSIL na CBL. Houve quatro casos diagnosticados como LSIL na CBL dentre os quais dois casos foram HSIL, um ASC-US e um normal na CC. Uma amostra foi diagnosticada como ASC-H na CBL e HSIL na CC. Foram observados ainda quatro casos de HSIL na CC, sendo dois casos diagnosticados como LSIL, um normal e um ASC-H pela CBL.

### 5.3 DISTRIBUIÇÕES DE FREQUÊNCIA DAS CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES E A PREVALÊNCIA DE CITOLOGIA CONVENCIONAL POSITIVA

No grupo estudado foi calculada a razão de chance com regressão de Poisson e a prevalência das alterações citológicas com relação às características do grupo de acordo com o questionário (tabela 4).

Os pacientes que apresentaram maiores taxas de citologia convencional alteradas foram os que apresentaram 18 a 30 anos, pacientes do sexo feminino, os pacientes com CD4 < 200, com tempo de infecção entre 1 a 5 anos, que praticam sexo anal com mais de dois parceiros/ano e pacientes tabagistas. As demais variáveis, TARV, coito anal, o tempo de início do coito anal e etilismo não apresentaram associação significativa com a positividade do CC.

Tabela 4 – Distribuição de frequências das variáveis estudadas com análise de Regressão de Poisson Múltipla (n=33 pacientes)

<b>Variáveis</b>	<b>Regressão de Poisson Múltipla</b>		
	<b>RP</b>	<b>IC 95%</b>	<b>p-valor</b>
<b>Idade</b>			
18 – 30	3,67	1,33 – 10,20	0,0123
> 30	1,00	-	-
<b>Sexo</b>			
Feminino	4,20	1,28 – 13,79	0,0180
Masculino	1,00	-	-
<b>CD4</b>			
< 200	5,93	1,55 – 22,73	0,0094
200 – 500	1,00	-	-
> 500	8,18	1,92 – 34,74	0,0044
<b>Tempo Infecção HIV</b>			
1 – 5	3,60	1,11 – 11,67	0,0325
> 5	1,00	-	-
<b>TARV</b>			
Negativo	1,00	-	-
Positivo	2,67	0,77 – 9,24	0,1219
<b>Coito Anal</b>			
Não	1,00	-	-
Sim	5,83	0,98 – 34,63	0,0523

(continua)

(continuação)

Tabela 4 – Distribuição de frequências das variáveis estudadas com análise de Regressão de Poisson Múltipla (n=33 pacientes)

<b>Variáveis</b>	<b>Regressão de Poisson Múltipla</b>		
	<b>RP</b>	<b>IC 95%</b>	<b>p-valor</b>
<b>Há quantos Anos Coito Anal</b>			
0 – 10	2,05	0,63 – 6,61	0,2314
> 10	1,00	-	-
<b>Número de Parceiros no Ano</b>			
1 – 2	1,00	-	-
> 2	4,92	1,25 – 19,45	0,0230
<b>Tabagismo</b>			
Não Fumante	1,00	-	-
Fumante	3,26	1,19 – 8,94	0,0217
<b>Etilismo</b>			
Não	1,00	-	-
Sim	1,67	0,89 – 3,15	0,1114

RP – razão de Prevalência; IC – intervalo de Confiança; TARV – terapia antirretroviral.

(conclusão)

#### 5.4 DISTRIBUIÇÕES DE FREQUÊNCIA DAS CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES E A PREVALÊNCIA DE CITOLOGIA EM BASE LÍQUIDA POSITIVA

No grupo estudado foi calculada a razão de chance com Regressão de Poisson e a prevalência das alterações citológicas (CBL) com relação às características do grupo de acordo com o questionário (tabela 5).

Os pacientes que apresentaram maiores taxas de citologia em base líquida alteradas foram os que apresentaram 18 a 30 anos, pacientes do sexo feminino, os pacientes com CD4 < 200, com tempo de infecção entre 1 a 5 anos, que praticam sexo anal com mais de dois parceiros/ano, pacientes tabagistas, etilistas e por último pacientes em uso de TARV. As demais variáveis não apresentaram associação significativa com a positividade do CBL.

Tabela 5 – Distribuição de frequências das variáveis estudadas com análise de Regressão de Poisson Múltipla (33 pacientes)

<b>Variáveis</b>	<b>Regressão de Poisson Múltipla</b>		
	<b>RP</b>	<b>IC 95%</b>	<b>p-valor</b>
<b>Idade</b>			
18 – 30	4,62	1,68 – 12,70	0,0030
> 30	1,00	-	-
<b>Sexo</b>			
Feminino	3,41	1,02 – 11,42	0,0468
Masculino	1,00	-	-
<b>CD4</b>			
< 200	8,47	1,78 – 40,38	0,0073
200 – 500	1,00	-	-
> 500	10,82	2,46 – 47,56	0,0016
<b>Tempo Infecção HIV</b>			
1 – 5	3,18	1,09 – 9,28	0,0346
> 5	1,00	-	-
<b>TARV</b>			
Negativo	1,00	-	-
Positivo	5,55	1,61 – 19,15	0,0066
<b>Coito Anal</b>			
Não	1,00	-	-
Sim	8,40	0,96 – 73,48	0,0544
<b>Há quantos Anos Coito Anal</b>			
0 – 10	4,27	0,94 – 19,32	0,0594
> 10	1,00	-	-
<b>Número de Parceiros no Ano</b>			
1 – 2	1,00	-	-
> 2	10,83	1,71 – 68,57	0,0114

(continua)

(continuação)

Tabela 5 – Distribuição de frequências das variáveis estudadas com análise de Regressão de Poisson Múltipla (33 pacientes)

<b>Variáveis</b>	<b>Regressão de Poisson Múltipla</b>		
	<b>RP</b>	<b>IC 95%</b>	<b>p-valor</b>
<b>Tabagismo</b>			
Não Fumante	1,00	-	-
Fumante	3,15	1,12 – 8,83	0,0289
<b>Etilismo</b>			
Não	1,00	-	-
Sim	2,14	1,07 – 4,28	0,0306

RP – razão de Prevalência; IC – intervalo de Confiança; TARV – terapia antirretroviral

(conclusão)

## 5.5 DISTRIBUIÇÃO DOS ACHADOS MORFOLÓGICOS DE ACORDO COM OS DIAGNÓSTICOS PROPOSTOS (SISTEMA DE BETHESDA)

Para a classificação das alterações citológicas pelos critérios de Bethesda foram utilizados os critérios descritos na tabela 6 e 7.

Tabela 6 – Frequência das alterações morfológicas de acordo com o diagnóstico citológico pela citologia convencional

CC		<b>N</b>	<b>ASC-US</b>	<b>LSIL</b>	<b>HSIL</b>
<b>AMOSTRA</b>					
<b>GLA</b>	1	13 (72,2%)	3 (75%)	6 (100%)	5 (100%)
	2	14 (77,7%)	2 (50%)	6 (100%)	3 (60%)

N - normal; GLA - glandular; MET - metaplásicas; CA - células anucleadas; HIPER - hiperchromatismo nuclear; MNI - membrana nuclear irregular; N/C - alteração na relação núcleo/citoplasma; PARAC - paceratose; PA - paraceratose atípica; COIL - coilocitose; INFLA – inflamação; ASC-US – células escamosas atípicas de significado indeterminado; LSIL lesão intraepitelial de baixo grau; HSIL – lesão intraepitelial de alto grau

(continua)

(continuação)

Tabela 6 – Frequência das alterações morfológicas de acordo com o diagnóstico citológico pela citologia convencional

CC		N	ASC-US	LSIL	HSIL
<b>AMOSTRA</b>					
<b>MET</b>	1	2 (11,1%)	2 (50%)	6 (100%)	4 (80%)
	2	2 (11,1%)	2 (50%)	5 (83,3%)	3 (60%)
<b>CA+50%</b>	1				
	2				
<b>CA-50%</b>	1	18 (100%)	4 (100%)	5 (83,3%)	5 (100%)
	2	16 (88,8%)	4 (100%)	5 (83,3%)	3 (60%)
<b>HIPER</b>	1			3 (50%)	5 (100%)
	2			2 (33,3%)	3 (60%)
<b>MNI</b>	1			5 (83,3%)	5 (100%)
	2			4 (66,6%)	3 (60%)
<b>N/C</b>	1		1 (25%)	3 (50%)	5 (100%)
	2		1 (25%)	3 (50%)	3 (60%)
<b>PARAC</b>	1	1 (5,5%)	3 (75%)	6 (100%)	5 (100%)
	2	1 (5,5%)	3 (75%)	6 (100%)	3 (60%)
<b>PA</b>	1			3 (50%)	5 (100%)
	2			2 (33,3%)	3 (60%)
<b>COIL</b>	1		1 (25%)	5 (83,3%)	4 (80%)
	2			6 (100%)	2 (40%)
<b>INFLA</b>	1	6 (33,3%)	2 (50%)	6 (100%)	3 (60%)
	2	6 (33,3%)	2 (50%)	6 (100%)	2 (40%)

N - normal; GLA - glandular; MET - metaplásicas; CA - células anucleadas; HIPER - hiper Cromatismo nuclear; MNI - membrana nuclear irregular; N/C - alteração na relação núcleo/citoplasma; PARAC - paceratose; PA - paraceratose atípica; COIL - coilocitose; INFLA – inflamação; ASC-US – células escamosas atípicas de significado indeterminado; LSIL lesão intraepitelial de baixo grau; HSIL – lesão intraepitelial de alto grau

(conclusão)

Tabela 7 – Frequência das alterações morfológicas de acordo com o diagnóstico citológico pela CBL

CBL	N	ASC-US	LSIL	ASC-H	HSIL
<b>GLA</b>	13 (72,2%)	3 (100%)	8 (80%)	1(100%)	1 (100%)
<b>MET</b>		1 (33,3%)	1 (10%)	1 (100%)	
<b>CA+50%</b>					
<b>CA-50%</b>	18 (100%)	3 (100%)	10 (100%)	1 (100%)	1 (100%)
<b>HIPER</b>		1 (33,3%)	9 (90%)	1(100%)	1 (100%)
<b>MNI</b>		1(33,3%)	10 (100%)	1(100%)	1 (100%)
<b>N/C</b>		1 (33,3%)	8 (80%)	1(100%)	1 (100%)
<b>PARAC</b>	2 (11,1%)	2 (66,6%)	8 (80%)	1(100%)	1 (100%)
<b>PA</b>			2 (20%)	1(100%)	1 (100%)
<b>COIL</b>		1 (33,3%)	9 (90%)	1(100%)	1 (100%)
<b>INFLA</b>	7 (39%)	3 (100%)	5 (100%)	1 (100%)	

N - normal; GLA - glandular; MET - metaplásicas; CA - células anucleadas; HIPER - hiper Cromatismo nuclear; NI - membrana nuclear irregular; N/C - alteração na relação núcleo/citoplasma; PARAC - paceratose; PA - paraceratose atípica; COIL - coilocitose; INFLA – inflamação; ASC-US – células escamosas atípicas de significado indeterminado; ASC-H – células escamosas atípicas, não podendo excluir lesão intraepitelial de alto grau; LSIL lesão intraepitelial de baixo grau; HSIL – lesão intraepitelial de alto grau

### 5.5.1 Diagnósticos citológicos na CC e CBL negativos

Nas amostras com diagnóstico negativo, as células glandulares estavam presentes em 72,2% (13/18) na amostra 1, e em 74,7% (14/18) na amostra 2 da CC. Na CBL essas células estavam presentes em 72,2% (13/18). Dois casos na CC (11,1%) apresentaram células metaplásicas em ambas as amostras. Nenhum caso negativo apresentou células metaplásicas na CBL. Todos os casos da amostra 1 da CC e CBL apresentaram menos de 50% de células anucleadas. Apenas dois casos na amostra 2 apresentaram mais de 50% de células anucleadas. Em 5,5% dos casos apresentou-se paraceratose nas duas amostras da CC. Na CBL, 11,1% dos casos apresentaram paraceratose. A inflamação foi encontrada em 33,3% dos casos em ambas as amostras da CC, e na CBL a inflamação foi vista em 39% dos casos. A flora de todos os casos, 100%, foi coco bacilar (figura 6).

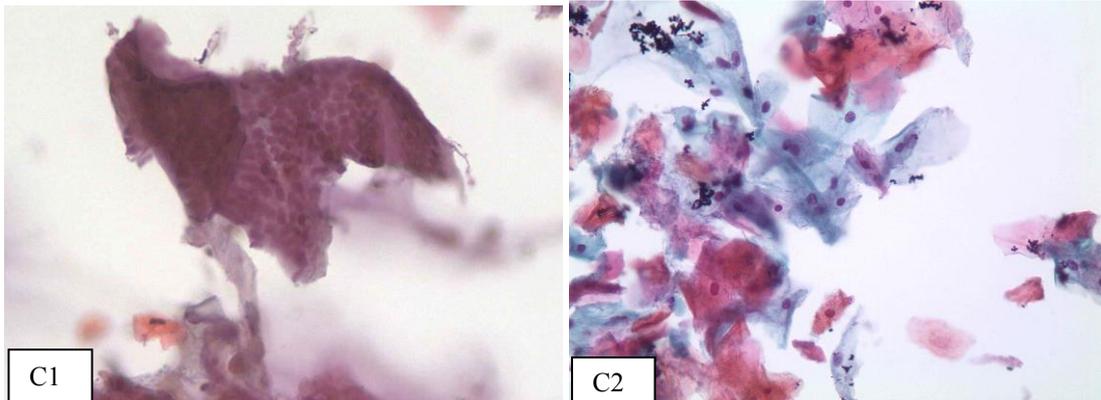


Figura 6 – Papanicolau 400 X. Esfregaços anal em base líquida demonstrando células glandulares (C1) e células escamosas nucleadas (C2). Fonte: O autor (2012)

### 5.5.2 Diagnósticos citológicos na CC e CBL de ASC-US

Nos diagnósticos de ASC-US na CC o achado mais frequente em ambas as amostras foi a paraceratose (75%) e alterações inflamatórias (50%). Na CBL a paraceratose estava presente em 66,6% e a inflamação em 100% (figura 7).

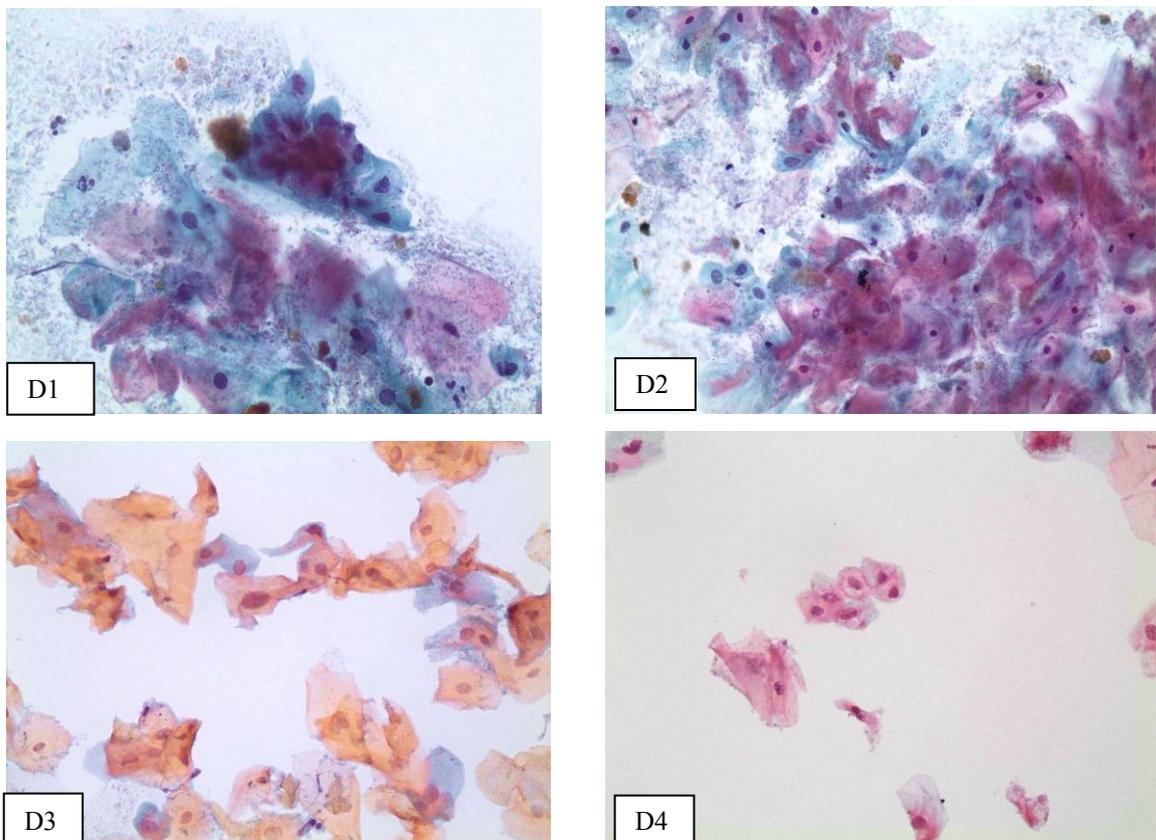


Figura 7 – Papanicolaou 400 X. Células com discreto aumento nuclear em meio a paraceratose, diagnosticados como ASC-US na CC (D1e D2) e na CBL (D3 e D4). Fonte: O autor (2012)

### 5.5.3 Diagnósticos citológicos na CC e CBL de LSIL

Nas lesões de baixo grau (LSIL) vistas na CC, 100% dos casos apresentaram células metaplásicas na amostra 1, e 83,3%, na amostra 2. Na CBL, apenas 10% apresentaram essa alteração. Em relação ao hiper cromatismo nuclear, 50% dos casos da amostra 1 revelaram essas alterações, e 33,3% dos casos da amostra 2. Na CBL, em 90% dos casos houve hiper cromatismo nuclear. Na amostra 1 da CC, 83,3% dos casos apresentaram membrana nuclear irregular, e 66,6% apresentaram essas alterações na amostra 2. Na CBL, todos os casos apresentaram essas alterações. A presença de coilocitose foi encontrada em 83,3% dos casos (5/6) na amostra 1 e em todos os casos na amostra 2. Na CBL, os coilocitos foram encontrados em 90% dos casos (figura 8 e 9).

