

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**  
**LABORATÓRIO DE VIROLOGIA MOLECULAR**

**DIAGNÓSTICO DAS LESÕES ESOFÁGICAS EM**  
**PACIENTES HIV-POSITIVOS UTILIZANDO A REAÇÃO**  
**EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)**

Dissertação de Mestrado apresentada à  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto,  
da Universidade de São Paulo, para  
obtenção do título de Mestre em Medicina.  
Área de concentração: Clínica Médica

Aluno: Jeová Keny Baima Colares  
Orientador: Prof. Dr. Benedito Antônio  
Lopes da Fonseca

**Ribeirão Preto - SP**

**2001**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo de  
Ribeirão Preto / USP.

Colares, Jeová Keny Baima

Diagnóstico das Lesões Esofágicas em Pacientes HIV-positivos  
Utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), 2001.

142p.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina  
de Ribeirão Preto/USP – Departamento de Clínica Médica

Orientador: Fonseca, Benedito Antônio Lopes.

1. Úlcera esofágica. 2. HIV. 3. Diagnóstico 4. PCR

**“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor,**

**mas lutamos para que o melhor fosse feito...**

**Não somos o que devíamos ser.**

**Não somos o que iremos ser.**

**Mas graças a Deus,**

**não somos o que éramos.”**

**Martin Luther King**

## DEDICATÓRIA ESPECIAL

Ao meu pai, Antônio de Paula Colares. A primeira inspiração e o eterno exemplo. Muito obrigado pelo estímulo de quem sempre acreditou em mim. Até quando nem eu mesmo acreditava.

À Danielle, meu amor e companheira inseparável. Pela ajuda inestimável e por transformar este ano de tantas dificuldades num belo passeio ao por do sol.

## DEDICATÓRIA

Ao Professor Dr. Benedito Antônio Lopes da Fonseca, orientador e amigo.  
Obrigado pelo estímulo, solidariedade e paciência durante todos esses anos.

Aos meus irmãos Heleno, Paulo, Toni, Paula e Felipe, que mesmo à distância sempre me ofereceram amizade e estímulo.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos colegas de laboratório, Danielle Malta e Marcos Borges, pela colaboração direta, fundamental para a realização deste trabalho

Aos profissionais do serviço de endoscopia digestiva do HCFMRP-USP, especialmente os médicos endoscopistas Dr. Luciano Coelho, Dr. Miguel de Souza, Dra. Elodie Bonfim e Prof. Modena, pela colaboração na coleta de material para este trabalho.

Ao amigo Márcio Tadeu (UETDI), que além de trazer mais alegria e reflexão ao nosso local de trabalho, ainda manteve sempre cheio o balão de nitrogênio líquido.

Aos colegas Renan Montenegro Jr e Elodie Bonfim, pelas importantes sugestões e colaborações na elaboração deste trabalho.

A todos os colegas da UETDI, professores, médicos assistentes, residentes, enfermeiros, auxiliares de enfermagem, assistentes sociais e outros profissionais, que ajudam a construir uma realidade melhor a cada dia. Pela paciência nos momentos de maior tensão e pela diversão nos momentos de descontração.

Aos docentes da Divisão de Doenças Infecciosas e Tropicais (Profa. Alcyone, Prof. Benedito, Prof. José Fernando, Prof. Martinez e Prof. Tadeu) pelos ensinamentos e pelo estímulo que me propiciaram durante todos estes anos.

Ao Prof. José Fernando Castro Figueiredo, pela experiência e conhecimento que nos transmite todos os dias e pela paciência e ajuda, que possibilitaram transformar um amontoado de dados em um documento compreensível.

Aos amigos Ana Paula, Ângelo, Cleto, Edmar, Elodie, Fito, Harnôlido, Marta Bartolomeu, Max, Paula, Paulo André, Raquel, Renan, Roberto, Sérgio, que tornaram o meu caminho mais belo, interessante e divertido.

Aos amigos e professores Juan Stuardo e Marta Edna, que em mim confiaram sem ao menos conhecer, me recebendo nesta cidade então estranha.

Aos amigos Zelci, Maria Helena, Danielle, Janaína, Rafael e Ingrid, que me receberam no seio de sua família e se tornaram, também, minha família.

A todos os colegas e amigos que certamente esqueci. Pela compreensão neste momento de tanta pressão.

