

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO

MARJORY LUCIA FIRMINO DA COSTA

Expressão das moléculas HLA-E nas lesões intraepiteliais cervicais  
em mulheres portadoras do HPV com ou sem a infecção pelo HIV-1

Ribeirão Preto  
2016

MARJORY LUCIA FIRMINO DA COSTA

Expressão das moléculas HLA-E nas lesões intraepiteliais cervicais em mulheres portadoras do HPV com ou sem a infecção pelo HIV-1

Dissertação apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação Enfermagem Fundamental.

Linha de pesquisa: Doenças infecciosas: problemáticas e estratégias de enfrentamento

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Morais Fernandes

Ribeirão Preto

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Costa, Marjory Lucia Firmino da

Expressão das moléculas HLA-E nas lesões intraepiteliais cervicais em mulheres portadoras do HPV com ou sem a infecção pelo HIV-1. Ribeirão Preto, 2016.

102 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Enfermagem Fundamental.

Orientador: Ana Paula Morais Fernandes

1. HIV-1. 2. Lesões Intraepiteliais Cervicais. 3.HPV. 4.HLA-E. 5.Expressão.

COSTA, Marjory Lucia Firmino da

Expressão das moléculas HLA-E nas lesões intraepiteliais cervicais em mulheres portadoras do HPV com ou sem a infecção pelo HIV-1.

Dissertação apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação Enfermagem Fundamental.

Aprovada em        /        /

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Ao meu grande amor, Danilo, com amor,  
admiração e gratidão por sua compreensão,  
carinho, presença e apoio na elaboração deste  
trabalho e na vida.

Aos meus pais, Valmir e Vera, e a minha  
família que tanto apoiam e incentivam o meu  
crescimento profissional.

## AGRADECIMENTOS

À Professora Dr<sup>a</sup>. **Ana Paula Moraes Fernandes**, pela orientação neste trabalho, por ter acreditado em mim e pela amizade.

À Professora Dr<sup>a</sup>. **Silvana Maria Quintana** pelos grandes ensinamentos, paciência e auxílio fundamentais, durante todas as etapas deste estudo.

Dr<sup>a</sup> **Patrícia Pereira dos Santos Melli**, pela ajuda durante a coleta de dados.

Ao Professor Dr. **Eduardo Antônio Donadi**, por possibilitar a realização deste trabalho em seu laboratório.

À Professora **Paula Rahal** e sua aluna **Carolina** pela ajuda nos procedimentos laboratoriais.

Ao Professor Dr. **Alfredo Ribeiro da Silva**, por tornar esse trabalho possível disponibilizando seu laboratório e repassando seus conhecimentos.

Às técnicas de laboratório **Laura Kawasse, Sandra e Flávia** pela ajuda nos procedimentos laboratoriais.

Ao estatístico **Jonas Bodini Alonso**, pela realização das análises estatísticas.

À equipe do **AMIG e UETDI**, pela colaboração e compreensão durante a fase de coleta de dados.

À enfermeira **Francielly Matos**, pela parceria durante cada etapa deste trabalho.

Ao programa de pós-graduação em enfermagem fundamental e à CAPES pelo apoio financeiro.

## RESUMO

COSTA, M. L. F. **Expressão das moléculas HLA-E nas lesões intraepiteliais cervicais em mulheres portadoras do HPV com ou sem a infecção pelo HIV-1.** 2016. 102p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Entre mulheres com HIV/AIDS há um maior número de casos de infecções persistentes pelo HPV contribuindo para um risco aumentado do desenvolvimento de lesões intraepiteliais escamosas cervicais. Ademais, a expressão anormal de moléculas HLA-E pode modular o sistema imunológico através da ligação com o receptor inibitório (CD94/NKG2A) ou estimulatório (CD94/NKG2C) de células NK e linfócitos T CD8<sup>+</sup>, diminuindo imunovigilância favorecendo a evasão de células infectadas por vírus. Diante da escassez de estudos avaliando a molécula HLA-E na interação com o HPV, mais especificamente na infecção pelo HIV-1, este estudo teve como objetivo avaliar a expressão de HLA-E em lesões intraepiteliais cervicais em mulheres portadoras do HPV, apresentando ou não a infecção pelo HIV-1. Trata-se de um estudo transversal, ao qual foram submetidos ao processo imunohistoquímico tecido do colo do útero parafinado de 67 mulheres infectadas pelo HIV-1 e 62 mulheres não infectadas, todas com lesão intraepitelial cervical com HPV, o qual foi tipificado. A expressão da molécula HLA-E foi analisada quantitativamente como sem expressão, de 1% a 30%, de 31% a 70% e de 71% a 100%. Os resultados mostraram que a infecção por herpes vírus foi maior entre as participantes HIV+ ( $P=0,005$ ). Na análise imunohistoquímica, ficou evidente que as lesões intraepiteliais cervicais de mulheres infectadas pelo HIV-1 apresentaram redução na expressão da molécula HLA-E de 31% a 100% em comparação com mulheres sem a infecção pelo HIV-1 ( $P=0,001$ ), sugerindo que essa redução possa ser um mecanismo de escape viral, que acarreta a redução da apresentação de peptídeos virais para os linfócitos T CD8<sup>+</sup>. A expressão do HLA-E não foi associada aos graus de lesões intraepiteliais cervicais. Outros estudos são necessários para melhor compreensão do padrão e da função da expressão das moléculas HLA-E em lesões intraepiteliais cervicais de mulheres infectadas pelo HIV-1.

Palavras-chave: HIV-1. Lesões Intraepiteliais Cervicais. HPV. HLA-E. Expressão.

## ABSTRACT

COSTA, M. L. F. **HLA-E molecules expression. in cervical intraepithelial lesions of HIV-1 infected and non-infected women.** 2016. 102p. Dissertation (Master) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Among women with HIV / AIDS there is a greater number of cases of persistent HPV infections contributing to an increased risk of developing squamous intraepithelial lesions of the cervix. In addition, abnormal expression of HLA-E molecules can modulate the immune system by binding to the inhibitory (CD94 / NKG2A) or stimulatory (CD94 / NKG2C) receptor NK cells and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, decreasing immunovigilance and favoring the evasion of infected cells infected with virus. Due to the lack of studies evaluating the HLA-E molecule in the interaction with HPV, more specifically in HIV-1 infection, this project aimed to evaluate the expression of HLA-E in cervical intraepithelial lesions of infected women or not by HIV-1, with the infection by HPV. It is a cross-sectional study, which was submitted to immunohistochemical processing the paraffin-embedded cervix tissue of 67 HIV-1 women infected with HIV-1 and 62 uninfected women, all of them with cervical intraepithelial lesion with HPV, which was typified. The expression of HLA-E was quantitatively analyzed as non-expressed, 1% to 30%, 31% to 70% and 71% to 100%. The results showed that the herpes virus infection was higher among HIV + participants ( $P = 0.005$ ). In immunohistochemical analysis, it became evident that cervical intraepithelial lesions in HIV-1 infected women showed a reduction the expression of HLA-E molecule from 31% to 100% compared to women without HIV-1 infection ( $P = 0.001$ ) Suggesting that this reduction may be a viral escape mechanism, which leads to a reduction in the presentation of viral peptides to CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. The expression of HLA-E was not associated with cervical intraepithelial lesions. More studies are need to better understand the pattern and function of HLA-E molecule expression in cervical intraepithelial lesions of infected women by HIV-1.

Key-words: HIV-1; cervical intraepithelial lesions; HPV; HLA-E; Expression.



## RESUMEN

COSTA, M. L. F. **La expresión de moléculas HLA-E en las lesiones de cuello uterino de mujeres infectadas y no infectadas por el VIH-1.** 2016. 102p. Dissertación (Maestría) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Entre las mujeres con VIH/SIDA hay un mayor número de casos de infecciones por VPH persistentes que contribuyen a un mayor riesgo de desarrollar lesiones intraepiteliales de cuello uterino. Además, la expresión anormal de moléculas HLA-E puede modular el sistema inmunológico mediante la unión al receptor inhibitorio (CD94 / NKG2A) o estimulante (CD94 / NKG2C) las células NK y los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, la disminución de la inmunovigilancia favoreciendo la evitación de células infectados virus. Dada la falta de estudios que evalúan la interacción molécula HLA-E con el VPH, específicamente en el VIH-1, este proyecto tuvo como objetivo evaluar la expresión de HLA-E en lesiones intraepiteliales cervicales en mujeres con VPH, infectadas o no por VIH-1. Se trata de un estudio transversal, que se presentaron al proceso de tejido cervical inmunohistoquímica encerrado de 67 mujeres con VIH-1 y 62 mujeres no infectadas, todas con lesión intraepitelial cervical por VPH, que se ha escrito. La expresión de HLA-E molécula se analizó cuantitativamente y sin expresión de 1% a 30%, de 31% a 70% y de 71% a 100%. Los resultados mostraron que el virus del herpes fue mayor en sujetos VIH + ( $P = 0,005$ ). En el análisis inmunohistoquímico, se hizo evidente que las lesiones intraepitelial cervical en mujeres con VIH-1 mostraron una reducción en la expresión de HLA-E molécula de 31% a 100% en comparación con mujeres sin VIH-1 ( $P = 0,001$ ) lo que sugiere que esta reducción puede ser un mecanismo de escape viral, lo que provoca la reducción en la presentación de péptidos virales a los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. La expresión de HLA-E no se asoció con el grado de las lesiones intraepiteliales cervicales. Se necesitan más estudios para comprender mejor la estructura y la función de la expresión de moléculas HLA-E en las lesiones intraepiteliales de cuello uterino en las mujeres con el VIH-1.

Palabras-clave: VIH-1; Lesiones Intraepiteliales Escamosas de Cuello Uterino; VPH; HLA-E; expresión.

## LISTA DE ABREVIATURAS

|               |   |
|---------------|---|
| AIDS          | Síndrome da Imunodeficiência Adquirida      |
| ARV           | Antirretroviral                             |
| CDC           | Centro de Controle e Prevenção de Doenças   |
| cDNA          | Ácido Desoxirribonucleico Complementar      |
| CV            | Carga Viral                                 |
| HIV-1         | Vírus da Imunodeficiência Humana-1          |
| HPV           | Papilomavírus Humano                        |
| HSIL ou LIEAG | Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau  |
| LCR           | <i>Long Control Region</i> do HPV           |
| LSIL ou LIEBG | Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau |
| ORFs          | Unidades de Tradução do HPV                 |
| RNA           | Ácido Ribonucleico                          |
| SIV           | Vírus da Imunodeficiência Símia             |
| TARV          | Terapia Antirretroviral                     |

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DO HIV E SEUS COMPONENTES (RETIRADO DE MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).....   | 20 |
| FIGURA 2 - FASES DA INFECÇÃO PELO HIV (RETIRADO DE MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010). ...   | 22 |
| FIGURA 3 - GENOMA DE HPV 16. GENOMA DE DNA CIRCULAR DE DUPLA-FITA, MOSTRANDO A LOCALIZAÇÃO DOS GENES. (ADAPTADO DE D'ABRAMO; ARCHAMBAULT (2011)) .....  | 24 |
| FIGURA 4 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DE 170 TIPOS DE HPV (RETIRADO DE VILLIERS, 2013). .....  | 26 |
| FIGURA 5: O CICLO DE VIDA DO HPV. (ADAPTADO DE HAUSEN, 2002).....   | 28 |
| FIGURA 6 - ALTERAÇÕES CELULARES NO COLO DO ÚTERO. (ADAPTADO DE <i>NATIONAL CANCER INSTITUTE</i> )32   |    |
| FIGURA 7 - LESÕES INTRAEPITELIAIS ESCAMOSAS: A – LESÃO INTRAEPITELIAL ESCAMOSA DE ALTO GRAU (HSIL), B – LESÃO INTRAEPITELIAL ESCAMOSA DE BAIXO GRAU LSIL. (RETIRADO DE DARRAGH <i>ET AL.</i> , 2012) .....  | 32 |
| FIGURA 8 - LOCALIZAÇÃO DO HLA NO BRAÇO CURTO DO CROMOSSOMO 6 (RETIRADO DE UTIYAMA; REASON; KOTZE, 2004) .....   | 39 |
| FIGURA 9 – CLASSIFICAÇÃO DA MARCAÇÃO DA MOLÉCULA HLA-E. A REAÇÃO DE IMUNOHISTOQUÍMICA DO HLA-E FOI REALIZADA COM O ANTICORPO MEM-E/02. DE ACORDO COM O ESCORE UTILIZADO, PODE-SE OBSERVAR AUSÊNCIA DE EXPRESSÃO (A); DE 1% A 30% (B); DE 31% A 70% (C); DE 71% A 100% (D). RIBEIRÃO PRETO-SP, 2016. FONTE: PESQUISA DE CAMPO..... | 68 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| TABELA 1 – GENES DO HIV E SUA FUNÇÃO NO PROCESSO DE REPLICAÇÃO. ....  | 19 |
| TABELA 2 - ESCORE UTILIZADO PARA CLASSIFICAÇÃO QUANTITATIVA DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DAS MOLÉCULAS HLA-E. ADAPTADO DE XIE, CLAUSEN E BOYSEN, 2004.....   | 56 |
| TABELA 3: DISTRIBUIÇÃO DAS 129 PARTICIPANTES SEGUNDO COR DA PELE, ATIVIDADE OCUPACIONAL, ESCOLARIDADE E ORIENTAÇÃO SEXUAL. AMIG, 2013-2015.....   | 60 |
| TABELA 4: DISTRIBUIÇÃO DAS 129 PARTICIPANTES SEGUNDO ESTADO CIVIL, DOENÇAS SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS (DSTs) PRÉVIAS, MÉTODO CONTRACEPTIVO E TABAGISMO. AMIG, 2013-2015.....  | 61 |
| TABELA 5: DISTRIBUIÇÃO DAS 129 PARTICIPANTES, COM AS VARIÁVEIS REAGRUPADAS, SEGUNDO COR DA PELE, ATIVIDADE OCUPACIONAL, ESCOLARIDADE, ESTADO CIVIL E TABAGISMO. RIBEIRÃO PRETO-SP, 2016. FONTE: PESQUISA DE CAMPO. ....                       | 62 |
| TABELA 6: DISTRIBUIÇÃO DAS 129 PARTICIPANTES SEGUNDO USO DE CONTRACEPTIVOS HORMONAIS E DSTs PRÉVIAS. RIBEIRÃO PRETO-SP, 2016. FONTE: PESQUISA DE CAMPO.....   | 62 |
| TABELA 7: DISTRIBUIÇÃO DAS 129 PARTICIPANTES SEGUNDO IDADE NA MENARCA, IDADE NA PRIMEIRA RELAÇÃO SEXUAL, IDADE NA PRIMEIRA GESTAÇÃO E NÚMERO DE GESTAÇÕES. RIBEIRÃO PRETO-SP, 2016. FONTE: PESQUISA DE CAMPO. ....                            | 63 |
| TABELA 8: DISTRIBUIÇÃO DAS 129 PARTICIPANTES SEGUNDO GRAU DE LESÃO INTRAEPITELIAL CERVICAL E INFECÇÃO PELO PAPILOMAVIRUS HUMANO. RIBEIRÃO PRETO-SP, 2016. FONTE: PESQUISA DE CAMPO. ....  | 64 |
| TABELA 9: DISTRIBUIÇÃO DAS PARTICIPANTES DO ESTUDO SEGUNDO GRAU DE LESÃO CERVICAL COM SEUS PRINCIPAIS FATORES DE RISCO. RIBEIRÃO PRETO-SP, 2016. FONTE: PESQUISA DE CAMPO. ....   | 65 |
| TABELA 10: DISTRIBUIÇÃO DAS 53 PARTICIPANTES DO GRUPO HIV+, SEGUNDO CARGA VIRAL, CONTAGEM DE LINFÓCITOS T CD4+ E CLASSE DE ANTIRRETROVIRAIS EM USO. RIBEIRÃO PRETO-SP, 2016. FONTE: PESQUISA DE CAMPO.....                                    | 66 |
| TABELA 11: DISTRIBUIÇÃO DOS CRUZAMENTOS ENTRE GRAU DE LESÃO CERVICAL COM CARGA VIRAL, CONTAGEM DE LINFÓCITOS T CD4+ E USO DE ANTIRRETROVIRAIS ENTRE AS 67 PARTICIPANTES DO GRUPO HIV+. RIBEIRÃO PRETO-SP, 2016. FONTE: PESQUISA DE CAMPO..... | 67 |
| TABELA 12: DISTRIBUIÇÃO DAS 123 PARTICIPANTES SEGUNDO NÍVEIS DE EXPRESSÃO DAS MOLÉCULAS HLA-E. RIBEIRÃO PRETO-SP, 2016. FONTE: PESQUISA DE CAMPO.....   | 69 |
| TABELA 13: DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO DAS MOLÉCULAS HLA-E DE ACORDO COM A VARIÁVEL NÚMERO DE LINFÓCITOS T CD4+. RIBEIRÃO PRETO-SP, 2016. FONTE: PESQUISA DE CAMPO. ....  | 70 |
| TABELA 14: COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS MOLÉCULAS HLA-E, DE ACORDO COM OS DIFERENTES ESCORES E COM OS GRUPOS ESTUDADOS. RIBEIRÃO PRETO-SP. FONTE: PESQUISA DE CAMPO.....   | 70 |

## SUMÁRIO

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 1.     | INTRODUÇÃO.....   | 17 |
| 1.1.   | HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana.....               | 17 |
| 1.1.1. | Breve histórico .....                                     | 17 |
| 1.1.2. | Fases da doença .....                                     | 21 |
| 1.1.3. | Epidemiologia.....  | 23 |
| 1.2.   | Papilomavírus.....  | 23 |
| 1.2.1. | Estrutura viral e taxonomia .....                         | 23 |
| 1.2.2. | Papilomavírus humano .....                                | 25 |
| 1.2.3. | Transmissão e tipos de infecção pelo HPV.....             | 27 |
| 1.2.4. | Epidemiologia.....  | 29 |
| 1.3.   | Lesões Intraepiteliais Cervicais.....                     | 30 |
| 1.3.1. | Classificação .....                                       | 30 |
| 1.3.2. | Fatores de risco .....                                    | 32 |
| 1.4.   | Infecção pelo HPV em mulheres portadoras do HIV .....     | 36 |
| 1.5.   | Antígeno Leucocitário Humano-E .....                      | 38 |
| 1.5.1. | Complexo Principal de Histocompatibilidade .....          | 38 |
| 1.5.2. | HLA-E: Função no sistema imunológico.....                 | 39 |
| 1.5.3. | HLA-E nas infecções virais .....                          | 41 |
| 1.5.4. | Expressão do HLA-E em tecidos .....                       | 42 |
| 1.6.   | Conhecimento científico e assistência de enfermagem ..... | 43 |
| 2.     | Justificativa .....                                       | 46 |
| 3.     | OBJETIVOS.....  | 48 |
| 3.1.   | Geral:.....   | 48 |
| 3.2.   | Específicos: .....  | 48 |
| 4.     | MATERIAIS E MÉTODOS.....                                  | 50 |
| 4.1.   | Delineamento do estudo e definição da amostra .....       | 50 |
| 4.2.   | População de estudo .....                                 | 50 |
| 4.3.   | Critérios de inclusão.....                                | 50 |
| 4.4.   | Aspectos éticos.....                                      | 51 |
| 4.5.   | Instrumento para coleta de dados .....                    | 51 |
| 4.6.   | Obtenção e processamento das amostras.....                | 51 |

|   |     |
|---|-----|
| 4.6.1. Obtenção de amostras cervicais.....  | 51  |
| 4.6.2. Exame anatomopatológico.....   | 52  |
| 4.6.3. Extração do DNA viral do conteúdo cérvicovaginal .....   | 52  |
| 4.6.4. Detecção e tipificação do HPV .....  | 53  |
| 4.6.5. Expressão proteica das moléculas HLA-E em tecidos do colo do útero<br>55                             |     |
| 4.6.6. Análise da Expressão do HLA-E.....   | 56  |
| 4.7. Análise estatística.....   | 57  |
| 5. RESULTADOS .....   | 60  |
| 5.1. Caracterização das participantes do estudo .....   | 60  |
| 5.2. Características das mulheres infectadas pelo HIV .....   | 65  |
| 5.3. Expressão do HLA-E em tecido cervical.....   | 67  |
| 6. DISCUSSÃO.....   | 73  |
| 7. Conclusão.....   | 85  |
| 8. REFERÊNCIAS .....  | 87  |
| APÊNDICE I: Instrumento de Coleta de Dados .....  | 98  |
| APÊNDICE II: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....   | 100 |
| ANEXO I: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa .....   | 102 |
| ANEXO II: Aprovação pela Comissão de Pesquisa do Departamento de<br>Ginecologia e Obstetrícia da FMRP ..... | 103 |

# ***INTRODUÇÃO***

---

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

#### 1.1.1. Breve histórico

Estudos indicam que a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana – 1 (HIV-1) na população humana ocorreu pela transmissão do vírus da imunodeficiência simia (SIV) presente em Chipanzés da subespécie *Pan troglodytes*, nativos do sul de Camarões, na África, por meio do contato de caçadores com sangue contaminado desses animais. Após a transmissão, o SIV sofreu mutações transformando-se no HIV-1. Uma sequência de dados do HIV estimou que o início da contaminação humana pelo HIV-1, ocorreu por volta de 1920 em Kenshasa, República Democrática do Congo, local onde também foi identificado o primeiro tecido humano com HIV-1, em 1959 (COHEN, 2014; FARIA *et al.*, 2014; TAYLOR *et al.*, 2008).

Através de uma análise filogenética do HIV-1 e do SIV apontou-se que, no início do século 20, a transmissão do vírus para humanos ocorreu em distintas ocasiões dando origem aos quatro grupos conhecidos do HIV-1, que são classificados de acordo com sua sequência nucleotídica em: M, N, O e P. Devido ao pouco relacionamento entre os grupos, acredita-se que a transmissão do vírus dos chimpanzés para o homem tenha sido independente, envolvendo várias introduções na espécie humana. (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010; SHARP; HAHN, 2010). O grupo M é responsável pelo grande número de casos, sendo os grupos O e N responsáveis por casos isolados em países na África (SHARP; HAHN, 2010)

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças, em 1981, divulgou um relato no qual apresentava casos de cinco homens com infecção por *Pneumocystis carinii*, além de infecções anteriores ou atuais por citomegalovírus e cândida, em que todos referiram praticar sexo com outros homens, e que eram previamente saudáveis. O quadro de pneumonia por *Pneumocystis* é compatível apenas com pessoas que apresentam grave imunodeficiência (CDC, 1981). Após a divulgação desse relato, o primeiro registro da doença no Brasil ocorreu em 1982, sendo reportado



retrospectivamente um caso do ano de 1980, na cidade de São Paulo. (BRASIL, 1999).

Em maio de 1983, os pesquisadores franceses François Barre-Sinoussi e Luc Montagnier descreveram o retrovírus causador da AIDS. No ano seguinte, o pesquisador norte-americano Robert Gallo corroborou com os achados dos franceses, além de demonstrar o crescimento viral *in vitro*. Somente em 2008, os pesquisadores Barre-Sinoussi e Montagnier receberam o prêmio Nobel pela descoberta do HIV (CDC, 2011; BARRÉ-SINOUSSE *et al.*, 1983).

Acredita-se que o denominado HIV-2 foi transmitido para humanos através do macaco mangabey scooty (*atys Cercocebus*). Este, por sua vez, tem menor infectividade e patogenicidade quando comparado ao HIV-1, além disso, o HIV-2 é endêmico apenas na África Ocidental (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010; SHARP; HAHN, 2010).

