

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO

FRANCIELLY MAIARA DA PENNA MATOS

Polimorfismo do *HLA-G* nas lesões cervicais em mulheres portadoras  
ou não da infecção pelo HIV-1

Ribeirão Preto

2015

FRANCIELLY MAIARA DA PENNA MATOS

Polimorfismo do *HLA-G* nas lesões cervicais em mulheres portadoras  
ou não da 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: Ana Paula Morais Fernandes

Ribeirão Preto

2015

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.

Matos, Francielly Maiara da Penna

Polimorfismo do *HLA-G* nas lesões cervicais em mulheres portadoras ou não da infecção pelo HIV-1. Ribeirão Preto, 2015.

114 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 Escamosas Cervicais. 3.HPV 4.HLA-G.  
5.Polimorfismo Genético.

MATOS, Francielly Maiara da Penna

Polimorfismo do *HLA-G* nas lesões cervicais em mulheres portadoras ou não da 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.

Aprovado em        /        /

Comissão Julgadora

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

Instituição: \_\_\_\_\_

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

Instituição: \_\_\_\_\_

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

Instituição: \_\_\_\_\_

*Ao amor da minha vida, Douglas*  
*Aos meus pais, Aílton e Lourdes*  
*Aos meus irmãos, Alíson e Lucas*

## AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Ana Paula Morais Fernandes, pela orientação neste trabalho.

À Profª Drª Silvana Maria Quintana pelos ensinamentos e auxílio durante todas as etapas deste estudo.

À Drª Patrícia Pereira dos Santos Melli, pelo auxílio durante a coleta de dados.

Ao Profº Drº Eduardo Antônio Donadi, por possibilitar a realização deste trabalho em seu laboratório.

À Profª Paula Rahal e sua aluna Carolina, ambas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, pela ajuda nos procedimentos laboratoriais.

À Juliana Massaro e Wagner Campos pelos ensinamentos de técnicas laboratoriais.

À Neife, Rubens, Sandra e Flávia pela colaboração durante os procedimentos laboratoriais.

Ao Jonas Bodini Alonso, pela realização das análises estatísticas.

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

À mestranda Marjory Costa, pela participação e apoio durante cada etapa deste trabalho.

Ao programa de pós-graduação em enfermagem fundamental pelo apoio financeiro por meio de verba do PROEX para custeio de parte desta pesquisa.

À todas as participantes deste estudo.

## RESUMO

MATOS, F. M. P. **Polimorfismo do *HLA-G* nas lesões cervicais em mulheres portadoras ou não da infecção pelo HIV-1**. 2015. 114p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

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 (SIL). Ademais, o polimorfismo de inserção/deleção de 14pb da região 3'UTR do gene *HLA-G* está relacionado com a modulação da resposta imunológica. Diante disso, o principal objetivo deste estudo foi identificar a possível associação entre o polimorfismo de 14pb com os diferentes graus de SIL entre mulheres apresentando ou não a infecção pelo HIV-1. Trata-se de um estudo transversal, para o qual foram selecionadas 116 mulheres HPV+ com SIL, sendo 53 com a infecção pelo HIV-1 e 63 sem esta infecção, e coletado amostras biológicas para classificação das SIL, tipificação do HPV e identificação dos polimorfismos de 14pb do gene do *HLA-G*. Entre as mulheres do grupo HIV+, a ocorrência do alelo inserção foi maior entre os casos com lesões de alto grau (HSIL), estando presente em 61,8% destes ( $P = 0,009$ ). O mesmo foi observado com o genótipo ins/del, que ocorreu em 66,7% dos casos de HSIL ( $P = 0,003$ ). Já o genótipo del/del foi identificado em 79% dos casos de LSIL ( $P = 0,003$ ). Já entre as participantes do grupo HIV- não foram encontradas associações significantes entre o grau de SIL e o polimorfismo de 14pb. Os resultados sugerem que entre as mulheres vivendo com HIV/aids, o alelo inserção e o genótipo ins/del são fatores de risco para progressão das SIL e o genótipo del/del um fator protetor, o que não se observou entre as mulheres sem infecção pelo HIV-1.