# ÍNDICE

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

RESUMO

SUMMARY

<b>I.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
1.	Considerações gerais sobre a infecção pelo HIV	02
2.	Alterações gastrintestinais na infecção pelo HIV	05
3.	Etiologia das lesões esofágicas	08
4.	Diagnóstico das lesões esofágicas	12
<b>II.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
<b>III.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>24</b>
1.	Pacientes	25
2.	Exames laboratoriais	28
3.	Endoscopia digestiva alta	28
4.	Amostras de biópsias	29
5.	Histologia	30
6.	Extração do DNA	30
7.	Reação em cadeia da polimerase	32



<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>42</b>
1. Resultados globais	43
2. Dados clínicos	46
3. Endoscopia digestiva alta	47
4. Exame histopatológico	50
5. Reação em cadeia da polimerase	52
6. Correlações entre os achados	63
<b>V. DISCUSSÃO</b>	<b>78</b>
<b>VI. CONCLUSÕES</b>	<b>98</b>
<b>VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>101</b>

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Relação com os microorganismos pesquisados, os *primers* específicos, suas respectivas seqüências e referências originais (parte 1). \_\_\_\_\_ 33

**Tabela 2:** Relação com os microorganismos pesquisados, os *primers* específicos, suas respectivas seqüências e referências originais (parte 2). \_\_\_\_\_ 34

**Tabela 3:** Parâmetros dos ciclos da PCR para cada agente, e o tamanho do respectivo fragmento amplificado. \_\_\_\_\_ 36

**Tabela 4:** Distribuição dos 80 resultados, nas 49 amostras positivas, ao exame de PCR, realizado em 96 amostras de biópsias esofágicas, de 79 pacientes HIV -positivos. \_\_\_\_\_ 60

**Tabela 5:** Distribuição dos resultados positivos ao exame de PCR, realizado em 96 biópsias esofágicas, de 79 pacientes HIV-positivos. \_\_\_\_\_ 60

**Tabela 6:** Correlação entre os resultados dos exames endoscópico, histopatológico, PCR e o esquema terapêutico relacionada a uma resposta clínica favorável nos 21 pacientes HIV-positivos com úlceras esofágicas. \_\_\_\_\_ 66

**Tabela 7:** Correlação entre os resultados dos exames endoscópico, histopatológico, PCR e o esquema terapêutico relacionada a uma resposta clínica favorável nos 10 pacientes HIV-positivos com esofagite. \_\_\_\_\_ 67

**Tabela 8:** Correlação dos 17 resultados positivos para agentes virais obtidos no exame histopatológico e o respectivo resultado da PCR realizada em amostras obtidas no mesmo exame. \_\_\_\_\_73

**Tabela 9:** Correlação dos 80 resultados positivos pela PCR e o respectivo resultado do exame histopatológico realizado em amostras obtidas no mesmo exame. \_\_\_\_\_73

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Gel de agarose a 2% mostrando, da esquerda para a direita, o marcador (M) de peso molecular, controle positivo (C) e 4 amostras positivas para CMV. \_\_\_\_\_53
- Figura 2:** Gel de agarose a 2% mostrando, da esquerda para a direita, o marcador (M) de peso molecular, controle positivo (C) e duas amostras positivas para o Herpes. \_\_\_\_\_54
- Figura 3:** Gel de agarose a 2% mostrando, da esquerda para a direita marcador (M) de peso molecular, controle positivo (C) e 4 amostras positivas para o HPV. \_\_\_\_\_54
- Figura 4:** Gel de agarose a 2% mostrando, da esquerda para a direita, o marcador (M) de peso molecular, o controle positivo (C) e 4 amostras positivas para o HIV. \_\_\_\_\_55
- Figura 5:** Gel de agarose a 1% mostrando, da esquerda para a direita, o marcador (M) de peso molecular, o controle positivo (C) e 3 amostras para *H. ducreyi*. \_\_\_\_\_55
- Figura 6:** Gel de agarose a 3% mostrando, da esquerda para a direita, o marcador (M) de peso molecular, o controle positivo (C) para o *M. tuberculosis* e amostras negativas. \_\_\_\_\_56
- Figura 7:** Gel de agarose a 1% mostrando, da esquerda para a direita, o marcador (M) de peso molecular, o controle positivo (C) para o *M. avium* e amostras negativas. \_\_\_\_\_56

**Figura 8:** Gel de agarose a 1% mostrando, da esquerda para a direita, o marcador (M) de peso molecular, o controle positivo (C) para o *M. intracellulare* e amostras negativas. \_\_\_\_\_57

**Figura 9:** Gel de agarose a 2% mostrando, da esquerda para a direita, o marcador (M) de peso molecular, o controle positivo (C) para o *T. pallidum* e amostras negativas. \_\_\_\_\_57