### 1.1.1. Classificação, estrutura e ciclo

O HIV é um retrovírus que faz parte gênero *Lentivirus*, que por sua vez é parte da família *Retroviridae*. Os *Lentivirus* recebem esse nome por serem responsáveis por doenças de longa duração sem, no entanto, manifestar os sinais clínicos (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010). É composto por duas cópias de ácidos ribonucléicos (RNA) simples de polaridade positiva. O RNA do vírus está intimamente ligado às proteínas do nucleocapsídeo e às enzimas necessárias ao desenvolvimento do virião, requeridas nos primeiros passos da infecção e replicação viral, antes que novas proteínas virais sejam produzidas. A Figura 1 ilustra a estrutura do vírus e seus componentes (FOCACACCIA *et al.*, 2010; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

O genoma viral apresenta nove genes e duas regiões de longas sequências terminais repetitivas, sendo estas necessárias à integração do vírus ao ácido desoxirribonucléico (DNA) da célula hospedeira. Dos nove genes, Gag, Pol e Env são os três principais. O gene Gag é responsável pela codificação de proteínas estruturais do núcleo viral, o gene Pol codifica as enzimas que participam na replicação e integração do vírus (protease, transcriptase reversa, RNase e

integrase), e o gene Env codifica as glicoproteínas da superfície do envelope viral. Dos outros seis genes, dois regulam a replicação viral (Tat e Rev), e quatro são eficientes para produzir o vírus *in vivo* (Nef, Vif, Vpr e Vpu). A Tabela 1 resume a função dos genes supracitados (FOCACCIA *et al.*, 2010; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

Tabela 1 – Genes do HIV e sua função no processo de replicação.

| <b>Genes</b> | <b>Função</b>   |
|--------------|---|
| <b>Gag</b>   | Responsável pela codificação de proteínas estruturais do núcleo viral     |
| <b>Pol</b>   | Codifica protease, transcriptase reversa, RNase e integrase               |
| <b>Env</b>   | Codifica as glicoproteínas da superfície do envelope viral (gp120 e gp41) |
| <b>Tat</b>   | Regulam a replicação viral  |
| <b>Rev</b>   |   |
| <b>Nef</b>   | Eficientes para replicação e infectividade do vírus                       |
| <b>Vpr</b>   |   |
| <b>Vif</b>   |   |
| <b>Vpu</b>   |   |
| <b>Vif</b>   |   |

O início da infecção pelo HIV ocorre por meio da entrega da carga viral nas células do hospedeiro, através do Env do HIV, que é composto pelas subunidades glicoproteicas gp120 e gp41. A gp120 se liga, com alta afinidade, ao CD4 da célula hospedeira por meio de receptores na superfície da membrana. Esta ligação provoca alterações conformacionais no Env, permitindo a ligação de um correceptor. Os principais correceptores descritos são o CCR5 e o CXCR4. O CCR5 é expresso em células dendríticas, macrófagos e linfócitos T CD4<sup>+</sup>, e a variante de HIV que utiliza este receptor é denominada vírus R5. O vírus X4 utiliza como co-receptor o CXCR4, que está expresso em linfócitos T ativados. Os vírus que podem utilizar ambos os co-receptores são chamados vírus R5X4. Após ligação de receptor e co-receptor é iniciado o processo de fusão da membrana com o peptídeo de fusão gp41, permitindo a entrada do RNA e proteínas virais no citoplasma da célula hospedeira. (WILEN; TILTON; DOMS, 2012; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

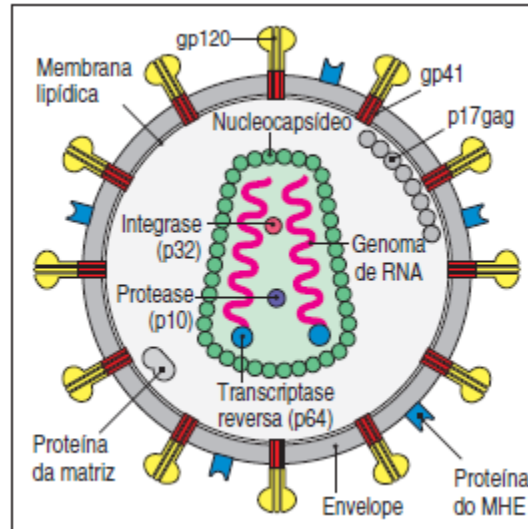


Figura 1 - Representação da estrutura do HIV e seus componentes (Retirado de MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010)

Pouco tempo após a penetração do capsídeo viral na célula alvo, o RNA e proteínas virais são libertados no citoplasma, e a transcriptase reversa transcreve uma cópia do RNA viral em DNA complementar de fita dupla (cDNA). A integração do cDNA ao das células anfitriãs é realizada por outra enzima viral, denominada integrase, que permanece na célula até a sua morte. O vírus HIV se replica, de 93 a 99%, em linfócitos TCD4+ ativos que possuem meia vida de aproximadamente um dia, porque estes expressam fatores necessários para transcrição reversa, integração e expressão do DNA viral. Os macrófagos, células dendríticas e linfócitos T de memória são responsáveis por 1-7% das partículas virais em replicação, os primeiros com meia vida de 14 dias e os linfócitos T de memória com tempo de meia vida de 44 meses, dificultando as tentativas de erradicação da infecção.

O HIV difere de grande parte dos vírus devido a uma imensa variabilidade genética. Esta diversidade é resultado de:

- Rápido ciclo de replicação, capaz de gerar  $10^{10}$  viriões por dia;
- Não correção, pela transcriptase reversa, das fitas recém originadas, incorporando nucleotídeos erroneamente;
- Recombinação genética entre sbtipos (co-infecção) ou grupos virais. (FOCACCIA *et al.*, 2010; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

### 1.1.2. Fases da doença

Após a infecção pelo HIV, os linfócitos T CD8<sup>+</sup> (citotóxicas) do organismo são ativadas e matam as células infectadas, que subsequentemente, produzem anticorpos anti-HIV, processo chamado soroconversão. Essa primeira fase é chamada de infecção aguda e ocorre entre 3 a 6 semanas após a infecção. Caracteriza-se pela rápida multiplicação do vírus aumentando a quantidade circulante no sangue, além da queda brusca no número dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, seja pela destruição direta pelo vírus, indução de apoptose da célula infectada ou eliminação pelos linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Esse processo resulta em um indivíduo altamente infectante, com carga viral entre 10<sup>5</sup> a 10<sup>7</sup> cópias/ml, e com o sistema imunológico enfraquecido. Posteriormente, entre 8 a 10 semanas, a carga viral é reduzida em aproximadamente 100 vezes (BRASIL, 2013; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

Nesse período os sintomas são semelhantes a gripe, sendo eles: febre, mialgia, adenopatia, faringite, cefaleia, além de sintomas gastrointestinais como vômito, diarreia e perda de peso. Esse conjunto de manifestações clínicas é chamado de Síndrome Retroviral Aguda, e por ser semelhante a outros tipos de infecções virais é comum que não seja diagnosticado nessa fase, pois dificilmente os pacientes procuram atendimento médico e raramente há suspeita da contaminação pelo HIV, a não ser que o paciente relate ocorrência suspeita. Mesmo sem o diagnóstico e tratamento os sintomas são temporários, desaparecendo após 3 a 4 semanas. (SUTHAR *et al.* 2015; BRASIL, 2013; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

Segue-se, a partir da soroconversão até o aparecimento de doenças oportunistas, a fase de latência clínica ou fase assintomática, que pode durar de seis meses até mais de 20 anos após a infecção primária. A resposta imune adaptativa controla a doença aguda e restaura amplamente os níveis de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, porém sem erradicar o vírus. Nesse período o achado clínico de linfadenopatia generalizada é comum, além de plaquetopenia, anemia e leucopenia leves. Enquanto a contagem de linfócitos está acima de 350 células/mm<sup>3</sup> as

infecções mais frequentes são as bacterianas (BRASIL, 2013; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

A medida que a contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> cai (200 – 300 células/mm<sup>3</sup>), a doença entra em fase sintomática. Nesse período os sintomas mais frequentes são febre baixa, sudorese noturna, fadiga, diarreia crônica, infecções bacterianas, lesões orais, sendo que um indício precoce de imunossupressão grave é o aparecimento de candidíase oral. A fase subsequente, denominada AIDS, é caracterizada pelo aparecimento de doenças oportunistas e neoplasias. Pneumocistose, neurotoxoplasmose, tuberculose pulmonar, meningite criptocócica e retinite por citomegalovírus são as infecções mais comuns, enquanto sarcoma de Kaposi, linfomas não Hodgkin e, em mulheres jovens, câncer de colo de útero tratam-se das neoplasias mais comuns. Nesse estágio, a contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> é menor que 200 células/mm<sup>3</sup>. A Figura 2 ilustra a progressão da doença e dos sintomas relacionado a queda do número de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, desde o momento de infecção, até a progressão para AIDS. (BRASIL, 2013; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

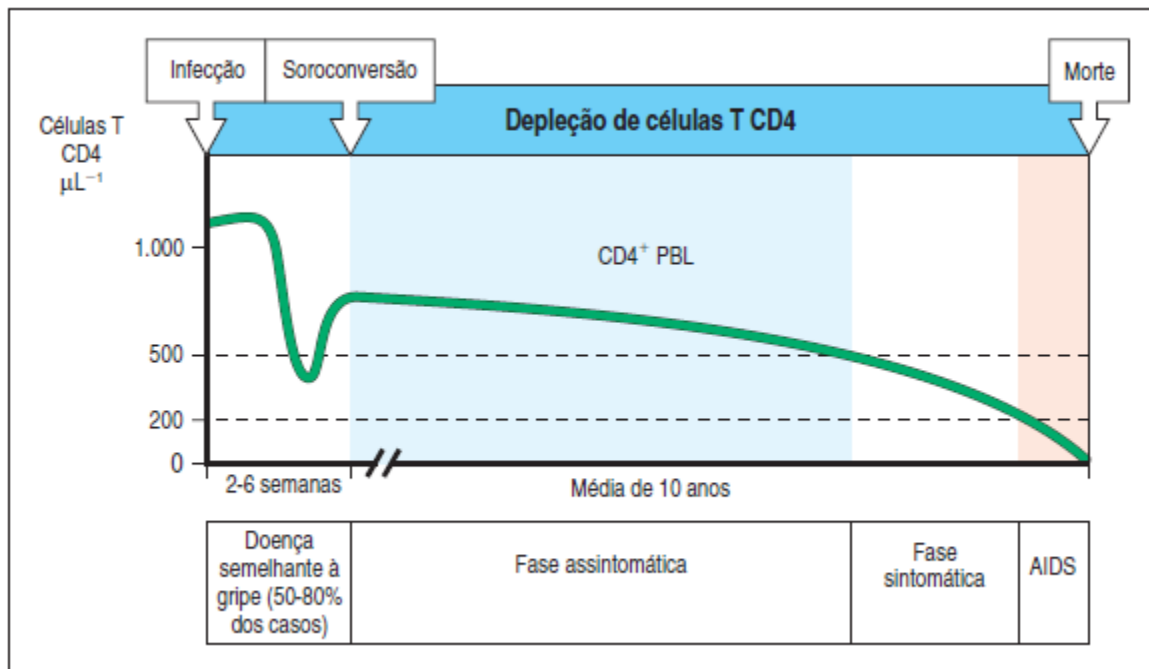


Figura 2 - Fases da infecção pelo HIV (retirado de MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

### **1.1.3. Epidemiologia**

No Brasil, desde o início da epidemia até junho de 2015 foram notificados 798.366 casos de AIDS, sendo que o maior número de casos encontram-se nas regiões sul e sudeste que representam 20% e 53,8% do total de casos, respectivamente. Desses casos, 519.183 foram diagnosticados em homens e 278.960 em mulheres. Já o número de óbitos notificados soma 290.929 casos desde 1980 até dezembro de 2014, sendo 206.991 entre os homens e 83.820 entre as mulheres. Até o ano de 2008, o número de mulheres diagnosticadas com AIDS vinha aumentando linearmente chegando à proporção de 1,5:1,0 (homens:mulheres), entretanto após o ano de 2009 vem se observando queda no número de casos entre mulheres e aumento entre os homens, resultando em uma proporção de 1,9:1,0 (homens:mulheres). Em ambos os sexos, a maior concentração dos casos de AIDS ocorre entre as idades de 25 e 39 anos representando 53,6% dos casos entre as mulheres e 49,8% entre os homens. (BRASIL, 2015)

No ano de 2015, foi estimado que mais de 798 mil pessoas vivessem com HIV/AIDS representando uma prevalência de 0,39%. Nos últimos 10 anos o país vive um período de estabilização na detecção de AIDS, com média de 20,5 notificações para cada 100.000 habitantes, porém nas regiões norte, nordeste e centro-oeste foi identificada uma tendência linear de aumento dos casos, sendo este mais acentuado na região norte, e apenas o sudeste apresentou tendência de queda. (BRASIL, 2015).

## **1.2. Papilomavírus**

### **1.2.1. Estrutura viral e taxonomia**

Os Papilomavírus são um grupo diverso de vírus que foram encontrados em mais de 20 espécies de mamíferos diferentes, além de aves e répteis. Todos os papilomavírus, independentemente da especificidade do hospedeiro, são bastante semelhantes em estrutura física e organização do genoma, em que apresentam dupla fita de DNA de conformação circular, com cerca de oito mil pares de bases,

envolto por um capsídeo icosaédrico de 55nm de diâmetro, com 72 capsômeros, não envelopados (DOORBAR, 2005; SCHEURER, TORTOLERO-LUNA, ADLER-STORTHZ, 2005). Apesar da sua pequena dimensão, sua biologia molecular é muito complexa, e a divisão de seu genoma é feita de acordo com a localização e as propriedades funcionais das mesmas. As regiões E (early) e L (late), denominadas ORFs (*open read frames* ou unidades de tradução), e a região não codificadora LCR (*long control region*). Três são oncogenes, E5, E6 e E7, e modulam o processo de transformação, duas são proteínas reguladoras, E1 e E2, que modulam a transcrição e a replicação, e duas são proteínas estruturais, L1 e L2, que compõem o envoltório viral, há ainda a região LCR responsável pela regulação do ciclo de replicação viral. Os genes E6 e E7 codificam proteínas associadas a malignidade de lesões, além disso, elas estimulam a proliferação celular através da interação com as proteínas celulares p53 e pRb, que estão envolvidas no controle da proliferação celular e em suprimir suas funções. A Figura 3 ilustra o genoma de um tipo de HPV, os genes supracitados e suas funções (VILLIERS *et al.*, 2004; DOORBAR, 2005).

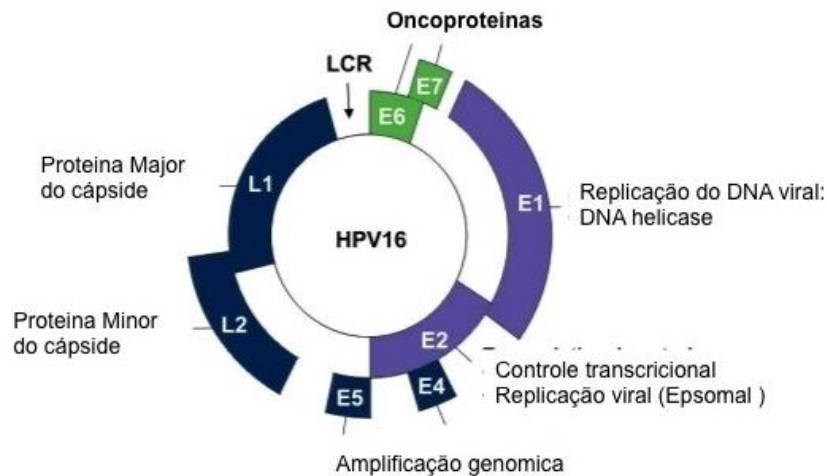


Figura 3 - Genoma de HPV 16. Genoma de DNA circular de dupla-fita, mostrando a localização dos genes. (Adaptado de D'ABRAMO; ARCHAMBAULT (2011))

O vírus foi isolado pela primeira vez em 1976 pelos pesquisadores Gissmann e Hausen, porém apenas em 2003 foi aceito, pelo comitê internacional de taxonomia de vírus (ICTV), sua classificação com base na semelhança de sequências de

nucleotídeos L1. Por ser o mais conservado gene dentro do genoma, o L1 tem sido utilizado para a identificação de novos tipos de Papilomavírus ao longo dos últimos anos, em que é considerado um novo tipo de papilomavírus humano (HPV) quando as variações dos genes L1 forem maiores que 10% quando comparados com qualquer tipo de HPV já conhecido (DE VILLIERS *et al.*, 2004; DE VILLIERS *et al.*, 2013). Pertencem a família Papillomaviridae e possuem cerca de 200 tipos diferentes de vírus que foram identificados como infectantes de pele ou mucosa (PAASO *et al.*, 2015).

### **1.2.2. Papilomavírus humano**

Os gêneros diferentes de HPVs compartilham menos de 60% de similaridade na sequência de nucleotídeos do capsídeo principal da proteína L1, e são agrupados em Alfacapilomavírus, que apresentam tropismo ao epitélio genital, e alguns tipos também causam verrugas vulvares; Betapapilomavírus, encontrados na pele da população geral sem lesões e em pacientes portadores da Epidermodisplasia Verruciforme; Gamapapilomavírus, que causam lesões cutâneas; Mupapilomavírus, causadores de verrugas vulvares e palmares; e Nupapilomavírus (VILLIERS *et al.*, 2004; DOORBAR, 2005).

Os HPVs são agrupados quanto ao tropismo tecidual, por isso destacam-se três grupos de HPV: HPV cutâneo (que atingem predominantemente áreas não genitais estando associados a lesões verrucosas benignas e são representados, em sua maioria, pelo gênero Beta), HPV de mucosa (que causam infecção principalmente na mucosa genital e são representados pelo gênero alfa), e HPV associado a Epidermodisplasia Verruciforme (doença genética rara que é caracterizada pela alta susceptibilidade a câncer de pele induzido pelo HPV do gênero Beta) (BERNARD *et al.*, 2010; FOCACCIA *et al.*, 2010).



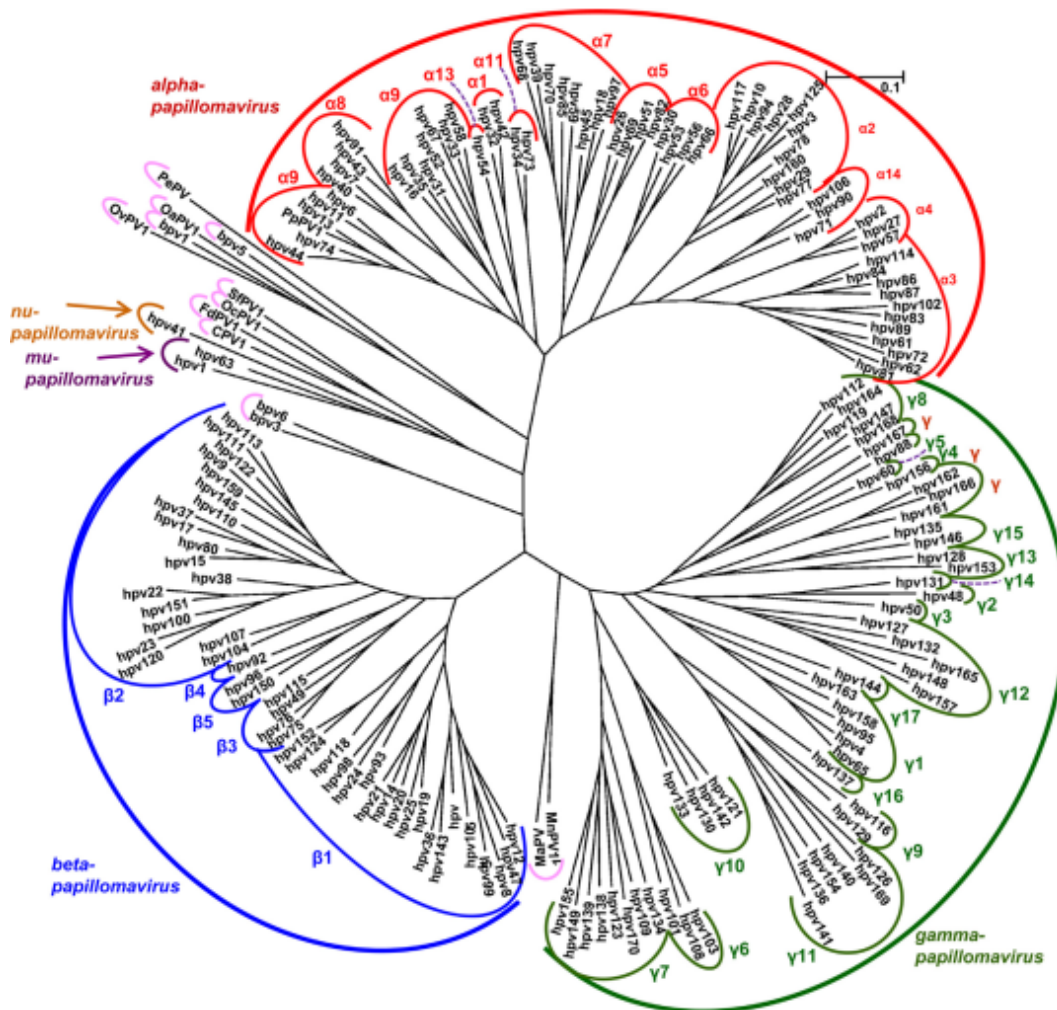


Figura 4 - Árvore filogenética de 170 tipos de HPV (retirado de VILLIERS, 2013).

Dos 170 tipos já identificados (Figura 4), mais de 40 tipos virais acometem o trato genital, e podem ser subdivididos de acordo com o seu potencial oncogênico, ou seja, a sua associação com o câncer cervical, sendo de baixo e de alto risco (VILLIERS *et al.*, 2004; PAASO *et al.*, 2015). Os HPVs de baixo risco estão fortemente presentes em lesões condilomatosas, na papilomatose laríngea recorrente e em parte das lesões intraepiteliais cervicais de baixo grau e são representados principalmente pelos HPVs 6, 11, 34, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 70, 74, 82 sendo os HPV 6 e 11 os com maior incidência diante de tais patologias. Já os HPVs de alto risco são representados pelos tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73, sendo que os tipos 16 e 18 são associados, aproximadamente, a 50% das lesões intraepiteliais de alto grau e a 70% dos casos

de câncer cervical (TROTTIER; FRANCO, 2006; NOWAKOWSKI *et al.*, 2015; CLIFFORD *et al.*, 2006).

O nexos causal entre a infecção pelo HPV e o desenvolvimento de câncer cervical foi identificado pela primeira vez em 1984 pelo pesquisador Harald Zur Hausen, o qual ganhou o Prêmio Nobel por isolar os tipos de HPV 16 e 18 (LEES *et al.*, 2016).

### **1.2.3. Transmissão e tipos de infecção pelo HPV**

A transmissão ocorre através do contato com a pele ou superfície infectada, sendo que em 95% dos casos ocorre por via sexual e em apenas 5% dos casos por vias não sexual (transmissão vertical, contato com objetos contaminados) (CUBIE, 2013; DE PALO; VECCHIONE, 1996; FOCACCIA *et al.*, 2010).

Por meses o mecanismo de escape do vírus no organismo se dá pelo fato de que o ciclo infeccioso em si é um mecanismo para isso. Não há viremia, os níveis de proteína viral expressos estão muito baixos e, principalmente, o HPV não é citolítico. A replicação e montagem viral ocorre em células que já estão destinadas a morrer por "causas naturais" e não há inflamação ou sinal para alertar o sistema imunológico, além disso a resposta do Interferon, proteína chave no mecanismo de defesa antiviral, é suprimida pelas proteínas virais E6 e E7 dos HPVs que inibem as vias de sinalização do receptor de Interferon e a ativação dos genes de resposta do hospedeiro (Revisado em STANLEY, 2010).

Os HPVs são patógenos intraepiteliais, cujo ciclo de replicação está intrinsecamente associado à diferenciação celular do epitélio. A infecção ocorre por meio da penetração do vírus nos tecidos através de microlesões na pele ou mucosa, infectando a camada de células basais e metaplásicas do epitélio. No citoplasma celular, o genoma viral é liberado e se dirige ao núcleo, porém a expressão das proteínas virais ocorre de maneira diferenciada nas diversas camadas do epitélio, associada ao processo de maturação da célula escamosa. Quando uma célula infectada migra para uma camada superficial ocorre a ativação dos genes virais, a replicação do DNA viral e a formação das proteínas do capsídeo, as quais formam as partículas virais que são eliminadas no ambiente com a descamação celular. A

**Erro! Fonte de referência não encontrada.** ilustra este ciclo de vida do HPV e sua regressão através das camadas celulares (DOORBAR, 2005; KRANJEC; DOORBAR, 2016; SCHEURER; TORTOLERO-LUNA; ADLER-STORTHZ, 2005).

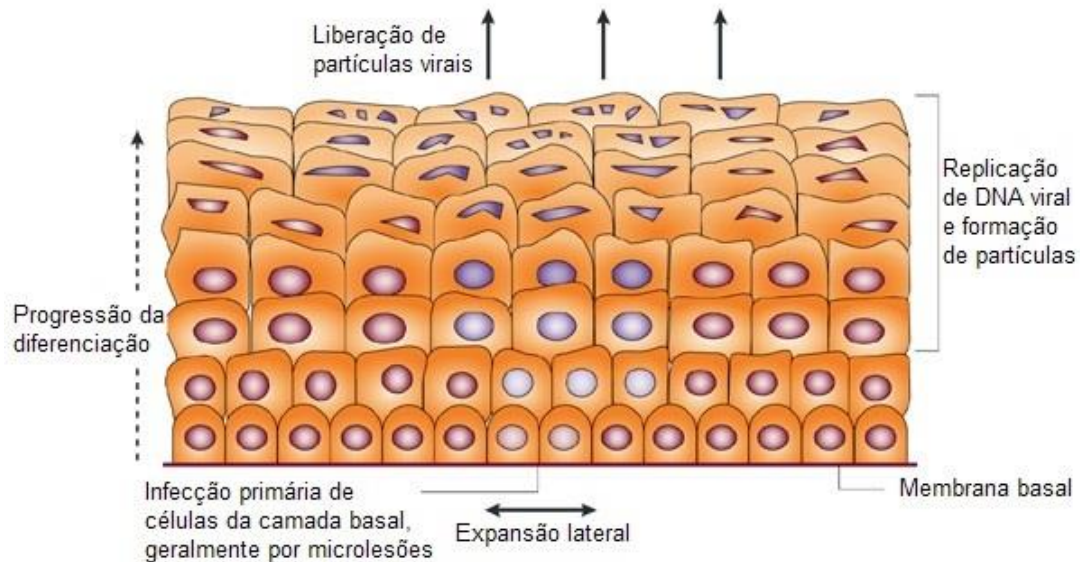


Figura 5: O ciclo de vida do HPV. (Adaptado de Hausen, 2002)

Após a entrada do vírus no organismo a infecção pelo HPV pode ser clínica, subclínica e latente. A primeira é caracterizada pelo aparecimento de lesões genitais em forma de verrugas que podem ser vistas a olho nú, e a segunda pode ser diagnosticada apenas através de exames complementares, como o exame microscópico com o auxílio de ácido acético aplicado topicamente em colposcopia do colo do útero. Nessas fases a reprodução viral é rápida, há alta transmissibilidade e causa lesões celulares (espessamento epitelial, multinucleação e atipias celulares) (CUBIE, 2013).