Palavras-chave: HIV-1. Lesões Intraepiteliais Escamosas Cervicais. HPV, *HLA-G*. Polimorfismo Genético.

## ABSTRACT

MATOS, F. M. P. **HLA-G polymorphism in cervical lesions in women with and without HIV-1 infection.** 2015. 114p. Dissertation (Master) - College of Nursing, University of São Paulo at Ribeirao Preto, Ribeirão Preto, 2015.

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 (SIL). Moreover, the 14pb insertion/deletion polymorphism in the HLA-G 3'UTR is associated with modulation of the immune response. Thus, the objectives of this study was to identify the possible association between the 14pb polymorphism with varying degrees of SIL in women presenting or not HIV-1 infection. It is a cross-sectional study, for which they were selected 116 women HPV+ with SIL, distributed in two groups: 53 with HIV-1 infection and 63 without this, collected biological samples for SIL classification, HPV typing and identification of 14pb polymorphisms. Among women HIV+ group, the occurrence of the insertion allele was higher among cases with HSIL, being present in 61.8% of them ( $P = 0,009$ ). The same was observed with the genotype ins/del, which it occurred in 66.7% of HSIL cases ( $P = 0,003$ ). The genotype del/del been identified in 79% of LSIL cases ( $P = 0,003$ ). Among the HIV- group were no significant associations between the degree of SIL and 14pb polymorphism. The results suggest that among women living with HIV/aids, the insertion allele and genotype ins/del are risk factors for progression of SIL and genotype del/del a protective factor, which was not observed among women without HIV-1 infection.

Keywords: HIV-1. Squamous Intraepithelial Lesion of the Cervix. HPV. HLA-G. Polymorphism, genetic.



## RESUMEN

MATOS, F.M.P. **Polimorfismo del *HLA-G* en las lesiones de cuello uterino en las mujeres con y sin infección por el VIH-1.** 2015. 114p. Tesis (MS) - Escuela de Enfermería de Ribeirao Preto de la Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

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 escamosas de cuello uterino (SIL). Además, el polimorfismo de inserción/delección 14pb de la región 3'UTR del gene *HLA-G* se asocia a la modulación de la respuesta inmune. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue identificar la posible asociación entre el polimorfismo 14pb con diversos grados de SIL entre las mujeres que presentan o no VIH-1. Se trata de un estudio transversal, para lo cual se seleccionaron 116 mujeres VPH+ con SIL, distribuido en dos grupos: 53 estar con infección VIH-1 y 63 sin esta, y muestras biológicas recogidas para la clasificación SIL, tipificación del VPH y la identificación de polimorfismos 14pb. Entre las mujeres el grupo VIH +, la aparición del alelo de inserción fue mayor entre los casos con HSIL, estando presente en el 61,8% de ellos ( $P = 0,009$ ). El mismo se observó con los genotipo ins/del, que se le ocurrió en el 66,7% de los casos de HSIL ( $P = 0,003$ ). El genotipo del/del fue identificado en 79% de los casos de LSIL ( $P = 0,03$ ). Entre el grupo VIH- no se encontraron asociaciones significativas entre el grado de SIL y de 14pb polimorfismo. Los resultados sugieren que las mujeres que viven con el VIH/sida, los alelos de inserción y genotipo ins/del son factores de riesgo para la progresión de SIL y el genotipo del/del factor de protección, que no se observó entre las mujeres sin infección VIH-1.