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1:** Distribuição dos 79 pacientes infectados pelo HIV de acordo com a faixa etária. \_\_\_\_\_ 44
- Gráfico 2:** Distribuição dos 79 pacientes infectados pelo HIV de acordo com o gênero. \_\_\_\_\_ 44
- Gráfico 3:** Distribuição dos 79 pacientes infectados pelo HIV de acordo com faixas de contagem de linfócitos T CD4+. \_\_\_\_\_ 45
- Gráfico 4:** Freqüência de sinais e sintomas que indicaram o exame endoscópico em 79 pacientes infectados pelo HIV. \_\_\_\_\_ 45
- Gráfico 5:** Quantidade de diferentes tipos de lesões esofágicas observadas em 89 exames endoscópicos de 79 pacientes HIV-positivos. \_\_\_\_\_ 48
- Gráfico 6:** Achados esofágicos nos 89 exames endoscópicos realizados em 79 pacientes infectados pelo HIV. \_\_\_\_\_ 48
- Gráfico 7:** Achados histopatológicos em 89 amostras de biópsias esofágicas, colhidas de 79 pacientes infectados pelo HIV. \_\_\_\_\_ 51
- Gráfico 8:** Achados histopatológicos em 26 biópsias, provenientes de 25 pacientes HIV-positivos, submetidos a 26 exames endoscópicos, em que foi evidenciada mucosa de aspecto normal. \_\_\_\_\_ 51

**Gráfico 9:** Achados histopatológicos em 22 amostras de biópsias colhidas de 22 lesões ulceradas, em 22 exames endoscópicos provenientes de 21 pacientes HIV-positivos. \_\_\_\_\_53

**Gráfico 10:** Resultados da PCR em 96 amostras de biópsias esofágicas de 79 pacientes infectados pelo HIV. \_\_\_\_\_59

**Gráfico 11:** Resultados da PCR em 26 amostras de biópsias de mucosa, com aspecto normal em 26 exame endoscópicos, provenientes de 25 pacientes HIV-positivos. \_\_\_\_\_59

**Gráfico 12:** Resultados da PCR em 29 amostras de biópsias de 22 lesões ulceradas, verificadas ao exame endoscópico de 21 pacientes HIV-positivos. \_\_\_\_\_62

**Gráfico 13:** Resultados da PCR em 15 amostras de biópsias de 10 lesões ulceradas, verificadas ao exame endoscópico de 10 pacientes HIV-positivos, que permaneceram sem diagnóstico etiológico após o exame histopatológico. \_\_\_\_\_62

**Gráfico 14:** Principais achados endoscópicos evidenciados nos exames de pacientes HIV-positivos, dos quais foram colhidas as 19 biópsias esofágicas com PCR positivo para o CMV. \_\_\_\_\_69

**Gráfico 15:** Principais achados endoscópicos evidenciados nos exames de pacientes HIV-positivos, dos quais foram colhidas as 4 biópsias esofágicas com PCR positivo para Herpes. \_\_\_\_\_69

**Gráfico 16:** Principais achados endoscópicos evidenciados nos exames de pacientes HIV-positivos, dos quais foram colhidas as 17 biópsias esofágicas com PCR positivo para o HPV. \_\_\_\_\_70

**Gráfico 17:** Principais achados endoscópicos evidenciados nos exames de pacientes HIV-positivos, dos quais foram colhidas as 37 biópsias esofágicas com PCR positivo para o HIV. \_\_\_\_\_70

**Gráfico 18:** Principais achados endoscópicos evidenciados nos exames de pacientes HIV-positivos, dos quais foram colhidas as 3 biópsias esofágicas com PCR positivo para o *H. ducreyi*. \_\_\_\_\_72

**Gráfico 19:** Resultados de PCR positivos para outros agentes nas 37 amostras com PCR positivo para o HIV. \_\_\_\_\_75



## LISTA DE ABREVIATURAS

bp	Pares de bases
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
gp	Glicoproteína
HCl	Ácido clorídrico
kDa	Kilodaltons
NaCl	Cloreto de sódio
RNAr	Ácido ribonucléico ribossômico
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tampão de tris (hidroximetil) aminometano e EDTA
TBE	Tampão de tris (hidroximetil) aminometano, Ácido bórico e EDTA
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano

## Resumo

Os pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) freqüentemente apresentam alterações digestivas, sendo o esôfago um alvo comum de lesões estruturais. A etiologia infecciosa é a mais freqüente neste grupo de pacientes. Múltiplos agentes já foram implicados como causadores de lesões esofágicas. As infecções virais são uma das principais causas de tais lesões, sendo os vírus mais implicados o citomegalovirus (CMV) e o vírus herpes simples (HSV). Muitas lesões ulceradas permanecem sem diagnóstico etiológico, mesmo após exaustiva investigação, sendo denominadas úlceras idiopáticas ou aftosas. Os métodos de diagnóstico usuais são demorados e pouco sensíveis. Assim, nosso estudo tem como principal objetivo estudar o papel do método da reação em cadeia da polimerase (PCR) no diagnóstico destas lesões.