A infecção pelo HPV que não apresenta qualquer tipo de lesão é chamada de latente e detectada apenas através de técnicas de biologia molecular. Essa forma de infecção é transitória e apresenta transmissibilidade próxima de zero. Não está associada a progressão para câncer, já que não acarreta transformação celular, uma vez que o DNA viral não se liga ao DNA do hospedeiro, mantendo-se na forma episomal. Esta fase pode durar por tempo indeterminado e em menos de

10% dos casos pode perdurar a vida toda ou se tornar ativa por fatores como a imunodepressão. A eliminação do vírus ocorre na maioria dos casos, chegando a atingir 70% de eliminação em um ano e 90% após dois anos de infecção (CUBIE, 2013; VELDHUIJZEN *et al.*, 2010; DUNNE; MARKOWITZ, 2006).

#### 1.2.4. Epidemiologia

A associação entre a infecção persistente pelos HPVs de alto risco e o câncer cervical foi bem estabelecida. O câncer do colo do útero é terceiro tipo de câncer mais comum entre as mulheres e a quarta maior causa de morte pela doença entre estas. Para o ano de 2016 o INCA estima 16.340 novos casos da doença. Em todo o mundo 265 mil mortes foram causadas por esta neoplasia somente no ano de 2012, sendo que 87% ocorreram em países em desenvolvimento, e enquanto a mortalidade por esse tipo de câncer diminuiu em países desenvolvidos, aumentou no Brasil entre 2000 e 2012 (BRASIL, 2016; JEMAL *et al.*, 2011). No Brasil, sua ocorrência varia de acordo com a região do país sendo o câncer mais comum entre mulheres da região Norte, o segundo mais comum entre as mulheres das regiões Centro-Oeste e Nordeste, o 3º e 4º entre as mulheres do Sudeste e Sul, respectivamente (BRASIL, 2016).

É estimado que aproximadamente 80% das mulheres sexualmente ativas vão ser infectadas pelo HPV durante a vida. Na maioria dos casos, as infecções por HPV permanecem assintomáticas e são eliminadas em, relativamente, curto período (6-12 meses), porém em 10-20% dos casos a infecção pode persistir, e após um período de latência há o aparecimento de lesões neoplásicas (HAUSEN, 2002; TOMMASINO, 2014). Sendo assim, a infecção pelo HPV não necessariamente causará lesões cervicais, porém estudos mostram que no caso de lesões cervicais de baixo grau há uma prevalência de 80% de HPV de alto risco (MARKS *et al.*, 2015) e em lesões cervicais de alto grau há prevalência aproximada de 94% (NOWAKOWSKI *et al.*, 2014).

É consenso que a incidência da infecção pelo HPV é alta, principalmente após a primeira relação sexual e a cada introdução de parceiro novo. Em um estudo de coorte brasileira, demonstrou que mulheres previamente negativas para a

infecção pelo HPV tinham 1,3% de novas infecções por mês, e 38% de positividade para a infecção acumulado após 18 meses (FRANCO *et al.*, 1999).

Os mais frequentes genótipos de HPV encontrados em câncer cervical em todo o mundo são os HPV16 e HPV18, responsáveis por 70% dos casos. Em um estudo de Sanjose e colaboradores (2010) com amostras biológicas de mulheres do mundo todo, mostraram que os tipos de HPV mais comuns foram 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 e 58, com uma contribuição combinada a nível mundial de 91% dos casos, sendo os HPVs 16 e 18 responsáveis por 71% dos casos de câncer cervical (JEMAL *et al.*, 2011; SANJOSE *et al.*, 2010). Esses dados corroboraram com o estudo de Smith e colaboradores (2007), que, além disso, observaram que 55% dos casos estavam associados ao HPV16 e 15% dos casos ao HPV18, seguidos pelos tipos 31, 33, 35, 45 e 52, 58 que, juntos, são responsáveis por 18% dos casos (SMITH *et al.*, 2007).

### **1.3. Lesões Intraepiteliais Cervicais**

#### **1.3.1. Classificação**

Em 1988, John Williams descreveu pela primeira vez as lesões cervicais pré-cancerígenas (DARRAGH *et al.*, 2012). Em 1967, o pesquisador Richart introduziu o termo neoplasia intraepitelial cervical (NIC), que eram divididos em 3 grupos de acordo com a histologia, sendo NIC 1 atipias celulares localizadas no terço inferior do epitélio escamoso, NIC 2 as atipias que ocupavam dois terços inferiores desse epitélio e NIC 3 as células atípicas que comprometiam mais de dois terços ou toda a espessura do epitélio (RICHART, 1967).

A subjetividade da diferenciação entre NIC 2 e NIC 3 tornou-se aparente e levou ao reconhecimento de que um sistema de 2 camadas de lesões intraepiteliais (LIE, também designada em inglês de SIL - *squamous intraepithelial lesion*) de alto e baixo grau, seria mais biologicamente relevante e histologicamente reprodutível do que a de 3 camadas (NIC 1, 2 e 3). Sendo assim, em 1988 foi criado na cidade de Bethesda, Maryland, nos Estados Unidos, um novo sistema de classificação citológica cervical com terminologia uniforme, visando a facilitação no manejo das lesões cervicais. Tal classificação foi chamada de Sistema Bethesda, no qual as

---

NIC 1 foram classificadas como lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (LIEBG, também designada em inglês por LSIL - *low squamous intraepithelial lesion*) e NIC 2 e 3 agrupadas em lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (LIEAG, também designada em inglês por HSIL - *high squamous intraepithelial lesion*). Essa classificação foi revista em 1991 e 2001, porém não houve mudanças estruturais (DARRAGH *et al.*, 2012; SOLOMON *et al.*, 2002; RICHART, 1990).

O Sistema Bethesda é a classificação citológica mais atual do esfregaço cervical e a mais aceita e indicada para descrição de tais lesões, pois reúne aspectos citológicos e histológicos, sendo também recomendada pelo Ministério da Saúde (DARRAGH *et al.* 2012; BRASIL, 2012). A Figura 6 ilustra as alterações celulares ocorridas no colo do útero desde o LSIL até o desenvolvimento de câncer cervical.

LSIL caracteriza-se pela proliferação de células escamosas ou metaplásicas com características nucleares anormais, incluindo o tamanho aumentado do núcleo e membranas nucleares irregulares. Há pouca maturação citoplasmática no terço inferior do epitélio, mas a maturação começa no terço médio e é relativamente normal no terço superior (DARRAGH *et al.*, 2012). HSIL caracteriza-se, também, pela proliferação de células escamosas ou metaplásicas com características nucleares anormais, incluindo o tamanho nuclear aumentado e membranas nucleares irregulares. Porém há pouca ou nenhuma diferenciação citoplasmática no terço médio e superior do epitélio e a mitose anormal pode ser observada por todo o epitélio inclusive no terço superior, como pode ser observado na Figura 7 (DARRAGH *et al.*, 2012).



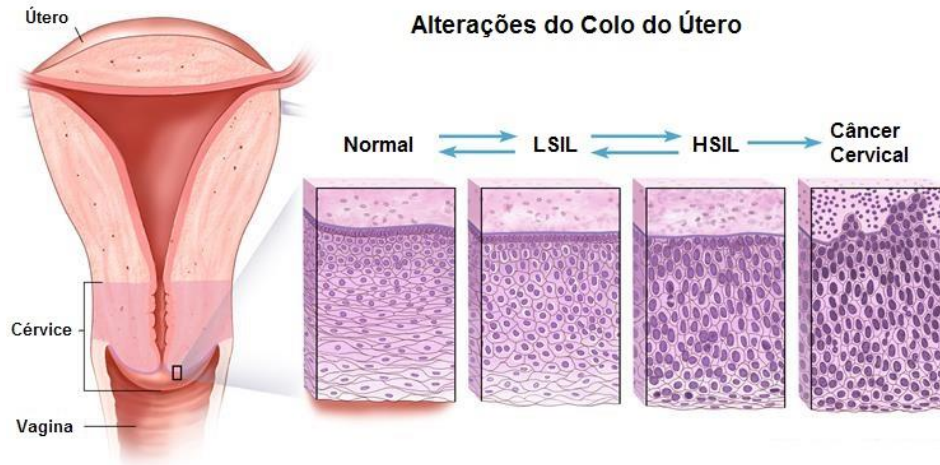


Figura 6 - Alterações celulares no colo do útero. (Adaptado de *National Cancer Institute*)

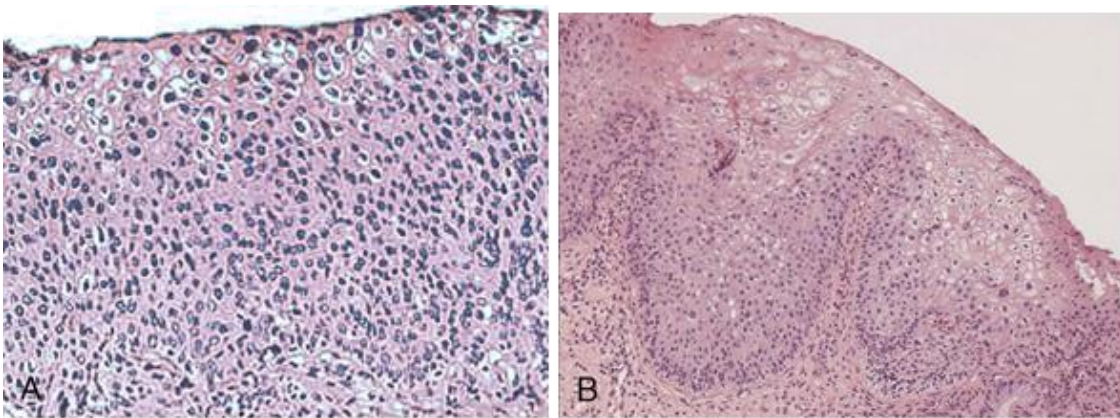


Figura 7 - Lesões intraepiteliais escamosas: A – Lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL), B – Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau LSIL. (Retirado de DARRAGH *et al.*, 2012)

### 1.3.2. Fatores de risco

A infecção pelo HPV é o principal fator de risco para o desenvolvimento das LSIL e HSIL e para o desenvolvimento do câncer de colo de útero (BRASIL, 2016). Porém, ainda há outros fatores importantes que influenciam no desenvolvimento das lesões que incluem consumo de tabaco, idade precoce na primeira relação sexual e na primeira gravidez, multiparidade, promiscuidade sexual, relações sexuais desprotegidas, histórico de doenças sexualmente transmissíveis (DST), uso de anticoncepcionais hormonais, baixa situação socioeconômica e baixo nível

---

educacional, infecção pelo HIV e outras condições que resultem em imunossupressão (VALLE; TRAMALLONI; BRAGAZZI, 2015).

1. Idade e Número de parceiros sexuais: As maiores taxas de infecção genital por HPV ocorrem entre 15 e 25 anos, depois diminui progressivamente com a idade, tornando-se estável após os 40 anos. Estudos mostram que quanto mais cedo a primeira relação sexual maior a chance de infecção pelo HPV. Rousseau e colaboradores (2000) identificaram aumento no risco para HPVs oncogênicos de acordo com a diminuição da idade à primeira relação sexual. Um dos determinantes também significativos para a aquisição do HPV é o número de parceiros sexuais, tanto durante a vida, quanto recentemente. Percebe-se que as duas variáveis estão ligadas devido ao fato de que quanto mais cedo se inicia a atividade sexual, maior a possibilidade de múltiplos parceiros, e quanto maior o número de parceiros sexuais, maiores são as chances de adquirir um ou vários tipos de HPV (SCHEURER; TORTOLERO-LUNA; ADLER-STORTHZ, 2005; VACCARELLA *et al.*, 2006; BOSCH *et al.*, 2006; CHELIMO *et al.*, 2013).

2. Tabagismo: Um estudo de coorte entre mulheres entre 18-35 anos de idade nos Estados Unidos revelou que, as mulheres tabagistas mantinham a infecção por HPV por tempo significativamente maior em comparação com as mulheres que nunca fumaram. Este foi o primeiro estudo que demonstrou que o tabagismo promove eventos carcinogênicos precoce, aumentando a duração das infecções de HPV oncogênicos e diminuindo a probabilidade de eliminação da infecção pelo organismo, ou seja, diminui a regressão das LSIL que geralmente ocorre em até 2 anos após a infecção (GIULIANO *et al.*, 2002; MATSUMOTO *et al.*, 2010). Mulheres fumantes tem prevalência maior de infecção pelo HPV e lesões cervicais, que aumenta linearmente de acordo com o número de cigarros fumados por dia e o tempo de fumante (MARKS *et al.*, 2015; ROURA *et al.*, 2014). Alguns estudos recentes já corroboram com os achados anteriores e confirmam a associação entre o hábito de fumar e a prevalência e persistência do HPV e desenvolvimento de lesões cervicais (HARPER; DEMARS, 2014; LIN *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2014; CATARINO *et al.*, 2016).



Fumar pode aumentar o risco de neoplasia cervical através de dois mecanismos biológicos plausíveis. Os produtos químicos encontrados nos cigarros, como a nicotina e seu metabólito cotinina, foram encontrados no muco do colo do útero de mulheres fumantes e podem causar diminuição do número de células de Langerhans, importantes na apresentação de antígenos. Além disso podem induzir um efeito imunossupressor local provocado por metabólitos de tabaco que podem produzir um efeito negativo sobre a capacidade do hospedeiro de desenvolver uma resposta imune eficaz, tanto humoral quanto celular, contra infecções virais, aumentando o risco de infecções persistentes no colo do útero. Fumantes de longa data podem ser afetadas devido ao baixo número de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, contribuindo para infecções, além de ter uma redução dos níveis de IgA, IgG e IgM em 20% (ROURA *et al.*, 2014; ARCAVI; BENOWITZ, 2004; revisado em PINTO; TÚLIO; CRUZ, 2002).

3. Uso de anticoncepcional oral: Estudos demonstraram que o uso de contraceptivos orais hormonais combinados por mais de 5 anos é um fator de risco no desenvolvimento do câncer cervical em mulheres infectadas pelo HPV, devido ao risco de persistência do vírus. Um estudo realizado pela Agência Internacional de Investigação do Câncer (IARC) mostrou que o risco para o desenvolvimento de câncer cervical em mulheres infectadas pelo HPV aumenta em 4 vezes para as que fazem uso de contraceptivos orais por mais de 5 anos (MARKS *et al.*, 2015; MORENO *et al.*, 2002). Alguns estudos corroboram com esses achados, encontrando associação no uso prolongado de contraceptivos orais e a persistência da infecção pelo HPV e o desenvolvimento de lesões cervicais (BOSCH *et al.*, 2006; ROURA *et al.*, 2016; OH *et al.*, 2016; RUGGERI *et al.*, 2015)

Estudos relacionam o uso prolongado de contraceptivos hormonais e lesões cervicais mostrando basicamente três hipóteses: uma contribuindo para ectopia cervical (“ferida”) e aumentando a aquisição de HPV, outra modulando a resposta imune do hospedeiro ao HPV, facilitando a persistência da infecção e desenvolvimento de lesões pré-cancerígenas, e uma terceira através do aumento da atividade transformadora dos oncogenes do HPV, bem como a contribuição para o aumento da expressão destes, principalmente E6 e E7, podendo interferir na

resolução da infecção e das lesões na cérvix de mulheres jovens por meio da ligação de progesterona e de receptores de glicocorticóides à LCR do HPV (MARKS *et al.*, 2011; PINTO; TÚLIO; CRUZ, 2002; KWASNIEWSKA *et al.*, 2011).

4. Multiparidade: Encontra-se atualmente uma vasta galeria de estudos que correlacionam o número de partos com o risco para a persistência do HPV e o desenvolvimento de lesões cervicais, porém não há clareza quanto essa associação, uma vez que há estudos que não encontram relação entre essas variáveis. Há estudos que mostram que mulheres que relataram sete ou mais gestações e que eram HPV positivas tiveram um risco 4 vezes maior de ter câncer cervical quando comparadas com mulheres nulíparas, e 2 vezes maior quando comparadas com mulheres com 1 ou 2 gestações, também HPV positivas. Resultados semelhantes foram obtidos na Costa Rica e Tailândia. Para mulheres que usaram contraceptivos orais mais de 5 anos e somavam mais que 5 gestações, o risco para o desenvolvimento de câncer cervical aumentava em 11 vezes, quando comparadas às nulíparas que não utilizavam contraceptivos orais. Sarian e colaboradores (2009) mostraram que apenas uma gestação é suficiente para aumentar o risco de lesões de alto grau quando comparada as nuligestas (BOSCH *et al.*, 2006; ALMONTE *et al.*, 2008; ROURA *et al.*, 2016).

Em contraste, outros estudos não encontraram uma associação significativa entre a paridade e o risco para o desenvolvimento de lesões cervicais (STENSEN *et al.*, 2015; PALTIEL *et al.*, 2016; CASTLE *et al.*, 2002; CASTLE *et al.*, 2005; SHIELDS *et al.*, 2004).

5. Doenças Sexualmente Transmissíveis (DSTs): Há estudos que investigam a influência de outras infecções genitais na infecção pelo HPV e no desenvolvimento de lesões. A principal DST associada é o HIV, uma vez que a imunodeficiência oferece um risco maior para a persistência do HPV. Samoff e colaboradores (2005) identificaram uma associação na persistência de HPVs de alto risco e infecção pela *Chlamydia trachomatis*, bem como Imai e colaboradores (2015). Herpes simples também foi associada ao risco aumentado para o desenvolvimento de câncer cervical (SAMOFF *et al.*, 2005; IMAI *et al.*, 2015; SMITH *et al.*, 2002).

**6. Fatores imunogenéticos:** Fatores de suscetibilidade genética, tais como polimorfismos de específicos antígenos leucocitário humano (HLA), já foram descritos como sendo associados a um efeito de proteção de infecções pelo HPV, bem como a uma redução do risco de infecções persistentes. Por outro lado, alguns haplótipos foram associados a um risco 7 vezes e 3 vezes maior na persistência do HPV (SCHEURER; TORTOLERO-LUNA; ADLER-STORTHZ, 2005). Uma revisão sistemática de 249 artigos feita para analisar variantes genéticas no risco de desenvolvimento de câncer cervical apontou que os alelos *HLA-DQA1\*0101* e *\*0201* e *HLA-DQB1\*0501* e *\*0603* podem diminuir o risco para o desenvolvimento de câncer cervical, enquanto que os alelos *HLA-DQB1\*0301*, *\*0303*, *\*06* e *\*0602* podem aumentar o risco (ZHANG et al., 2014). Recentes associações apontaram os alelos *B\*35* e *DRB1\*10* e os haplótipos *A\*11-B\*35* e *DRB1\*10-DQB1\*0501* como de proteção para o câncer cervical no sul da Índia (RATHIKA et al., 2016)

#### **1.4. Infecção pelo HPV em mulheres portadoras do HIV**

A presença de altas prevalências da infecção pelo HPV em mulheres portadoras do HIV já foi largamente documentada na literatura. O HIV, é a principal DST para o desenvolvimento de lesões cervicais. Clifford e colaboradores (2006) analisaram 20 estudos com mulheres portadoras do HIV e mostraram que a prevalência para infecção por qualquer HPV foi de 36,3% e 11,9% para vários tipos de HPV. Para mulheres portadoras do HIV, a prevalência de LSIL é de aproximadamente 36,8% e 5,3% de HSIL. A prevalência de infecção pelo HPV é dependente da população estudada, do grau de imunocomprometimento e das técnicas de detecção viral, com estimativas que variaram entre 36% e 98% (CLIFFORD et al., 2006; URSU et al., 2015; ZHANG et al., 2012; LEVI et al., 2002) variando entre 22,6% e 42,2% na população geral (URSU et al., 2015; VINODHINI et al., 2012).

A infecção por vários tipos de HPV é mais frequente em mulheres HIV+, bem como a persistência da infecção. Em estudo brasileiro realizado com mulheres portadoras do HIV, mais de um tipo de HPV foi identificado em cerca de 80% das amostras positivas para esse vírus (LEVI et al., 2002). Quando é comparado com a

população geral, o risco de infecção por mais de um genótipo de HPV em portadoras do HIV é de 20,8% contra 3,1% em HIV-. Quando associado com HSIL, este achado ocorre em 41,4% dos casos dentre as HIV+ e 6,7% em HIV- e quando associado ao câncer cervical invasivo, é observado em 20,8% e 3,1% dos casos, respectivamente (CLIFFORD *et al.*, 2006; VUYST *et al.*, 2012; FREITAS *et al.*, 2015). Zhang e colaboradores mostraram que após 12 meses de acompanhamento, a persistência do HPV é de 47,5% entre as HIV+ e 21,1% entre as HIV- (ZHANG *et al.*, 2012).

Estudos vêm demonstrando que o risco câncer cervical está intimamente relacionado com o estado imunológico da mulher e, desde 1993, tem sido classificada como uma doença definidora de AIDS (FREITAS *et al.*, 2015). Em mulheres HIV+, a infecção pelo HPV pode ser mais facilmente investigada pelo fato de serem mais vulneráveis à infecção e menos suscetíveis a eliminar o vírus, aumentando o risco de desenvolver lesões cervicais e posteriormente câncer. Estudos já relataram risco de 2 a 22 vezes maior para o desenvolvimento de câncer entre mulheres HIV+ em comparação com a população feminina em geral na mesma área geográfica (DENNY *et al.*, 2012). A alta prevalência de lesões cervicais associadas a mulheres HIV+ destacou que a resposta imune desempenha um papel importante no desenvolvimento das lesões pré-cancerígenas, e que a agressividade da doença e suas altas taxas de recorrência, bem como a gravidade, está diretamente relacionada com o grau de imunossupressão, em especial pela perda progressiva das linfócitos T CD4+, que está associada com o aumento da infecção por HPV e persistência viral quando atinge menos que 250 células/mm<sup>3</sup>.

Com o advento da terapia antirretroviral (TARV), cresceu a expectativa de que ocorressem mudanças significativas na história natural do HPV e das doenças induzidas por este vírus nas mulheres portadoras do HIV. Estudos já mostraram que o uso de antirretrovirais por 2 anos ou mais confere efeito protetor, entretanto há divergências na literatura. Sendo assim, a imunodeficiência celular e humoral desempenha papel importante na permissividade e persistência da infecção ativa por HPV oncogênico e a instalação das lesões cervicais (FERNANDES *et al.*, 2004; GONÇALVES *et al.*, 2004; VUYST, 2012).

Investigou-se que o HIV desempenha um papel direto na carcinogênese associada ao HPV exercendo estímulo através da proteína oncogênica TAT, aumentando a expressão dos oncogenes E6 e E7 do HPV através da inibição da proteína E2 (KIM *et al.*, 2008).

## 1.5. Antígeno Leucocitário Humano-E

### 1.5.1. Complexo Principal de Histocompatibilidade

O complexo principal de histocompatibilidade (CPH, também designado em inglês como MHC- *Major Histocompatibility Complex*) é o conjunto de genes mais polimórficos do genoma de vertebrados responsáveis por codificar as moléculas de histocompatibilidade, os antígenos leucocitários humanos (HLA), com importantes funções imunológicas, principalmente fornecendo proteção contra patógenos. Ele foi descrito pela primeira vez pelo pesquisador Pete Gorer, em 1937, durante estudos sobre transplantes realizados em camundongos. Consiste em um grande complexo gênico com múltiplos *loci* cujas moléculas codificadas são responsáveis pela apresentação de antígenos proteicos (peptídeos) às células do sistema imune, principalmente linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> (ABBAS; LICHTMAN, 2008; GORER, 1937).

O MHC está localizado no braço curto do cromossomo 6 em que ocupa uma região de aproximadamente 7,6 megabases de DNA, contendo 421 loci com 252 genes expressos, sendo a  $\beta$ 2-microglobulina, que auxilia a manter a conformação apropriada da molécula, codificada por um gene no cromossomo 15 (ABBAS; LICHTMAN, 2008; HORTON *et al.*, 2004). A localização do MHC está ilustrada na Figura 8.