Palabras clave: VIH-1. Lesiones Intraepiteliales Escamosas de Cuello Uterino. VPH. *HLA-G*. Polimorfismo Genético.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Representação da estrutura do HIV .....	18
<b>Figura 2</b> - Ciclo viral do HIV.....	20
<b>Figura 3</b> - Fases da infecção pelo HIV .....	22
<b>Figura 4</b> - Árvore filogenética de 170 tipos de HPV .....	25
<b>Figura 5</b> - Ciclo de vida do HPV .....	26
<b>Figura 6</b> – Lesões intraepiteliais escamosas .....	31
<b>Figura 7</b> – Localização do HLA no cromossomo 6 .....	36
<b>Figura 8</b> - Estrutura do gene <i>HLA-G</i> e suas isoformas.....	38
<b>Figura 9</b> - Localização da região 3'UTR na gene <i>HLA-G</i> .....	40
<b>Figura 10</b> - Formação de bandas no gel de poliacrilamida não desnaturante 7% após coloração e secagem.....	60

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Programa utilizado na termocicladora para tipificar os alelos HLA-G (região 3'UTR).....	58
<b>Tabela 2</b> - Distribuição das 116 participantes segundo cor da pele, atividade ocupacional, escolaridade e orientação sexual. AMIG, 2013-2015.....	63
<b>Tabela 3</b> - Distribuição das 116 participantes segundo parceiro sexual, DSTs prévias, anticoncepcional hormonal e tabagismo. AMIG, 2013-2015.....	64
<b>Tabela 4</b> - Distribuição das 116 participantes segundo idade na menarca, idade na primeira relação sexual, idade na primeira gestação e número de gestações. AMIG, 2013-2015. ....	65
<b>Tabela 5</b> - Distribuição das 116 participantes segundo grau de lesão intraepitelial cervical e infecção pelo papilomavirus humano AMIG, 2013-2015 .....	65
<b>Tabela 6</b> - Distribuição das 53 participantes do grupo HIV+, segundo carga viral, contagem de linfócitos TCD4+ e classe de antirretrovirais em uso. AMIG 2013-2015. ....	67
<b>Tabela 7</b> - Distribuição dos cruzamentos entre os graus de lesão cervical das 116 participantes com seus principais fatores de risco (tabagismo, uso de anticoncepcional hormonal, doenças sexualmente transmissíveis prévias, parceiro sexual e tipo de papilomavirus humano). AMIG, 2013-2015.....	68
<b>Tabela 8</b> - Distribuição dos cruzamentos entre grau de lesão cervical com carga viral, contagem de linfócitos TCD4+ e uso de antirretrovirais entre as 53 participantes do grupo HIV+. AMIG, 2013-2015.....	68
<b>Tabela 9</b> - Distribuição das 116 participantes segundo polimorfismo de 14 pb do gene <i>HLA-G</i> na região 3'UTR. AMIG, 2013-2015 .....	69
<b>Tabela 10</b> - Distribuição dos cruzamentos entre os tipos de HPV e DSTs prévias com os alelos identificados nas 116 participantes. AMIG, 2013-2015. ....	69

<b>Tabela 11</b> - Distribuição dos cruzamentos entre os tipos de HPV e DSTs prévias com os genótipos identificados nas 116 participantes. AMIG, 2013-2015. ....	70
<b>Tabela 12</b> - Distribuição dos cruzamentos entre carga viral e contagem de linfócitos TCD4+ com os alelos identificados nas 53 participantes do grupo HIV+. AMIG, 2013-2015 .....	70
<b>Tabela 13</b> - Distribuição dos cruzamentos entre carga viral e contagem de linfócitos TCD4+ com os genótipos identificados nas 53 participantes do grupo HIV+. AMIG, 2013-2015 .....	71
<b>Tabela 14</b> - Distribuição dos cruzamentos entre grau de lesão cervical com os alelos e genótipos identificados nas 116 participantes separadas por grupo estudado. AMIG 2013-2015. ....	72
<b>Tabela 15</b> - Distribuição das 63 participantes HIV- e das 53 participantes HIV+, segundo grau de lesão cervical estratificado pelo alelo inserção. AMIG, 2013-2015.. .....	73
<b>Tabela 16</b> - Distribuição das 63 participantes HIV- e das 53 participantes HIV+, segundo grau de lesão cervical estratificado pelo alelo deleção. AMIG, 2013-2015.. .....	73
<b>Tabela 17</b> - Distribuição das 63 participantes HIV- e das 53 participantes HIV+, segundo grau de lesão cervical estratificado pela ocorrência dos genótipos ins/ins, del/del e ins/del. AMIG, 2013-2015 .....	73