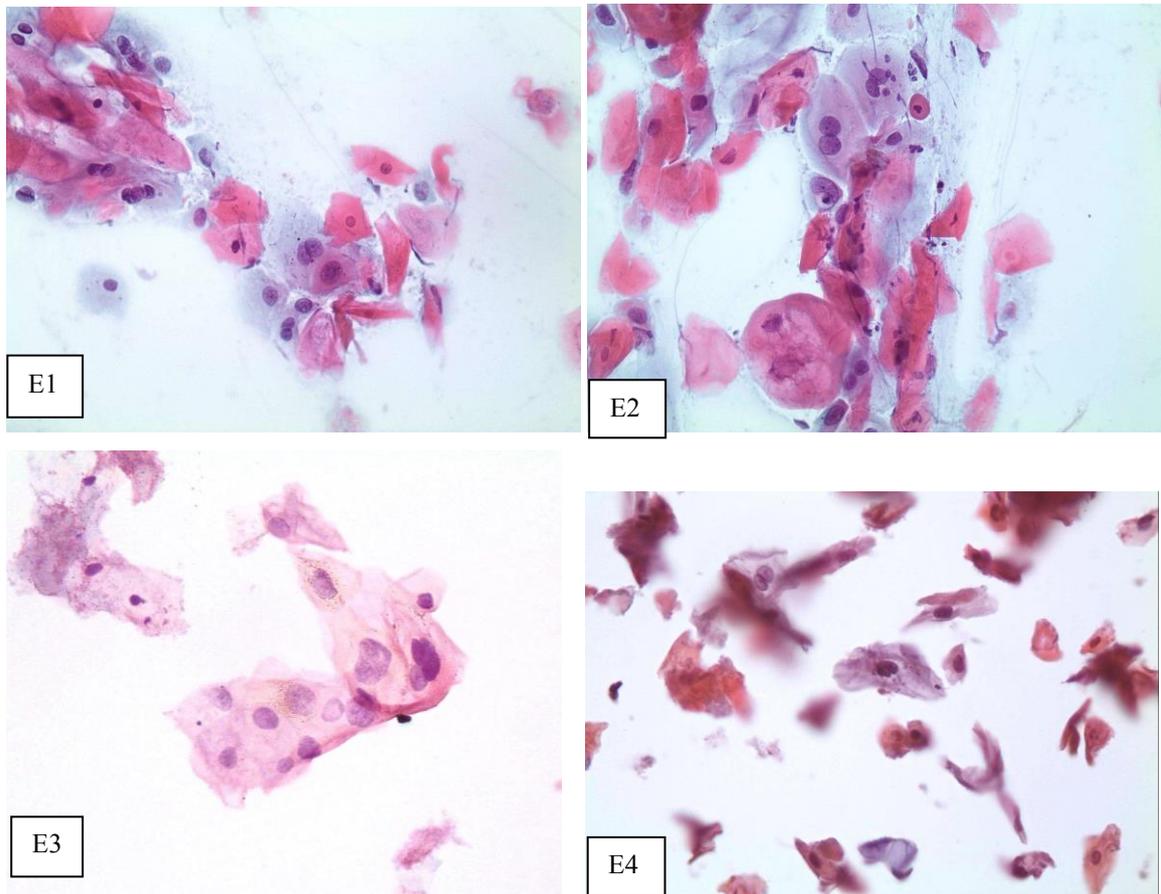


Figura 8 – Papanicolaou 400 X. Lesões de baixo grau com presença de coilocitose, alterações na relação núcleo/citoplasma, cromatina irregular e hiper cromatismo nuclear, vistos na CC (E1 e E2) e CBL (E3 e E4). Fonte: O autor (2012)

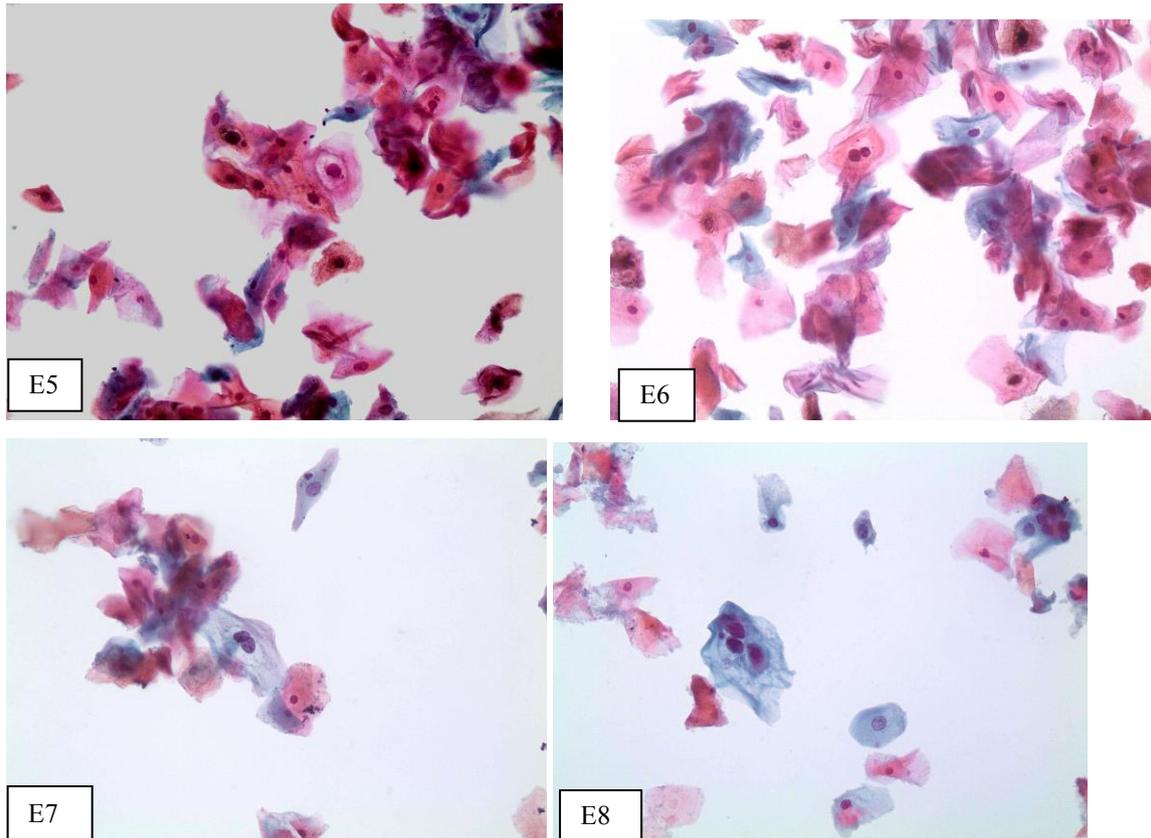


Figura 9 – Papanicolaou 400 X. Lesões de baixo grau com presença de coilocitose, alterações na relação núcleo/citoplasma, cromatina irregular e hiperchromatismo nuclear, vistos na CBL (E5 a E8). Fonte: O autor (2012)

#### **5.5.4 Diagnósticos citológicos na CC e CBL de ASC-H e HSIL**

Apenas um caso de ASC-H foi diagnosticado na CBL, no qual foram observadas todas as alterações morfológicas listadas na tabela 15. Nas lesões de alto grau (HSIL) a presença de hiperchromatismo nuclear, membrana nuclear irregular, alteração na relação núcleo/citoplasma, paraceratose e paraceratose atípica foram encontradas em todos os casos nas amostras 1, e 60% nas amostras 2. Na CBL, o único caso de HSIL também demonstrou todas essas alterações (figura 10 e 11).

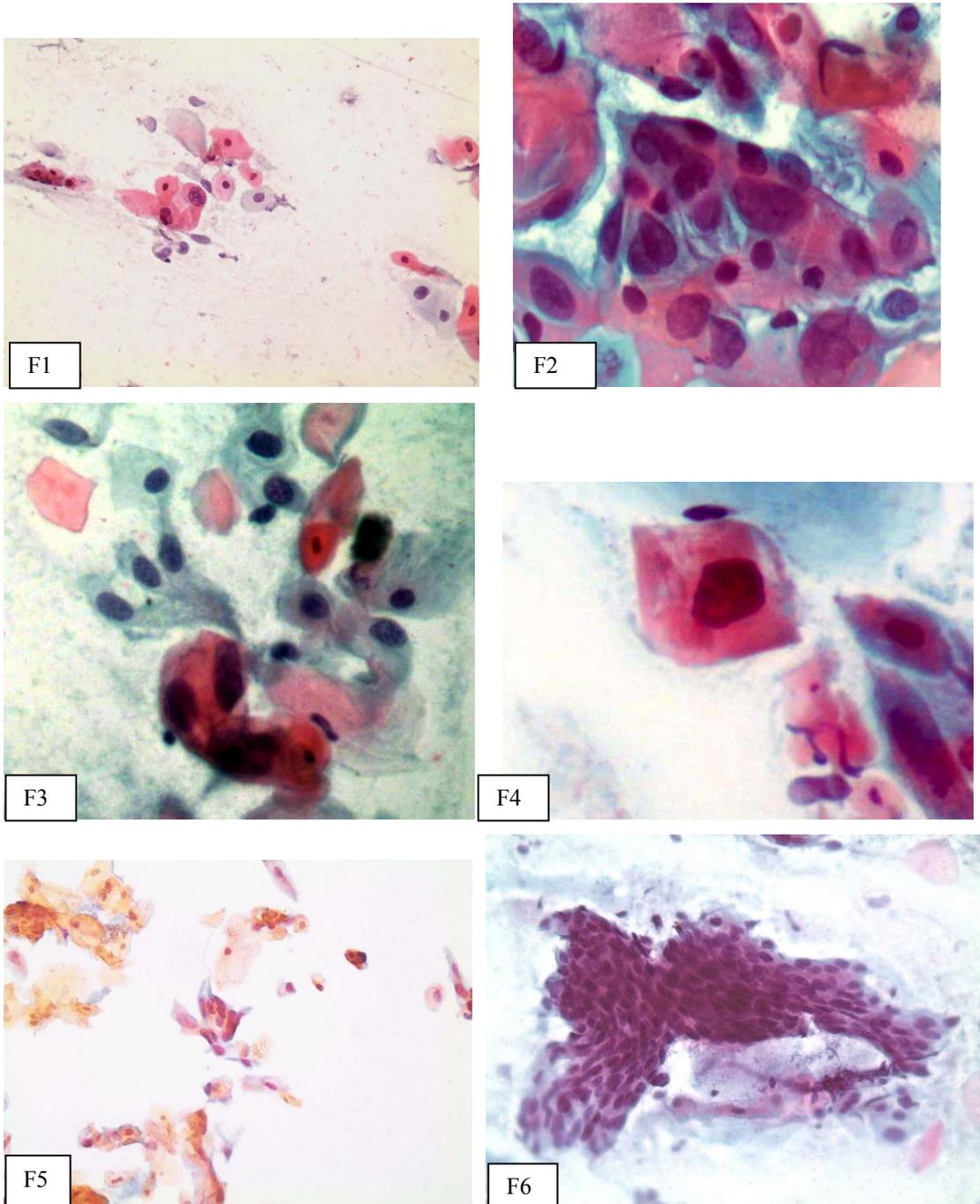


Figura 10 – Papanicolaou 400 x: F1, F5 e F6; 1000 x: F2, F3 e F4. Lesões alto grau (HSIL) com presença de células com alterações na relação núcleo/citoplasma, cromatina irregular e hiperchromatismo nuclear, vistos na CC (F1,F2,F3 e F4) e CBL (F5, F6). Fonte: O autor (2012)

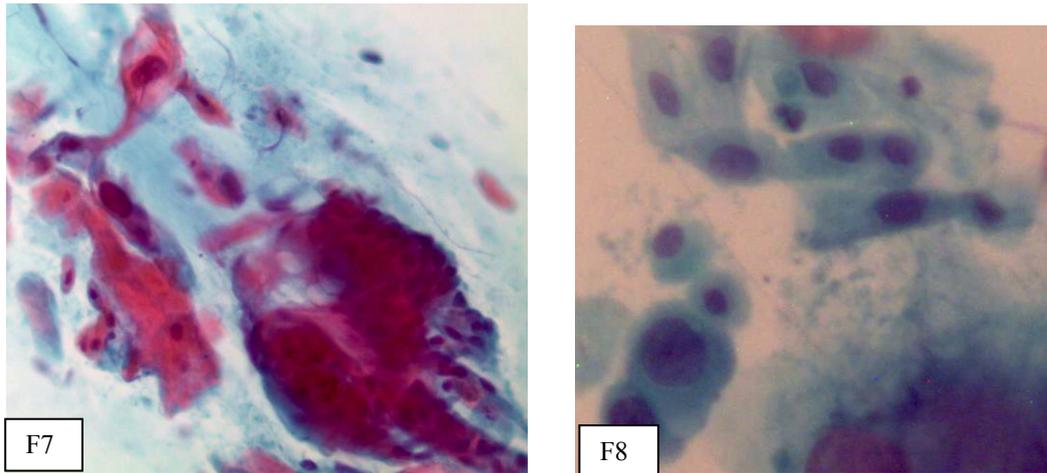


Figura 11 – Papanicolaou 400 X. Lesões alto grau (HSIL) com presença de células com alterações na relação núcleo/citoplasma, cromatina irregular e hiperchromatismo nuclear, vistos na CBL (F7 e F8). Fonte: O autor (2012)

## 5.6 COMPARAÇÕES DOS RESULTADOS DA ANUSCOPIA DE ALTA RESOLUÇÃO E BIÓPSIA RELACIONADOS AOS ACHADOS CITOLÓGICOS

A anoscopia foi realizada em todos os pacientes (33 casos). Nos casos que apresentaram alterações, realizou-se biópsia dirigida.

Dos 18 casos de CC negativa, em 15 (15/18) a anoscopia foi igualmente negativa. Em 3 casos (3/18) a anoscopia foi positiva, dentre estes 1 caso (1/18) de biópsia negativa e 2 casos (2/18) diagnosticados na biópsia como LSIL (NIA I).

Nos 4 casos de citologia convencional com ASC-US a anoscopia foi negativa em 3 casos (3/4) e positiva em apenas 1 (1/4). No caso com anoscopia positiva o resultado foi negativo na biópsia.

Nos 6 casos de LSIL a anoscopia foi negativa em 3 casos (3/6) e positiva nos outros 3 casos (3/6). Nos 3 casos positivos os resultados da biópsia foram os seguintes: biópsia negativa em 1 caso (1/6) e positiva para NIA I nos outros 2 casos (2/6).

Nos 5 casos com diagnóstico de HSIL a anoscopia foi negativa em 1 caso (1/5) e positiva em 4 casos (4/5). Dentre os quatro casos positivos à anoscopia a biópsia revelou 3 casos (3/5) de NIA I (LSIL) e 1 caso (1/5) de NIA III (HSIL).

Após análise estatística desses casos, observa-se que capacidade do teste CC identificar corretamente aqueles pacientes com biópsia positiva foi de 75,00%, com intervalo de confiança de 95% variando de 34,91% a 96,81%. Quando analisamos a capacidade de

concordância entre os métodos de CC e anoscopia, observa-se uma concordância regular de 0,3750 com intervalos de confiança de 95% (0,0643 a 0,6857).