Os antígenos leucocitários humanos (HLA) são moléculas codificadas pelos genes do MHC que atuam na imunossupressão e imunomodulação das respostas antitumorais, e podem ser reunidos em 3 grupos, denominados classe I, classe II e classe III (ABBAS; LICHTMAN, 2008).

Classe I:

- Clássicos: HLA-A, HLA-B e HLA-C
- Não Clássicos: HLA-E, HLA-F e HLA-G

Classe II: HLA-DR (-DRB1, -DRB3, -DRB4, -DRB5), HLA-DQ (-DQA1, -DQB1) e HLA-DP (-DPA1, -DPB1)

Classe III: Contém vários genes, muitos de função desconhecida, eles não codificam moléculas de histocompatibilidade, mas várias proteínas do sistema imune, incluindo componentes do sistema complemento (C4, C2 e fator B) e fatores de necrose tumoral (MOULDS, 2001).

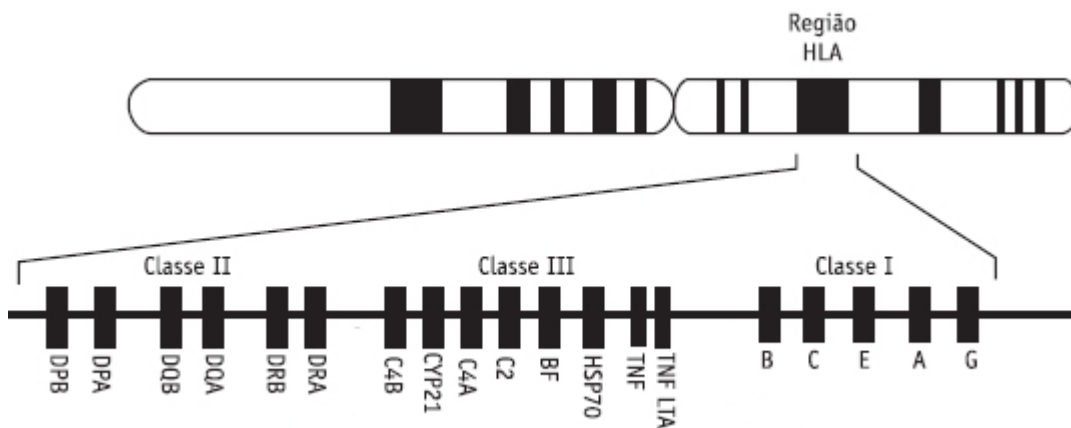


Figura 8 - Localização do HLA no braço curto do cromossomo 6 (retirado de UTIYAMA; REASON; KOTZE, 2004)

Dentre as moléculas HLA, encontra-se a molécula HLA-E, que vem sendo estudada por se diferenciar das outras moléculas de classe I por ter uma natureza conservada e não-polimórfica. A sua expressão e sua função em tumores sólidos ainda não está totalmente compreendida. Os primeiros grandes estudos a respeito da função do HLA-E foram dirigidos a interação materno-fetal na gravidez. Expressa em tecidos da placenta, o HLA-E desempenha um papel importante na gravidez e permite que o sistema imunológico da mãe aceite o feto, o que de outro modo seria detectado como "estranho" (GOODEN *et al.*, 2011; SPAANS *et al.*, 2012).

### 1.5.2. HLA-E: Função no sistema imunológico

Há ainda poucas informações sobre a região que regula o gene *HLA-E*, porém já foi considerado o gene menos polimórfico com base em pesquisas feitas em todo o mundo, inclusive na população brasileira que é considerada como uma

das mais heterogêneas. Ela foi descrita, inicialmente, em linfócitos T em repouso e tecidos trofoblásticos, sendo associada à tolerância maternal ao feto durante a gestação (VEIGA-CASTELLI *et al.*, 2016; CASTELLI *et al.*, 2015).

O *HLA-E* é o menos polimórfico de todos os genes HLA de classe I, pois apresenta um grau de polimorfismo muito mais limitado do que os loci clássicos de classe I, sendo dois alelos não-sinônimos, *HLA-E\*0101* e *HLA-E\*0103*, os mais encontrados em populações em todo mundo em frequências quase iguais, e apesar dos alelos *E\*0104*, *E\*0105*, *E\*0106* e *E\*0107* terem sido descritos não são amplamente encontrados. Não foram encontradas diferenças estruturais entre os alelos, apesar de parecer haver diferenças referentes à afinidade com peptídeos (ISHITANI, SAGESHIMA E HATAKE, 2006; KOCHAN *et al.*, 2013; VEIGA-CASTELLI *et al.*, 2013; FELICIO *et al.*, 2014).

A molécula de HLA-E faz papel tanto de modulador de atividades de células *Natural Killer* (NK), através da interação com o receptor CD94-NKG2A, na imunidade inata, ou como de molécula apresentadora de antígeno, desencadeando uma resposta imune específica (CASTELLI *et al.*, 2015; BENEVOLO *et al.*, 2011). A ligação da molécula nos receptores das células NK resulta em sua inibição, regulando, dessa forma, a citotoxicidade mediada pelas células NK, além disso, o HLA-E também interage com o receptor de linfócitos T CD8+ apresentando antígenos próprios e não-próprios. Apesar de também se ligar ao receptor de ativação NKG2C nas células NK, o HLA-E mantém maior afinidade ao receptor de inibição NKG2A (CASTELLI *et al.*, 2015; WIETEN *et al.*, 2014).

As células NK são responsáveis pelo reconhecimento e destruição de células infectadas ou malignas, mas não são prejudiciais, de forma geral, as células normais. Esta capacidade em distinguir seus alvos está relacionada com a expressão dos receptores inibitórios (complexo HLA-E/peptídeo ligado ao receptor CD94 que está associado ao NKG2A) (ABBAS; LICHTMAN, 2008; GOODEN *et al.*, 2011).

Para que a expressão do HLA-E seja estável, é necessária ligação de peptídeos derivados de outros HLA de classe I (HLA-A, -B, -C ou -G). Normalmente a fenda de ligação do peptídeo na molécula HLA-E está ocupada por antígenos

próprios de outras moléculas do MHC de classe I, porém já foi evidenciado que peptídeos derivados de vírus como o citomegalovírus, HIV, Epstein-Barr e hepatite C se ligam às moléculas de HLA-E. Com isso, a resposta imune adaptativa pode desencadear a rápida ativação de linfócitos T citotóxicos, bem como pode desencadear um mecanismo de fuga da resposta imune inata pela inibição das células NK (ABBAS; LICHTMAN, 2008; CASTELLI *et al.*, 2015; WIETEN *et al.*, 2014).

### 1.5.3. HLA-E nas infecções virais

Ao longo de sua evolução, os vírus desenvolveram mecanismos de escape do sistema imunológico para se disseminar no hospedeiro, sendo o escape das células NK e a modulação da sua ativação é a mais comum. Normalmente, os peptídeos virais são apresentados aos linfócitos T CD8<sup>+</sup> através das moléculas HLA de classe I. Por isso, para se evadir da resposta dos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, o HIV inibe a expressão de HLA de classe I, importante para o reconhecimento e ativação desses linfócitos. Entretanto, qualquer alteração na expressão desses HLA é detectada pelas células NK, que lisam as células com padrão de expressão diferentes. Assim, para evitar esse problema, a proteína Nef do HIV diminuiu a expressão das moléculas HLA-A e -B porém a HLA-C não é afetada, e ocorre um aumento na expressão de HLA-G e HLA-E, para que estes possam se ligar ao receptor das células NK e inibir a sua ação citotóxica, o mesmo ocorre com o HPV (FUNKE *et al.*, 2011; IWASZKO; BOGUNIA-KUBIK 2011; WIETEN *et al.*, 2014; ABBAS; LICHTMAN, 2008; GRIMSLEY *et al.*, 2002).

Foi relatado que as células NK que não tem receptores inibitórios para HLA-E podem matar as linfócitos T CD4<sup>+</sup> infectadas com HIV, apoiando a importância da molécula na modulação relativa à protecção de células infectadas pelo HIV contra a lise por células NK. Pesquisas realizadas *in vitro* mostraram aumento da expressão de HLA-E em linfócitos, o que resultou em resistência das células infectadas por HIV e a lise por células NK, mesmo com a redução da expressão de moléculas clássicas do MHC de classe I. Foi relatada expressão aumentada do complexo HLA-E com o peptídeo p24 derivado do HIV. O peptídeo p24 é importante



na interação do complexo HLA-E/peptídeo com o receptor CD94/NKG2A das células NK (receptor inibidor específico) impedindo a degradação da célula hospedeira (NATTERMANN *et al.*, 2005a).

O HLA-E e HLA-G tem sido consideradas como “moléculas HLA de tolerância”, e podem ser expressas de forma aberrante em células em situação patológica, tumorais ou infectadas por vírus, e esta expressão pode estar associada a um possível papel de escape da imunovigilância por inibição da ação de células NK e linfócitos T citotóxicos (DONADI *et al.*, 2011).

#### 1.5.4. Expressão do HLA-E em tecidos

O locus *HLA-E* é um gene de classe I não-clássico que, diferentemente dos genes clássicos, produz uma molécula estruturalmente semelhante, cuja função principal não é apresentação antigênica. A molécula de HLA-E é amplamente distribuída entre os tecidos humanos, porém em níveis mais baixos em comparação com as outras moléculas de classe I, tem a capacidade de se ligar a antígenos próprios e não-próprios e interagir com as células NK e linfócitos T, além de desempenhar uma função dupla, na resposta imune inata e adaptativa, sendo importante para a vigilância imunológica e também para lutar contra as infecções (CASTELLI *et al.*, 2015; VEIGA-CASTELLI *et al.*, 2016; WIETEN *et al.*, 2014; SULLIVAN *et al.*, 2008).

HLA-E é expresso principalmente em superfícies das células trofoblásticas (durante a gravidez), além de células em órgãos transplantados, células infectadas por vírus, em doenças inflamatórias e doenças auto-imunes. A transcrição de *HLA-E* foi detectado em quase todos os tipos de células, porém sua expressão típica é essencialmente restrita às células endoteliais, linfócitos T e B, monócitos e macrófagos (KOCHAN *et al.*, 2013). Enquanto as células do sistema imune expressam HLA-E em níveis elevados, as células endoteliais exibem níveis reduzidos em sua superfície, muito menor do que os da maioria dos genes MHC de classe I. Apenas quando as células estão expostas a citocinas pró-inflamatórias (fator de necrose tumoral e interleucinas, por exemplo) é que exibem aumento dos níveis de HLA-E na superfície (KOCHAN *et al.*, 2013).

Na vigência de tumores, o estudo realizado por Gooden e colaboradores (2011) determinou a expressão do HLA-E em amostras cervicais e ovarianas de mulheres com estes tipos de câncer, sendo que os resultados indicaram que a molécula de HLA-E está frequentemente mais expressa nestes tipos de tumor (HIRANKARN *et al.*, 2004; GOODEN *et al.*, 2011). Em adenocarcinomas cervicais de pacientes infectadas pelo HPV, a alta expressão de HLA-E foi associada a uma melhor sobrevida da paciente. Os autores desse estudo sugeriram que as funções de inibição e ativação do HLA-E podem estar relacionadas ao delicado equilíbrio entre o escape de células tumorais e a imunovigilância em tumores cervicais, uma vez que há estudos que associam o aumento da expressão de HLA-E tanto com a melhoria da sobrevida em câncer colorretal e de mama, por exemplo, como com a piora da sobrevida devido a associação da superexpressão de HLA-E com a progressão tumoral (SPAANS *et al.*, 2012).

Na literatura não é possível encontrar muitos trabalhos que fazem a associação entre HLA-E e HPV. O HLA-E está fracamente expresso no epitélio cervical normal e foi demonstrado que a expressão de HLA-E aumenta gradualmente com a progressão das lesões pré-cancerígenas, sendo expresso em 56-83% dos cânceres cervicais e em 69% dos adenocarcinomas do colo do útero, e capaz de induzir a tolerância ao tumor por se ligar ao CD94/NKG2A, expresso tanto em células NK como em linfócitos T citotóxicos (FERGUSON *et al.*, 2011).

### **1.6. Conhecimento científico e assistência de enfermagem**

Com o rápido avanço tecnológico e o aumento de pesquisas baseadas em genes há uma redefinição da fisiopatologia, prevenção e tratamento de diversas doenças visando a melhoria da qualidade de vida do indivíduo (FLÓRIA-SANTOS *et al.*, 2013). Este estudo corrobora para a inserção e protagonismo da enfermagem na produção de conhecimentos e tecnologias que ofereçam importantes contribuições, buscando a excelência na prestação de cuidados. É oportuno salientar que o profissional de enfermagem representa a maior força de trabalho na equipe de saúde em todo o mundo, permanecendo o maior tempo junto ao paciente,

e possibilitando a abordagem dos aspectos biológicos, físicos, ambientais, culturais, sociais e espiritual de cada indivíduo (FLÓRIA-SANTOS; NASCIMENTO, 2006).

Diante de tais mudanças e evolução dos saberes, o enfermeiro vem ganhando espaço nas novas áreas do conhecimento e enfrentando o desafio de participar ativamente no desenvolvimento de novas tecnologias assistenciais (LEA *et al.*, 2011). Estudos como o nosso podem colaborar para o melhor entendimento do papel das moléculas HLA-E, fundamental para o desenvolvimento de estratégias assistenciais inerentes ao trabalho desenvolvido pelo enfermeiro.

***JUSTIFICATIVA***

---

## 2. JUSTIFICATIVA

Considerando que:

1. A infecção pelo HIV está associada a imunossupressão que favorece a persistência da infecção pelo HPV e a progressão das lesões intraepiteliais cervicais;

2. A molécula HLA-E, considerada imunossupressora, pode ser expressa de forma aberrante em situações patológicas, como tumores ou infecções virais;

3. Não existem estudos na literatura avaliando o papel da expressão da molécula HLA-E nas lesões intraepiteliais cervicais em mulheres portadoras do HPV com ou sem a infecção pelo HIV-1;

Este estudo pretendeu avaliar se a presença das moléculas HLA-E em mulheres infectadas pelo HIV poderia influenciar a progressão das lesões intraepiteliais cervicais.

## ***OBJETIVOS***

---

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Geral:**

Analisar a expressão das moléculas HLA-E em lesões intraepiteliais cervicais de mulheres portadoras do HPV com ou sem a infecção pelo HIV-1.

#### **3.2. Específicos:**

- 1) Caracterizar a população estudada de acordo com o perfil clínico e sociodemográfico;
- 2) Identificar, de acordo com as técnicas de biologia molecular, os genótipos do HPV em lesões intraepiteliais cervicais;
- 3) Quantificar a expressão das moléculas HLA-E nas lesões intraepiteliais cervicais;
- 4) Associar a expressão das moléculas HLA-E com os diferentes graus de lesões intraepiteliais cervicais (LSIL ou HSIL), com a presença ou não da infecção pelo HIV-1, e com os tipos de HPV.

## ***MATERIAIS E MÉTODOS***

---



## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Delineamento do estudo e definição da amostra**

Trata-se de estudo transversal, comparativo, descritivo, incluindo mulheres selecionadas no Ambulatório de Moléstias Infecciosas em Ginecologia (AMIG) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP), com seleção amostral não probabilística.

### **4.2. População de estudo**

Foram avaliadas 129 mulheres com LSIL ou HSIL atendidas no AMIG no período de janeiro de 2013 a setembro de 2015. Estas, estão divididas em dois grupos:

a) Grupo HIV positivas (HIV+): composto por 67 mulheres com LSIL ou HSIL com sorologia positiva para HIV-1;

b) Grupo HIV negativas (HIV-): composto por 62 mulheres com LSIL ou HSIL com sorologia negativa para HIV-1;

### **4.3. Critérios de inclusão**

#### a) Grupo HIV+:

- Ter idade igual ou superior a 18 anos;
- Ser soropositiva para anticorpos contra o HIV-1;
- Ter PCR positivo para HPV no conteúdo cervicovaginal;
- Apresentar diagnóstico de LSIL ou HSIL;
- Estar ou não recebendo terapia antirretroviral;
- Não estar gestante;
- Concordar em participar do estudo.

#### b) Grupo HIV-:

- Ter idade igual ou superior a 18 anos;
- Ter PCR positivo para HPV no conteúdo cervicovaginal;
- Apresentar diagnóstico de LSIL ou HSIL;

- Não estar gestante;
- Concordar em participar do estudo.

#### **4.4. Aspectos éticos**

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (EERP-USP) sob protocolo CAAE: 12703213.0.00005393 (Anexo I) e pela Comissão de Pesquisa do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) sob protocolo 55/2013 (Anexo II).

#### **4.5. Instrumento para coleta de dados**

Para coleta de dados, foi realizada uma análise do prontuário da participante, do sistema digital de armazenamento de resultado de exames realizados no HCFMRP (sistema ATHOS) e entrevista norteada por um questionário estruturado (Apêndice I). As entrevistas foram realizadas após a obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice II), em uma das salas do serviço de saúde descrito anteriormente, antes ou após a consulta médica. A análise de prontuário e do sistema ATHOS foram realizadas na sala de pesquisa do serviço de arquivo médico e em computadores disponíveis no hospital, respectivamente. Os dados coletados no prontuário e no sistema ATHOS são referentes ao grau de SIL e presença de HPV para todas as participantes, e o número de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, carga viral e antirretrovirais utilizados na terapêutica da paciente, dentre as portadoras do HIV-1.

#### **4.6. Obtenção e processamento das amostras**

##### **4.6.1. Obtenção de amostras cervicais**

Todas as participantes foram submetidas à coleta do conteúdo cervicovaginal e biópsia do colo do útero. Durante o exame especular, após a coleta e distribuição do material para avaliação oncológica na lâmina, a escova utilizada neste

procedimento foi novamente introduzida na vagina para coleta do conteúdo cervicovaginal. A escova com o material obtido foi inserida em microtubo tipo *Eppendorf* de 1,5 ml previamente identificado e contendo 1ml de solução salina. Este microtubo foi congelado em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

A biópsia do colo do útero foi realizada sob visão colposcópica utilizando o colposcópio da marca DF Vasconcellos, modelo CPM7, com aumentos de 6, 10, 16, 24 e 40 vezes. Inicialmente, foi realizada à inspeção direta do colo, vagina e vulva sob luz branca e, quando necessário, aplicação de solução fisiológica a 0,9% para retirada do excesso de conteúdo vaginal e visualização sob luz branca e filtro verde (Teste de Kraatz, 1939). A seguir, foi aplicada uma solução de ácido acético a 5% para identificação da junção escamocolunar (JEC) e zona de transformação (ZT). Para finalizar, foi aplicada uma solução de lugol a 2% (Teste de Schiller). A biópsia foi realizada utilizando a pinça de Gaylor-Medina de 3 ou 5 mm. O fragmento de colo uterino foi imediatamente fixado em formol a 10% com volume de 9 vezes o tamanho da peça e encaminhado para o Serviço de Anatomia Patologia do HCFMRP-USP (SERPAT) para recortes, inclusão em parafina, coloração com hematoxilina-eosina e armazenamento. As coletas das amostras cervicovaginais descritas foram realizadas pela equipe médica do ambulatório e fazem parte dos exames de rotina realizados durante as consultas médicas no AMIG.

#### **4.6.2. Exame anatomopatológico**

Os fragmentos do colo do útero coletados foram processados no serviço de patologia (SERPAT) e sua leitura realizada por dois patologistas independentes. O diagnóstico de lesões intraepiteliais cervicais de baixo ou alto grau foi realizado segundo os critérios baseados no sistema Bethesda (AIDÉ *et al.*, 2009; DARRAGH *et al.*, 2012; RICHART, 1990).

#### **4.6.3. Extração do DNA viral do conteúdo cérvicovaginal**

A extração do DNA foi realizada com o *kit* de extração QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen) seguindo-se as instruções do fabricante. Posteriormente, foi realizada uma PCR (*Polimerase Chain Reaction*) com *primers* complementares ao gene

endógeno GSTP1 (*Foward*: 5'ACCCCAGGGCTCTATGGGAA 3'; *Reverse*: 5'TGAGGGCACAAGAAGCCCCT 3') para verificar a eficiência da extração do DNA e após foi realizada a tipificação do HPV.

#### 4.6.4. Detecção e tipificação do HPV

##### 4.6.4.1. Amplificação do DNA viral

O DNA extraído do conteúdo cervicovaginal foi submetido a uma PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores GP5+ (5-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3) e GP6+ (5-CTTATACTAAATGTCAAATAAAAA-3), que amplificam uma seqüência de 150 pb correspondente à região L1 do genoma do HPV. As reações foram processadas em 50 µL, contendo Tampão 1X, dNTP mix (0,08 mM), MgCl<sub>2</sub> (2,5 mM), oligonucleotídeo iniciador GP5+ e GP6+ (0,5pmol), *Taq DNA Polymerase* (*Fermentas Molecular Biology Tools/Thermo Scientific*, Pittsburgh PA, USA) (5U/µL) e 5 µL do produto extraído. Em todas as reações foram utilizados dois tubos, sendo um deles o controle negativo da reação e o outro o controle positivo. No tubo controle negativo não foi inserido DNA, enquanto no segundo foi inserido DNA (Ca Ski). As reações compreenderam um passo inicial de nove minutos a 95 °C para a ativação da enzima, seguido de 40 ciclos de: 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 45 °C, que é a temperatura de anelamento do oligonucleotídeo iniciador e 30 segundos a 72 °C. Após os 40 ciclos, seguiu-se um passo final de oito minutos a 72 °C, para a extensão dos fragmentos. Os produtos das amplificações foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose 1% para a visualização das bandas, com tamanho correspondente a 150 pb.

##### 4.6.4.2. Purificação dos produtos de PCR

Os produtos de amplificação foram purificados utilizando o *kit* de purificação Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (*GE Healthcare/Life Sciences*, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, aos produtos de reação foram adicionados inicialmente 500 µL do reagente *Capture buffer type 3*. Posteriormente, essa mistura foi transferida para a

coluna de purificação, sendo submetida à centrifugação com 16000 x g por 30 segundos. Na sequência, foram adicionados 500 µL do reagente *Wash buffer type 1* à coluna, seguindo-se centrifugação a 16000 x g por 30 segundos. Para eluição, foram adicionados 25 µL de água mili-Q autoclava à coluna, seguido de incubação a temperatura ambiente por um minuto e centrifugação a 16000 x g por um minuto. Os produtos de amplificação purificados foram estocados a -20 °C.

#### 4.6.4.3. Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado segundo a técnica de Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977), utilizando-se o *kit Big Dye terminator* (Applied Biosystems/Life Technologies, Foster City, CA, USA). A reação de sequenciamento foi processada em 10,0 µL contendo: 2,0 µL de *Big Dye Terminator*, 2,0 µL de Tampão de Sequenciamento (5X), 1 µL de cada oligonucleotídeo iniciador a 10 pmol (GP5+ e GP6+) e 5,0 µL de amostra. Inicialmente as amostras foram submetidas a uma desnaturação inicial a 95 °C por 10 minutos. Em seguida, a ciclagem compreendeu 25 ciclos de 20 segundos a 95 °C, 20 segundos para anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores em temperatura de 50 °C e 1 minuto a 60 °C, para extensão das cadeias.

A precipitação dos produtos da reação de sequenciamento consistiu inicialmente, na adição de 2,0 µL EDTA 125 mM, 2,0 µL de acetato de sódio 3M e 50 µL de etanol 100%. Em seguida, uma breve agitação foi dada na placa e esta foi incubada a temperatura ambiente por 15 minutos ao abrigo da luz. Logo após, a placa foi centrifugada a 4.000 rpm por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido por inversão e a placa centrifugada invertida por 1 minuto a 1.000 rpm. Em seguida, foram adicionados 70 µL de etanol 70% às amostras, que foram centrifugadas a 4.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Novamente o sobrenadante foi desprezado por inversão da placa e esta centrifugada invertida por 1 minuto a 1.000 rpm. As amostras foram mantidas a temperatura ambiente e ao abrigo da luz por aproximadamente 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 10 µL de formamida às amostras, que foram centrifugadas por 1 minuto a 1000 rpm, desnaturadas a 95 °C por 5 minutos e imediatamente transferidas para o gelo no

qual foram mantidas por 2 minutos. As amostras foram sequenciadas em um sequenciador automático *ABI 3130 XL* (*Applied Biosystems Inc/Life Technologies*, Foster City, CA, USA).

#### **4.6.4.4. Análise das sequências**

Os eletroferogramas obtidos no sequenciamento foram analisados pelo programa de análise de qualidade de sequências *Eletroferogram Quality Analysis* disponível on-line no site do laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília - <http://www.biomol.unb.br/phph>.

As comparações quanto à identidade das sequências foram realizadas utilizando o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.

#### **4.6.5. Expressão proteica das moléculas HLA-E em tecidos do colo do útero**

A avaliação da expressão dos antígenos de histocompatibilidade (HLA-E) foi realizada utilizando-se a técnica de imunohistoquímica. As amostras do colo do útero, processadas no serviço de patologia (SERPAT), foram cortadas com 4 µm de espessura, utilizando tecido de placenta para o controle positivo. Foi utilizando o *kit* ABC da Vectastain® com Avidina e Biotina.