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1. HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana .....	16
1.1.1. Breve Histórico .....	16
1.1.2. O vírus e seu ciclo .....	18
1.1.3. Fases da doença .....	20
1.1.4. Epidemiologia .....	22
1.2. Papilomavirus .....	23
1.2.1. Estrutura viral e taxonomia .....	23
1.2.2. Papilomavirus Humano .....	24
1.2.2.1. Organização genômica, classificação, transmissão e infecção .....	24
1.2.2.2. Epidemiologia .....	27
1.2.2.3. Vacinas .....	28
1.3. Lesões Intraepiteliais Escamosas Cervicais .....	29
1.3.1. Classificação .....	29
1.3.2. Fatores de risco .....	31
1.4. Co-infecção HPV-HIV .....	34
1.5. Antígeno Leucocitário Humano – G (HLA-G) .....	35
1.5.1. Caracterização e definição .....	36
1.5.2. Funções .....	38
1.5.3. Polimorfismo de inserção/deleção de 14pb da região 3'UTR .....	40
1.5.4. HLA-G em infecções virais (HIV e HPV) .....	41
1.6. Conhecimento científico e assistência de enfermagem .....	43
<b>2. HIPÓTESE</b> .....	45
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	47
3.1. Geral .....	48
3.2. Específico .....	48
<b>4. MATERIAL E MÉTODO</b> .....	49
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.....	52
4.6.1. Obtenção de amostras cervicais.....	52
4.6.2. Obtenção de amostras de sangue periférico.....	53
4.6.3. Exame anatomopatológico.....	53
4.6.4. Extração do DNA viral do conteúdo cérvicovaginal.....	53
4.6.5. Extração do DNA de células do sangue periférico.....	54
4.7. Análise das amostras.....	55
4.7.1. Detecção e tipificação do HPV.....	55
4.7.1.1. Amplificação do DNA viral.....	55
4.7.1.2. Purificação dos produtos de PCR.....	56
4.7.1.3. Sequenciamento.....	56
4.7.1.4. Análise das sequências.....	57
4.7.2. Tipificação do polimorfismo do <i>HLA-G</i> .....	57
4.7.2.1. Amplificação dos segmentos de DNA.....	58
4.7.2.2. Separação eletroforética dos produtos amplificados.....	58
4.7.2. Coloração com nitrato de prata.....	59
4.8. Análise estatística.....	60
<b>5. Resultados.....</b>	<b>62</b>
<b>6. Discussão.....</b>	<b>74</b>
<b>7. Conclusão.....</b>	<b>90</b>
<b>8. Referências.....</b>	<b>92</b>
<b>9. Apêndices.....</b>	<b>107</b>
Apêndice I – Instrumento de Coleta de Dados.....	108
Apêndice II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	110
<b>10. Anexos.....</b>	<b>112</b>
Anexo I – Aprovação pelo Comitê de ética em Pesquisa.....	113
Anexo II – Aprovação pela Comissão de Pesquisa do departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP.....	114

## ***INTRODUÇÃO***

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

#### 1.1.1. Breve Histórico

A infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida – 1 (HIV-1), na população humana, se iniciou pela transmissão de vírus da imunodeficiência símia (SIV) presente em Chipanzés da subespécie *Pan troglodytes*, nativo de África, por meio do contato de caçadores com sangue contaminado desses animais. Após a transmissão, o SIV sofreu mutações transformando-se no HIV-1. Estima-se que o início da contaminação humana pelo HIV-1, ocorreu por volta de 1920 em Kenshasa, República Dominicana do Congo, entretanto o primeiro tecido humano identificado com HIV-1 é de 1959 de um homem também de Kenshasa (CDC, 2006; COHEN, 2014; FARIA et al., 2014; TAYLOR et al., 2008). Evidências apontam que esta transmissão de SIV para humanos ocorreu em três ocasiões independentes, dando origem aos três grupos conhecidos do HIV-1, classificados de acordo com sua sequência nucleotídea em: M (major), O (outlier) e N (new) (FOCACCIA et al., 2010; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010; SHARP; HAHN, 2010).