Tabela 8 – Relação dos resultados da CC com anoscopia/biópsia

<b>CC</b>					
<b>ANUSC/BX</b>	<b>N</b>	<b>ASC-US</b>	<b>LSIL</b>	<b>HSIL</b>	<b>TOTAL</b>
<b>BX NEG</b>	n = 1	n = 1	n = 1		n = 3
<b>NIA I</b>	n = 2		n = 2	n = 3	n = 7
<b>NIA II</b>					n = 0
<b>NIA III</b>				n = 1	n = 1
<b>ANUSC</b>	n = 15	n = 3	n = 3	n = 1	n = 22
<b>TOTAL</b>	n = 18	n = 4	n = 6	n = 5	n = 33

N - negativo; ANUSC/BX: anoscopia/biópsia; BX NEG - biópsia negativa; ANUSC NEG - anoscopia negativa; ASC-US – células escamosas atípicas de significado indeterminado; LSIL lesão intraepitelial de baixo grau; HSIL – lesão intraepitelial de alto grau

Dos 18 casos em que a CBL foi negativa, em 15 casos (15/18) a anoscopia foi igualmente negativa e em 3 casos (3/18) a anoscopia foi positiva. Dentre os casos de anoscopia positiva 1 caso (1/18) de biópsia foi negativa e 2 casos (2/18) diagnosticados na biópsia como LSIL (NIA I).

Nos 3 casos de ASC-US a anoscopia foi negativa em 2 casos (2/3) e positiva em apenas 1 (1/3). Neste caso de anoscopia positiva e a biópsia negativa.

Nos 10 casos de LSIL a anoscopia foi negativa em 5 casos (5/10) e positiva nos outros 5 casos (5/10). Nos casos de anoscopia positiva a biópsia foi negativa em 1 caso (1/10) e positiva para NIA I em 4 casos (4/10).

No caso com diagnóstico de ASC-H a anoscopia foi positiva e a biópsia revelou NIA I.

No caso com diagnóstico de HSIL a anoscopia foi positiva e a biópsia revelou NIA III (HSIL).

Avaliando os resultados referentes à citologia em base líquida, (tabela 9), observa-se que a capacidade do teste CBL de identificar corretamente aqueles pacientes com biópsia positiva foi de 85,71% com intervalo 95% de confiança variando de 34,91% a 96,81%. Quando analisamos a capacidade de concordância entre os métodos de CBL e anoscopia, os resultados foram semelhantes aos encontrados entre os métodos de CC e anoscopia (figura 12).

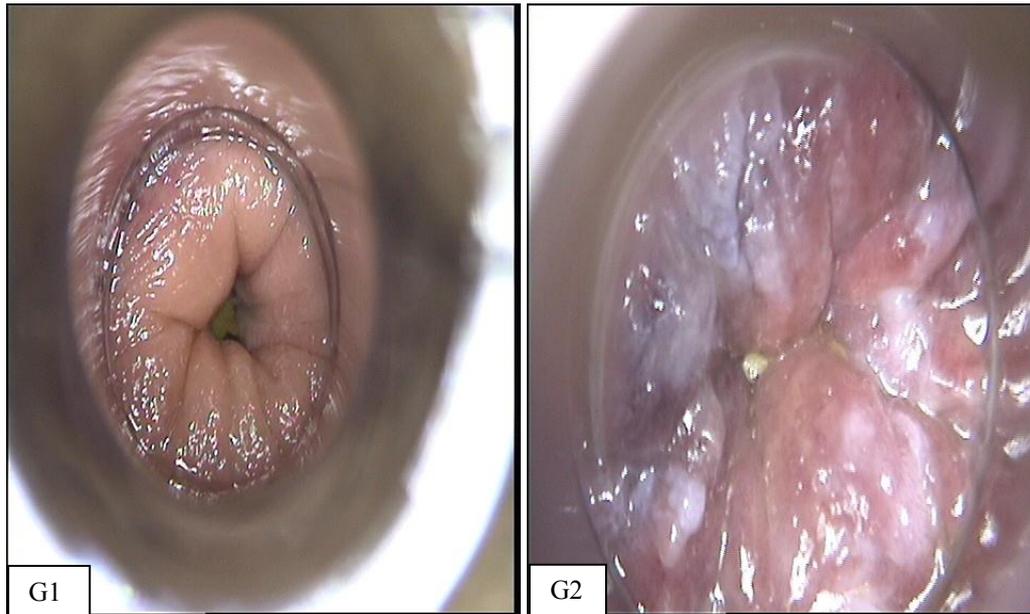


Figura 12 – Anuscopia normal (G1) e anuscopia alterada com áreas brancacentas após aplicação do ácido acético (G2). Fonte: O autor (2012).

Tabela 9 – Relação dos resultados da CBL com anuscopia/biópsia

CBL						
ANUSC/BX	N	ASC-US	LSIL	ASC-H	HSIL	TOTAL
<b>BX NEG</b>	n = 1	n = 1	N = 1			n = 3
<b>NIA I</b>	n = 2		N = 4	n = 1		n = 7
<b>NIA II</b>						n = 0
<b>NIA III</b>					n = 1	n = 1
<b>ANUSC</b>	n = 15	n = 2	N = 5			n = 22
<b>TOTAL</b>	n = 18	n = 3	n = 10	n = 1	n = 1	n = 33

N - negativo; ANUSC/BX: anuscopia/ biópsia; BX NEG - biópsia negativa; ANUSC NEG - anuscopia negativa; ASC-US – células escamosas atípicas de significado indeterminado; ASC-H – células escamosas atípicas, não podendo excluir lesão intraepitelial de alto grau; LSIL lesão intraepitelial de baixo grau; HSIL – lesão intraepitelial de alto grau

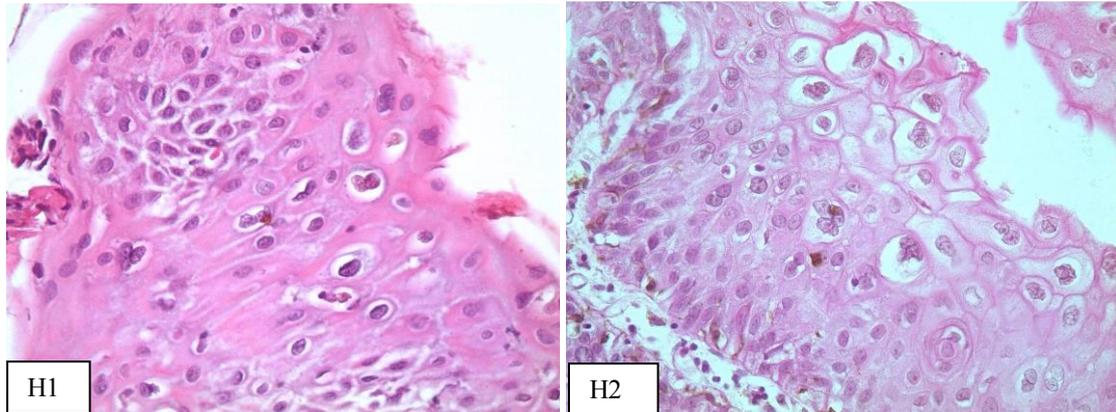


Figura 13 – Hematoxilina e Eosina (HE) 400 X. H1 e H2: Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau, neoplasia intraepitelial anal de grau I - NIA I. Fonte: O autor (2012).

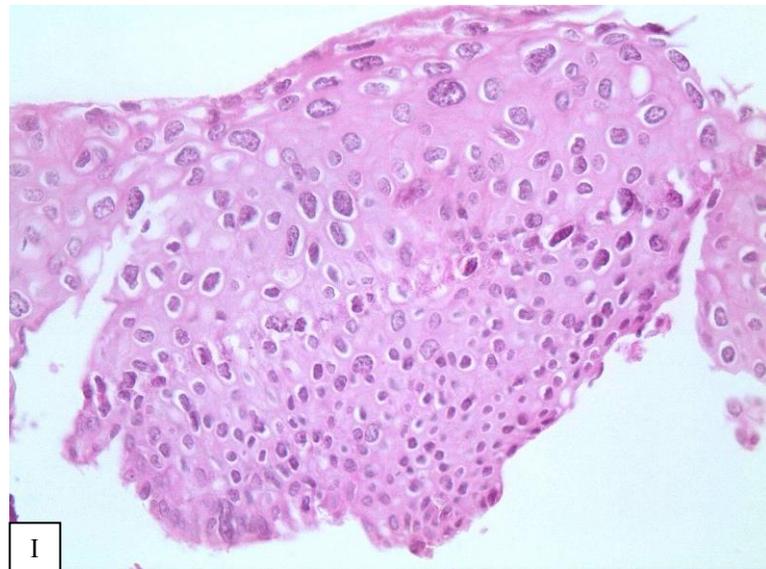


Figura 14 – HE 400 X. I: Lesão intraepitelial escamosa de alto grau, neoplasia intraepitelial anal de grau III - NIA III. Fonte: O autor (2012).

### 5.7 FREQUÊNCIA E PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO POR HPV ANALISADOS PELO MÉTODO PAPILOCHECK®

O método de biologia molecular por microarrays (PAPILOCHECK®) foi positivo em 72,7% das amostras.

Os resultados da citologia convencional, quando negativos, apresentaram biologia molecular positiva em 66,1% dos casos. Quando esta revelou ASC-US, a biologia molecular foi positiva em 75% dos casos. Nos diagnósticos de LSIL, a biologia molecular foi positiva

em 83,3%. Nos casos diagnosticados como HSIL na CC, todos apresentaram biologia positiva (tabela 10).

Os resultados do exame molecular na citologia em base líquida, quando negativos, apresentaram achados moleculares semelhantes aos da citologia convencional. Nos diagnósticos de ASC-US, 66,6% dos casos apresentaram biologia molecular positiva. Nas LISL diagnosticadas na CBL, 90% dos apresentaram biologia molecular positiva. Dentre os resultados de ASC-H e HSIL na CBL, a biologia molecular foi positiva em ambos os casos (tabela 11).

Tabela 10 – Resultados da biologia molecular para HPV relacionados com os achados da CC

<b>CC</b>					
<b>BIOL. MOL.</b>	<b>N</b>	<b>ASC-US</b>	<b>LSIL</b>	<b>HSIL</b>	<b>TOTAL</b>
<b>POSITIVO</b>	n = 11	n = 3	n = 5	n = 5	n = 24
<b>NEGATIVO</b>	n = 7	n = 1	n = 1		n = 09
<b>TOTAL</b>	n = 18	n = 4	n = 6	n = 5	n = 33

N - negativo; BIOL. MOL - biologia molecular; ASC-US – células escamosas atípicas de significado indeterminado; LSIL lesão intraepitelial de baixo grau; HSIL – lesão intraepitelial de alto grau

Tabela 11 – Resultados da biologia molecular para HPV relacionados com os achados da CBL

<b>CBL</b>						
<b>BIOL. MOL.</b>	<b>N</b>	<b>ASC-US</b>	<b>LSIL</b>	<b>ASC-H</b>	<b>HSIL</b>	<b>TOTAL</b>
<b>POSITIVO</b>	n = 11	n = 2	n = 9	n = 1	n = 1	n = 24
<b>NEGATIVO</b>	n = 7	n = 1	n = 1			n = 09
<b>TOTAL</b>	n = 18	n = 3	n = 10	n = 1	n = 1	n = 33

N - negativo; BIOL. MOL - biologia molecular; ASC-US – células escamosas atípicas de significado indeterminado; ASC-H – células escamosas atípicas, não podendo excluir lesão intraepitelial de alto grau; LSIL lesão intraepitelial de baixo grau; HSIL – lesão intraepitelial de alto grau

### 5.8 TIPOS E FREQUÊNCIA DO HPV (PAPPILOCHECK®) RELACIONADOS COM OS DIAGNÓSTICOS NA CC e CBL

A distribuição dos subtipos de HPV na biologia molecular, de acordo com o diagnóstico na citologia convencional, está representada na tabela 12. Dentre os achados citológicos negativos, o HPV de alto risco mais comum foi o subtipo 68. Nos diagnósticos de ASC-US o subtipo mais comum de baixo risco foi 44/55. Os diagnósticos de LSIL foram os que apresentaram maior positividade para os diversos subtipos do HPV. Os mais comuns do subtipo de alto risco foram o 16 e o 68. E os de baixo risco mais comuns foram os subtipos 44/55. Nas lesões HSIL o subtipo do HPV 16 foi o mais comum.

Tabela 12 – Tipos e frequência do HPV (pappilochek®) relacionados com os diagnósticos na CC

	<b>NORMAL</b>	<b>ASC-US</b>	<b>LSIL</b>	<b>HSIL</b>	<b>TOTAL</b>
<b>HPV</b>					
<b>16</b>	2	1	3	3	9
<b>18</b>			2		2
<b>45</b>			1	1	2
<b>31</b>	1		1		2
<b>33</b>			2		2
<b>52</b>			1		1
<b>58</b>		1			1
<b>35</b>			1	1	2
<b>59</b>	1	1	1	1	4
<b>56</b>	1	1	2		4
<b>51</b>			1	2	3
<b>39</b>		1	1	2	4
<b>68</b>	4	1	3	1	9
<b>73</b>			1		1
<b>82</b>					0
<b>53</b>		1			1
<b>66</b>	2				2
<b>70</b>		1	1	1	3
<b>6</b>	2	1	2	1	6
<b>11</b>	3		1	1	5
<b>40</b>	1		2		3
<b>42</b>	2		1		3
<b>43</b>			1		1
<b>44/55</b>	5	2	3	1	11

ASC-US – células escamosas atípicas de significado indeterminado; LSIL lesão intraepitelial de baixo grau; HSIL – lesão intraepitelial de alto grau

Dentre os achados citológicos negativos na CBL, o HPV 44/55 foi o subtipo mais comum. Nos diagnósticos de ASC-US o subtipo de alto risco mais comum foi o 16. Os diagnósticos de LSIL foram os que apresentaram maior positividade para os diversos subtipos do HPV, sendo o mais comum do subtipo de alto risco o 16, 56 e 68. Os de baixo risco mais comuns foram os subtipos 44/55. No caso de HSIL, os HPV 16 e 68 foram os mais comuns (tabela 13).

Tabela 13 – Tipos e frequência do HPV (pappilochek®) relacionados com os diagnósticos na CBL

	<b>NORMAL</b>	<b>ASC-US</b>	<b>LSIL</b>	<b>ASC-H</b>	<b>HSIL</b>	<b>TOTAL</b>
<b>HPV</b>						
<b>16</b>	2	2	4		1	9
<b>18</b>		1	1			2
<b>45</b>			2			2
<b>31</b>	1		1			2
<b>33</b>			2			2
<b>52</b>		1				1
<b>58</b>		1				1
<b>35</b>	1		1			2
<b>59</b>	1		3			4
<b>56</b>			4			4
<b>51</b>		1	1	1		3
<b>39</b>			3	1		4
<b>68</b>	4		4		1	9
<b>73</b>			1			1
<b>82</b>						0
<b>53</b>			1			1
<b>66</b>	2					2
<b>70</b>			3			3
<b>6</b>	2		4			6
<b>11</b>	3		1	1		5
<b>40</b>	1	1	1			3
<b>42</b>	2	1				3
<b>43</b>		1				1
<b>44/55</b>	5		5	1		11

ASC-US – células escamosas atípicas de significado indeterminado; ASC-H – células escamosas atípicas, não podendo excluir lesão intraepitelial de alto grau; LSIL lesão intraepitelial de baixo grau; HSIL – lesão intraepitelial de alto grau

Em 12 e 14 casos com alterações na citologia convencional e em base líquida respectivamente, observou-se associação com *microarrays* positiva para mais que um subtipo de HPV. A quantidade e os subtipos de HPV foram relacionados aos diferentes achados na

CC e CBL e estão listados nas tabelas 12 e 13. Quando analisada a relação entre as múltiplas infecções pelo HPV com a positividade na citologia, foi observado que não houve significância estatística (teste do Qui-quadrado) para CC e CBL com valores semelhantes de  $p = 0,2419$  (tabelas 14 e 15).

Tabela 14 – Tipos de HPV na biologia molecular e suas frequências relacionadas aos resultados da CC.

	<b>NEGATIVO</b>	<b>ASC-US</b>	<b>LSIL</b>	<b>HSIL</b>
	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>2</b>
	59-44/55	16-58	33-73-6-44/55	16-18
	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>4</b>
	68	59-56-68-6-	16-31-68-6-11-40-	51-39-11-
	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>7</b>	<b>4</b>
	56-66	39-53-70-44/55	16-18-52-51-40-42-	16-39-70-6
	<b>2</b>		<b>6</b>	<b>4</b>
	11-44/55		33-35-59-56-68-	16-45-59-51
<b>HPV - Nº/TIPOS</b>	<b>1</b>		<b>7</b>	<b>1</b>
	68		16-18-45-56-39-68-	35
	<b>4</b>			
	16-31-68-11			
	<b>2</b>			
	42-44/55			
	<b>3</b>			
	66-6-44/55			
	<b>3</b>			
	68-6-44/55			
	<b>3</b>			
	16-11-42			
	<b>1</b>			
	40			

ASC-US – células escamosas atípicas de significado indeterminado; LSIL lesão intraepitelial de baixo grau; HSIL – lesão intraepitelial de alto grau

Tabela 15 – Tipos de HPV na biologia molecular e suas frequências relacionadas aos resultados da CBL

	<b>NEGATIVO</b>	<b>ASC-US</b>	<b>LSIL</b>	<b>ASC-H</b>	<b>HSIL</b>
	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>2</b>
	59-44/55	16-58	16-39-70-6	51-39-11-	16-18
	<b>1</b>	<b>7</b>	<b>4</b>		
	68	16-18-52-51-40-	16-45-59-51		
	<b>2</b>		<b>2</b>		
	11-44/55		56-66		
	<b>1</b>		<b>4</b>		
<b>HPV-</b>	45		33-76-6-44/55		
<b>Nº/TIPOS</b>	<b>2</b>		<b>5</b>		
	42-44/55		59-56-68-6-44/55		
	<b>3</b>		<b>7</b>		
	66-6-44/55		16-31-68-6-11-		
	<b>1</b>		<b>7</b>		
	35		16-18-45-56-39-		
	<b>3</b>		<b>4</b>		
	68-6-44/55		39-53-70-44/55		
	<b>3</b>		<b>6</b>		
	16-11-42		33-35-59-56-68-		
	<b>4</b>				
	16-31-68-11				
	<b>1</b>				
	40				

ASC-US – células escamosas atípicas de significado indeterminado; ASC-H – células escamosas atípicas, não podendo excluir lesão intraepitelial de alto grau; LSIL lesão intraepitelial de baixo grau; HSIL – lesão intraepitelial de alto grau

As prevalências dos diversos subtipos de HPV diagnosticados nos nossos casos pelo método molecular foram listadas na tabela 16.