As lâminas foram incubadas em estufa à 60 °C por no mínimo 1 hora e posteriormente foram submetidas a banhos consecutivos em xileno, para a desparafinização. Banhos em álcool em ordem decrescente de concentração e com água destilada foram realizados para hidratação. A recuperação antigênica foi feita com solução de citrato 10 mM a um pH 6,0 em panela à vapor por 40 minutos a 96 °C. Após o resfriamento em temperatura ambiente por 30 minutos, as lâminas foram lavadas três vezes em PBS 0,01M (pH 7,6) por 5 minutos cada lavagem. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado pela incubação das lâminas em PBS, metanol e peróxido de hidrogênio por 15 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com TBST por 5 minutos, sendo então realizado o bloqueio das ligações inespecíficas com soro normal horse 2% (pH 7,4) por 30 minutos. O anticorpo HLA-

E (clone MEM-E02, EXBIO antibodies, Republica Tcheca) diluído em concentração 1/200 ficou incubado no tecido resfriado em geladeira e câmara úmida por uma noite. Após esse período, as lâminas foram lavadas em TBST por 1 minuto e incubadas no anticorpo secundário da Vectastain® na diluição 1/200 por 30 minutos, a temperatura ambiente. Os cortes foram então lavados com TBST por 1 minuto e incubados com Avidina + Biotina na diluição 1/100 por 30 minutos. Posteriormente, foram lavados com TBST por 5 minutos e a reação revelada com a aplicação de diaminobenzidina (DAB) por 3 minutos. As lâminas foram lavadas e neutralizadas com água destilada, coradas com hematoxilina de Harris por 40 segundos e lavadas com água destilada novamente, azuladas em amônia 5% e também lavadas em água destilada. A desidratação foi feita em ordem crescente de concentração de álcoois e xilol, e a montagem foi feita com Entellan (MERCK).

#### 4.6.6. Análise da Expressão do HLA-E

A avaliação imunohistoquímica da expressão da proteína foi feita por meio da análise das lâminas e conferidas posteriormente pelo patologista Prof. Dr. Alfredo Ribeiro da Silva. Os resultados foram classificados de acordo com a quantidade de células marcadas. Uma média de 10 a 400x de ampliação foi utilizado para avaliação microscópica da imunocoloração, em cada corte histológico. Para a quantificação, a expressão dos marcadores utilizados foi pontuado seguindo um sistema de classificação baseado em trabalho anterior de Xie, Clausen e Boysen (2004), como se segue: 0 para a ausência de expressão; 1 para as células positivas de 1-30%; 2 para células positivas 31-70%; e 3 para as células positivas 71-100% (Tabela 2).

Tabela 2 - Escore utilizado para classificação quantitativa dos níveis de expressão das moléculas HLA-E. Adaptado de XIE, CLAUSEN e BOYSEN, 2004

| <b>Marcação quantitativa de HLA-E</b> |   |
|---------------------------------------|---|
| Ausência de expressão                 | 0 |
| 1-30%                                 | 1 |
| 31-70%                                | 2 |
| 71-100%                               | 3 |

#### 4.7. Análise estatística

Os dados coletados foram dispostos em planilhas do *Microsoft Office Excel® 2013*, em dupla digitação e posteriormente foi realizada validação das planilhas para correção de qualquer erro. As variáveis quantitativas foram descritas em média e desvio padrão e as variáveis categóricas e porcentagem.

Para avaliar associação entre duas variáveis categóricas foi utilizado o Teste Qui-Quadrado de Pearson, ou, quando ocorreram categorias com valores de N menores que 5, o Teste Exato de Fisher. Para o cruzamento com três variáveis categóricas, foi utilizado o Teste Qui-Quadrado de Cochran-Mantel-Haenzel. Nas variáveis quantitativas foi realizado, inicialmente, o teste de Shapiro-Wilk, identificando que estas não apresentaram distribuição normal. Desta forma, testes não paramétricos foram utilizados nestas variáveis, sendo que a comparação entre dois grupos foi utilizado o Teste de Mann-Whitney e entre três grupos o Teste de Kruskal-Wallis. Os testes foram realizados utilizando o programa SPSS versão 22. O nível de significância adotado foi de 5% para todos os testes utilizados ( $p \leq 0,05$ ).

Após a verificação das associações no teste Qui-Quadrado, foi realizado a metodologia de regressão. Sendo a variável dependente do estudo a expressão do HLA-E, foi assumida que ela segue uma distribuição multinomial com parâmetros  $p_1$ ,  $p_2$  e  $p_3$ . Onde  $p_1$  é a probabilidade de classificação do HLA-E como “sem expressão”,  $p_2$  é a probabilidade de classificação do HLA-E como de 1 a 30% e  $p_3$  é a probabilidade de classificação do HLA-E como “31 a 100%”. A análise de regressão foi feita em duas partes: na primeira foram inseridas as variáveis comuns a ambos os grupos. As variáveis foram inseridas conjuntamente e a retirada das variáveis não significantes foi feita de forma individual, sempre retirando a variável com maior  $p$ -valor, e realizando um novo ajuste após a retirada. O procedimento foi refeito até que restassem apenas variáveis significantes no modelo.

Para a segunda etapa da análise de regressão foram adicionadas às variáveis significantes da primeira etapa as variáveis relacionadas ao grupo HIV. Um procedimento similar de ajuste foi feito nesta etapa, até que restassem apenas as variáveis significantes.



As variáveis independentes utilizadas nesta análise foram Grupo (HIV- e HIV+), Tabagismo (Não Fumante, Ex-fumante ou fumante irregular e Fumante), uso de Anticoncepcional Hormonal (sim ou não), Grau de Lesão Intraepitelial (Baixo ou Alto), Idade de início de vida sexual (em anos), Número de Gestações (0, 1, ...) e Risco de HPV (Baixo ou Alto).

Das variáveis relacionadas que se encontravam apenas no grupo caso (HIV) foram utilizadas Uso de Antirretroviral (Sim ou Não), e o uso de cada classe de antirretroviral (Inibidores da Protease, Inibidores Nucleosídeos da Transcriptase Reversa, Inibidores Não Nucleosídeos da Transcriptase Reversa) e o logaritmo da Carga Viral (em cópias/ml).

## ***RESULTADOS***

---

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Caracterização das participantes do estudo

Este estudo envolveu a participação de 129 mulheres que foram divididas em dois grupos, sendo 67 (51,9%) participantes do grupo HIV- e 62 (48,1%) do grupo HIV+. A média de idade das participantes  $\pm$  desvio padrão (DP) foi de 34 anos ( $\pm$  9), sendo dentre as HIV- 32 anos ( $\pm$  9) e entre as HIV+ 35 anos ( $\pm$  8). A maioria das participantes referiram serem brancas, heterossexuais e com baixa escolaridade (ensino fundamental incompleto). Dentre as HIV- a maioria exercia algum tipo de atividade remunerada e negou o tabagismo, já entre as HIV+ a maioria era do lar e 44,8% negou o tabagismo.

A distribuição detalhada das participantes segundo cor da pele, atividade ocupacional, escolaridade e orientação sexual encontra-se na Tabela 3 e a distribuição segundo estado civil, doenças sexualmente transmissíveis prévias, uso de contraceptivo hormonal e tabagismo encontra-se na Tabela 4.

Tabela 3: Distribuição das 129 participantes segundo cor da pele, atividade ocupacional, escolaridade e orientação sexual. AMIG, 2013-2015.

| Variáveis         |                               | HIV- (n=62) | HIV+ (n=67) | Total |
|-------------------|-------------------------------|-------------|-------------|-------|
|                   |                               | n (% grupo) | n (% grupo) |       |
| Raça              | Branca                        | 37 (59,7%)  | 31 (46,3%)  | 68    |
|                   | Parda                         | 17 (27,4%)  | 22 (32,8%)  | 39    |
|                   | Negra                         | 8 (12,9%)   | 14 (20,9%)  | 22    |
| Ocupação          | Remunerada                    | 34 (54,8%)  | 25 (37,3%)  | 59    |
|                   | Aposentada                    | 0 (0%)      | 5 (7,5%)    | 5     |
|                   | Do lar                        | 27 (43,6%)  | 37 (55,2%)  | 64    |
|                   | Presidiária                   | 1 (1,6%)    | 0 (0%)      | 1     |
| Escolaridade      | Ensino fundamental incompleto | 22 (35,5%)  | 26 (38,8%)  | 48    |
|                   | Ensino fundamental completo   | 8 (12,9%)   | 12 (17,9%)  | 20    |
|                   | Ensino médio incompleto       | 12 (19,4%)  | 12 (17,9%)  | 24    |
|                   | Ensino médio completo         | 17 (27,4%)  | 15 (22,4%)  | 32    |
|                   | Superior e pós-graduação      | 3 (4,8%)    | 2 (3%)      | 5     |
| Orientação Sexual | Bissexual                     | 1 (1,6%)    | 3 (4,5%)    | 4     |
|                   | Heterossexual                 | 61 (98,4%)  | 64 (95,5%)  | 125   |

Tabela 4: Distribuição das 129 participantes segundo estado civil, Doenças Sexualmente Transmissíveis (DSTs) prévias, método contraceptivo e tabagismo. AMIG, 2013-2015.

| Variáveis              |                   | HIV- (n=62) | HIV+ (n=67) | Total |
|------------------------|-------------------|-------------|-------------|-------|
|                        |                   | n (% grupo) | n (% grupo) |       |
| Estado Civil           | Casada            | 16 (25,8%)  | 14 (20,9%)  | 30    |
|                        | Solteira          | 12 (19,4%)  | 18 (26,9%)  | 30    |
|                        | Amasiada          | 8 (12,9%)   | 8 (11,9%)   | 16    |
|                        | Divorciada        | 24 (38,7%)  | 23 (34,3%)  | 47    |
|                        | Viúva             | 2 (3,2%)    | 4 (6%)      | 6     |
| Contraceptivo Hormonal | Não               | 30 (48,4%)  | 39 (58,2%)  | 69    |
|                        | Sim               | 32 (51,6%)  | 28 (41,8%)  | 60    |
| DSTs Prévias           | Condiloma         | 25 (40,3%)  | 26 (38,8%)  | 51    |
|                        | Herpes            | 1 (1,6%)    | 11 (16,4%)  | 12    |
|                        | Sífilis           | 2 (3,2%)    | 9 (13,4%)   | 11    |
|                        | Hepatite C        | 0 (0%)      | 5 (7,5%)    | 5     |
|                        | Hepatite B        | 0 (0%)      | 2 (3%)      | 2     |
| Tabagismo              | Fumante           | 18 (29%)    | 29 (43,3%)  | 47    |
|                        | Ex fumante        | 7 (11,3%)   | 6 (9%)      | 13    |
|                        | Fumante irregular | 1 (1,6%)    | 2 (3%)      | 3     |
|                        | Não fumante       | 36 (58,1%)  | 30 (44,8%)  | 66    |

Referente ao tabagismo, a média de tempo decorrido entre o início do uso de cigarros e a aplicação do questionário foi de 16 anos ( $\pm 9$ ) entre as pacientes HIV+ e de 12 anos ( $\pm 10$ ) dentre as HIV-. Já o número médio de cigarros fumados por dia foi 15 ( $\pm 11$ ) entre as HIV+ e 7 ( $\pm 12$ ) entre as HIV-. Pelo desvio padrão alto podemos observar a alta variação de cigarros fumados por dia pelas mulheres do estudo.

O número de pacientes em algumas destas categorias era reduzido e prejudicaria a análise estatística, por esse motivo, optou-se por um novo agrupamento que não interferisse no resultado final nas categorias ocupação, escolaridade, estado civil e tabagismo, como mostrado na Tabela 5. Tais variáveis não apresentaram associação estatisticamente significativa entre os grupos HIV+ e HIV-.

Tabela 5: Distribuição das 129 participantes, com as variáveis reagrupadas, segundo cor da pele, atividade ocupacional, escolaridade, estado civil e tabagismo. Ribeirão Preto-SP, 2016.

Fonte: pesquisa de campo.

| Variáveis    |  | HIV- (n=62) | HIV+ (n=67) | Total | P-value |
|--------------|--|-------------|-------------|-------|---------|
|              |  | n (% grupo) | n (% grupo) |       |         |
| Raça         | Branca   | 37 (59,7%)  | 31 (46,3%)  | 68    | 0,27*   |
|              | Parda  | 17 (27,4%)  | 22 (32,8%)  | 39    |         |
|              | Negra  | 8 (12,9%)   | 14 (20,9%)  | 22    |         |
| Ocupação     | Com remuneração                                | 34 (53,1%)  | 30 (46,9%)  | 64    | 0,215*  |
|              | Sem remuneração                                | 28 (43,1%)  | 37 (56,9%)  | 65    |         |
| Escolaridade | Ensino fundamental incompleto                  | 22 (45,8%)  | 26 (54,2%)  | 48    | 0,688*  |
|              | Ensino fundamental completo + médio incompleto | 20 (45,5%)  | 24 (54,5%)  | 44    |         |
|              | Ensino médio completo ou superior              | 20 (54,1%)  | 17 (45,9%)  | 37    |         |
| Estado Civil | Com companheiro                                | 24 (52,2%)  | 22 (47,8%)  | 46    | 0,487*  |
|              | Sem companheiro                                | 38 (45,8%)  | 45 (54,2%)  | 83    |         |
| Tabagismo    | Fumante  | 18 (38,3%)  | 29 (61,7%)  | 47    | 0,231*  |
|              | Ex fumante                                     | 8 (50%)     | 8 (50%)     | 16    |         |
|              | Não fumante                                    | 36 (54,5%)  | 30 (45,5%)  | 66    |         |

\* Teste de associação Qui-Quadrado de Pearson.

A Tabela 6 mostra os valores de  $P$  para as variáveis contraceptivos hormonais e DSTs prévias. Após teste estatístico de associação, foi encontrado significância apenas para a presença prévia de Herpes no grupo HIV+ ( $P= 0,005$ ), as demais variáveis não apresentaram associação estatisticamente significativa entre os grupos.

Tabela 6: Distribuição das 129 participantes segundo uso de contraceptivos hormonais e DSTs prévias. Ribeirão Preto-SP, 2016. Fonte: pesquisa de campo.

| Variáveis              |            | HIV- (n=62) | HIV+ (n=67) | Total | P-value |
|------------------------|------------|-------------|-------------|-------|---------|
|                        |            | n (% grupo) | n (% grupo) |       |         |
| Contraceptivo Hormonal | Não        | 30 (48,4%)  | 39 (58,2%)  | 69    | 0,264*  |
|                        | Sim        | 32 (51,6%)  | 28 (41,8%)  | 60    |         |
| DSTs Prévias           | Condiloma  | 25 (49%)    | 26 (51%)    | 51    | 0,86*   |
|                        | Herpes     | 1 (8,3%)    | 11 (91,7%)  | 12    | 0,005** |
|                        | Sífilis    | 2 (18,8%)   | 9 (81,8%)   | 11    | 0,056** |
|                        | Hepatite C | 0 (0%)      | 5 (100%)    | 5     | 0,059** |
|                        | Hepatite B | 0 (0%)      | 2 (100%)    | 2     | 0,497** |

\* Teste de associação Qui-Quadrado de Pearson. \*\* Teste exato de Fisher.

Algumas das variáveis numéricas relacionadas aos antecedentes ginecológicos e obstétricos como a idade das participantes na menarca, na primeira relação sexual, na primeira gestação e o número de gestações estão expostas na Tabela 7. Tais variáveis se mostraram semelhantes em ambos os grupos e não foram consideradas estatisticamente significantes após teste não paramétrico.

Tabela 7: Distribuição das 129 participantes segundo idade na menarca, idade na primeira relação sexual, idade na primeira gestação e número de gestações. Ribeirão Preto-SP, 2016. Fonte: pesquisa de campo.

| Variáveis                            | HIV- (n=62) | HIV+ (n=67) | P-value |
|--------------------------------------|-------------|-------------|---------|
|                                      | Média ± DP  | Média ± DP  |         |
| <b>Idade Menarca</b>                 | 13 ± 1,8    | 13 ± 1,6    |         |
| <b>Idade Primeira Relação Sexual</b> | 15 ± 2,64   | 15 ± 2,69   | 0,609*  |
| <b>Idade Primeira Gestação</b>       | 17,5 ± 4,45 | 19 ± 4,65   |         |
| <b>Número de gestações</b>           | 3 ± 1,95    | 2 ± 1,67    | 0,354*  |

\* Teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Todas as participantes deste estudo foram diagnosticadas com lesões intraepiteliais cervicais classificadas em LSIL e HSIL e com infecção pelo HPV confirmada por meio de PCR positivo para o vírus. Entretanto só foi possível tipificar o HPV em 77 amostras de conteúdo cervicavaginal (59,7% do total de amostras). Dentre as amostras tipificadas, 59 são HPV de alto risco e apenas 6 são HPV de baixo risco. Os tipos de lesões cervicais, tipo e genótipos mais frequentes de HPV estão dispostos na Tabela 8.

No total, identificamos a presença de 20 diferentes genótipos de HPV e sua distribuição foi diferente entre os dois grupos estudados. No grupo HIV-, a frequência dos HPV, em ordem decrescente, foi: HPV 16 (17 casos), 31, 33, 58 e 90 (3 casos cada), 45 (2 casos), 18, 51, 56, 59, 67 e 85 (1 caso cada). No grupo HIV+, a sequência decrescente foi: HPV 16 (8 casos), 35 (6 casos), 18, 66 e 99 (4 casos), 70 (3 casos), 52 e 102 (2 casos cada), 31, 42, 56, 59, 67 e 69 (1 caso cada). Embora em ambos os grupos o HPV16 tenha sido o mais encontrado, no grupo

HIV+ há uma maior distribuição entre os diferentes genótipos de HPV em comparação ao grupo HIV-, no qual 56,7% das amostras possuem o HPV 16.

Após teste estatístico, não foi encontrada associação significativa entre o grau de lesão cervical e o tipo de HPV com os grupos HIV+ e HIV-. Também foi realizado testes estatísticos cruzando as variáveis tabagismo, anticoncepcional hormonal, risco do HPV, e DSTs prévias com a variável lesões intraepiteliais a fim de encontrar possível associação entre as mesmas, porém não foram encontradas associações significantes.

Tabela 8: Distribuição das 129 participantes segundo grau de lesão intraepitelial cervical e infecção pelo papilomavirus humano. Ribeirão Preto-SP, 2016. Fonte: pesquisa de campo.

| Variáveis                             |                    | HIV-        | HIV+        | Total     | P-value |
|---------------------------------------|--------------------|-------------|-------------|-----------|---------|
|                                       |                    | n (% grupo) | n (% grupo) |           |         |
| <b>Risco HPV (n=77)</b>               | HPV de baixo risco | 2 (5,3%)    | 4 (10,3%)   | <b>6</b>  | 0,413*  |
|                                       | HPV de alto risco  | 32 (84,2%)  | 27 (69,2%)  | <b>59</b> |         |
|                                       | Não classificável  | 4 (10,5%)   | 8 (20,5%)   | <b>12</b> |         |
| <b>Lesões Intraepiteliais (n=129)</b> | Baixo grau (LSIL)  | 26 (41,9%)  | 34 (50,8%)  | <b>60</b> | 0,316** |
|                                       | Alto grau (HSIL)   | 36 (58,1%)  | 33 (49,3%)  | <b>69</b> |         |
| <b>HPVs mais Frequentes (n=77)</b>    | 16                 | 17 (56,7)   | 8 (26,7)    | <b>25</b> |         |
|                                       | 90                 | 3 (10)      | 4 (13,3)    | <b>7</b>  |         |
|                                       | 35                 | 0           | 6 (20)      | <b>6</b>  |         |
|                                       | 18                 | 1 (3,3)     | 4 (13,3)    | <b>5</b>  |         |
|                                       | 31                 | 3 (10)      | 1 (3,4)     | <b>4</b>  |         |
|                                       | 66                 | 0           | 4 (13,3)    | <b>4</b>  |         |
|                                       | 33                 | 3 (10)      | 0           | <b>3</b>  |         |
|                                       | 70                 | 0           | 3 (10)      | <b>3</b>  |         |
| 58                                    | 3 (10)             | 0           | <b>3</b>    |           |         |

\* Teste exato de Fisher. \*\* Teste de associação Qui-Quadrado de Pearson.

Levando em consideração os tipos de lesões intraepiteliais cervicais (LSIL e HSIL), foram feitas análises estatísticas cruzando as variáveis tabagismo, uso de anticoncepcional hormonal, risco do HPV e a presença de DSTs para avaliação dos principais fatores de risco no desenvolvimento e na evolução dessas lesões encontrados na literatura. Após o teste, não foram encontradas associações

estatísticas significantes entre estas variáveis, e tais dados podem ser observados na Tabela 9.

Tabela 9: Distribuição das participantes do estudo segundo grau de lesão cervical com seus principais fatores de risco. Ribeirão Preto-SP, 2016. Fonte: pesquisa de campo.

| Variáveis                |                    | Grau de Lesão Intraepitelial |                  | Total | P-value |
|--------------------------|--------------------|------------------------------|------------------|-------|---------|
|                          |                    | Baixo grau (LSIL)            | Alto grau (HSIL) |       |         |
| Tabagismo                | Fumante            | 18 (38,3%)                   | 29 (61,7%)       | 47    | 0,221*  |
|                          | Ex fumante         | 10 (62,5%)                   | 6 (37,5%)        | 16    |         |
|                          | Não fumante        | 32 (48,5)                    | 34 (51,5%)       | 66    |         |
| Contraceptivo Hormonal   | Não                | 30 (43,5%)                   | 39 (56,5%)       | 69    | 0,459*  |
|                          | Sim                | 30 (50%)                     | 30 (50%)         | 60    |         |
| Risco HPV (n=77)         | HPV de baixo risco | 4 (66,7%)                    | 2 (33,3%)        | 6     | 0,224** |
|                          | HPV de alto risco  | 23 (39%)                     | 36 (61%)         | 59    |         |
| Presença de DSTs Prévias | Condiloma          | 28 (54,9%)                   | 23 (45,1%)       | 51    | 0,122*  |
|                          | Herpes             | 6 (50%)                      | 6 (50%)          | 12    | 0,799*  |
|                          | Sífilis            | 6 (54,5%)                    | 5 (45,5)         | 11    | 0,576*  |
|                          | Hepatite C         | 0,00                         | 5 (100%)         | 5     | 0,061** |
|                          | Hepatite B         | 1 (50%)                      | 1 (50%)          | 2     | 1,000** |

\*Teste de associação Qui-Quadrado de Pearson. \*\*Teste exato de Fisher.

## 5.2. Características das mulheres infectadas pelo HIV

No grupo composto por pacientes HIV+, algumas variáveis clínicas foram avaliadas. Dentre estas participantes, o tempo médio entre o diagnóstico da infecção pelo HIV e o desenvolvimento da lesão intraepitelial cervical avaliada neste estudo foi de 9 anos ( $\pm 5$ ), a média da contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> foi de 317 cél/mm<sup>3</sup> ( $\pm 316,7$ ), sendo que apresentou uma variação entre 9 e 1181 cél/mm<sup>3</sup>. A carga viral variou de indetectável, sendo menor que 50 cópias/ml, até 70.981 cópias/ml, sendo 31 participantes (46,3%) indetectável e 36 (53,7%) detectável (> 50 cópias/ml).

Referente ao uso de antirretrovirais, 32,8% não estavam fazendo uso, ou faziam uso irregular, no momento do diagnóstico da lesão intraepitelial cervical e, dentre as 67,2% das participantes em uso da medicação, todas faziam uso de um ou mais medicamentos da classe dos inibidores da transcriptase reversa análogo de nucleosídeos. Tal classe foi a mais frequente, seguida por inibidores da protease, inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos e por último, com



apenas uma das participantes fazendo uso, encontra-se os inibidores da integrase. Em nossa amostra, não havia participante em uso de inibidores da fusão.

A distribuição das 67 pacientes HIV+ segundo carga viral, contagem de linfócitos CD4+ e antirretrovirais em uso encontra-se disposta na Tabela 10.

Tabela 10: Distribuição das 53 participantes do grupo HIV+, segundo carga viral, contagem de linfócitos T CD4+ e classe de antirretrovirais em uso. Ribeirão Preto-SP, 2016. Fonte: pesquisa de campo.

| Variáveis               |   | HIV+ (n=67) |
|-------------------------|---|-------------|
|                         |   | n (% grupo) |
| Contagem de TCD4 (n=64) | < 200 mm <sup>3</sup>                     | 22 (34,4%)  |
|                         | 200 mm <sup>3</sup> - 500 mm <sup>3</sup> | 18 (28,1%)  |
|                         | > 500 mm <sup>3</sup>                     | 24 (37,5%)  |
| Uso ARV                 | II*                                       | 1 (1,5%)    |
|                         | IP**                                      | 29 (43,3%)  |
|                         | INTR***                                   | 51 (76,1%)  |
|                         | INNTR****                                 | 19 (28,4%)  |
|                         | Não faz uso                               | 22 (32,8%)  |
| Carga Viral             | Indetectável (< 50 cópias/ml)             | 31 (46,3%)  |
|                         | Detectável (> 50 cópias/ml)               | 36 (53,7%)  |

\*Inibidores da Integrase. \*\*Inibidores da protease. \*\*\*Inibidores da transcriptase reversa. \*\*\*\*Inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos.