Durante o período de outubro de 1996 a outubro de 1997, foram estudados 79 pacientes HIV-positivos, que foram submetidos ao exame de endoscopia digestiva alta por indicação clínica. Estes foram submetidos a 89 exames endoscópicos, sendo colhidas 96 biópsias, as quais foram armazenadas em nitrogênio líquido (50) ou em freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$  (46). O DNA foi extraído usando método baseado na lise hipotônica, digestão com proteinase K, extração com fenol-clorofórmio e precipitação em etanol. Uma quantidade fixa foi usada para amplificação em ciclador térmico, utilizando

primers específicos para CMV, Herpesvirus, HPV, HIV, *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum* e as micobactérias *M. tuberculosis*, *M. avium* e *M. intracellulare*. O produto final foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose e corado com brometo de etídeo.

A endoscopia não revelou alterações esofágicas em 26 exames (29,2%). As alterações observadas foram monilíase esofágica em 33 exames (37,1%), úlceras em 22 (24,7%); esofagite em 10 (11,2%) e áreas lúgo-negativas em 9 (10,1%). A PCR resultou positiva para o CMV em 19 amostras (19,8%), para o Herpes em 4 (4,2%), para o HPV em 17 (17,7%), para o HIV em 37 (38,5%) e para o *H. ducreyi* em 3 (3,1%). Nenhuma amostra foi positiva para o *T. pallidum* e para micobactérias. No estudo de 29 amostras de 22 úlceras esofágicas a PCR detectou o CMV em 9 amostras (31%), o Herpes em 3 (10,3%), o HPV em 6 (20,7%), o HIV em 19 (65,5%) e o *H. ducreyi* em 2 (6,9%) e em 8 (36,4%) não foi detectado nenhum agente.

O CMV foi detectado com freqüência nas úlceras esofágicas, sendo difícil diferenciar se havia infecção ativa ou latente. O HIV teve uma incidência elevada nas biópsias de úlceras, o que pode sugerir um possível papel etiológico deste agente em tais lesões. O HPV foi o terceiro agente mais freqüente, mas não foi possível caracterizá-lo como causador de lesões esofágica ulceradas. A PCR apresentou potencial para tornar-se um método útil na investigação das lesões esofágicas em pacientes infectados pelo HIV.

## Summary

Patients infected by Human Immunodeficiency Virus (HIV) usually present digestive abnormalities and the esophagus is a common target of structural lesions. Infections are the most frequent cause of esophageal lesions in these patients. Several agents were already implied in this process. Viral infections are one of the main causes of such lesions and cytomegalovirus (CMV) and herpes simplex virus (HSV) were the most involved agents. Many ulcerated lesions persist without etiologic diagnosis even after exhaustive investigation, being denominated idiopathic or aphthous ulcers. The usual diagnostic methods are difficult and have low sensitivity. Thus, the main objective of our study was to evaluate the role of the polymerase chain reaction (PCR) method in the diagnosis of these lesions.

During the period of October of 1996 to October of 1997, 79 HIV-positive patients were studied. They were submitted to upper digestive endoscopies, which were indicated on clinical basis. These patients were submitted to 89 upper digestive endoscopies, being obtained 96 biopsies, which were stored in liquid nitrogen or in a 70°C freezer. DNA was extracted using a method based on hypotonic lyses, proteinase K digestion, extraction with phenol-chloroform and precipitation in ethanol. A fixed amount was used for amplification in thermal cycler, using specific primers for CMV, herpesvirus, human papillomavirus (HPV), HIV, Haemophilus ducreyi,

Treponema pallidum, Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium avium and Mycobacterium intracellulare. The final products were submitted to an electrophoresis in agarose gel and stained with ethidium bromide.

The endoscopies did not reveal esophageal alterations in 26 exams (29,2%). The abnormalities observed were esophageal candidiasis in 33 exams (37,1%), ulcers in 22 (24,7%); esophagitis in 10 (11,2%) and lugol-negative areas in 9 (10,1%). The PCR was positive to CMV in 19 samples (19,8%), for Herpes in 4 (4,2%), for HPV in 17 (17,7%), for HIV in 37 (38,5%) and for the H. ducreyi in 3 (3,1%). No sample was positive for T. pallidum or micobacterium. In the study of the esophageal ulcers by PCR, CMV was detected in 9 samples (31%), Herpes in 3 (10,3%), HPV in 6 (20,7%), HIV in 19 (65,5%), H. ducreyi in 2 (6,9%) and any agent was detected in 8 samples (36,4%).

CMV was frequently detected in esophageal ulcers, being difficult to differentiate between active and latent infections. The HIV had an elevated incidence in ulcer biopsies, which may suggest a possible etiologic role of this virus in such lesions. HPV was the third more frequent agent, but it was not possible to attribute the esophageal lesions to that virus. In conclusion, this study suggests that the PCR can be an useful method in the investigation of esophageal lesions in HIV infected patients.