Tabela 16 – Prevalência dos subtipos de HPV diagnosticados pela biologia molecular

Prevalência (%)	HPV
33.33	HPV 44/55*
30.30	HPV 16
27.27	HPV 68
18.18	HPV 6*
15.15	HPV 11*
12.12	HPV 59
12.12	HPV 56
12.12	HPV 39
9.09	HPV 51
9.09	HPV 70
9.09	HPV 40*
9.09	HPV 42*
6.06	HPV 18
6.06	HPV 45
6.06	HPV 31
6.06	HPV 33
6.06	HPV 35
6.06	HPV 66
3.13	HPV 43*
3.03	HPV 52
3.03	HPV 58
3.03	HPV 73
3.03	HPV 53
0.00	HPV 82

\* Subtipo de HPV de baixo risco

Quando verificamos a associação entre biópsias positivas e a presença de infecções múltiplas pelo HPV observamos significância estatística com  $p=0,04$  (tabela 17).

Tabela 17: Anuscopia / biópsia e múltiplas infecções para HPV. Teste de Fisher

mHPVa	Anuscopia - ou anuscopia + e biópsia -	Biópsia +	Total
Presente	8	6	14(100%)
Ausente	17	2	19(100%)
Total	25	8	33(100%)

## 6 DISCUSSÃO

A eleição do tema “rastreamento das lesões precursoras do câncer do canal anal e ânus” ocorreu por observar-se aumento considerável desse câncer em um determinado grupo populacional considerado de risco. A semelhança existente com o colo de útero, tanto histologicamente como anatomicamente, vem incentivando uma tentativa de rastreamento precoce das neoplasias anais a fim de evitar o diagnóstico tardio de lesões invasoras. Entretanto não há ensaios clínicos randomizados que validem a eficácia de qualquer tipo de rastreamento para o câncer anal.

A literatura é controversa quanto ao seguimento, rastreamento e tratamento das lesões anais. Contudo, o papel do HPV na gênese dessas lesões parece estar bem definido. (1)

### 6.1 MÉTODOS UTILIZADOS

No presente estudo foram utilizados os métodos diagnósticos: citologia esfoliativa convencional (CC) e em base líquida (CBL).

A semelhança entre câncer do canal anal e ânus com o câncer cervical, e por seu agente etiológico ser conhecido e passível de tratamento quando diagnosticado precocemente, refletem a relevância e aplicabilidade clínica dos dados deste estudo. (47)

A literatura é escassa quando o tema é a comparação dos métodos de CC e CBL no câncer anal, apesar disso vem sendo discutido na citologia cervical. (57, 62, 78)

O esfregaço cervicovaginal convencional é uma técnica atualmente empregada no rastreamento do câncer de colo uterino e seguimento pós-tratamento. Essa é uma técnica de alta eficácia, baixo custo e indolor, entretanto apresenta baixa sensibilidade.(79) A citologia em base líquida foi eleita por possibilitar a realização de testes complementares de biologia molecular e imunocitoquímica. (64, 65) Alguns estudos relataram melhora da sensibilidade do diagnóstico em relação ao método convencional. (62) Apesar da controvérsia junto à acurácia da CC e CBL, estudos que compararam os dois métodos apontam a CBL como tendo maior acurácia. (62, 78, 80-82) Beerman H. et al., em 2009, concluíram que houve queda nos números de casos insatisfatórios e aumento de sensibilidade na detecção de anormalidades citológicas pela CBL quando comparada a CC e CBL com o exame histopatológico. (80) Schlederermann et al., em 2006, indicaram que a acurácia diagnóstica da citologia cervical foi melhorada com a CBL. (81) Syrjänen et al., em 2008, descreveram que a citologia

convencional é superior à CBL e à inspeção com ácido acético no rastreamento de lesões do colo uterino. (61) Uma análise que revisou os dados disponíveis sobre as duas técnicas concluiu que não há evidências de que a CBL reduza o número de lâminas insatisfatórias ou detecte mais lesões de alto grau do que a citologia convencional. (82)

Phanuphad et al., em 2013, revelaram semelhança entre os achados citológicos na CC e CBL no rastreamento das lesões anais com uma concordância de 62,4% dos casos. (57) Darragh et al., em 1997, também demonstraram a semelhança no diagnóstico entre os métodos citológicos no rastreamento das lesões anais. (60)

A anoscopia de alta resolução é técnica utilizada para detecção de lesões subclínicas, para guiar as biópsias e dirigir o tratamento. Nesse método são empregadas soluções que revelam áreas de suspeição, que associadas à magnificação da imagem, melhoram a acuidade diagnóstica, quando em comparação com a anoscopia simples. Para o rastreamento das lesões neoplásicas anais, esse exame deve ser analisado em associação com a citologia esfoliativa, o que aumenta a sensibilidade desse método. Suas limitações são a necessidade de aparelhos especializados, ser operador-dependente e não ser ainda difundido no meio médico. (1, 6) Apesar desse fato, o exame histopatológico permanece padrão-ouro para o diagnóstico das lesões displásicas e invasoras. (1, 11)

O exame por *microarrays* é um método qualitativo e semiquantitativo para a detecção de diversos subtipos do vírus HPV. Divididos em baixo e alto risco oncogênico, é considerado método de alta sensibilidade e especificidade na detecção viral. (70)

## 6.2 DADOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS

Indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) têm alto risco para infecção pelo HPV e para o desenvolvimento de lesões anais induzidas por esse vírus. Embora alguns estudos apresentem a importância do rastreamento, principalmente nesse grupo de pacientes, o mesmo não é feito de rotina. (1)

A epidemiologia dessa doença baseia-se em pacientes soropositivos homens e mulheres, homens que praticam sexo com outros homens (MSM) e pacientes em uso da terapia antirretroviral (TARV) por apresentarem maior tempo de exposição à infecção viral pelo HPV. Além disso, existe relação com o número de parceiros/ano, contagem de células CD4, coito anal receptivo, etilistas e tabagistas. (1, 11)

A amostra deste estudo apresentou maior prevalência de pacientes do sexo masculino (69,7%). A faixa etária variou de 18 a 52 anos, com média de idade de 39 anos. Conley et al,

em 2010, demonstraram uma frequência maior também em indivíduos do sexo masculino com faixa etária média de 31 anos. (83)

Em relação ao tempo de infecção pelo HIV, observamos no presente estudo que em 66,6% dos pacientes o diagnóstico se dera havia mais de 5 anos.

Em relação à contagem de células CD4, houve concordância com o estudo de Guimarães et al., em 2011, que encontraram 16,2% de pacientes com contagem de células < 200 mm<sup>3</sup>, 44,4% variando de 200-500/mm<sup>3</sup> e 39,4% com contagem maior ou igual a 500 mm<sup>3</sup>. (18) Foi encontrado no presente estudo que 15,1% dos pacientes tinham contagem de células < 200 mm<sup>3</sup>, 39,4% dos pacientes com contagem de 200-500/mm<sup>3</sup> e 45,5% tinham maior ou igual a 500/mm<sup>3</sup>.

A terapia antirretroviral é bem difundida em todo o mundo e a maioria dos pacientes tem boa adesão a esse tratamento. Em nosso estudo 85% dos pacientes fazia uso dessas medicações. Guimarães et al., em 2011, e Conley et al., em 2010, também observaram que a maioria dos pacientes faziam uso da terapia antirretroviral. (18, 82, 83)

Em relação aos pacientes praticantes de coito anal receptivo, nossos dados mostraram que 72,7% tinham essa prática. Destes, 57,6% eram homens que praticam sexo com outros homens. Conley et al., em 2010, mostraram entre os homens uma frequência de 80% que praticava sexo anal receptivos. (83) Guimarães et al., e, 2011, revelaram que 54,8% eram receptivos para intercuro anal. (18) Diversos estudos têm mostrado a importante prevalência do HPV em MSM na taxa de 64% a 93% influenciado pela presença de coinfeção pelo HIV, sendo que os de alto risco chegam até a 74% de prevalência. Os principais fatores de risco associados à sua alta prevalência são história de intercuro anal receptivo, recente intercuro anal receptivo e número de parceiros sexuais homens nos últimos 6 meses. Nos pacientes HIV positivos, a baixa contagem de CD4 foi importante preditor para detecção do HPV. (24) Porém, alguns estudos tem mostrado que o intercuro anal não é necessariamente fator necessário para infecção pelo HPV anal, podendo-se assim justificar sua incidência em mulheres e homens heterossexuais. (23) A incidência de HPV de alto risco em mulheres e homens heterossexuais chega até a 20% e a incidência de NIA de alto grau a até a 10%. Um fator que pode contribuir para este dado é o comportamento sexual dos grupos analisados com utilização do estímulo anal digital. (47, 84) Foi analisado também o número de parceiros por ano e foi observado que 45,5% dos pacientes tinham mais de 2 parceiros. Conley et al., em 2010, e Guimarães et al., em 2011, demonstram respectivamente que 16% dos pacientes tinham de 2 a 3 parceiros nos últimos 6 meses, e 37,1%, mais de um no último ano. (18, 83) Ainda no estudo de Guimarães et al., em 2011, 64% dos pacientes relataram ser não

tabagistas e 40%, não etilistas. No presente estudo, 72,2% eram não tabagistas e 70%, não etilistas. (18, 82)

De acordo com recente revisão, a prevalência das NIA em MSM HIV positivos é de cerca de 54%. Este número cai para cerca de 7% a 21% quando estudamos MSM HIV negativos. Tal estudo também não mostrou qualquer relação da incidência das NIA com a idade, ao contrário do que ocorre com lesões cervicais, sugerindo que MSM possuem risco constante ao longo da idade para desenvolvimento das NIA. (23)

### 6.3 CONCORDÂNCIAS ENTRE OS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICOS (CC e CBL)

No presente estudo, foram avaliados pacientes HIV positivos sem lesões sugestivas de infecção pelo HPV, visíveis à ectoscopia. Diversos estudos constataram o benefício da combinação de ferramentas para detecção e rastreamento do câncer anal, entre elas a citologia (convencional e em base líquida), a anoscopia de alta resolução, a biópsia e a biologia molecular por *microarrays*. Apesar disso, não existe consenso quanto ao melhor tipo de exame, grupo de pacientes a serem rastreados e o período do início do rastreamento. Dado a alta prevalência de lesões intraepiteliais anais em pacientes HIV positivos infectados pelo HPV, sabe-se que uma minoria vai evoluir para lesão invasiva. Entretanto, qual o indivíduo ou lesão que vai persistir, regredir ou progredir para o câncer não pode ser determinado nos dias atuais. (1)

No presente estudo, foi avaliado o grau de concordância entre os métodos citológicos (CC e CBL). Tais exames fazem parte de programas de rastreamento e normalmente revelam as primeiras alterações displásicas para posterior seguimento com abordagens complementares.

Estudos vêm consolidando o uso da CBL como rotina no rastreamento das lesões cervicais e anais. Contudo, em serviços de saúde pública com recursos limitados, a exemplo do Brasil, o uso desse método não vem sendo empregado rotineiramente principalmente por mostrar-se mais dispendioso. (57) São poucos os estudos que comparam os resultados citológicos no rastreamento das lesões anais quando realizado em base líquida ou método convencional.

Comparamos os resultados dos métodos (CC e CBL) e encontramos uma concordância quase perfeita, com Kappa de 0,878, para os diagnósticos das lesões anais, demonstrando assim que a citologia convencional tem valor equivalente à citologia em base líquida para o rastreamento das lesões anais.

Phanuphad et al., em 2013, demonstraram concordância entre os métodos CC e CBL de 62,4%, em homens que praticam sexo com outros homens (MSM) HIV positivos e negativos. Além disso, foi relatado que MSM HIV positivo tiveram maiores taxas de resultados citológicos discordantes nos diagnósticos de lesão de alto grau. O mesmo estudo, não realizou exames moleculares para detecção dos tipos de HPV de alto risco ou de múltiplas infecções para HPV, o que poderia contribuir para heterogeneidade dos achados morfológicos. (47, 57)

Nadal et al., em 2009, observaram que os resultados da citologia anal convencional (CC) vêm tendo eficácia semelhante à das coletas cervicais, com sensibilidade oscilando entre 42 e 98% e especificidade de 38 a 96%, quando os resultados foram comparados com os achados histopatológicos. (21)

Darragh et al., em 2012, demonstraram que em pacientes HIV positivos, a sensibilidade da citologia anorretal variou de 69% a 93% e especificidade de 32% a 59%. Tais dados são comparáveis aos encontrados para citologia cervical. (53) É importante considerar dois pontos essenciais quando avaliamos os resultados e características das citologias anais. A primeira é que o cálculo da acurácia é baseado em modelo ainda não ideal de biopsia guiada por anoscopia de alta resolução o qual é sujeito a variações de coleta e interpretação. Outro ponto a ser destacado é que o sucesso do resultado da citologia anal para rastreamento, assim como na citologia cervical, está na periodicidade e repetição de seus resultados, não apenas em uma amostra isolada. (53) Palefsky et al., em 1997, mostraram que a sensibilidade para detecção de alterações na citologia anorretal forma aumentadas quando o exame foi repetido em uma segunda visita. (85)

Palefsky et al., em 1997, também demonstraram uma sensibilidade para diagnosticar lesões anais de 87% em pacientes MSM e especificidade de 42% nesse mesmo grupo, usando a citologia em base líquida. (1, 85)

#### 6.4 FREQUÊNCIAS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS E AS PREVALÊNCIAS DE CC e CBL POSITIVAS

Os pacientes com 18 a 30 anos de idade apresentaram prevalência de CC positiva 3,67 vezes maior que os pacientes com mais de 30 anos. A prevalência de HPV pela idade difere consideravelmente entre MSM comparados com a população geral de mulheres, em que o pico de incidência é em adultos jovens, diminuindo sua incidência com o aumento da idade. Este fato ainda não é totalmente esclarecido, porém, Coutle et al., em 2012, relataram que adultos jovens tem maior número de parceiro/ ano estando mais suscetíveis a alterações

inflamatórias agudas induzidas pela infecção recente do HPV ou coinfecção por outros agentes demonstrando assim, maior número de citologias alteradas. (1, 23)

Pacientes do sexo feminino apresentaram prevalência de CC positiva 4,20 vezes maior do que os pacientes do sexo masculino. Esse dado foi discordante com o estudo de Conley et al., em 2010, que demonstraram uma prevalência maior das alterações citológicas em MSM. (86) Esse dado discordante provavelmente ocorreu pelo pequeno número de amostras do nosso estudo, embora a OMS tenha demonstrado maior incidência do câncer do canal anal em mulheres. (12)

Em relação à contagem de CD4, os pacientes com  $CD4 < 200$  cópias apresentaram uma prevalência de CC positiva 5,93 maior que os pacientes com contagem de CD4 entre 200 a 500 cópias. Picanto et al. demonstraram a associação de lesões anais com contagem de  $CD4 < 200/mm^3$ . Esse achado também está relacionado com a recidiva dessas lesões, demonstrando assim que a imunodepressão é fator de risco para desenvolvimento e recidiva dessas lesões. Nadal et al., em 2007, não obtiveram esses resultados, inferindo que a imunidade sistêmica isolada parece não interferir na gênese dessas lesões, sugerindo que o aspecto da imunidade local deve ser estudado. (9)

Os pacientes com tempo de infecção entre 1 a 5 anos apresentaram prevalência de CC positiva 3,60 maior que os pacientes com tempo de infecção maior que 5 anos. Esse dado é discordante com a teoria de que quanto maior o tempo de infecção pelo HIV, maior o tempo de exposição à infecção pelo HPV, sendo maior a chance de desenvolvimento de lesão precursora para o câncer anal. O pequeno número da amostra limitou essa análise.