Para as participantes do grupo HIV+, também foi realizado o cruzamento das variáveis clínicas e tratamento da doença com o grau de lesão cervical. Após o teste de associação entre o grau de lesão cervical e as variáveis acima citadas, não foram encontradas associações estatísticas significantes entre as variáveis carga viral, número de linfócitos CD4+ e o uso de antirretroviral com o grau de lesão intraepitelial. Tal distribuição encontra-se na Tabela 11.

Tabela 11: Distribuição dos cruzamentos entre grau de lesão cervical com carga viral, contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e uso de antirretrovirais entre as 67 participantes do grupo HIV+. Ribeirão Preto-SP, 2016. Fonte: pesquisa de campo.

| Variáveis                |   | Lesão Intraepitelial |                  | Total | P- value |
|--------------------------|---|----------------------|------------------|-------|----------|
|                          |   | Baixo grau (LSIL)    | Alto grau (HSIL) |       |          |
| Contagem de T-CD4 (n=64) | < 200 mm <sup>3</sup>                     | 10 (45,5%)           | 12 (54,5%)       | 22    | 0,604*   |
|                          | 200 mm <sup>3</sup> - 500 mm <sup>3</sup> | 11 (61,1%)           | 7 (38,9%)        | 18    |          |
|                          | > 500 mm <sup>3</sup>                     | 12 (50%)             | 12 (50%)         | 24    |          |
| Uso ARV                  | Sim                                       | 23 (51,1%)           | 22 (48,9%)       | 45    | 0,932*   |
|                          | Não                                       | 11 (50%)             | 11 (50%)         | 22    |          |
| Carga Viral              | Indetectável (< 50 cópias/ml)             | 17 (54,8%)           | 14 (45,2%)       | 31    | 0,189**  |
|                          | Detectável (> 50 cópias/ml)               | 17 (47,2%)           | 19 (52,7%)       | 36    |          |

\*Teste de associação Qui-Quadrado de Pearson. \*\*Teste não paramétrico de Mann-Whitney.

### 5.3. Expressão do HLA-E em tecido cervical

Foram submetidas à reação de imunohistoquímica fragmentos de tecido do colo do útero de 129 mulheres, sendo que destas 67 pertencem ao grupo HIV+ e 62 ao grupo HIV-. Destas biópsias analisadas 6, devido ao tamanho reduzido da biópsia, não foi possível realizar a técnica. Desta forma, 62 lâminas analisadas eram de pacientes HIV+ e 61 lâminas de pacientes HIV-.

É importante ressaltar que tais biópsias submetidas à análise foram classificadas quantitativamente considerando o nível de expressão das moléculas HLA-E presente nas lesões cervicais das participantes do estudo a partir dos diferentes escores de marcação como mostrado anteriormente.

Considerando esse aspecto, a classificação quantitativa da expressão da molécula baseou-se na porcentagem das células do colo do útero que estavam marcadas nas biópsias. Essa porcentagem foi calculada de forma subjetiva e confirmada pelo patologista Prof. Dr. Alfredo Ribeiro da Silva. A classificação utilizada pode ser observada na Figura 9.

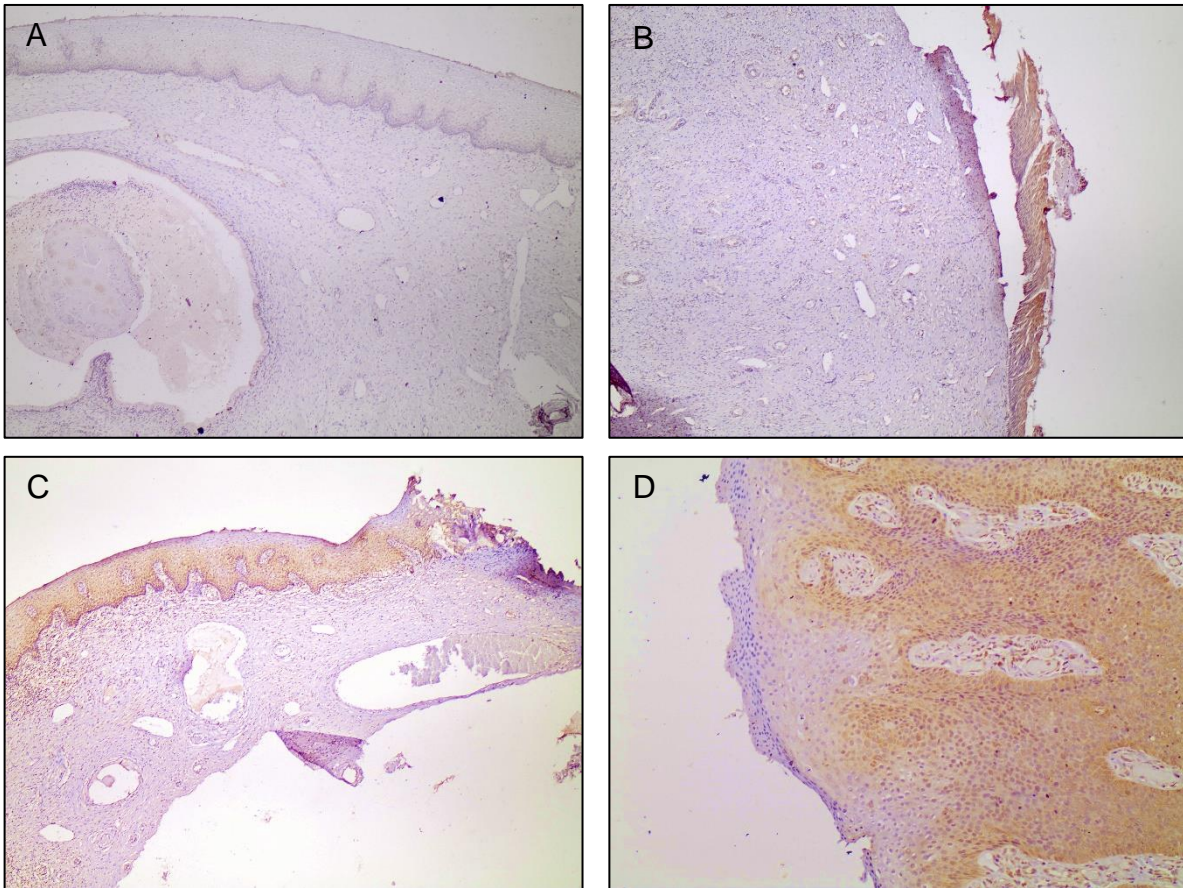


Figura 9 – Classificação da marcação da molécula HLA-E. A reação de imunohistoquímica do HLA-E foi realizada com o anticorpo MEM-E/02. De acordo com o escore utilizado, pode-se observar ausência de expressão (A); de 1% a 30% (B); de 31% a 70% (C); de 71% a 100% (D). Ribeirão Preto-SP, 2016. Fonte: pesquisa de campo.

Os níveis de expressão das moléculas HLA-E foram categorizadas, inicialmente, em quatro, entretanto o número de pacientes distribuídos nas duas últimas categorias foi baixo, prejudicando a análise estatística. Por esse motivo, optou-se por um novo agrupamento de escores unificando as categorias 31%-70% e 71%-100% em uma só.

Considerando os grupos individualmente, observamos que no grupo HIV+ há um maior número de pacientes sem expressão das moléculas de HLA-E e um número muito reduzido nas categorias de alta expressão, enquanto que se observarmos o grupo HIV- a expressão da molécula se mostra equilibrada entre as categorias sem expressão e de 1% a 30%. Quando comparamos os grupos entre si, fica evidente a diferença entre as variáveis, tendo 66 biópsias sem expressão,

sendo 41 (62,1%) pertencentes ao grupo HIV+ e 25 (37,9%) ao grupo HIV -. Na marcação de 1%-30% tem-se um total de 44 biópsias, sendo 20 (45,5%) pertencentes ao grupo HIV+ e 24 (54,5%) ao grupo HIV-. Para biópsias que marcaram de 31% a 100% (alta expressão) temos uma diferença significativa ( $P=0,001$ ) sendo 1 (7,7%) pertencente ao grupo HIV+ e 12 (92,3%) ao grupo HIV-, Tais dados podem ser observados na Tabela 12.

O risco de HPV, o grau de lesão intraepitelial, o tabagismo e o uso de anticoncepcional hormonal também foi analisado de acordo com os níveis de expressão de HLA-E, independente do grupo ao qual as mulheres pertenciam, e não mostrou diferenças significantes, podendo ser observados também na Tabela 12. Para a variável número de gestações foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, por ser uma variável numérica, de acordo com os níveis de expressão de HLA-E e também não foi encontrado diferenças significantes ( $P=0,419$ ).

Para o grupo de mulheres com HIV+ foram realizadas associações com as variáveis contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Tabela 13) e a quantificação de carga viral (Teste de Kruskal-Wallis  $P=0,849$ ), e para ambas não foram encontradas associações significantes.

Tabela 12: Distribuição das 123 participantes segundo níveis de expressão das moléculas HLA-E. Ribeirão Preto-SP, 2016. Fonte: pesquisa de campo.

| Variáveis                 |             | Expressão HLA-E |            |            |       | P- value |
|---------------------------|-------------|-----------------|------------|------------|-------|----------|
|                           |             | sem expressão   | 1% - 30%   | 31% - 100% | Total |          |
| HIV                       | HIV+        | 41 (66,1%)      | 20 (32,3%) | 1 (1,6%)   | 62    | 0,001*   |
|                           | HIV-        | 25 (41%)        | 24 (39,3%) | 12 (19,7%) | 61    |          |
| Risco HPV                 | LR - HPV    | 4 (66,7%)       | 2 (33,3%)  | 0 (0%)     | 6     | 0,608*   |
|                           | HR - HPV    | 31 (54,4%)      | 18 (31,6%) | 8 (14%)    | 57    |          |
| Lesão intraepitelial      | LSIL        | 33 (57,9%)      | 17 (29,8%) | 7 (12,3%)  | 57    | 0,427*   |
|                           | HSIL        | 33 (50%)        | 27 (40,9%) | 6 (9,1%)   | 66    |          |
| Tabagismo                 | Fumante     | 23 (53,5%)      | 14 (32,6%) | 6 (14%)    | 43    | 0,239*   |
|                           | Ex fumante  | 6 (40%)         | 9 (60%)    | 0 (0%)     | 15    |          |
|                           | Não fumante | 37 (56,9%)      | 21 (32,3%) | 7 (10,8%)  | 65    |          |
| Anticoncepcional hormonal | Não         | 34 (53,1%)      | 27 (42,2%) | 3 (4,7%)   | 64    | 0,052*   |
|                           | Sim         | 32 (54,2%)      | 17 (28,8%) | 10 (16,9%) | 59    |          |

\*Teste de associação Qui-Quadrado de Pearson.

Tabela 13: Distribuição da expressão das moléculas HLA-E de acordo com a variável número de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Ribeirão Preto-SP, 2016. Fonte: pesquisa de campo.

| Variável          |   | Expressão de HLA-E |           |           | Total     | P-value |
|-------------------|---|--------------------|-----------|-----------|-----------|---------|
|                   |   | sem expressão      | 1%- 30%   | 31%- 100% |           |         |
| Contagem de T-CD4 | < 200 mm <sup>3</sup>                     | 12 (54,5%)         | 9 (40,9%) | 1 (4,5%)  | <b>22</b> | 0,314*  |
|                   | 200 mm <sup>3</sup> - 500 mm <sup>3</sup> | 12 (75%)           | 4 (25%)   | 0         | <b>16</b> |         |
|                   | > 500 mm <sup>3</sup>                     | 17 (81%)           | 4 (19%)   | 0         | <b>21</b> |         |

\*Teste de associação Qui-Quadrado de Pearson.

Explorando um pouco mais os resultados, de acordo com os dados obtidos, foi feita nova análise estatística comparando o grupo HIV- com o grupo HIV+, com os diferentes níveis de expressão de HLA-E, uma vez que foi encontrado diferença significativa entre os grupos quando feito o teste associação Qui-Quadrado de Pearson ( $P= 0,001$ ). Os resultados mostraram que a expressão das moléculas HLA-E estava significativamente mais discrepante entre os grupos com expressão de 31% a 100%. Assim, quem pertence ao grupo HIV+ tem 0,05 vezes mais chances de apresentar a expressão de HLA-E entre 31 a 100% quando comparado ao grupo HIV- (Tabela 14), ou seja, invertendo as equações temos que o grupo de mulheres sem a infecção pelo HIV tem 20 vezes mais chances de expressar HLA-E entre 31 a 100% quando comparado ao grupo HIV+. Os valores de odds ratio são indicativos do quanto a variável HIV influencia na expressão das moléculas HLA-E.

Tabela 14: Comparação da expressão das moléculas HLA-E, de acordo com os diferentes escores e com os grupos estudados. Ribeirão Preto-SP. Fonte: pesquisa de campo.

| Variável                            | Odds Ratio | IC 95%        | P- value |
|-------------------------------------|------------|---------------|----------|
| HIV- vs HIV+ (expressão "1 a 30%)   | 0,5081     | 0,2343 1,1021 | 0,0866   |
| HIV- vs HIV+ (expressão "31 a 100%) | 0,0508     | 0,0062 0,4145 | 0,0054   |

Método logístico de regressão.

Nos casos que o valor 1 está englobado no intervalo de confiança (IC 95%), indica que não houve associação estatística significativa entre as variáveis. Fazendo análise de regressão dos níveis de expressão do HLA-E de 1 a 30% de de 31 a

100%, entre os grupos HIV- e HIV+, com as variáveis tabagismo, uso de anticoncepcional hormonal, lesão intraepitelial, início da vida sexual e o número de gestações não foram encontradas associações significantes (o valor 1 estava incluído nos intervalos de confiança), como já havia sido demonstrado no teste Qui-quadrado, indicando que não houve associação entre a infecção pelo HIV+ e estas variáveis e que, portanto, não interferem na expressão de HLA-E.

Para as variáveis exclusivas do grupo HIV+, foi feita análise de regressão quanto a carga viral, uso de antirretrovirais e as classes destes medicamentos, e as classes de expressão de HLA-E. Foi realizado esta análise para identificar o quanto a carga viral e a terapia antirretroviral utilizada poderia influenciar na intensidade da expressão de HLA-E, porém, também não foi encontrada associação significativa entre elas, uma vez que também não foi encontrada associação anterior com teste Qui-quadrado.

## ***DISCUSSÃO***

---

## 6. DISCUSSÃO

Mulheres que vivem com HIV/AIDS apresentam infecções persistentes pelo HPV e resulta em risco aumentado para o desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais. Ademais, o histórico de outras DSTs, o comportamento sexual, o número de gestações, o tabagismo, uso de anticoncepcional hormonal e fatores imunogenéticos também estão sendo considerados como importantes no desenvolvimento e progressão dessas lesões (CLIFFORD *et al.*, 2006; BRASIL, 2013; IMAI *et al.*, 2015; CHELIMO *et al.*, 2013; ROURA *et al.*, 2016; CATARINO *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2014).

Este estudo avaliou pela primeira vez a expressão da molécula HLA-E em lesões intraepiteliais cervicais de mulheres apresentando ou não a infecção pelo HIV-1.

Todas mulheres apresentavam lesões intraepiteliais cervicais com a presença da infecção pelo HPV; a média de idade das participantes foi de 34 anos, estando em conformidade com o que é visto literatura, visto que o maior número de casos de HPV é encontrada na população de mulheres jovens com menos de 30 anos; e a faixa etária de maior número de casos de câncer cervical encontra-se entre 40 e 60 anos (SMITH *et al.*, 2008; CARVALHO; QUEIROZ, 2011).

Referente a cor da pele, 52,7% das participantes eram brancas, mostrando-se em consonância com a população brasileira, uma vez que o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), mostrou que a população brasileira em 2011 era composta por, aproximadamente, 47% de indivíduos brancos, seguidos por 52% de pardos e negros. No entanto, a característica cor da pele não vem sendo apresentada como um fator de risco para o desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais (BRASIL, 2011; GAMBERINI *et al.*, 2008).

De acordo com a escolaridade, 52,7% das participantes possuíam 8 anos ou menos de estudo, e apenas 3,9% estavam cursando ou concluíram o ensino superior. As participantes que não exerciam atividade remunerada ou recebiam aposentadoria somavam 54,3%. Estas duas características juntas (escolaridade e ocupação profissional) vem sendo associadas a infecção pelo HIV e a evolução de lesões intraepiteliais cervicais. Carvalho e Queiroz (2011) descreveram o perfil



socioeconômico de mulheres com lesões precursoras do câncer cervical e observaram em uma população de 120 mulheres que 76,7% apresentavam HSIL, e que 70% das participantes possuíam 8 anos ou menos de estudo. Nesse mesmo estudo observou-se que 43% das mulheres não exerciam atividade remunerada. As autoras sugerem que a baixa renda e a baixa escolaridade possam influenciar na compreensão da doença, e assim resultar em atitudes de proteção ou não da doença (CARVALHO; QUEIROZ, 2011).

O comportamento sexual feminino está associado com o risco de infecção pelo HPV e conseqüentemente ao desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais. Relacionamentos casuais e idade precoce na primeira relação sexual estão associados ao aumento da prevalência e persistência da infecção pelo HPV, pois estes dois fatores levam a um maior número de parceiro sexuais aumentando o risco de exposição ao vírus. Essa relação pôde ser observada em um estudo com 12.076 mulheres que mostrou que não ter parceiro sexual fixo e ter tido 5 ou mais parceiros sexuais aumentavam o risco para infecção por HPV de alto risco. A imaturidade do colo uterino também pode aumentar a vulnerabilidade, o que facilita as infecções cervicais (SCHEURER; TORTOLERO-LUNA; ADLER-STORTHZ, 2005; SARIAN *et al.*, 2009; CIRINO; NICHATA; BORGES, 2010).

O número de gestações também vem sendo apontado como um possível risco para a infecção pelo HPV e o aparecimento de lesões cervicais, isso pode ocorrer devido as alterações que o colo do útero sofre na gestação que facilitariam a infecção viral. Há estudos que apontam a existência de risco aumentado para câncer cervical em mulheres com 7 ou mais gestações, porém outros mostram que uma gestação pode ser suficiente para aumentar o risco de infecção pelo HPV (ALMONTE *et al.*, 2008; SARIAN *et al.*, 2009).

Em nosso estudo, 64,3% das participantes não tinham companheiro fixo (solteiras, viúvas, divorciadas) e a média de gestações nos grupos HIV- e HIV+ foi 3 e 2, respectivamente. A média de idade da primeira relação sexual foi de 15 anos para ambos grupos (HIV-  $\pm 2,64$  e HIV+  $\pm 2,69$ ). Apesar disso, não foram encontradas diferenças nas distribuições entre variáveis acima discutidas e os dois grupos abordados, com a infecção pelos tipos de HPV ou com desenvolvimento de lesões

intraepiteliais cervicais. Embora estas variáveis venham sendo consideradas fatores de risco, há pesquisas que, assim como nosso estudo, não encontram associação significativa. Um grande estudo feito com 1.183 mulheres não encontrou correlação entre início precoce da vida sexual e o risco de infecção pelo HPV (UMAI *et al.*, 2015).

Há um outro estudo que também não relacionou o número de gestações e a infecção pelo HPV. Stense e colaboradores (2015), após estudar 40 mil mulheres, com média de idade de 30 anos, não encontrou associação com o número de gestações e risco para persistência da infecção pelo HPV com consequente desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais (STENSE *et al.*, 2015).

O uso de anticoncepcional hormonal combinado, composto por estrógeno e progesterona, vem sendo exposto na literatura como um dos fatores de risco para infecção pelo HPV. Estes hormônios esteróides podem contribuir para a ocorrência de infecção persistente pelo HPV por meio da ligação principalmente da progesterona e de receptores de glicocorticóides à LCR do HPV, levando ao aumento da expressão dos oncogenes E6 e E7 do vírus (KWASNIEWSKA *et al.*, 2011), e aumentando a atividade transformadora de E6 e E7 resultando em uma diminuição da resposta imunológica do hospedeiro e na regressão das lesões cervicais (MARKS *et al.*, 2011; PINTO; TÚLIO; CRUZ, 2002).

Em nossa amostra, 46,5% das mulheres faziam uso de anticoncepcional hormonal, sendo 51,6% das mulheres HIV- e 41,8% das HIV+, sendo 50% com LSIL e 50% com HSIL, e assim não encontramos associação entre o uso de anticoncepcional hormonal com a progressão das lesões. Alguns estudos encontraram associação significativa entre o uso de anticoncepcionais hormonais combinados com o aumento da prevalência e persistência da infecção pelo HPV, aumentando as chances de desenvolver HSIL em mulheres infectadas pelo HIV, bem como riscos aumentados de desenvolvimento de câncer cervical com o uso prolongado de anticoncepcionais (MARKS *et al.*, 2011; STENSE *et al.*, 2015; LESLIE *et al.*, 2014). Porém, um outro estudo feito com 3.390 mulheres também não encontrou relação significativa entre o uso de anticoncepcional hormonal com a infecção pelo HPV (SILVA *et al.*, 2014).

Com relação ao consumo de tabaco, já é bem relacionado o risco do seu uso com diversas doenças, pois as substâncias cancerígenas contidas, principalmente nicotina e a cotidina, podem interferir na proliferação celular. Quando o DNA das células epiteliais cervicais fica expostas por longos períodos de tempo às substâncias contidas no tabaco, pode ocorrer a inibição da apoptose e redução do número de células de Langerhans no tecido cervical, importantes na apresentação de antígenos, além da imunossupressão local devido a redução de linfócitos T CD4+, aumentando a susceptibilidade às infecções (PINTO; TÚLIO; CRUZ, 2002).

Na literatura é possível encontrar que o tabagismo aumenta os riscos de infecção pelo HPV (MATSUMOTO *et al.*, 2010) e por HPV de alto risco (IMAI *et al.*, 2015). A prevalência da infecção aumenta 4 vezes entre as fumantes quando comparadas com mulheres que nunca fumaram (IMAI *et al.*, 2015), e ainda que o tabagismo aumenta os riscos para persistência da infecção pelo HPV (MATSUMOTO *et al.*, 2010).

No presente estudo, 62,3% das mulheres referiram ser tabagistas, ex tabagistas ou tabagistas irregulares, somando 41,9% do grupo HIV- e 55,3% das HIV+; e dentre estas, 44,4% apresentavam LSIL e 55,5% HSIL. Embora seja claro na literatura a ocorrência de associação entre HPV e lesões intraepiteliais cervicais com o hábito do tabagismo, e nossos resultados apresentarem um aumento de casos de HSIL dentre as fumantes, não encontramos associação estatisticamente significativa entre estas variáveis.

O histórico de infecção por algum tipo de DST também é um fator de risco para o desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais. Um estudo recente, 40.000 mulheres foram seguidas por 4 anos, concluiu que o condiloma acuminado aumenta a persistência da infecção pelo HPV (STENSE *et al.*, 2015). Outros estudos mostraram que o histórico de infecção por clamídia aumentou a prevalência pelo HPV e o risco de infecção por mais de um genótipo do vírus (UMAI *et al.*, 2015; SMITH *et al.*, 2014). A infecção por herpes vírus pode causar transformações celulares em células infectadas por HPV, e pode aumentar o risco de câncer cervical (SMITH *et al.*, 2002).

Em nosso estudo, 81 (62,8%) participantes informaram a ocorrência de DSTs prévias. Destas participantes, o grupo HIV+ apresentou maior número (65,4%), estando de acordo com um estudo realizado no Brasil (SANTOS *et al.*, 2009). Dentre as DST, o herpes apresentou diferença estatisticamente significativa ( $P=0,005$ ) encontrado em 91,7% das mulheres do grupo HIV+, estando de acordo com um estudo recente que mostrou que mulheres infectadas pelo HIV são significativamente mais propensas a serem infectadas com clamídia, gonorréia e herpes vírus quando comparadas com mulheres não infectadas pelo HIV (GALLAGHER *et al.*, 2016).

A prevalência da infecção pelo HPV e de seus diversos genótipos variam de acordo com a população estudada. Dentre as mulheres com câncer cervical invasivo, a prevalência do HPV é de aproximadamente 91% (MUÑOZ *et al.*, 2003), sendo o HPV16 responsável por 61% dos casos e o HPV18 por 10% (SANJOSE *et al.*, 2010) entre as mulheres com HSIL (IMAI *et al.*, 2015; JEMAL *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2014; MARKS *et al.* 2015; VINODHINI *et al.*, 2012).

Em nosso estudo selecionamos apenas participantes com resultado positivo para infecção pelo HPV, e identificamos que 76,6% da nossa amostra possuíam infecção por HPV de alto risco, 7,8% por HPV de baixo risco e 15,6% por HPV não classificáveis. Estando assim, de acordo com o encontrado na literatura que revela que os HPV de baixo risco estão associados com lesões condilomatosas diferentemente dos HPV de alto risco que estão fortemente associados com a ocorrência e desenvolvimento de lesões precursoras do câncer de colo uterino (NOWAKOWSKI *et al.*, 2014). Ressaltamos que não foi possível realizar com sucesso a genotipagem de todas as amostras coletadas, mas de apenas 59,7% destas.

Com relação a frequência de ocorrência dos diversos genótipos de HPV, encontramos diferenças em sua distribuição entre os dois grupos estudados. Dentre as mulheres HIV- a frequência dos HPV, em ordem decrescente, foi: HPV 16 (44,7% dos casos), 31, 33, 58 e 90 (7,9% cada genótipo), 45 (7,9% cada), 6, 18, 51, 56, 59, 67, 85 (2,63% cada). No grupo HIV+, a sequência decrescente foi: HPV 16 (20,5% dos casos), 35 (15,4% dos casos), 18, 66, 90 (10,2% cada genótipo), 70 (7,7% dos

genótipos), 52, 102 (5,1% de cada), 31, 42, 56, 59, 67, 69 (2,6% cada genótipo). Diferenças na distribuição dos genótipos de HPV entre HIV+ e HIV- também foram encontradas em um estudo transversal com 1.032 mulheres (TEIXEIRA et al., 2012) e estão de acordo com o exposto em outro estudo com 5.578 mulheres infectadas pelo HIV, o qual relata um aumento da infecção pelo HPV18 e HPV52 entre as HIV+ quando comparadas a população geral, entretanto este mesmo estudo sugere que este aumento ocorre também com os HPV33, HPV51 e HPV58, o que não foi observado em nossa amostra (CLIFFORD et al., 2006).

Em pessoas que vivem com HIV/AIDS, a incidência, persistência e evolução de diversas doenças está relacionado com o estado clínico e fase do HIV, no qual a carga viral detectável (>50 cópias/ml) e linfócitos T CD4<sup>+</sup> abaixo de 500 células/mm<sup>3</sup> indicam um estado imunológico deprimido podendo facilitar a infecção e progressão de doenças (BRASIL, 2013). Sendo assim, a implementação da terapia antirretroviral (TARV) é essencial para reduzir a morbidade e mortalidade dessas pessoas aumentando a qualidade de vida. A TARV tem sido considerada a principal causa associada com a queda da replicação viral e reconstituição do sistema imunológico, mantendo a contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> acima de 500 células/mm<sup>3</sup> (BRASIL, 2013).

Nosso estudo analisou a possível associação entre o uso de antirretrovirais e os diferentes graus de lesão. Em nossa amostra 67,2% das participantes faziam uso de ARV, sendo 76,1% usuárias de INTR, 43,3% de IP e 28,4% de INNTR, mostrando dominância no esquema de terapia combinada de INTR+IP e INTR+INNTR, estando de acordo com o recomendado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2013). A ocorrência de LSIL foi identificada em 51,1% das participantes em uso de ARV, e a ocorrência de HSIL em 48,9% das participantes em uso de ARV. Das participantes que não faziam uso de ARV, 50% apresentaram LSIL e 50% apresentaram HSIL, não se mostrando uma variável associada com os diferentes graus de lesão ( $P = 0,932$ ).

Com relação a carga viral entre as participantes HIV+, 52,7% apresentavam carga viral detectável e HSIL, e entre as com carga viral indetectável, 45,2% apresentavam HSIL, porém não foi possível encontrar diferença estatisticamente

significante entre a ocorrência de carga viral detectável e lesões de alto grau ( $P = 0,189$ ). Assim como em nosso estudo, outra pesquisa brasileira com 494 mulheres infectadas pelo HIV, não encontrou relação significativa entre o uso de ARV e o risco de desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais (TEIXEIRA et al., 2012).

Em referência a contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em associação com as lesões intraepiteliais cervicais, 45,5% das mulheres que apresentavam linfócitos T CD4<sup>+</sup> < 200 células/mm<sup>3</sup> tinham LSIL, e 50% das mulheres que apresentavam linfócitos T CD4<sup>+</sup> > 500 células/mm<sup>3</sup> tinham LSIL, sem associação significativa entre as duas variáveis ( $P = 0,604$ ).

Em mulheres infectadas pelo HIV, a contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> maior que 200 cél/mm<sup>3</sup> está associada ao aumento em 33% da prevalência de HPV, já quando a contagem está menor de 200 cél/mm<sup>3</sup> a prevalência de HPV é de 66% (URSU et al., 2015). Ainda, o baixo número de linfócitos T CD4<sup>+</sup> está relacionado também com a persistência do HPV, facilitando a evolução das lesões intraepiteliais cervicais (VUISTY et al., 2012; MARKS et al., 2015). Assim, era esperado um aumento do número de casos de HSIL entre as mulheres HIV+ com baixa contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, porém não foi observado nessa amostra.

Considerando que estudos que envolvam o HLA-E são escassos, principalmente quando associados ao HIV e lesões intraepiteliais cervicais, este é, até o momento, o primeiro estudo a estudar as três variáveis. Assim, utilizamos para análise outras doenças, bem como estudos que analisaram a expressão do HLA-G, também uma molécula MHC de classe I não-clássica.

HLA-E é uma molécula do gene MHC de classe I não clássica, e pouco polimórfica, contrastando com seus homólogos de classe I clássicos: HLA-A, -B e -C. O complexo HLA-E/peptídeo interage com o receptor CD94 em conjunto com a molécula NKG2A inibitória ou a molécula NKG2C estimuladora, ambas expressas na maioria das células NK e em alguns linfócitos T CD8<sup>+</sup> ativados (CASTELLI et al., 2015). Nos últimos anos a participação da molécula HLA-E, descrita primeiramente com função de proteção ao feto contra a resposta imunológica materna, vem sendo estudada em doenças infecciosas virais e em diversos tipos de tumores (HUNT et al., 2005).

Uma vez que a expressão da HLA-E possa estar relacionada com a evasão viral do sistema imune (SPAANS *et al.*, 2012) sua presença nas lesões intraepiteliais cervicais também pode estar associada com a evolução dessas lesões na presença da infecção pelo HPV e na coinfeção com o HIV.

Devido ao seu baixo polimorfismo, apenas dois grupos de alelo (*HLA-E\*0101* e *HLA-E\*0103*) foram encontrados em populações do mundo todo. Sendo assim, um estudo observou a distribuição da expressão desses dois alelos de *HLA-E* em mulheres com câncer ovariano. Os níveis de expressão da proteína HLA-E em pacientes com câncer ovariano com o alelo *HLA-E\*0103* foram maiores do que aqueles com o *HLA-E\*0101*. O alelo *HLA-E\*0103* facilitou a transferência da molécula HLA-E para a superfície celular e o complexo HLA-E/peptídeo tornou-se mais estável. Estas diferenças influenciaram na função das células NK, mostrando que as células com o alelo *HLA-E\*0103* inibiram a lise das células NK (ZHENG *et al.*, 2015).

Biópsias cervicais de pacientes coinfectadas com HIV/HPV, coradas por imunohistoquímica para HLA-E em nosso estudo, mostrou a presença de expressão em 46,4% das amostras das lesões intraepiteliais cervicais (57 participantes), independente do grupo ao qual pertenciam (HIV- ou HIV+). A distribuição da intensidade da expressão de HLA-E mostrou que 53,6% das amostras não mostraram expressão alguma. Destas, 62,1% era do grupo HIV+ e 37,9% HIV-. Para a categoria de 1% a 30% de expressão, 35,8% das lâminas apresentaram esta intensidade, sendo 45,5% HIV+ e 54,5% HIV-. Por fim, apenas 10,6% das amostras tiveram marcação de alta intensidade (31% a 100%), sendo que 7,7% eram do grupo HIV+ e 92,3% do grupo HIV-. As análises entre os grupos, revelaram diferenças significativas para a presença ou não do HIV e o grau de expressão da HLA-E ( $P= 0,001$ ). Após análise de regressão observou-se que o grupo HIV- tem 20 vezes mais chances de apresentar alto nível de expressão de HLA-E (31% a 100%), ou seja, houve uma baixa expressão da molécula nas lesões intraepiteliais cervicais de mulheres HIV+. Entretanto, não houve diferenças significantes quando comparadas com HSIL e LSIL.

Diferente dos nossos resultados, Nattermann e colaboradores (2005) demonstraram expressão aumentada de HLA-E em linfócitos de pacientes infectados pelo HIV, e redução na susceptibilidade da toxicidade das células NK. Esses achados mostram que a infecção pelo HIV aumenta a expressão de HLA-E provavelmente como um mecanismo de evasão viral das células NK, contribuindo para o estabelecimento de uma infecção crônica (NATTERMANN *et al.*, 2005b). Gonçalves *et al.* (2008) comparou a expressão de moléculas do MHC de classe I clássicas e não clássicas em 74 biópsias cervicais com NIC (1,2 e 3), câncer invasivo e biópsias cervicais normais. Os resultados mostraram que a expressão do HLA-E aumentou de forma gradativa a medida que o grau de lesão piorava, e verificou uma associação significativa entre a expressão de HLA-E e a infecção pelos HPVs 16/18, indicando que sua expressão pode inibir a ação citotóxica das células NK, permitindo o escape viral da resposta imune (GONÇALVES *et al.*, 2008). Gooden e colaboradores (2011) analisaram a expressão de HLA-E em amostras cervicais de 150 mulheres, mostrando que 83,7% das biópsias com câncer cervical apresentaram níveis mais elevados de HLA-E (GOODEN *et al.*, 2011).

Outros estudos têm demonstrado que HLA-G pode influenciar e modular a expressão de HLA-E, uma vez que HLA-E foi detectada em todas as células que também expressavam HLA-G. Também já foi reportado que a expressão de HLA-E é mais baixa em células que expressam grandes níveis de HLA-G. Em infecções virais, a expressão tanto de HLA-E como de HLA-G estão aumentadas em células infectadas, sugerindo novamente o papel de ambas como inibidoras e provavelmente estejam envolvidas no escape viral do sistema imune (revisado em MORANDI; PISTOIA, 2014). Um estudo realizado analisando a expressão de HLA-E em placentas de mulheres infectadas pelo HIV-1 mostrou que a expressão da molécula não sofreu alteração na presença viral, mesmo a literatura afirmando que o HIV-1 é capaz de induzir a expressão do HLA-E (MARTINEZ *et al.*, 2016). Um estudo semelhante, que analisou a expressão da molécula HLA-G em placentas de mulheres também infectadas pelo HIV-1, mostrou que a presença da infecção pelo HIV estava significativamente associada a menor expressão de HLA-G (SANTIAGO, 2013). Seguindo a análise de expressão das moléculas HLA-G, outro



estudo mostrou a diminuição da isoforma HLA-G1 em portadores do HIV, sugerindo que esta redução possa ser um mecanismo de escape viral, que acarreta a redução da apresentação de peptídeos virais para os linfócitos T CD8<sup>+</sup> (DARRIEN *et al.*, 2004).

Com o objetivo de avaliar o comportamento da molécula HLA-E e outras variáveis, para ambos os grupos estudados, foram analisadas as associações entre tipos de HPV ( $P= 0,608$ ), tipo de lesões intraepiteliais cervicais ( $P= 0,427$ ), hábito de tabagismo ( $P= 0,239$ ) e o uso de anticoncepcional hormonal ( $P= 0,052$ ), porém os resultados não mostraram diferenças estatisticamente significantes para estas variáveis, mostrando que o nível de expressão de HLA-E independe de tais características, contrastando com os estudos já apresentados.

Sabendo que algumas classes de antirretrovirais estão associadas ao aumento da expressão de HLA-G, também avaliamos a expressão de molécula HLA-E nas biópsias cervicais das mulheres inseridas no grupo HIV+, que recebiam terapia antirretroviral. Nesse grupo de mulheres verificamos se os esquemas terapêuticos, bem como a contagem de carga viral e de linfócitos T CD4<sup>+</sup> influenciavam na expressão da molécula, entretanto não encontramos diferenças significantes.

Pelo exposto, nossos resultados mostraram a associação da infecção pelo HIV com a expressão reduzida de HLA-E em lesões intraepiteliais cervicais, porém outros estudos devem ser realizados para a melhor compreensão do papel da molécula HLA-E em lesões intraepiteliais cervicais em mulheres coinfectadas pelo HIV/HPV.

Nosso estudo apresenta limitações metodológicas, uma vez que o número relativamente baixo de participantes dificulta a análise e limita a aplicação dos resultados para além da amostra estudada. Além disso, a seleção amostral por conveniência realizada em um hospital terciário, resulta na dificuldade de seleção de mulheres com lesões intraepiteliais cervicais de baixo grau. A impossibilidade de tipificação do HPV de todas as amostras coletadas impediu a avaliação da distribuição dos HPV de baixo risco e HPV de alto risco nos diferentes graus de lesão. Contudo, mesmo com as limitações apresentadas, os resultados deste

estudo contribuem para elucidação do papel da expressão da molécula HLA-E entre as mulheres portadoras das lesões intraepiteliais cervicais vivendo com HIV/AIDS.

Neste contexto de evolução tecnológica e cognitiva, cabe ao enfermeiro ser protagonista e enfrentar o desafio de participar ativamente na busca pela elucidação da fisiopatologia, e desenvolvimento de novas medidas terapêuticas (LEA *et al.*, 2011). Ademais, a formação do enfermeiro possibilita uma abordagem holística do cuidado, englobando aspectos biológicos, ambientais, culturais, sociais e espirituais de cada indivíduo (FLÓRIA-SANTOS; NASCIMENTO, 2006) facilitando a integração e aplicabilidade do conhecimento advindo de pesquisas com a prática clínica, resultando em uma assistência de enfermagem fundamentada, especializada e de alta qualidade.

**CONCLUSÃO**

---

## 7. CONCLUSÃO

1. Este foi o primeiro trabalho a analisar a expressão de moléculas HLA-E em lesões intraepiteliais cervicais de mulheres com HPV, apresentando ou não a infecção pelo HIV-1.

2. Ao analisar os dados sociodemográficos, clínicos e comportamentais, observamos que a idade das participantes está de acordo com a faixa etária de maior ocorrência das lesões intraepiteliais cervicais, e a distribuição da amostra segundo cor da pele foi semelhante ao encontrado na população brasileira. Não encontramos relação entre tipo de parceria sexual, idade na primeira relação sexual, número de gestações, uso de anticoncepcionais hormonais, tabagismo, presença da infecção pelo HIV, diferenças no grau das lesões intraepiteliais cervicais ou tipo de HPV. Foi observado que mulheres HIV+ tinham mais chances de ser infectadas por outras DSTs, em especial o Herpes genital. Dentre as participantes HIV+, não foram encontradas diferenças significativas entre o número de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, carga viral e uso de ARV, progressão das lesões intraepiteliais cervicais e tipo de HPV.

3. Todas as participantes do estudo possuíam infecção pelo HPV, entretanto não houve diferenças significativas, mas foi observado predomínio de infecção por HPVs de alto risco.

4. A expressão da molécula HLA-E em lesões intraepiteliais cervicais de mulheres portadoras do HIV-1 estava significativamente menor quando comparada com mulheres sem a infecção pelo HIV-1 ( $P=0,001$ ). Porém não houve associação entre a expressão de HLA-E com o grau das lesões intraepiteliais cervicais, tipo de HPV, tabagismo, uso de anticoncepcional hormonal, bem como com os biomarcadores da infecção pelo HIV-1 (carga viral, linfócitos T CD4<sup>+</sup> e ARV).

## ***REFERÊNCIAS***

---

---

## 8. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. O complexo principal de histocompatibilidade. In: **Imunologia Celular e Molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 97-111.
- AIDÉ, S. et al. Neoplasia Intraepitelial Cervical. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 21, n. 4, p. 166-170, 2009.
- ALMONTE, M. et al. Risk factors for Human Papillomavirus Exposure and Co-factors for Cervical Cancer in Latin America and the Caribbean. **Vaccine**, v. 26, p. L16-L36, 2008.
- ARCAVI, L.; BENEWITZ, N. L. Cigarette smoking and infection. **Archives of Internal Medicine**, v. 164, n. 20, p. 2206-2216, 2004.
- BARRÉ-SINOUSI, F. et al. Isolation of T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, v. 220, n. 4599, p. 868-871, 1983.
- BENEVOLO, M. et al. High expression of HLA-E in colorectal carcinoma is associated with a favorable prognosis. **Journal of Translational Medicine**, v. 9, n. 1, p. 1, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Evolução temporal das doenças de notificação compulsória no Brasil de 1980 a 1998**. Brasília, DF, 1999. 43p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. **Manual de adesão ao tratamento para pessoas vivendo com HIV e aids**. Brasília, DF, 2008. 130p.
- BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e estatística População e demografia, **Características gerais da população: População residente por cor ou raça**. 2001-2011. Disponível em: <http://seriesestatisticas.ibge.gov.br/series.aspx?no=10&op=0&vcodigo=PD336&t>. Acesso em: 13 set 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Nomenclatura Brasileira para Laudos Citopatológicos**. 3ªed. Rio de Janeiro, RJ: INCA, 2012. 23p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para adultos vivendo com HIV/aids**. Brasília, DF, 2013. 75p.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Boletim Epidemiológico HIV aids**. Brasília, DF, 2015. 100p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, RJ: INCA, 2016. 126p.
- BERNARD, H. U. et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, v. 401, p. 70-79, 2010.
- CARVALHO, M. C. M. P.; QUEIROZ, A. B. A. Mulheres portadoras de lesões precursoras do câncer do colo do útero e HPV: Descrição do perfil socioeconômico e demográfico. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 23, n. 1, p. 28-33, 2011.
- CASTELLI, E. C. et al. HLA-E coding and 3' untranslated region variability determined by next-generation sequencing in two West-African population samples. **Human immunology**, v. 76, n. 12, p. 945-953, 2015.
- CASTLE, P. E. et al. A prospective study of high-grade cervical neoplasia risk among human papillomavirus-infected women. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, n. 18, p. 1406-1414, 2002.
- CASTLE, P. E. et al. Hormonal contraceptive use, pregnancy and parity, and the risk of cervical intraepithelial neoplasia 3 among oncogenic HPV DNA-positive women with equivocal or mildly abnormal cytology. **International Journal of Cancer**, v. 117, n. 6, p. 1007-1012, 2005.
- CATARINO, R. et al. Risk factors associated with human papillomavirus prevalence and cervical neoplasia among Cameroonian women. **Cancer Epidemiology**, v. 40, p. 60-66, 2016.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) Pneumocystis Pneumonia-Los Angeles. **MMWR**, v. 30, n. 21, p. 250-252, 1981.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC); CURRAN, J.W.; JAFFE, H. W. AIDS: The Early Years and CDC's Response. **MMWR**, v. 60, n. 4, p 64-69, 2011.
- CHELIMO, C. et al. Risk factors for and prevention of human papillomaviruses (HPV), genital warts and cervical cancer. **Journal of Infection**, v. 66, n. 3, p. 207-217, 2013.

- CIRINO, F. M. S. B.; NICHATA, L. Y. I.; BORGES, A. L. V. Conhecimento, atitude e práticas na prevenção do câncer de colo uterino e HPV em adolescentes. **Escola Anna Nery: Revista de Enfermagem**, v. 14, n. 1, p. 126-134, 2010.
- CLIFFORD, G. M. et al. Human papillomavirus types among women infected with HIV: a meta-analysis. **AIDS**, v. 20, n. 18, p. 2337-2344, 2006.
- COHEN, J. Early AIDS virus may have ridden Africa's rails. **Science**, v. 346, n. 6205, p. 21-22, 2014.
- CUBIE, H. A. Diseases associated with human papillomavirus infection. **Virology**, v. 445, n. 1-2, p. 21-34, 2013.
- DARRAGH, T. M. 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. **Archives of Pathology & Laboratory medicine**, v. 136, n. 10, p. 1266-1297, 2012.
- DE PALO, G.; VECCHIONE, A. Neoplasia intra-epitelial do colo uterino. In: **Colposcopia e Patologia do Trato Genital Inferior**. Rio de Janeiro: Medsi, 1996. p. 265-311.
- DE VILLIERS, E. M. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17-27, 2004.
- DE VILLIERS, E. M. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 445, n. 1, p. 2-10, 2013.
- DENNY, L. A. et al. Human papillomavirus, human immunodeficiency virus and immunosuppression. **Vaccine**, v. 30, p. F168-F174, 2012.
- DERRIEN, M. et al. Human immunodeficiency virus 1 downregulates cell surface expression of the non-classical major histocompatibility class I molecule HLA-G1. **Journal of general virology**, v. 85, n. 7, p. 1945-54, 2004.
- DONADI, E. A. et al. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 3, p. 369-395, 2011.
- DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, p. 7-15, 2005.
- DUNNE, E. F.; MARKOWITZ, L. E. Genital human papillomavirus infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 5, p. 624-629, 2006.



- FARIA, N. R. et al. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. **Science**, v. 346, p. 61, 2014.
- FELICIO, L. P. et al. Worldwide HLA-E nucleotide and haplotype variability reveals a conserved gene for coding and 3' untranslated regions. **Tissue Antigens**, v. 83, n. 2, p. 82-93, 2014.
- FERGUSON, R. et al. Human leukocyte antigen (HLA)-E and HLA-G polymorphisms in human papillomavirus infection susceptibility and persistence. **Human Immunology**, v. 72, n. 4, p. 337-341, 2011.
- FERNANDES, A. P. et al. Influência do HPV-16 sobre a Produção Intralesional de IL-10 em Mulheres Imunogeneticamente Responsivas e Portadoras do HIV-1. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 16, n. 3, p. 67-72, 2004.
- FLÓRIA-SANTOS, M.; NASCIMENTO, L. C. Perspectivas históricas do Projeto Genoma e a evolução da enfermagem. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 59, n. 3, p. 358-361, 2006.
- FLÓRIA-SANTOS, M. et al. Oncology nursing practice from the perspective of genetics and genomics. **Texto & Contexto-Enfermagem**, v. 22, n. 2, p. 526-533, 2013.
- FOCACCIA, R. et al. **Tratado de Infectologia** v.1, 4. ed., São Paulo:Editora Atheneu, 2010. p. 131-277, 681-98.
- FRANCO, E. L. et al. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. **Journal of Infectious Diseases**, v. 180, n. 5, p. 1415-1423, 1999.
- FREITAS, Beatriz C. et al. HPV Infection and Cervical Abnormalities in HIV Positive Women in Different Regions of Brazil, a Middle-Income Country. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP**, v. 16, n. 18, p. 8085-8091, 2015.
- FUNKE, Jessica et al. Natural killer cells in HIV-1 infection: a double-edged sword. **AIDS Reviews**, v. 13, n. 2, p. 67-76, 2011.
- GALLAGHER, K. E. et al. The association between cervical human papillomavirus infection and subsequent HIV acquisition in Tanzanian and Ugandan women: a nested case-control study. **Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. 1, p. 87-95, 2016.
- GAMBERINI, K. S. T.; LAGANÁ, M. T. C.; TORIYAMA, Á. T. M. Relação entre raça/cor e a frequência de lesões intra-epiteliais de alto grau (NIC II e NIC III). **Saúde Coletiva**, v. 5, n. 20, p. 51-56, 2008.

- GISSMANN, L., HAUSEN H. Z. Human papilloma virus DNA: physical mapping and genetic heterogeneity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 73, n. 4, p. 1310-1313, 1976.
- GIULIANO, A. R. et al. Clearance of oncogenic human papillomavirus (HPV) infection: effect of smoking (United States). **Cancer Causes & Control**, v. 13, n. 9, p. 839-846, 2002.
- GONÇALVES, M. A. G. et al. Langerhans' cell count and HLA class II profile in cervical intraepithelial neoplasia in the presence or absence of HIV infection. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 114, n. 2, p. 221-227, 2004.
- GONÇALVES, M. A. G. et al. Classical and non-classical HLA molecules and p16 INK4a expression in precursors lesions and invasive cervical cancer. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v. 141, n. 1, p. 70-74, 2008.
- GORER, Peter A. The genetic and antigenic basis of tumour transplantation. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 44, n. 3, p. 691-697, 1937.
- HARPER, Diane M.; DEMARS, Leslie R. Primary strategies for HPV infection and cervical cancer prevention. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 57, n. 2, p. 256-278, 2014.
- HIRANKARN, N.; KIMKONG, I.; MUTIRANGURA, A. HLA-E polymorphism in patients with nasopharyngeal carcinoma. **Tissue Antigens**, v. 64, n. 5, p. 588-592, 2004.
- HORTON, R. et al. Gene map of the extended human MHC. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 12, p. 889-899, 2004.
- HUNT, Joan S. et al. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. **The FASEB Journal**, v. 19, n. 7, p. 681-693, 2005.
- IMAI, H. et al. Prevalence, Potential Predictors, and Genotype-Specific Prevalence of Human Papillomavirus Infection among Sexually Active Students in Japan. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1-9, 2015.
- ISHITANI, A.; SAGESHIMA, N.; HATAKE, K. The involvement of HLA-E and -F in pregnancy. **Journal of Reproductive Immunology**. v. 69, n. 2, p. 101-113, 2006.
- IWASZKO, M.; BOGUNIA-KUBIK, K. Clinical Significance of the HLA-E and CD94/NKG2 Interaction. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 59, n. 5, p. 353-367, 2011.
- JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**, v.