Os pacientes que praticam sexo anal com mais de dois parceiros/ano apresentaram prevalência de CC positiva 4,92 vezes maior que os pacientes com um ou dois parceiros. Esse dado corrobora com a literatura, na medida em que Darragh et al (2011), Conley et al (2010) e Guimarães et al., 2011 também observaram chance maior de alterações citológicas em pacientes que têm mais parceiros/ano. (1, 18, 82, 83)

Pacientes com hábito de tabagismo apresentaram prevalência de CC positiva 3,26 vezes maior que os pacientes que não têm esse hábito. Apesar disso, dados publicados por Conley et al., em 2010, não demonstram essa associação.

As variáveis de TARV, coito anal, tempo de início do coito e etilismo não apresentaram associação significativa com a positividade dos achados da CC. A partir da segunda metade de década de 90, com a introdução da TARV, observou-se uma diminuição dramática da morbimortalidade dos pacientes soropositivos. Entretanto, a reconstituição

imunológica ocasionada pela TARV não pareceu proteger contra o câncer anal ou outras neoplasias definidoras de AIDS. (18)

Quanto à relação das alterações citológicas e intercuro anal receptivo, Conley et al., em 2010 relataram significância estatística. (82, 83)

No presente estudo, a concordância diagnóstica entre os métodos de CC e CBL foi quase perfeita. Ao observarmos a frequência das variáveis estudadas entre os dois métodos diagnósticos, a sua distribuição foi equivalente para idade, sexo, células de CD4, tempo de infecção pelo HIV, números de parceiros/ano e tabagismo entre os dois métodos citológicos.

Foram encontrados achados diferentes entre os resultados da CC, nos pacientes que usam TARV, (prevalência de CBL positivo 5,55 vezes maior, pacientes etilista prevalência de CBL positivo 2,14 vezes maior). Em relação ao etilismo, Guimarães et al., em 2011, demonstraram dados significativos quanto ao etilismo e positividade do HPV de alto risco. As variáveis coito anal e início (anos) da prática de coito anal não apresentaram associação significativa com a positividade da CBL.

## 6.5 ACHADOS MORFOLÓGICOS DE ACORDO COM OS DIAGNÓSTICOS PROPOSTOS (SISTEMA DE BETHESDA)

Quanto aos achados morfológicos, os princípios da citologia anal são equivalentes aos utilizados na citologia cervical. Dessa forma, existem poucos estudos que relatam os achados morfológicos da citologia anal. Scholefield et. al, em 1998, relataram alguns guias em relação à citologia anal. No entanto, incluíram apenas 30 amostras anais e não correlacionaram com diagnóstico histopatológico. (87) Scherman et al., em 1995, descreveram alguns achados morfológicos encontrados na CBL de espécimes anais, mas também não houve nenhuma correlação com achado anuscópicos ou histopatológicos. (88) Um dos objetivos do nosso estudo foi a avaliação morfológica da citologia anal nos métodos de citologia convencional e meio líquido, utilizando os critérios de Bethesda nas categorias diagnósticas. (75, 89)

Darragh e Winklerem (2011), relataram durante a interpretação da citologia anal a presença de células escamosas nucleadas do tipo superficial e intermediária, e células escamosas metaplásicas e colunares na amostra citológica normal. Na porção distal do canal anal, é frequente o aparecimento de células escamosas anucleadas, originadas do epitélio queratinizado. Quando tais células estão presentes em mais de 50% dos esfregaços, o diagnóstico é insatisfatório. De forma geral, uma variedade de organismos pode ser encontrada na citologia anal, podendo ocasionar alterações citopáticas semelhantes às

encontradas na citologia ginecológica (ex: herpes e cândida). Outros achados, como ectoparasitas, são essencialmente exclusivos do trato gastrointestinal, sendo raros nos testes de Papanicolaou.

Em comparação com a citologia ginecológica, lesões mais queratinizadas e alterações degenerativas são vistas com maior frequência na citologia anal. Os achados morfológicos do LSIL e HSIL na citologia anal são semelhantes aos achados da citologia cervical, particularmente quando estes derivam de regiões com metaplasia escamosa imatura ou epitélio não queratinizado, apesar de alterações de queratinizantes serem encontradas. Paraceratose atípica é um achado comumente identificado nessas lesões. (1)

Shehla et al., em 2005, revelaram numerosas células anucleadas nos esfregaços e poucos esfregaços foram insatisfatórios para o diagnóstico. A representatividade glandular estava presente em 56% dos casos. As células com paraceratose foram encontradas em 71% dos casos, nos esfregaços com diagnósticos negativos estavam presentes em 63% dos casos e nos casos com alterações citológicas de 74%. As células com paraceratose atípica foram vistas em 40% das amostras. O número de casos com a paraceratose atípica foram os casos com maior grau de displasias. A presença de coilócitos clássicos não foram frequentemente encontrados (17%). A citologia em base líquida tem baixa especificidade para predizer o grau da lesão. Pacientes com diagnósticos de ASC-US e LSIL tem um risco significativo de ter HSIL e deve ser recomendado anoscopia e biópsia. (90)

No presente estudo houve satisfatoriedade nas amostras com menos de 50% de células anucleadas em pelo menos uma amostra na CC e na CBL. Apenas em um caso foi diagnosticado inclusões virais sugestivas de herpes vírus na CC. As alterações morfológicas encontradas nos diagnósticos de ASC-US, LSIL, ASC-H e HSIL foram similares às encontradas na citologia cervical, assim como descrito por Darragh e Winkler em 2011. Os achados mais comuns foram: paraceratose atípica, coilocitose e hiper Cromatismo nuclear. (1)

## 6.6 ANUSCOPIA /BIÓPSIA RELACIONADOS AOS ACHADOS CITOLÓGICOS

A técnica da anoscopia com magnificação de imagem é similar à realizada na colposcopia cervical. Essa ferramenta é extremamente útil na determinação da extensão e características das lesões intraepiteliais anal e perianal. O procedimento permite a identificação de alterações do epitélio como áreas aceto-brancas para guiar o local a ser biopsiado. (91)

Nos casos que foram realizados CC, a anoscopia foi negativa em 66% (22/33), sendo destes 68,1% (15/22) com citologia normal. Os demais casos, 31,9% (7/22) apresentaram citologia positiva. Esses valores foram semelhantes nos casos em que foram realizados a CBL.

Os achados anuscópicos normais em citologias alteradas podem ser explicados por tratar-se de um exame operador-dependente, em que existe possibilidade de ocorrer alterações falso-negativas. Além disso, o aparelho colposcópico não consegue visualizar alterações no interior das criptas caso haja infecção nesse local. (1, 92) Nadal et al., em 2011, demonstraram que 21% dos pacientes com citologia alterada tiveram avaliações normais pela anoscopia e, após 12 meses de seguimento, 26% desses pacientes desenvolveram alterações clínicas vistas à anoscopia. (92) Darragh et al., em 2011, relataram variação inter-observador na análise citológica. Isso pode ser explicado pela falta de experiência do patologista na citologia anal. (1)

Dentre os casos analisados, 33,3% (11/33) apresentaram anoscopia alterada, sendo que 27,2% (3/11) apresentaram CC e CBL negativas. O restante dos casos, 72,8% (7/11), tinham alterações na CC e CBL, sendo que na CC o diagnóstico de HSIL foi o mais frequente entre os casos que apresentaram anoscopia alterada. Na CBL o diagnóstico de LSIL foi o achado mais comum.

Pereira et al., em 2008, demonstraram grau moderado de concordância entre a anoscopia e exame citológico, haja vista que 47,6% dos pacientes com lesões vistas na anoscopia apresentaram exame citológico alterado, sendo que nenhum diagnóstico de HSIL foi observado. (93) No presente estudo foi observado grau de concordância regular entre os exames citológicos de CC e CBL (Kappa = 0,3750). Tal fato pode ser explicado pelo pequeno número da nossa amostra e pela variação inter-observador entre os patologistas ao avaliar a citologia anal. Sirena et al., relataram 75% de anormalidades citológicas, vistas nos pacientes com anoscopia positiva, corroborando com nossos resultados. Sanjosé et al., que o diagnóstico citológico de ASC-US foi o mais frequentemente associado aos pacientes com anoscopia e biópsias positivas. Palefsky et al., em 1997, demonstraram que a sensibilidade da citologia anal é maior entre pacientes HIV positivos, principalmente em razão de as lesões mediadas pelo HPV serem mais comuns nestes grupos. As discrepâncias observadas entre esses dados, especialmente para a citologia, subestimam a frequência e o grau das lesões encontradas na anoscopia. (1, 40, 85)

Os pacientes que apresentaram anoscopia positiva foram submetidos à biópsia dirigida, as quais revelaram NIA I como achado mais comum. Três casos apresentaram

biópsia negativa, podendo este último fato ser explicado pela alta sensibilidade e baixa especificidade da anuscopia na detecção das lesões anais. (1) De forma geral, os achados anuscópicos positivos se correlacionam bem com os resultados histopatológicos, entretanto, diferentemente dos nossos dados, Pereira et al., em 2008, relataram uma maior prevalência de lesões de alto grau nos pacientes com anuscopia alterada. (91)

Ao analisarmos a sensibilidade dos diagnósticos citológicos e os resultados histopatológicos observamos 75% para CC e 85,7% para CBL com intervalo de confiança de 95%, variando de 34,91% a 96,81%.

Pereira et al., em 2008, encontraram moderado grau de concordância entre os resultados citológicos e histopatológicos, com alterações de menor intensidade vistas na citologia quando comparadas com as observadas nas biópsias. Outros autores também relataram essa discordância. Arain et al., em 2005, encontraram uma concordância de 90% entre os diagnósticos de HSIL e NIA III. Nos casos, porém, com os diagnósticos de ASC-US e LSIL a biópsia foi mais favorável para o diagnóstico de NIA III. (90) Coutlée et al., em 2012, observaram que paciente HIV positivos apresentaram maior concordância entre achados citológicos e histopatológicos quando comparados a pacientes HIV negativos. (23)

Dado a especificidade e sensibilidade dessas diferentes ferramentas – citologia, anuscopia e biópsia –, Palefsky et al., em 1998, advogam que essa tríade deve ser o manejo recomendando para os pacientes com citologia alterada (ASC-US, LSIL, ASC-H, HSIL). (1) Chiao et al., em 2006, também demonstraram que o uso da anuscopia e biópsia, para qualquer achado igual ou superior a ASC-US na citologia, eleva de forma significativa a especificidade e sensibilidade dos métodos para detecção das lesões precursoras do câncer anal. (1, 94) Salit et al., em 2010, revelaram que quando a anuscopia e a biópsia são indicadas a partir de achado citológico de HSIL a sensibilidade desse resultado chega a 91%. (1) Palefsky et al., em 1997, demonstraram valores semelhantes para o diagnóstico citológico a partir de ASC-US, desde que realizados em pacientes HIV positivos e MSM. (1)

## 6.7 INFECÇÃO POR HPV DETECTADOS PELO MÉTODO PAPILOCHECK®

Existe larga evidência na literatura de que as lesões precursoras do câncer anal estão associadas à infecção pelo HPV. A infecção anal com a genotipagem do HPV oncogênico pode ser a chave do fator causal das neoplasias intraepiteliais e do câncer anal, assim como observado no câncer do colo útero. Dessa forma, foi descrita alta prevalência do HPV anal entre as populações de risco. (18) Alguns autores sugerem a genotipagem para o HPV como

parte do rastreamento e triagem nos pacientes de alto risco para desenvolvimento do câncer anal. (1)

No presente estudo, foi realizado genotipagem do HPV pelo método de *microarrays* e correlacionado com os achados citológicos na CC e CBL. Nas amostras analisadas, foi observada prevalência de genotipagem positiva para o HPV de 72,7% (24/33 casos). Quando analisada a genotipagem, foi observado uma prevalência de HPV de alto risco de 64,2%, sendo o subtipo 16 o mais comum, enquanto a prevalência do HPV de baixo risco foi de 35,8%, sendo 44/55 o subtipo mais comum.

Guimarães et al., em 2011, encontraram em uma amostra de 557 pacientes HIV positivos uma prevalência de 65,6% de infecção pelo HPV, sendo o tipo oncogênico detectado em 40,7% das amostras. (18) Palesfky et al., em 1997, demonstraram dados semelhantes entre homens HIV positivos com prevalência de 80% para os subtipos de HPV oncogênico. (1) Os resultados do presente estudo, são semelhantes aos relatados. Além disso, Darragh et al., em 2013, relataram que apenas a presença do HPV 16 em pacientes HIV positivos de MSM foi significativamente mais específico para os achados na biópsia de lesão de alto grau do que a citologia isolada (71% x 47%), porém com sensibilidade reduzida. (11) No que concerne a esse dado, 9 dos 33 casos apresentaram anoscopia e biópsia alteradas, associadas à biologia molecular positiva. Foi observado que a presença de HPV de alto risco antecipa as alterações histopatológicas sendo estes presentes em 87,5%. Quando a tipagem do HPV foi positiva para o HPV 16 foi observado chance de 83,3% de biópsia positiva. Apesar disso, a análise estatística não mostrou significância.

Dados recentes mostram presença da infecção pelo HPV em 91% dos pacientes com citologia anal alterada. (23) Os subtipos de HPV 16 e 18 estiveram presentes em 69% dos pacientes com citologia mostrando NIA de alto grau e em 27% dos que apresentaram NIA de baixo grau. Os tipos de HPV mais comuns foram 16, 18 e 58 nas NIA de alto grau e 6 e 11 nas NIA de baixo grau. (23)

Dessa forma, a caracterização geográfica e o fator prevalência dos subtipos de HPV são fundamentais para o planejamento de programa de prevenção e imunização nos grupos de risco para o desenvolvimento do câncer anal. (19)

Dentre os casos com exame de genotipagem positiva, quando correlacionados aos resultados da citologia convencional, foi observado no presente estudo que 11/24 casos (45,8%) apresentaram resultado citológico negativo. Observou-se ainda que 5/24 casos (20,8%) ensejaram diagnósticos de LSIL e outros 5/24 casos (20,8%) de HSIL. Para a citologia em base líquida, o número de diagnósticos negativos foi equivalente ao da CC e os

diagnósticos de LSIL foram vistos em 9/24 casos (37,5%) de genotipagem positiva, constatando-se apenas um caso de HSIL.

De acordo com Walts et al., em 2005, a citologia com alterações superiores ou equivalentes a ASC-US tiveram alta chance de biópsia com lesão de alto grau. A detecção do HPV de alto risco ocorreu em 95,8% das biópsias positivas para alto grau. (95) Contudo, em larga proporção dos casos, a citologia isolada não prediz de forma acurada lesões subsequentes na biópsia. Palefsky et al., em 1997, relataram que 85% dos espécimes da citologia anal apresentaram teste para HPV positivo. (85)

No presente, foi observado entre os casos com genotipagem positiva grande proporção de infecções múltiplas para o HPV: 20/24 casos (83,3%). Na citologia convencional, somente 1/10 casos (10%) dos diagnósticos de LSIL e HSIL apresentaram infecção única para HPV. Na CBL todos os casos com diagnósticos de ASC-US, ou pior, apresentaram múltiplas infecções para o HPV.

Palefsky et al., em 2005, demonstraram que a biologia molecular para o HPV foi positiva em 82% dos pacientes HIV positivos, que também apresentaram mais de um subtipo de HPV. (1) Os que tiveram três ou mais subtipos representaram 73% do total. Darragh et al., em 2013, relataram que a combinação da citologia com o diagnóstico de LSIL e HPV positivo para os subtipos oncogênicos aumentou de forma significativa a especificidade para detecção de lesão de alto grau na biópsia, colocando a tipagem do HPV como parte dos futuros algoritmos de triagem. (11)

Guimarães et al., em 2011, observaram alta prevalência de outros subtipos de HPV, além dos 16 e 18, tornando frequente a detecção de múltiplos agentes em pacientes de risco, tendo prevalência de 57% de infecção de mais de um subtipo de HPV de alto risco. Homens HIV positivos apresentaram prevalência de 30,8% na detecção de 3 ou mais subtipos de HPV. Esse estudo também revela que a presença do  $CD4 < 200$  /mm elevou a chance de infecção pelo HPV do tipo oncogênico em três vezes. Piketty et al., em 2008, de forma semelhante, também encontraram um ou mais subtipos de HPV oncogênico presente em 59% de suas amostras. (1) Na tentativa de encontrar uma relação entre as múltiplas infecções por HPV com as alterações na biópsia guiadas por anoscopia, observamos no presente estudo que todos os casos de biópsia positiva tinham infecção por mais de dois subtipos de HPV.

Foi observado estudo atual um caso em que a genotipagem foi negativa e a biópsia positiva para lesão intraepitelial. De acordo com Walts et al., em 2005, o exame de biologia molecular negativa não exclui a presença de lesão intraepitelial, pois esta pode não ter sido amostrada corretamente ou o exame pode não incluir o subtipo de HPV presente na amostra.