- 61, n. 2, p. 69-90, 2011.
- KIM, R. H. et al. HIV-1 Tat enhances replicative potential of human oral keratinocytes harboring HPV-16 genome. **International Journal of Oncology**, v. 33, n. 4, p. 777-782, 2008.
- KOCHAN, G. et al. Role of non-classical MHC class I molecules in cancer immunosuppression. **Oncolmmunology**, v. 2, n. 11, p. e26491, 2013.
- KRANJEC, C.; DOORBAR, J. Human papillomavirus infection and induction of neoplasia: a matter of fitness. **Current Opinion in Virology**, v. 20, p. 129-136, 2016.
- KWASNIEWSKA, A. et al. Estrogen and progesterone receptor expression in HPV-positive and HPV-negative cervical carcinomas. **Oncology Reports**, v. 26, n. 1, p. 153-160, 2011.
- LEA, D. H. et al. Implications for Educating the Next Generation of Nurses on Genetics and Genomics in the 21st Century. **Journal of Nursing Scholarship**, v. 43, n. 1, p. 3-12, 2011.
- LEE, H. et al. Risk factors associated with human papillomavirus infection status in Korea cohort. **Epidemiology and Infection**, v. 142, p. 1579-1589, 2013.
- LESLIE, H. H. et al. Cervical Cancer Precursors and Hormonal Contraceptive Use in HIV-Positive Women: Application of a Causal Model and Semi-Parametric Estimation Methods. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. 1-8, 2014.
- LEES, B. F.; ERICKSON, B. K.; HUH, W. K. Cervical cancer screening: evidence behind the guidelines. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 214, n. 4, p. 438-443, 2016.
- LEVI, J. E. et al. High prevalence of human papillomavirus (HPV) infections and high frequency of multiple HPV genotypes in human immunodeficiency virus-infected women in Brazil. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 9, p. 3341-3345, 2002.
- LIN, Lavinia et al. Racial and ethnic differences in human papillomavirus positivity and risk factors among low-income women in Federally Qualified Health Centers in the United States. **Preventive Medicine**, v. 81, p. 258-261, 2015.
- MARTINEZ, Juliana et al. Expression of HLA-E molecules in the placental tissue of women infected with HIV-1 and uninfected women. **Placenta**, 2016.
- MARKS, M. A.; KLEIN, S. L.; GRAVITT, P. E. Hormonal contraception and HPV: a tale of differing and overlapping mechanisms. **Open Access Journal of Contraception**, v. 2, p. 161-174, 2011.

- MARKS, M. A. et al. Prevalence and correlates of HPV among women attending family-planning clinics in Thailand. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 1, 2015.
- MATSUMOTO, K. et al. Tobacco smoking and regression of low-grade cervical abnormalities. **Cancer Science**, v. 101, n. 9, p. 2065-2073, 2010.
- MORANDI, Fabio; PISTOIA, Vito. Interactions between HLA-G and HLA-E in physiological and pathological conditions. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 394, 2014.
- MORENO, V. et al. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. **The Lancet**, v. 359, n. 9312, p. 1085-1092, 2002.
- MOULDS, J. M. Ethnic diversity of class III genes in autoimmune disease. **Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library**, v. 6, p. D986-D991, 2001.
- MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunologia de Janeway**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 525-551.
- NATTERMANN, J. et al. The HLA-A2 restricted T cell epitope HCV core 35–44 stabilizes HLA-E expression and inhibits cytolysis mediated by natural killer cells. **The American Journal of Pathology**, v. 166, n. 2, p. 443-453, 2005a.
- NATTERMANN, J. et al. HIV-1 infection leads to increased HLA-E expression resulting in impaired function of natural killer cells. **Antiviral Therapy**, v. 10, n. 1, p. 95-107, 2005b.
- NOWAKOWSKI, A. et al. HPV-type distribution and reproducibility of histological diagnosis in cervical neoplasia in Poland. **Pathology & Oncology Research**, v. 21, n. 3, p. 703-711, 2015.
- OH, H. Y. et al. Association of combined tobacco smoking and oral contraceptive use with cervical intraepithelial neoplasia 2 or 3 in Korean women. **Journal of Epidemiology**, v. 26, n. 1, p. 22-29, 2016.
- PAASO, A. et al. Cell mediated immunity against HPV16 E2, E6 and E7 peptides in women with incident CIN and in constantly HPV negative women followed-up for 10-years. **Journal of Translational Medicine**, v. 163, n. 13, p. 1-11, 2015.
- PALTIEL, O. et al. Grand multiparity and reproductive cancer in the Jerusalem Perinatal Study Cohort. **Cancer Causes & Control**, v. 27, n. 2, p. 237-247, 2016.

- PINTO, A. P.; TULIO, S.; CRUZ, O. R. Co-fatores do HPV na Oncogênese Cervical. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 48, n. 1, p. 73-78, 2002.
- RATHIKA, C. et al. Susceptible and Protective Associations of HLA Alleles and Haplotypes with Cervical Cancer in South India. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP**, v. 17, n. 5, p. 2491-2497, 2016.
- RICHART, R. M. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia. **Clinical Obstetrics & Gynecology**, v. 10, n. 4, p. 748-784, 1967.
- RICHART, R. M. A modified terminology for cervical intraepithelial neoplasia. **Obstetrics & Gynecology**, v. 75, n. 1, p. 131-133, 1990.
- ROURA, E. et al. Smoking as a major risk factor for cervical cancer and pre-cancer: Results from the EPIC cohort. **International Journal of Cancer**, v. 135, n. 2, p. 453-466, 2014.
- ROURA, E. et al. The Influence of Hormonal Factors on the Risk of Developing Cervical Cancer and Pre-Cancer: Results from the EPIC Cohort. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0147029, 2016.
- ROUSSEAU, M. C. et al. A cumulative case-control study of risk factor profiles for oncogenic and nononcogenic cervical human papillomavirus infections. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 9, n. 5, p. 469-476, 2000.
- RUGGERI, J. B. et al. Treatment and Follow-up of Human Papillomavirus Infected Women in a Municipality in Southern Brazil. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP**, v. 16, n. 15, p. 6521-6526, 2015.
- SAMOFF, E. et al. Association of Chlamydia trachomatis with Persistence of High-Risk Types of Human Papillomavirus in a Cohort of Female Adolescents. **American Journal of Epidemiology**. v. 162, n. 7, p. 668-675. 2005.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.
- SANJOSE, S. et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. **The Lancet Oncology**, v. 11, n. 11, p. 1048-1056, 2010.
- SANTIAGO, Mariana Rodrigues. **Expressão das moléculas HLA-G em tecido placentário de mulheres infectadas ou não pelo HIV-1**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, 2013.

- SARIAN, L. O. et al. Increased Risk of Oncogenic Human Papillomavirus Infections and Incident High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia Among Smokers: Experience From the Latin American Screening Study. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 36, n. 4, p. 241-248, 2009.
- SCHEURER, M. E.; TORTOLERO-LUNA, G.; ADLER-STORTHZ, K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. **International Journal Gynecological Cancer**. v. 15, n. 5, p. 727–746, 2005.
- SHARP, P. M.; HAHN, B. H. The evolution of HIV-1 and the origin of AIDS. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 365, n. 1522, p. 2487-2494, 2010.
- SHIELDS, T. S. et al. A case-control study of risk factors for invasive cervical cancer among US women exposed to oncogenic types of human papillomavirus. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 13, n. 10, p. 1574-1582, 2004.
- SILVA, C. et al. A retrospective study on cervical intraepithelial lesions of low-grade and undetermined significance: evolution associated factors and cytological correlation. **São Paulo Medical Journal**, v. 132, n. 2, p. 92-96, 2014.
- SMITH, J. S. et al. Herpes Simplex Virus-2 as a Human Papillomavirus Cofactor in the Etiology of Invasive Cervical Cancer. **Journal of National Cancer Institute**, vol. 94, n. 21, p.1604-1613, 2002.
- SMITH, J. S. et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update. **International Journal of Cancer**, v. 121, p. 621–632, 2007.
- SMITH, J. S. et al. Age-Specific Prevalence of Infection with Human Papillomavirus in Females: A Global Review. **Journal of Adolescent Health**, v. 43, n. 4, p. S5.e1-S5.e62, 2008.
- SMITH, M. A. et al. Determinants of human papillomavirus coinfections among Montreal university students: the influence of behavioral and biologic factors. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 23, n. 5, p. 812-822, 2014.
- SOLOMON, D. et al. The 2001 Bethesda System: Terminology for Reporting Results of Cervical Cytology. **Jama**, v. 287, n. 16, p. 2114-2119, 2002.
- SPAANS, V. M. et al. HLA-E expression in cervical adenocarcinomas: association with improved long-term survival. **Journal of Translational Medicine**, v. 10, n. 1, p. 184-195, 2012.

- 
- STANLEY, M. HPV-immune response to infection and vaccination. **Infectious Agents and Cancer**, v. 5, n. 1, p. 19, 2010.
- STENSEN, S. et al. Factors associated with type-specific persistence of high-risk human papillomavirus infection: A population-based study. **International Journal of Cancer**, v. 138, n. 2, p. 361-368, 2015.
- SULLIVAN, L. C. et al, The major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E at the interface between innate and adaptive immunity. **Tissue Antigens**. v. 72, n. 5, p. 415-424. 2008.
- TAYLOR, B. S. et al. The challenge of HIV-1 subtype diversity. **New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 15, p. 1590-1602, 2008.
- TEIXEIRA, N. C. P. et al. Prevalence and risk factors for cervical intraepithelial neoplasia among HIV-infected women. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 164-169, 2012.
- TOMMASINO, M. The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. **Seminars in Cancer Biology**. V. 26, p. 13-21, 2014.
- TROTTIER, H.; FRANCO, E. L. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. **Vaccine**, v. 24, p. S4-S15, 2006.
- URSU, R. G. et al. The Need for Cervical Cancer Control in HIV-Positive and HIV-Negative Women from Romania by Primary Prevention and by Early Detection Using Clinically Validated HPV/DNA Tests. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. e0132271, 2015.
- VACCARELLA, S. et al. Reproductive factors, oral contraceptive use, and human papillomavirus infection: pooled analysis of the IARC HPV prevalence surveys. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 15, n. 11, p. 2148-2153, 2006.
- VEIGA-CASTELLI, L. C. et al. A nonsynonymous mutation at HLA-E defines the new E\* 01:06 allele in Brazilian individuals. **Tissue Antigens**, v. 82, n. 3, p. 216-217, 2013.
- VEIGA-CASTELLI, L. C. et al. Low variability at the HLA-E promoter region in the Brazilian population. **Human Immunology**, v. 77, n. 2, p. 172-175, 2016.
- VALLE, I.; TRAMALLONI, D.; BRAGAZZI, N. L. Cancer prevention: state of the art and future prospects. **Journal of Preventive Medicine and Hygiene**, v. 56, n. 1, p. E21-E27, 2015.

- 
- VELDHUIJZEN, N. J. et al. Factors affecting transmission of mucosal human papillomavirus. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 10, n. 12, p. 862-874, 2010.
- VINODHINI, K. et al. Prevalence and risk factors of HPV infection among women from various provinces of the world. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 285, n. 3, p. 771-777, 2012.
- VUYST, H. D. et al. Prevalence of human papillomavirus in women with invasive cervical carcinoma by HIV status in Kenya and South Africa. **International Journal of Cancer**, v. 131, n. 4, p. 949-955, 2012.
- WIETEN, L. et al. Clinical and immunological significance of HLA-E in stem cell transplantation and cancer. **Tissue Antigens**, v. 84, n. 6, p. 523-535, 2014.
- WILEN, C. B.; TILTON, J. C.; DOMS, R. W. HIV: Cell Binding and Entry. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 8, p. a006866, 2012.
- XIE, X.; CLAUSEN, O. P. F.; BOYSEN, M. Bag-1 Expression as a Prognostic Factor in Tongue Squamous Cell Carcinomas. **The Laryngoscope**, v. 114, n. 10, p. 1785-1790, 2004.
- ZHANG, Y. X. et al. Analysis of cervical HPV infection in HIV positive Chinese women. **Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi**, v. 47, n. 3, p. 185-190, 2012.
- ZHANG, X. et al. Genetic variants and risk of cervical cancer: epidemiological evidence, meta-analysis and research review. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 121, n. 6, p. 664-673, 2014.
- ZHENG, Hui et al. Human leukocyte antigen-E alleles and expression in patients with serous ovarian cancer. **Cancer science**, v. 106, n. 5, p. 522-528, 2015.
- ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342-350, 2002.



## APÊNDICE I: Instrumento de Coleta de Dados

### IDENTIFICAÇÃO

Iniciais: \_\_\_\_\_ Nº de registro: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
 Telefone: \_\_\_\_\_ Endereço: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_  
 Idade: \_\_\_\_\_ Raça: (1) Branca (2) Negra (3) Parda Profissão: \_\_\_\_\_  
 Escolaridade: (1) Analfabeta (2) Fundam. Incompleto (3) Fundam. Completo (4) Médio Incompleto (5) Médio Completo (6) Superior Incompleto (7) Superior Completo (8) Pós-graduação (9) Outro \_\_\_\_\_  
 Estado civil: (1) Casada (2) União estável (3) Divorciada (4) Viúva (5) Solteira Há quanto tempo? \_\_\_\_\_

### TABAGISMO

1. Você fuma ou já fumou?  
 (1) Nunca fumou (2) Fuma irregularmente (< 1 cigarro/dia durante 1 ano, no mínimo)  
 (3) Fuma regularmente (1 > cigarro/dia durante 1 ano, no mínimo) (4) Ex-fumante (parou há, no mínimo, 1 ano)  
 \*Menos de 1 ano = fumante regular
2. Quantos cigarros você fumava/dia? \_\_\_\_\_ (2) 1-5 (3) 6-10 (4) 11-20 (5) + 20
3. Quantos cigarros você fuma/dia? \_\_\_\_\_ (2) 1-5 (3) 6-10 (4) 11-20 (5) + 20
4. Com que idade começou a fumar? \_\_\_\_\_

### ANTECEDENTES GINECOLÓGICOS

5. Qual sua idade na primeira menstruação? \_\_\_\_\_
6. Com quantos anos você passou a ter vida sexual ativa? \_\_\_\_\_
7. Antecedentes obstétricos: G \_\_\_ P \_\_\_ C \_\_\_ A \_\_\_ 8. Qual sua idade na primeira gestação: \_\_\_\_\_
9. Se encontra atualmente grávida? (1) Sim (2) Não
10. Utiliza, atualmente, algum método contraceptivo? (1) Abstinência sexual (2) Coito Interrompido (3) Tabela (4) Diafragma (5) Anel Vaginal (6) DIU (7) Preservativo (8) Anticoncepcional hormonal (9) Definitivo (10) Não faz uso
11. Com que frequência você vai ao ginecologista? (1) 1 vez/6 meses (2) 1 vez/ano (3) < 1 vez/ano, especificar \_\_\_\_\_
12. Grau de lesão cervical: \_\_\_\_\_ Data da biópsia: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### ANTECEDENTES SEXUAIS

13. Atualmente, você possui quantos parceiros sexuais?  
 (1) Nenhum (2) 1 (3) 2-10 especificar \_\_\_\_\_ (4) Mais de 10 especificar \_\_\_\_\_
14. Você tem conhecimento se seu(s) parceiro(s) tem vida sexual ativa com outro parceiro(a)?  
 (1) Não sabe (2) Não tem (3) Tem (especificar quantidade e sexo dos parceiros \_\_\_\_\_)
15. Quando foi sua última relação sexual? \_\_\_\_\_
16. Qual foi a frequência das relações sexuais no último mês?  
 (1) Nenhuma vez (2) <1 vez/semana (3) 1 vez/semana (4) >1 vez/semana \_\_\_\_\_ (4) Mais de uma vez /dia \_\_\_\_\_
17. A frequência das relações sexuais mudaram após o diagnóstico das lesões uterinas?  
 (1) Diminuíram (2) Se manteve (3) Aumentou
18. Atualmente, qual é tipo de relação sexual que você pratica?  
 (1) Nenhuma (2) Oral (3) Vaginal (4) Anal
19. Referente ao uso do preservativo, este uso ocorre:  
 (1) Nunca (2) Na minoria das vezes (3) Na maioria das vezes (4) Em todas as vezes
20. Utilizou preservativo na última relação sexual? (1) Sim (2) Não
21. Atualmente, em que tipo de relação sexual você usa preservativo?  
 (1) Nenhuma (2) Anal (3) Vaginal (4) Oral (5) Todas

22. Orientação sexual: (1) Heterossexual (2) Homossexual (3) Bissexual  
 23. Você já recebeu algum tipo de pagamento em troca de sexo? (dinheiro, presentes, viagens, etc)  
 (1) Não (2) Sim \_\_\_\_\_

### DOENÇAS SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS

24. Você já apresentou alguma doença de transmissão sexual? (1) Não sei (2) Não (3) Sim  
 25. Sabe qual doença? (1) Nunca apresentei (2) Não sei (3) Candidíase (4) Gonorréia  
 (5) Herpes (6) Sífilis (7) Cancro (8) Condiloma (9) Múltiplas  
 (10) Portador de HIV/AIDS (11) Outra (as) \_\_\_\_\_  
 26. Se você é positivo para condiloma, quantas vezes você teve verrugas genitais?  
 (1) Nenhuma (2) Uma (3) Duas (4) Três (5) Mais de três \_\_\_\_\_  
 27. Você sabe se seu parceiro tem ou já apresentou alguma DST? (1) Não sei (2) Não (3) Sim  
 28. Sabe qual foi? (1) Nunca apresentou (2) Não sei (3) Candidíase (4) Gonorréia  
 (5) Herpes (6) Sífilis (7) Cancro (8) Condiloma (9) Múltiplas  
 (10) Portador de HIV/AIDS (11) Outra (as) \_\_\_\_\_  
 29. Se é positivo para condiloma, você sabe com quantas parceiras ele já se relacionou sexualmente?  
 (2) Não sei (1) Sim \_\_\_\_\_  
 30. Alguma outra pessoa com quem você já manteve relação sexual, apresentava verrugas nos genitais?  
 (1) Não sei (2) Não (3) Sim, especificar \_\_\_\_\_

### PACIENTES HIV +

31. Há quanto tempo você tem conhecimento do diagnóstico de HIV? (Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_)  
 (1) < 6 meses (2) entre 6 meses a 1 ano (3) de 1 a 5 anos (4) > 5 anos  
 32. Carga viral: \_\_\_\_\_ Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
 33. Número de linfócitos TCD4: \_\_\_\_\_ TCD8: \_\_\_\_\_ TCD4/TCD8: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
 34. Está utilizando medicamentos antirretrovirais (ARV)? (1) Sim (2) Não  
 Quais \_\_\_\_\_  
 35. Faz uso regular dos ARV? (1) Sim (2) Não, especificar \_\_\_\_\_  
 36. Qual era sua preferência sexual antes do diagnóstico positivo para HIV?  
 (1) Homossexual (2) Heterossexual (3) Bissexual  
 37. Qual é sua preferência sexual atual? (1) Homossexual (2) Heterossexual (3) Bissexual  
 38. Quantos parceiros sexuais você teve antes do diagnóstico de HIV?  
 (1) Nenhum (2) 1 (3) 2- 5 \_\_\_ (4) 5 - 10 \_\_\_ (5) mais que 10 \_\_\_  
 39. Que tipo de relação sexual foi estabelecida com estes parceiros?  
 (1) Regulares (2) Casuais (3) Ambos  
 40. Que tipo de relação sexual você praticava antes do diagnóstico de HIV?  
 (1) Nenhuma (2) Oral (3) Vaginal (4) Anal  
 41. Depois do diagnóstico de HIV, você mudou os métodos anticoncepcionais utilizados?  
 (1) Não (2) Sim, diminuí a proteção (3) Sim, aumentei a proteção  
 Especificar \_\_\_\_\_

## **APÊNDICE II: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Convidamos a senhora para participar da Pesquisa: “POLIMORFISMO DO HLA-G E HLA-E NAS LESÕES CERVICAIS EM MULHERES PORTADORAS OU NÃO DA INFECÇÃO PELO HIV-1”, sob a responsabilidade das pesquisadoras: Francielly Maiara da Penna Matos, enfermeira, aluna de mestrado pela Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo –EERP/USP e, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Paula Morais Fernandes, docente desta mesma instituição, as quais pretendem identificar alguns genes que possam estar relacionados com o desenvolvimento de lesões no colo uterino associadas a infecção pelo papilomavírus humano (HPV), uma vez que sabe-se que estas lesões podem levar ao desenvolvimento de câncer de colo uterino, uma das principais causas de morte feminina, e ainda, que as mulheres com HIV-1, que também apresentam a infecção pelo HPV tem maiores chances de desenvolver este tipo de lesões quando comparada com mulheres com HPV, mas que não são HIV-1 positivas.

Sua participação é voluntária, ou seja, você não é obrigada a participar deste estudo e tem a liberdade de não participar. Caso isto ocorra, o atendimento neste hospital continuará ocorrendo da mesma forma. Você não gastará e nem ganhará dinheiro para participar deste estudo e os dados coletados serão mantidos sob anonimato, ou seja, os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada.

Caso aceite, será entregue uma via deste termo de consentimento assinado pelas pesquisadoras, e após, serão coletados 10 mL de sangue da veia do seu braço, 2 fragmentos do colo uterino e uma amostra de células deste, assim como é feito no exame de citologia oncológica (papanicolau). A coleta será realizada pelo médico que está te atendendo neste ambulatório e por mim, em uma sala reservada. Você responderá também um questionário sobre seus dados pessoais, hábitos de vida, antecedentes ginecológicos, antecedentes sexuais, doenças sexualmente transmissíveis e, entre as pacientes HIV-1+, vão ser incluídas questões sobre a infecção pelo HIV, tratamento e dados de exames de carga viral e contagem de linfócitos T CD4+. Aceitando participar desta pesquisa, você também estará

autorizando a coleta de dados em seu prontuário que será realizada por mim em até 15 dias após a entrevista. O material biológico coletado será desprezado após uso nesta pesquisa, não sendo utilizado em nenhuma outra. O tempo previsto de duração de sua participação é de no máximo 40 minutos.

Se você aceitar participar, estará colaborando para o esclarecimento de fatores envolvidos no surgimento e desenvolvimento das lesões de colo uterino o que contribuirá na criação de futuros tratamentos para a doença. Os riscos desta pesquisa são mínimos, uma vez que a coleta do material biológico será realizada por procedimentos já rotineiros neste ambulatório e por profissional capacitado, porém o questionário trás algumas perguntas íntimas e particulares que podem gerar constrangimento, entretanto você tem o direito a se recusar a responder qualquer pergunta. Além disso, mesmo após consentir em sua participação você tem o direito e a liberdade de desistir de continuar participando em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou após a coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa.

Para qualquer outra informação, senhora poderá entrar em contato com as pesquisadoras na Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto –USP, localizada na Avenida dos Bandeirantes, 3900, Campus Universitário - Bairro Monte Alegre, Ribeirão Preto - SP, no horário das 8: 00h às 17:00h, de segunda a sexta-feira e/ou pelo telefone (16) 36023462, ou poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Escola de Enfermagem de Ribeirão preto, também no horário das 8:00 às 17:00h, e/ou pelo telefone(16) 3602.3386.

---

Enf<sup>a</sup> Francielly Matos e  
Marjory Costa

---

Participante do estudo

RG: \_\_\_\_\_

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Paula M. Fernandes

Ribeirão Preto, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## ANEXO I: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

### DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

#### Dados do Projeto de Pesquisa

**Título da Pesquisa:** Polimorfismo do HLA-G e HLA-E nas lesões cervicais em mulheres portadoras ou não da infecção pelo HIV-1

**Pesquisador:** Francielly Maira da Penna Matos

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 12703213.0.0000.5393

**Submetido em:** 27/06/2013

**Instituição Proponente:** Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto - USP

**Situação:** Aprovado

**Localização atual do Projeto:** Pesquisador Responsável

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**ANEXO II: Aprovação pela Comissão de Pesquisa do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP**



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**



Ribeirão Preto, 18 de fevereiro de 2013.

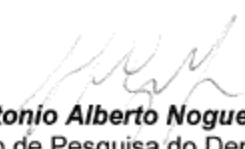
Ilma. Sra.

***Profa. Dra. Ana Paula Morais Fernandes***

Prezada Pesquisadora,

O projeto intitulado “Polimorfismo do HLA-G e HLA-E nas lesões cervicais em mulheres portadoras ou não da infecção pelo HIV-1”, protocolado sob nº 55/2013, de sua autoria, recebeu parecer favorável para ser desenvolvido junto ao Departamento, devendo ser enviado ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, antes do início da coleta de dados.

Atenciosamente,

  
***Prof. Dr. Antonio Alberto Nogueira***  
Presidente da Comissão de Pesquisa do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – FMRP-USP