(95) Dessa forma, em um pequeno percentual de pacientes, nem a citologia negativa nem a biologia molecular negativa, excluem a presença de uma alteração histopatológica. Alguns estudos sugerem que o manejo clínico nesses casos, deve ser a periodicidade do rastreamento. Diante de qualquer anormalidade citológica, deve-se realizar anoscopia, não sendo necessário novo teste molecular prévio. Esse tipo de problema ilustra a necessidade de novas ferramentas para o rastreamento do câncer anal, tais como a superexpressão do p16 e parâmetros clínicos da contagem de CD4 e carga viral nos pacientes com citologia alterada. (11)

Na população de risco para o câncer anal, o rastreamento com testes moleculares para HPV de alto risco, acrescenta pouco valor aos achados citológicos, por ter baixo valor preditivo positivo e baixa especificidade. O teste molecular específico para o HPV 16 tem se mostrado mais útil pela associação com as NIA de alto grau. O excelente valor preditivo negativo do teste para HPV de alto risco pode ser utilizado no seguimento, pós anoscopia de alta resolução e pós – tratamento. (54)

Estudos vêm demonstrando a importância da genotipagem para determinar o subtipo de HPV mais prevalente e programar medidas com o objetivo de diminuir a futura incidência de câncer anal. A vacina profilática contra os subtipos de HPV 16 e 18 tem o potencial de prevenir mais de 2/3 dos cânceres invasivos do canal anal em mulheres e homens. Conhecendo a caracterização da infecção viral em grupos de alto risco poderemos prever o potencial preventivo da vacina. O valor da vacinação em MSM HIV positivos para prevenir a infecção pelo HPV ainda é incerto, mas, resultados de estudos na fase II nesse grupo, mostraram alta taxa de soroconversão com a vacina quadrivalente. (96) A prevenção primária através da vacina quadrivalente (subtipos de HPV 6,11,16 e 18) tem mostrado diminuição do risco em desenvolver NIA de alto grau em 78% e a vacina bivalente (subtipos 16 e 18) impactou na diminuição na taxa de detecção do HPV 16 e 18 em 84% em mulheres. Os dados em pacientes MSM ainda são desconhecidos devido à pequena taxa de vacinação em homens. (47)

## 6.8 RASTREAMENTO E PERSPECTIVAS

Embora relativamente limitado o número de casos no presente estudo, foi observado que a citologia anal, tanto convencional quanto em base líquida, podem ser utilizadas no rastreamento das lesões precursoras do câncer do canal anal e ânus. Entretanto, sua utilização juntamente com outros métodos, como a anoscopia de alta resolução e biópsia, nos grupos

considerados de risco, aumenta de forma significativa o seu valor como preditor das lesões intraepiteliais anais. (1)

O emprego da genotipagem é importante para identificação dos subtipos de HPV, na medida em que seu subtipo oncogênico tem forte associação com o desenvolvimento do câncer anal, principalmente o HPV 16. O estudo do perfil epidemiológico dos subtipos de HPV mais prevalentes na população de risco, dão suporte para a vacinação específica para os subtipos mais frequentes e auxiliam nas comparações com outras pesquisas.

Em 2012 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) autorizou a utilização dessa vacina, em pacientes HIV positivos. É importante ressaltar a necessidade do estímulo no treinamento dos patologistas na avaliação das alterações citológicas anais em instituições de ensino e formação de centros de referência no tema em questão, fazendo com que o guia para rastreamento das lesões precursoras do câncer anal deixe de ser apenas empregado em meio de protocolos de pesquisa e se torne rotina difundida entre os diversos centros de referência do país. (97)

Esse método contribuiria para diminuição da angústia tanto dos profissionais de saúde quanto dos pacientes considerados de risco quando depararem com alterações citológicas ou histopatológicas, além de fornecer dados para melhor definição do esquema de seguimento quanto a sua periodicidade e ferramentas empregadas, implementação de medidas terapêuticas e taxa de conversão de lesões intra-epiteliais para lesões invasoras.

O emprego da prevenção secundária através do rastreamento teve seu início estimulado pela similaridade etiológica e patológica das lesões anais com as lesões cervicais. Apesar das diferenças entre as lesões intraepiteliais anais e cervicais serem substanciais, o rastreamento e tratamento das lesões anais se tornou no mínimo intuitivo e atrativo, mesmo sabendo-se que a identificação do local de surgimento da lesão neoplásica é incerta.

Alguns autores questionam o benefício do rastreamento devido a seu potencial impacto negativo nas questões físicas e psicológicas dos pacientes, além de elevar os custos financeiros da saúde pública sem evidente diminuição da mortalidade pelo câncer anal. Além disso, alguns autores relatam que as condutas terapêuticas nas lesões precursoras podem protelar o diagnóstico precoce de lesão invasora ao toque retal. (98) Uma resposta a tais críticas pode ser encontrada na dificuldade em obter dados longitudinais devido importante heterogeneidade dos grupos de risco estudados, diversas variantes de risco relacionadas ao surgimento e progressão das lesões precursoras do câncer anal, amostragem limitada dos grupos de estudo e uma particular dificuldade no seu seguimento. Nota-se também que as

ferramentas utilizadas para rastreamento ainda encontram-se em fase de padronização e curva de aprendizado. (47)

Todas essas questões ainda se mostram obscuras na literatura devido a carência de dados sólidos relacionados a custo-efetividade do rastreamento e são motivos de grande debate, o que leva à necessidade de estudos longitudinais direcionados ao tema e necessidade de identificação de novos biomarcadores preditores do desenvolvimento de lesões invasoras. (1, 11, 98)

## 6.9 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

O desenho do estudo por si só traz consigo limitações. Estudos descritivos transversais apresentam baixa capacidade de generalização, sugerindo, entretanto, explicações para as variações de frequência, o que serve de base ao prosseguimento de pesquisas sobre o assunto, constituindo-se numa primeira etapa para formulação de hipóteses. (99) Estudos demonstram o benefício do rastreamento precoce do câncer anal. Todavia, ainda não há estudos randomizados, o que torna o tema controverso quanto ao rastreamento, seguimento e tratamento das lesões intraepiteliais anais.

Outra limitação é o viés de seleção. O recrutamento foi feito com base na demanda de pacientes que foram atendidos no ambulatório de infectologia e que aceitaram a participação no estudo. Assim, a distribuição das variáveis pode não refletir a real proporção de pacientes que são atendidos nesse serviço. As informações foram colhidas diretamente com os pacientes, que podem não compreender adequadamente os questionamentos e mascarar algumas informações.

Vieses de aferição podem ocorrer em todas as fases da análise. As coletas das amostras, apesar da padronização das sequências, podem sofrer influências de diversos fatores, tais como: desconforto com exame, dor, sangramento e abundante material fecal.

Vieses também ocorrem quanto à variabilidade nas análises das amostras entre diferentes patologistas, pois citologias anais são incomuns na prática diária, assim como os resultados obtidos pela anoscopia dependerem da experiência do operador.

Quanto ao tamanho da amostra, sabe-se que conclusões da análise de eventos que ocorrem em menos de 10% da casuística apresentam baixo poder estatístico. Dessa forma, os resultados referentes às variáveis de baixa frequência devem ser analisados com cautela. A incidência do câncer anal é baixa, entretanto, o objetivo do presente eram as lesões precursoras.

## 7 CONCLUSÃO

Concluimos, pois, que a citologia esfoliativa convencional e a citologia em base líquida demonstraram ser igualmente eficazes, podendo ser ambas utilizadas no rastreamento das lesões precursoras do câncer anal.

Em resumo, nas condições em que foi realizado o presente estudo, foi observado que:

1. Pessoas com idade de 18 a 30 anos; sexo feminino; contagem de células CD4<200/mm<sup>3</sup>; tempo de infecção pelo HIV de 1 a 5 anos e tabagismo apresentaram associação significativa para ter CC positiva.
2. A idade de 18 a 30 anos; sexo feminino; contagem de células CD4<200/mm<sup>3</sup>; tempo de infecção pelo HIV de 1 a 5 anos; mais de dois parceiros/ano; tabagismo e etilismo apresentaram associação significativa para ter CBL positiva.
3. As características morfológicas encontradas nos esfregaços citológicos anais são semelhantes aos encontrados nos estudos referentes às citologias cervicais. Assim, é plausível a transposição dos critérios de Bethesda para citologia anal.
4. É possível e viável incorporar o exame de anoscopia de alta resolução para o diagnóstico de HPV do canal anal e ânus na forma subclínica. Tal providência revela-se de grande valia para o rastreamento dos pacientes considerados de risco quando associados à citologia anal.
5. Houve discrepância entre os achados citológicos/histopatológicos, sendo que os achados citológicos superestimaram as alterações histopatológicas.
6. A genotipagem se mostrou positiva na maioria dos casos com citologia alterada, identificando presença do HPV até mesmo quando os resultados citológicos foram normais.

7. A genotipagem para o HPV de alto risco foi positiva na quase totalidade dos casos com biópsias positivas, demonstrando tendência das alterações displásicas serem induzidas pelo HPV.
8. Nos casos com alterações citológicas (ASC-US ou maior grau da lesão) o subtipo do HPV mais frequente foi o subtipo 16, sugerindo sua relação com a gênese das lesões precursoras do câncer anal.
9. Foi observada significância estatística em relação à presença de múltiplos subtipos de HPV e alterações histopatológicas.

## 8 REFERÊNCIAS

1. Darragh TM, Winkler B. Anal cancer and cervical cancer screening: key differences. *Cancer cytopathology*. 2011;119(1):5-19.
2. Etienney I, Vuong S, Daniel F, Mory B, Taouk M, Sultan S, et al. Prevalence of anal cytologic abnormalities in a French referral population: a prospective study with special emphasis on HIV, HPV, and smoking. *Diseases of the colon and rectum*. 2008;51(1):67-72.
3. <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/anus.html>. [cited 2012 10-18].
4. <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/anal>. [cited 2013 02-20].
5. Durães LdC, Sousa JB. Câncer anal e doenças sexualmente transmissíveis: qual a correlação? *Revista do Colegio Brasileiro de Cirurgioes*. 2010;37:265-8.
6. Gimenez F, Costa-e-Silva IT, Daumas A, Araujo J, Medeiros SG, Ferreira L. The value of high-resolution anoscopy in the diagnosis of anal cancer precursor lesions in HIV-positive patients. *Arquivos de gastroenterologia*. 2011;48(2):136-45.
7. Costa e Silva IT, Gimenez FS, Guimaraes RA, Camelo RT, Melo MN, de Barros FS, et al. [Anal cytology as a screening method for early detection of anal cancer: are hydrophilic cotton smears really unsatisfactory?]. *Acta cirurgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia*. 2005;20(1):109-14.
8. Wentzensen N. Screening for anal cancer: endpoints needed. *The lancet oncology*. 2012;13(5):438-40.
9. Nadal S, Calore E, Nadal L. Citologia anal para rastreamento de lesões pré-neoplásicas; Anal cytology for screening of pre-neoplastic lesions. *Rev Assoc Med*. 2007.
10. Soares PC, Ferreira S, Villa LL, Matos D. Identificação do papilomavírus humano em doentes com carcinoma de células escamosas do canal anal e sua relação com o grau de diferenciação celular e estadiamento. *Revista Brasileira de Coloproctologia*. 2011;31:8-16.
11. Darragh TM, Colgan TJ, Thomas Cox J, Heller DS, Henry MR, Luff RD, et al. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization project for HPV-associated lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*. 2013;32(1):76-115.
12. Hamilton SRA, L.A. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System 1ed. Paul Kleihues MDLHS, M.D., editor. Lyon, France2000.
13. Pandey P. Anal anatomy and normal histology. *Sex Health*. 2012;9(6):513-6.

14. Shia J. An update on tumors of the anal canal. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2010;134(11):1601-11.
15. Richart RM. A modified terminology for cervical intraepithelial neoplasia. *Obstetrics and gynecology*. 1990;75(1):131-3.
16. The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses: developed and approved at the National Cancer Institute Workshop in Bethesda, Maryland, December 12-13, 1988. *Human pathology*. 1990;21(7):704-8.
17. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2002;287(16):2114-9.
18. Guimaraes MD, Grinsztejn B, Melo VH, Rocha GM, Campos LN, Pilotto JH, et al. Anal HPV prevalence and associated factors among HIV-seropositive men under antiretroviral treatment in Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2011;57 Suppl 3:S217-24.
19. Palefsky J. Biology of HPV in HIV infection. *Advances in dental research*. 2006;19(1):99-105.
20. Damay A, Fabre J, Costes V, Didelot J, Didelot M, Boulle N, et al. Human papillomavirus (HPV) prevalence and type distribution, and HPV-associated cytological abnormalities in anal specimens from men infected with HIV who have sex with men. *Journal of Medical Virology*. 2010;82(4):592-6.
21. Nadal SR, Manzione CR. Rastreamento e seguimento dos portadores das lesões anais induzidas pelo papilomavírus humano como prevenção do carcinoma anal. *Revista Brasileira de Coloproctologia*. 2009;29:250-3.
22. Nadal SR, Manzione CR. Papilomavirus humano e o câncer anal. *Revista Brasileira de Coloproctologia*. 2006;26:204-7.
23. Coutlee F, de Pokomandy A, Franco EL. Epidemiology, natural history and risk factors for anal intraepithelial neoplasia. *Sex Health*. 2012;9(6):547-55.
24. Machalek DA, Grulich AE, Jin F, Templeton DJ, Poynten IM. The epidemiology and natural history of anal human papillomavirus infection in men who have sex with men. *Sex Health*. 2012;9(6):527-37.
25. Holowaty P, Miller AB, Rohan T, To T. Natural history of dysplasia of the uterine cervix. *Journal of the National Cancer Institute*. 1999;91(3):252-8.
26. Kisseljov FL. Virus-associated human tumors: cervical carcinomas and papilloma viruses. *Biochemistry Biokhimiia*. 2000;65(1):68-77.
27. Santos O.S.N. RVTM, Wigg D.M. *Introdução à Virologia Humana* 2002.
28. Lindel K, Beer KT, Laissue J, Greiner RH, Aebbersold DM. Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx: a radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma. *Cancer*. 2001;92(4):805-13.

29. Scully C. Oral squamous cell carcinoma; from an hypothesis about a virus, to concern about possible sexual transmission. *Oral oncology*. 2002;38(3):227-34.
30. Neves D, Camara G, Alencar T, Cruz M. Prevalence of human papillomavirus in penile carcinoma. *Braz J Urol*. 2002.
31. Rivoire W, Capp E, Corletae H, Silva I. Bases biomoleculares da oncogênese cervical. *Rev Bras de Cancerol*. 2001.
32. Nelson LM, Rose RC, Moroianu J. Nuclear import strategies of high risk HPV16 L1 major capsid protein. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(26):23958-64.
33. Fehrmann F, Laimins LA. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene*. 2003;22(33):5201-7.
34. Lee D, Lee B, Kim J, Kim DW, Choe J. cAMP response element-binding protein-binding protein binds to human papillomavirus E2 protein and activates E2-dependent transcription. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(10):7045-51.
35. Payne S, Kernohan NM, Walker F. Proliferation in the normal cervix and in preinvasive cervical lesions. *Journal of clinical pathology*. 1996;49(8):667-71.
36. Silva AM, Amaral MV, Cruz AD. O Papel do Papiloma Vírus Humano na Carcinogênese. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. 2003;29:48-54.
37. Stubenrauch F, Laimins LA. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Seminars in cancer biology*. 1999;9(6):379-86.
38. Thomas JT, Hubert WG, Ruesch MN, Laimins LA. Human papillomavirus type 31 oncoproteins E6 and E7 are required for the maintenance of episomes during the viral life cycle in normal human keratinocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(15):8449-54.
39. Villa LL. Aspectos moleculares da oncogênese por papilomavírus. Bibbo M, editor. Rio de Janeiro: Revinter; 1998.
40. Bosch FX, Rohan T, Schneider A, Frazer I, Pfister H, Castellsague X, et al. Papillomavirus research update: highlights of the Barcelona HPV 2000 international papillomavirus conference. *Journal of clinical pathology*. 2001;54(3):163-75.
41. Bechtold V, Beard P, Raj K. Human papillomavirus type 16 E2 protein has no effect on transcription from episomal viral DNA. *Journal of virology*. 2003;77(3):2021-8.
42. Benson JD, Howley PM. Amino-terminal domains of the bovine papillomavirus type 1 E1 and E2 proteins participate in complex formation. *Journal of virology*. 1995;69(7):4364-72.
43. Carrancá A, Gariglio P. Aspectos moleculares de los papilomavirus humanos y su relación con el cáncer cérvico-uterino; Molecular aspects of human papillomaviruses and their relationship &hellip;. *Rev invest clín*. 1993.

44. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000;92(9):690-8.
45. Fairley CK, Brotherton JM, Hillman R, Grulich AE. Why a special issue on anal cancer and what is in it? *Sex Health*. 2012;9(6):501-3.
46. Nyitray AG. The epidemiology of anal human papillomavirus infection among women and men having sex with women. *Sex Health*. 2012;9(6):538-46.
47. Grulich AE, Hillman R, Brotherton JM, Fairley CK. Time for a strategic research response to anal cancer. *Sex Health*. 2012;9(6):628-31.
48. Fox PA. Treatment options for anal intraepithelial neoplasia and evidence for their effectiveness. *Sex Health*. 2012;9(6):587-92.
49. Palefsky JM, Giuliano AR, Goldstone S, Moreira ED, Jr., Aranda C, Jessen H, et al. HPV vaccine against anal HPV infection and anal intraepithelial neoplasia. *The New England journal of medicine*. 2011;365(17):1576-85.
50. Umiker WO. Oral and laryngeal exfoliative cytology. *CA: a cancer journal for clinicians*. 1960;10:160-4.
51. Landstra JM, Ciarrochi J, Deane FP. Psychosocial aspects of anal cancer screening: a review and recommendations. *Sex Health*. 2012;9(6):620-7.
52. Palefsky JM. Practising high-resolution anoscopy. *Sex Health*. 2012;9(6):580-6.
53. Darragh TM, Winkler B. Screening for anal neoplasia: anal cytology - sampling, processing and reporting. *Sex Health*. 2012;9(6):556-61.
54. Roberts JM, Ekman D. The reporting of anal cytology and histology samples: establishing terminology and criteria. *Sex Health*. 2012;9(6):562-7.
55. Acha A, Ruesga MT, Rodriguez MJ, Martinez de Pancorbo MA, Aguirre JM. Applications of the oral scraped (exfoliative) cytology in oral cancer and precancer. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal*. 2005;10(2):95-102.
56. Diniz Freitas M, García García A, Crespo Abelleira A, Martins Carneiro JL, Gándara Rey JM. Aplicaciones de la citología exfoliativa en el diagnóstico del cáncer oral. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Ed impresa)*. 2004;9:355-61.
57. Phanuphak N, Teeratakulpisarn N, Lim C, Changnam T, Kerr S, Deesua A, et al. Comparable performance of conventional and liquid-based cytology in diagnosing anal intraepithelial neoplasia in HIV-infected and -uninfected Thai men who have sex with men. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2013.
58. Berry JM, Palefsky JM, Jay N, Cheng SC, Darragh TM, Chin-Hong PV. Performance characteristics of anal cytology and human papillomavirus testing in patients with high-resolution anoscopy-guided biopsy of high-grade anal intraepithelial neoplasia. *Diseases of the colon and rectum*. 2009;52(2):239-47.

59. Utagawa ML, Pereira SM, Makabe S, Maeda MY, Marques JA, Santoro CL, et al. Pap test in a high-risk population comparison of conventional and liquid-base cytology. *Diagnostic cytopathology*. 2004;31(3):169-72.
60. Darragh TM, Jay N, Tupkelewicz BA, Hogeboom CJ, Holly EA, Palefsky JM. Comparison of conventional cytologic smears and ThinPrep preparations from the anal canal. *Acta cytologica*. 1997;41(4):1167-70.
61. Syrjanen K, Derchain S, Roteli-Martins C, Longatto-Filho A, Hammes LS, Sarian L. Value of conventional pap smear, liquid-based cytology, visual inspection and human papillomavirus testing as optional screening tools among latin american women <35 and > or =35 years of age: experience from the Latin American Screening Study. *Acta cytologica*. 2008;52(6):641-53.
62. Herbert A, Johnson J. IS IT REALITY OR AN ILLUSION THAT LIQUID-BASED CYTOLOGY IS BETTER THAN CONVENTIONAL CERVICAL SMEARS? AUTHORS' REPLY. *Cytopathology*. 2002;13(2):133-.
63. Bibbo M, Klump WJ, DeCecco J, Kovatich AJ. Procedure for immunocytochemical detection of P16INK4A antigen in thin-layer, liquid-based specimens. *Acta cytologica*. 2002;46(1):25-9.
64. Keyhani-Rofagha S, Vesey-Shecket M. Diagnostic value, feasibility, and validity of preparing cell blocks from fluid-based gynecologic cytology specimens. *Cancer*. 2002;96(4):204-9.
65. Liaw KL, Glass AG, Manos MM, Greer CE, Scott DR, Sherman M, et al. Detection of human papillomavirus DNA in cytologically normal women and subsequent cervical squamous intraepithelial lesions. *Journal of the National Cancer Institute*. 1999;91(11):954-60.
66. De Palo GC, W.; Dexeus, S. *Patologia e tratamento do trato genital inferior*. Rio de Janeiro: Medsi; 2002.
67. Goodman A. Screening for human papillomavirus infections of the lower genital tract. *Reviews in Gynaecological Practice*. 2002;2(1-2):99-101.
68. Molina AT, P.R. *Biologia molecular. Atualização*. 2 ed. São Paulo: Einstein; 2004.
69. Guindalini C, Tufik S. Uso de microarrays na busca de perfis de expressão gênica: aplicação no estudo de fenótipos complexos. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2007;29:370-4.
70. PapilloCheck - Test Kit\* for the genotyping of 24 types of genital HPV. In: GmbH GB-O, editor. Germany 2008.
71. Tsoumpou I, Arbyn M, Kyrgiou M, Wentzensen N, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, et al. p16(INK4a) immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. *Cancer treatment reviews*. 2009;35(3):210-20.

72. Soma M, Kamaraj S. Detection of Human Papillomavirus in Cervical Gradings by Immunohistochemistry and Typing of HPV 16 and 18 in High-Grades by Polymerase Chain Reaction. *Journal of laboratory physicians*. 2010;2(1):31-6.
73. Negri G, Moretto G, Menia E, Vittadello F, Kasal A, Mian C, et al. Immunocytochemistry of p16INK4a in liquid-based cervicovaginal specimens with modified Papanicolaou counterstaining. *Journal of clinical pathology*. 2006;59(8):827-30.
74. Tramuja da Costa ESI, Coelho Ribeiro M, Santos Gimenez F, Dutra Ferreira JR, Galvao RS, Vasco Hargreaves PE, et al. Performance of p16INK4a immunocytochemistry as a marker of anal squamous intraepithelial lesions. *Cancer cytopathology*. 2011;119(3):167-76.
75. Solomon D, Nayar, R. *Sistema Bethesda para Citopatologia Cervicovaginal*. 2 ed2004. 188 p.
76. Shrout PE. Measurement reliability and agreement in psychiatry. *Statistical methods in medical research*. 1998;7(3):301-17.
77. Moyses INFJ. *Epidemiology Beyond the Basis*.: Jones & Bartlett Learning; 2000.
78. Hutchinson ML, Cassin CM, Ball HG, 3rd. The efficacy of an automated preparation device for cervical cytology. *American journal of clinical pathology*. 1991;96(3):300-5.
79. Gomeple CK, L.G. *Citologia ginecológica e suas bases anatomoclínicas*. Rio de Janeiro: Manole Ltda; 1997.
80. Beerman H, van Dorst EB, Kuenen-Boumeester V, Hogendoorn PC. Superior performance of liquid-based versus conventional cytology in a population-based cervical cancer screening program. *Gynecologic oncology*. 2009;112(3):572-6.
81. Schledermann D, Ejersbo D, Hoelund B. Improvement of diagnostic accuracy and screening conditions with liquid-based cytology. *Diagnostic cytopathology*. 2006;34(11):780-5.
82. Davey E, Barratt A, Irwig L, Chan SF, Macaskill P, Mannes P, et al. Effect of study design and quality on unsatisfactory rates, cytology classifications, and accuracy in liquid-based versus conventional cervical cytology: a systematic review. *Lancet*. 2006;367(9505):122-32.
83. Conley L, Bush T, Darragh TM, Palefsky JM, Unger ER, Patel P, et al. Factors associated with prevalent abnormal anal cytology in a large cohort of HIV-infected adults in the United States. *J Infect Dis*. 2010;202(10):1567-76.
84. Hillman RJ, van Leeuwen MT, Vajdic CM, McHugh L, Prestage GP, Botes LP, et al. Prevalence and predictors of high-grade anal intraepithelial neoplasia in a community-based sample of homosexual men. *Sex Health*. 2012;9(6):574-9.
85. Palefsky JM, Holly EA, Hogeboom CJ, Berry JM, Jay N, Darragh TM. Anal cytology as a screening tool for anal squamous intraepithelial lesions. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology : official publication of the International Retrovirology Association*. 1997;14(5):415-22.

86. Conley L, Bush T, Darragh TM, Palefsky JM, Unger ER, Patel P, et al. Factors Associated with Prevalent Abnormal Anal Cytology in a Large Cohort of HIV-Infected Adults in the United States. *The Journal of Infectious Diseases*. 2010;202(10):1567-76.
87. Scholefield JH, Johnson J, Hitchcock A, Kocjan G, Smith JH, Smith PA, et al. Guidelines for anal cytology--to make cytological diagnosis and follow up much more reliable. *Cytopathology*. 1998;9(1):15-22.
88. Sherman ME, Friedman HB, Busseniers AE, Kelly WF, Carner TC, Saah AJ. Cytologic diagnosis of anal intraepithelial neoplasia using smears and cytyc thin-preps. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 1995;8(3):270-4.
89. Friedlander MA, Stier E, Lin O. Anorectal cytology as a screening tool for anal squamous lesions: cytologic, anoscopic, and histologic correlation. *Cancer*. 2004;102(1):19-26.
90. Arain S, Walts AE, Thomas P, Bose S. The Anal Pap Smear: Cytomorphology of squamous intraepithelial lesions. *CytoJournal*. 2005;2(1):4.
91. Pereira A, Lacerda H, Barros R. Diagnostic methods for prevention of anal cancer and characteristics of anal lesions caused by HPV in men with HIV/AIDS. *Brazilian Journal of*. 2008.
92. Nadal SR, Calore EE, Manzione TdS, Machado SP, Manzione CR, Seid VE, et al. Evolução dos doentes com citologia oncológica alterada e colposcopia anal normal. *Revista Brasileira de Coloproctologia*. 2011;31:71-6.
93. Pereira AC, Lacerda HR, Barros RC. Diagnostic methods for prevention of anal cancer and characteristics of anal lesions caused by HPV in men with HIV/AIDS. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*. 2008;12(4):293-9.
94. Soisson AP, Geszler G, Soper JT, Berchuck A, Clarke-Pearson DL. A comparison of symptomatology, physical examination, and vaginal cytology in the detection of recurrent cervical carcinoma after radical hysterectomy. *Obstetrics and gynecology*. 1990;76(1):106-9.
95. Walts AE, Thomas P, Bose S. Anal cytology: is there a role for reflex HPV DNA testing? *Diagnostic cytopathology*. 2005;33(3):152-6.
96. Wilkin T, Lee JY, Lensing SY, Stier EA, Goldstone SE, Berry JM, et al. Safety and immunogenicity of the quadrivalent human papillomavirus vaccine in HIV-1-infected men. *J Infect Dis*. 2010;202(8):1246-53.
97. Darragh TM, Tokugawa D, Castle PE, Follansbee S, Borgonovo S, LaMere BJ, et al. Interrater agreement of anal cytology. *Cancer cytopathology*. 2013;121(2):72-8.
98. Howard K. The cost-effectiveness of screening for anal cancer in men who have sex with men: a systematic review. *Sex Health*. 2012;9(6):610-9.

99. Bonita RB, R.; Kjellström, T. . Epidemiologia Básica. 2 ed. Santos: Livraria Santos Editora; 2010.

## APÊNDICES

## 9.1 APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO

1-Sexo: ( ) feminino ( ) masculino

2- Idade: \_\_\_\_ anos

3- Ausência de lesão anal externa ( ) sim ( ) não

4-Estado imunitário (dosagem de CD4): \_\_\_\_\_/mm<sup>3</sup>

5-Tempo de infecção pelo HIV: \_\_\_\_\_anos

6-Uso de terapia ARV: ( ) sim ( ) não

7- Pratica coito anal: ( ) sim ( ) não

8-Quando iniciou o coito anal: \_\_\_\_\_ anos

9- Número de parceiros/ano: \_\_\_\_\_

10-Tabagismo: ( ) sim ( ) não

11- Etilismo: ( ) sim ( ) não

## 9.2 APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### I-TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, \_\_\_\_\_, identidade nº \_\_\_\_\_, nascido em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_, residente em \_\_\_\_\_, declaro ter lido, ouvido e concordado com este documento. Eu aceito me submeter à colheita do material para exame citológico, a qual será feita por meio da fricção de uma escova, sobre a mucosa anal, a fim de que as células descamem. O exame será feito nos ambulatórios de DST/AIDS do HUB. Tal exame permitirá detecção precoce da lesão intra-epitelial anal (lesão precursora do câncer anal) da qual posso ser portador(a). Tenho também conhecimento de que ele será utilizado na pesquisa científica nominada *Estudo comparativo entre os exames de citologia esfoliativa convencional e em meio líquido para o rastreamento de lesões intra-epiteliais anais associadas à infecção pelo papillomavírus humano em pacientes portadores o vírus da imunodeficiência.*

Sei que sou portador(a) do vírus da imunodeficiência humana (HIV), e necessito de exames complementares para rastreamento de lesões precursoras do câncer anal, para posterior tratamento e sei também que o presente exame é necessário para ajudar a esclarecer e confirmar o precocemente o diagnóstico. Sou totalmente voluntário a realização desse procedimento mesmo sabendo que não possuo nenhuma lesão externa. Tenho conhecimento de que a colheita poderá ser desconfortável. É um exame simples e rápido e não oferece nenhum risco à minha saúde. Eu sei também, que meu exame será confirmado pela biologia molecular, que é o método mais sensível para a confirmação e determinação do tipo viral. Caso haja indicação clínica de realizar uma biópsia, concordarei com o procedimento para confirmação diagnóstica.

Fui esclarecido(a) que serei atendido(a) por médicos dos ambulatórios de origem e que a colheita citológica será realizada por um médico anatomopatologista que participa do curso de doutorado da Faculdade de Medicina – UNB., acompanhada pelos seus professores. Sei que ela me atenderá, esclarecerá todas as minhas dúvidas, e que, dependendo do resultado dos exames realizados, será proposto o tratamento, o qual será executado pela equipe técnica dos Ambulatórios – UNB, com orientação dos professores, ou por outras clínicas do HUB, caso seja necessário.

Autorizo que sejam providenciadas minhas fichas clínicas e que sejam realizados todos os exames clínicos e complementares necessários para a elaboração do diagnóstico. Autorizo também que meus dados sejam utilizados para estudo e aprendizado, atividades e publicações científicas, tanto no país como no exterior, respeitada toda a legislação vigente em relação ao assunto. Toda informação do meu caso será sempre confidencial e sigilosa. Não terei nenhum gasto financeiro.

Participo da pesquisa por minha vontade e fui esclarecido de que poderei recusar a participar ou desistir a qualquer momento, sem qualquer prejuízo. Qualquer dúvida posso ligar para Dra. Livia Bravo Maia, telefone (61)-34485499.

Brasília DATA:.....

Assinatura do Médico.....

Assinatura da Paciente ou Representante ou Responsável.....

TESTEMUNHA.....

Em caso de desistência do paciente em continuar participando da pesquisa:

Revogo o consentimento prestado no dia..... e afirmo que não desejo prosseguir no tratamento que me foi proposto, que dou como finalizado nesta data.

CIDADE: Brasília DATA:.....

Assinatura do Médico.....

Assinatura da Paciente ou Representante ou Responsável.....

TESTEMUNHA.....

### 9.3 APÊNDICE C: TABELA DOS DADOS DOS PACIENTES COM ACHADOS CITOLÓGICOS / ANUSCÓPICOS / HISTOPATOLÓGICOS E MOLECULARES

CASO	IDADE	SEXO	CD4	T INFEÇ - HIV	TARV	COITO ANAL	ANOS COITO AN	Nº PARC	TABAG	ETIL	CC	CBL	ANUSCOP	BIÓPSIA	HPV ALTO	HPV BAIXO
1	46	F	566	7	S	N	0	1	N	N	ASC-US	ASC-US	NEGATIVA	0	0	0
2	29	M	422	4	S	S	12	6	N	N	LIAG	LIAG	POSITIVA	NIA III	X	0
3	32	M	162	1	S	S	4	1	N	N	LIBG	LIBG	POSITIVA	NEGATIVA	0	0
4	31	M	350	1	S	S	11	7	S	S	LIAG	ASC-H	POSITIVA	NIA I	X	X
5	30	M	420	8	S	S	22	3	N	N	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVA	0	X	X
6	44	M	443	10	S	S	15	1	S	S	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVA	NIA I	0	0
7	32	M	582	1	N	S	12	10	N	S	LIAG	LIBG	POSITIVA	NIA I	X	X
8	47	F	136	12	S	N	0	1	S	N	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVA	0	X	0
9	34	M	558	8	S	S	2	1	S	N	LIAG	LIBG	POSITIVA	NIA I	X	0
10	38	M	702	3	N	N	0	4	S	N	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVA	0	0	0
11	44	F	379	3	S	S	10	1	N	N	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVA	0	0	0
12	49	M	1068	10	S	S	20	20	N	N	NEGATIVO	LIBG	NEGATIVA	0	X	0
13	40	M	529	16	S	S	20	1	N	N	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVA	NEGATIVO	0	X
14	38	M	873	8	S	S	13	8	N	N	ASC-US	ASC-US	POSITIVA	NEGATIVO	X	0
15	42	M	772	26	S	N	0	1095	S	N	LIBG	LIBG	NEGATIVA	0	X	X
16	46	M		22	S	N	0	20	N	N	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVA	0	X	0
17	39	M	580	10	S	S	15	20	N	S	ASC-US	LIBG	NEGATIVA	0	X	X
18	45	M	323	1	S	N	0	3	N	S	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVA	0	0	0
19	46	M	355	12	S	S	30	10	S	S	LIBG	LIBG	POSITIVA	NIA I	X	X
20	40	F	161	13	S	S	10	1	N	N	LIBG	LIBG	NEGATIVA	0	X	0
21	36	M	661	13	S	S	5	1	N	N	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVA	0	0	X
22	31	M	390	7	S	S	19	10	N	S	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVA	0	0	X
23	48	F	1165	2	N	S	26	1	N	N	LIAG	NEGATIVO	NEGATIVA	0	X	0
24	46	M	409	9	S	S	9	1	N	N	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVA	0	0	0
25	18	M	410	1	N	S	2	4	N	N	LIBG	ASC-US	NEGATIVA	0	X	X
26	39	F	644	12	S	N	0	1	S	S	ASC-US	LIBG	NEGATIVA	0	X	X
27	30	M	41	7	S	S	14	1	S	S	LIBG	LIBG	POSITIVA	NIA I	X	X
28	47	F	218	3	S	N	0	2	N	N	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVA	0	X	X
29	44	M	308	5	N	S	6	2	N	N	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVA	NIA I	X	X

Legenda: T INFEÇ HIV: Tempo de infecção pelo HIV; TARV: terapia antirretroviral; COITO ANAL: Coito anal receptivo; ANOS COITO NA: anos que pratica coito anal; Nº PARC: número de parceiros /ano; TABAG: tabagismo; ETIL: etilismo; CC: citologia convencional; CBL: citologia em base líquida; ANUSCOP: anuscopia; HPV ALTO: subtipos de HPV de alto risco oncogênico; HPV BAIXO: subtipos de HPV de baixo risco oncogênico.; S: sim; N: não; X: positivo; 0: negativo

(continua)

(continuação)

CASO	IDADE	SEXO	CD4	T INFEC - HIV	TARV	COITO ANAL	ANOS COITO AN	N° PARC	TABAG	ETIL	CC	CBL	ANUSCOP	BIÓPSIA	HPV ALTO	HPV BAIXO
30	43	M	917	9	S	S	30	6	N	N	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVA		0	0 X
31	42	F	611	19	S	S	4	1	N	N	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVA		0	0
32	52	F	746	8	S	N	0	1	N	N	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVA		0	0
33	39	F	280	7	S	S	3	1	N	S	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVA		0	0

Legenda: T INFEC HIV: Tempo de infecção pelo HIV; TARV: terapia antirretroviral; COITO ANAL: Coito anal receptivo; ANOS COITO NA: anos que pratica coito anal; N° PARC: número de parceiros /ano; TABAG: tabagismo; ETIL: etilismo; CC: citologia convencional; CBL: citologia em base líquida; ANUSCOP: anoscopia; HPV ALTO: subtipos de HPV de alto risco oncogênico; HPV BAIXO: subtipos de HPV de baixo risco oncogênico.; S: sim; N: não; X: positivo; 0: negativo

(conclusão)

CASO	CC	GLAN	META	CA + 50%	CA -50%	HIPER	MNI	N/C	PARA	P A	COI	INFLA	FLORA	MF	AMOS
1	ASC-US	X	X	-	x	-	-	-	x	-	-	-	CB	X	1
1	ASC-US	-	X	-	X	-	-	-	X	-	-	-	CB	X	2
2	LIAG	X	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	CB	-	1
2	LIAG	X	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	CB	-	2
3	LIBG	X	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	CB	X	1
3	LIBG	X	X	-	X	-	X	X	X	-	X	X	CB	X	2
4	LIAG	X	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	CB	X	1
4	INSAT	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	CB	X	2
5	NEGATIVO	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	CB	X	1
5	NEGATIVO	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	CB	X	2
6	NEGATIVO	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	CB	X	1
6	NEGATIVO	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	CB	X	2
7	LIAG	X	-	-	X	X	X	X	X	X	X	-	CB	X	1
7	INSAT	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	CB	X	2
8	NEGATIVO	X	X	-	X	-	-	-	-	-	-	-	CB	X	1
8	INSAT	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	CB	X	2
9	LIAG	X	X	-	X	X	X	X	X	X	-	-	CB	X	1
9	LIAG	X	X	-	X	X	X	X	X	X	-	-	CB	X	2
10	INSAT	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	CB	X	1
10	NEGATIVO	X	X	-	X	-	-	-	-	-	-	-	CB	X	2
11	NEGATIVO	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	CB	X	1
11	NEGATIVO	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	CB	X	2
12	NEGATIVO	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	CB	X	1
12	NEGATIVO	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	CB	X	2
13	NEGATIVO	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	CB	X	1
13	NEGATIVO	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	CB	X	2
14	ASC-US	X	-	-	X	-	-	-	X	-	-	-	CB	X	1
14	ASC-US	X	-	-	X	-	-	-	X	-	-	-	CB	X	2
15	LIBG	X	X	-	X	-	-	-	X	-	X	X	CB	X	1

Legenda: CC: citologia convencional; GLAN: células glandulares; META: células metaplásicas; CA+ 50%: mais de 50% de células anucleadas; CA-50%: menos de 50% de células anucleadas; HIPER: hiper cromatismo nuclear; MNI: membrana nuclear irregular; N/C: alteração da relação núcleo/citoplasma; PARA: paraceratose; PA: paraceratose atípica; COI: coilocitose; INFLA: inflamação; MF: material fecal; AMOS: amostras; X: presença; -: ausência; CB: coco bacilar

(continua)

(continuação)

CASO	CC	GLAN	META	CA + 50%	CA -50%	HIPER	MNI	N/C	PARA	P A	COI	INFLA	FLORA	MF	AMOS
15	LIBG	X	-	-	X	-	-	-	X	-	X	X	CB	X	2
16	NEGATIVO	X	X	-	X	-	-	-	X	-	-	X	CB	X	1
16	NEGATIVO	X	X	-	X	-	-	-	X	-	-	X	CB	X	2
17	ASC-US	X	X	-	X	-	-	-	X	-	-	X	CB	X	1
17	ASC-US	X	X	-	X	-	-	-	X	-	-	X	CB	X	2
18	NEGATIVO	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	CB	-	1
18	NEGATIVO	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	CB	X	2
19	LIBG	X	X	-	X	-	X	-	X	-	X	X	CB	X	1
19	LIBG	X	X	-	X	-	X	-	X	-	X	X	CB	X	2
20	LIBG	X	X	-	X	-	-	-	X	-	X	X	CB	X	1
20	LIBG	X	X	-	X	-	X	-	X	-	X	X	CB	X	2
21	NEGATIVO	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	CB	X	1
21	NEGATIVO	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	CB	X	2
22	NEGATIVO	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	CB	X	1
22	NEGATIVO	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	CB	X	2
23	LIAG	X	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	CB	X	1
23	LIAG	X	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	CB	X	2
24	NEGATIVO	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	CB	X	1
24	NEGATIVO	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	CB	X	2

Legenda: CC: citologia convencional; GLAN: células glandulares; META: células metaplásicas; CA+ 50%: mais de 50% de células anucleadas; CA-50%: menos de 50% de células anucleadas; HIPER: hiperchromatismo nuclear; MNI: membrana nuclear irregular; N/C: alteração da relação núcleo/citoplasma; PARA: paraceratose; PA: paraceratose atípica; COI: coilocitose; INFLA: inflamação; MF: material fecal; AMOS: amostras; X: presença; -: ausência; CB: coco bacilar

(conclusão)

## 9.5 APÊNDICE E – TABELA DOS ACHADOS MORFOLÓGICOS NA CITOLOGIA EM BASE LÍQUIDA

CASO	CBL	GLAN	META	CA + 50%	CA -50%	HIPER	MNI	N/C	PARA	PA	COI	INFLA	FLORA	MF
1	ASC-US	X	X	-	X	-	-	-	X	-	-	-	CB	AUSENTE
2	LIAG	X	-	-	X	X	X	X	X	-	X	-	CB	AUSENTE
3	LIBG	X	-	-	X	-	X	X	X	-	X	-	CB	AUSENTE
4	ASC-H	X	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	CB	AUSENTE
5	NEGATIVO	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	CB	AUSENTE
6	NEGATIVO	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	CB	AUSENTE
7	LIBG	X	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	CB	AUSENTE
8	NEGATIVO	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	CB	AUSENTE
9	LIBG	X	-	-	X	X	X	X	X	-	X	X	CB	AUSENTE
10	NEGATIVO	X	-	-	X	-	-	-	X-	-	-	X	CB	AUSENTE
11	NEGATIVO	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	CB	AUSENTE
12	LIBG	X	-	-	X	X	X	X	X	-	X	X	CB	AUSENTE
13	NEGATIVO	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	X	CB	AUSENTE
14	ASC-US	X	-	-	X	-	-	X	X	-	-	X	CB	AUSENTE
15	LIBG	X	-	-	X	X	X	X	X	-	X	X	CB	AUSENTE
16	NEGATIVO	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	CB	AUSENTE
17	LIBG	X	-	-	X	X	X	X	X	-	X	X	CB	AUSENTE
18	NEGATIVO	X	-	-	X	-	-	-	X	-	-	-	CB	AUSENTE
19	LIBG	X	-	-	X	X	X	X	X	-	X	X	CB	AUSENTE
20	LIBG	X	-	-	X	X	X	X	X	-	X	-	CB	AUSENTE
21	NEGATIVO	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	CB	AUSENTE
22	NEGATIVO	X	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	CB	AUSENTE
23	NEGATIVO	X	-	X	-	-	-	-	-	-	-	X	CB	AUSENTE
24	NEGATIVO	X	-	X	-	-	-	-	-	-	-	X	CB	AUSENTE
25	ASC-US	X	-	X	-	X	X	X	-	-	X	X	CB	AUSENTE
26	LIBG	-	-	X	-	X	X	X	-	-	-	X	CB	AUSENTE
27	LIBG	-	-	X	-	X	X	X	X	X	X	X	CB	AUSENTE
28	NEGATIVO	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	X	CB	AUSENTE
29	NEGATIVO	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	X	CB	AUSENTE
30	NEGATIVO	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	CB	AUSENTE
31	NEGATIVO	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	CB	AUSENTE
32	NEGATIVO	X	-	X	-	-	-	-	-	-	-	X	CB	AUSENTE
33	NEGATIVO	X	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	CB	AUSENTE

Legenda: CBL: citologia em base líquida; GLAN: células glandulares; META: células metaplásicas; CA+ 50%: mais de 50% de células anucleadas; CA-50%: menos de 50% de células anucleadas; HIPER: hiper cromatismo nuclear; MNI: membrana nuclear irregular; N/C: alteração da relação núcleo/citoplasma; PARA: paraceratose; PA: paraceratose atípica; COI: coilocitose; INFLA: inflamação; MF: material fecal; AMOS: amostras; X: presença; -: ausência; CB: coco bacilar

## 9.6 APÊNDICE F – TABELA DOS RESULTADOS DA CC/CBL/ANUSCOPIA/BIOPSIA E BILOGIA MOLECULAR

CASO	CC	CBL	ANU	BIOP	HPV 16	HPV 18	HPV 45	HPV 31	HPV 33	HPV 52	HPV 58	HPV 35	HPV 59	HPV 56	HPV 51	HPV 39	HPV 68	HPV 73	HPV 82	HPV 53	HPV 66	HPV 70	HPV 6	HPV 11	HPV 40	HPV 42	HPV 43	HPV 44/55		
1	ASC-US	ASC-US	NEG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2	LIAG	LIAG	POS	NIA III	1015	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	65.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3	LIBG	LIBG	POS	NEG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
4	LIAG	ASC-H	POS	NIA I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	277.8	590.9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2992.7	
5	NEG	NEG	NEG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	503.2	
6	NEG	NEG	POS	NIA I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
7	LIAG	LIBG	POS	NIA I	97.9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	365.7	0	0	0	0	0	0	82.5	253.9	0	0	0	0	
8	NEG	NEG	NEG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	35.9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
9	LIAG	LIBG	POS	NIA I	145.9	0	127.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	98.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
10	NEG	NEG	NEG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
11	NEG	NEG	NEG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
12	NEG	LIBG	NEG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	574.5	0	0	0	0	0	0	128.5	0	0	0	0	0	
13	NEG	NEG	POS	NEG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	54.3	0	0	0	149.1
14	ASC-US	ASC-US	POS	NEG	239.5	0	0	0	0	0	0	0	52.9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
15	LIBG	LIBG	NEG	0	0	0	0	0	22.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	835.1	0	0	0	0	3261.4
16	NEG	NEG	NEG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
17	ASC-US	LIBG	NEG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	46.9	20.3	0	0	3	1000.3	0	0	0	0	0	0	531.1	0	0	0	0	57.8
18	NEG	NEG	NEG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
19	LIBG	LIBG	POS	NIA I	1273	0	0	180.2	0	0	0	0	0	0	0	0	401.3	0	0	0	0	0	0	0	607.0	122.6	223.3	0	0	2028.5
20	LIBG	LIBG	NEG	0	3	47.2	217.7	0	0	0	0	0	0	0	0	134.4	0	821.4	997.7	0	0	0	0	58.4	0	0	0	0	0	
21	NEG	NEG	NEG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	37.9	0	21.8	
22	NEG	NEG	NEG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	211.2	0	89.9	0	0	0	0	1420
23	LIAG	NEG	NEG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	91.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Legenda: CC: citologia convencional; CBL: citologia em base líquida; ANU: anuscopia; BIOP: biopsia; HPV: Papilomavírus humano; NEG: negativo; POS: positivo; ASC-US: atipias em células escamosas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásico; LIBG: lesão intraepitelial escamosa de baixo grau; LIAG: lesão intraepitelial escamosa de alto grau;

(continuação)

(continua)

CAS O	CC	CBL	AN U	BIÓP	HPV 16	HPV 18	HPV 45	HPV 31	HPV 33	HPV 52	HPV 58	HPV 35	HPV 59	HPV 56	HPV 51	HPV 39	HPV 68	HPV 73	HPV 82	HPV 53	HPV 66	HPV 70	HPV 6	HPV 11	HPV 40	HPV 42	HPV 43	HPV 44/55	
24	NEG	NEG	NEG		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	LIBG	ASC-US	ASC-US		2459.8	70.3	0	0	0	175.4	0	0	0	0	177.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1903.4	1474.6	1469.6	0
26	US	LIBG	LIBG		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	153.5	0	0	0	375.5	0	38.1	0	0	0	0	0	0	177.2
27	LIBG	LIBG	POS	NIA I	0	0	0	0	487.1	0	0	90.0	411.1	8	0	0	55.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2259.5
28	NEG	NEG	NEG		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	198.1	0	0	0	0	0	0	3	155.	0	0	0	97.7
29	NEG	NEG	POS	NIA I	2804.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	51.2	0	262.8	0	0
30	NEG	NEG	NEG		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	1005.	0	0
31	NEG	NEG	NEG		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	NEG	NEG	NEG		0	547.7	0	0	51	0	0	0	0	0	0	0	274	0	0	0	0	0	0	0	273.3	0	0	0	0
33	NEG	NEG	NEG		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Legenda: CC: citologia convencional; CBL: citologia em base líquida; ANU: anoscopia; BIOP: biopsia; HPV: Papilomavírus humano; NEG: negativo; POS: positivo; ASC-US: atipias em células escamosas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásico; LIBG: lesão intraepitelial escamosa de baixo grau; LIAG: lesão intraepitelial escamosa de alto grau;

(conclusão)

## 10 ANEXO

### 10.1 ANEXO A – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

#### ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

**Registro de Projeto:** CEP-FM 062/2008.

**Título:** “Estudo comparativo entre os exames de citologia esfoliativa convencional e em meio líquido para rastreamento de lesões intra-epiteliais anais associadas à infecção pelo papiloma vírus humano em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humano (HIV).”

**Pesquisador Responsável:** Livia Bravo Maia.

**Documentos analisados:** Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo (s) de pesquisador (es).

**Data de entrega:** 12/09/2008.

Proposição do (a) relato (a)

( X ) **Aprovação**

( ) **Não aprovação.**

**Data da primeira análise pelo CEP-FM/UNB:** 17/09/2008.

**Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UNB:** 25/03/2009.

#### PARECER

Com base na Resolução CNS/MS nº 196/96 e resoluções posteriores, que regulamentam a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília decidiu **APROVAR** “ad referendum”, conforme parecer do (a) relator (a), o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

1. Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves;
2. O (s) pesquisador (es) deve (m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM.
3. Recomenda-se que seja evitada qualquer forma de dirigismo ou indução do paciente no sentido de realizar o procedimento.

Brasília, 02 de Abril de 2009.

*Prof. Elaine Maria de Oliveira Alves*  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa  
Faculdade de Medicina-UNB

## **10 ANEXO**

### **10.2 ANEXO B – DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES**

Declaro não ter qualquer conflito de interesses