O grupo M é reconhecido como a principal causa da pandemia da infecção e apresenta uma variedade genética que permite sua divisão em subtipos, sendo estes: A1, A2, A3, A4, B, C, D, F1, F2, G, H, J e K, além das cepas recombinantes circulantes (CRF) (FOCACCIA et al., 2010; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010). Nas Américas, há predominância da infecção pelo subtipo B conhecido por apresentar a maior distribuição geográfica dentre os subtipos, tendo sua origem na África, seguindo para o Haiti por volta de 1964, posteriormente para os Estados Unidos iniciando-se assim, sua distribuição mundial (FARIA et al., 2014;



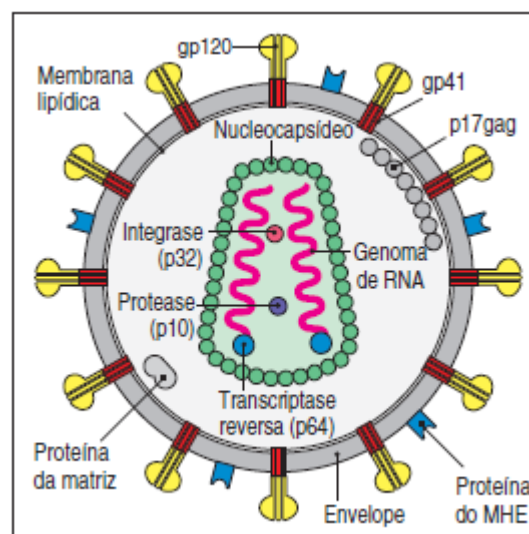
FOCACCIA et al., 2010). No Brasil, especificamente nos estados do sul, há uma significativa infecção pelo subtipo C, o qual apresenta a maior prevalência mundial, porém com baixa distribuição geográfica (BRIGIDO et al., 2011; FOCACCIA et al., 2010)

Em 1981, o Centro para Controle e Prevenção de Doenças (CDC), divulgou um relatório no qual apresentava cinco casos de infecção por *Pneumocystis carinii* entre homens previamente saudáveis, sendo que os cinco referiram praticar sexo com outros homens e, além da pneumonia, apresentavam infecção pelo citomegalovírus e cândida, quadro incompatível com pessoas as quais não apresentam grave imunodeficiência. Mesmo ainda não sendo identificada por este nome, a síndrome da imunodeficiência adquirida foi descrita, neste relatório, pela primeira vez, ganhado o nome aids apenas em julho de 1982 (CDC, 1981). No Brasil, o primeiro caso de aids, conhecido ocorreu em São Paulo, no ano de 1980 e foi diagnosticado retrospectivamente, sendo que o primeiro registro da doença ocorreu apenas em 1982 (BRASIL, 1999).

Somente em 1983 o HIV-1 foi descrito pela primeira vez pelos pesquisadores Robert Gallo, nos Estados Unidos da América e pela equipe de Luc Montagnier, na França, sendo que este ganhou o prêmio nobel em 2008 em reconhecimento por esta descoberta. Porém, o nome HIV só foi estabelecido em 1986 pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV) (CDC, 1983; CDC, 2011; FOCACCIA et al., 2010; GALLO et al., 1983; MONTAGNIER, 1983). Neste mesmo ano, foi identificado outro tipo de retrovírus, isolado de dois pacientes com aids provenientes da África Ocidental, denominado HIV-2, o qual apresenta uma menor infectividade e patogenicidade quando comparado ao HIV-1 e foi transmitido aos humanos pelo contato com o sangue contaminado do macaco *Mangabey sooty* (FOCACCIA et al., 2010; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010; SHARP; HAHN, 2010).

### 1.1.2.O Vírus e seu ciclo

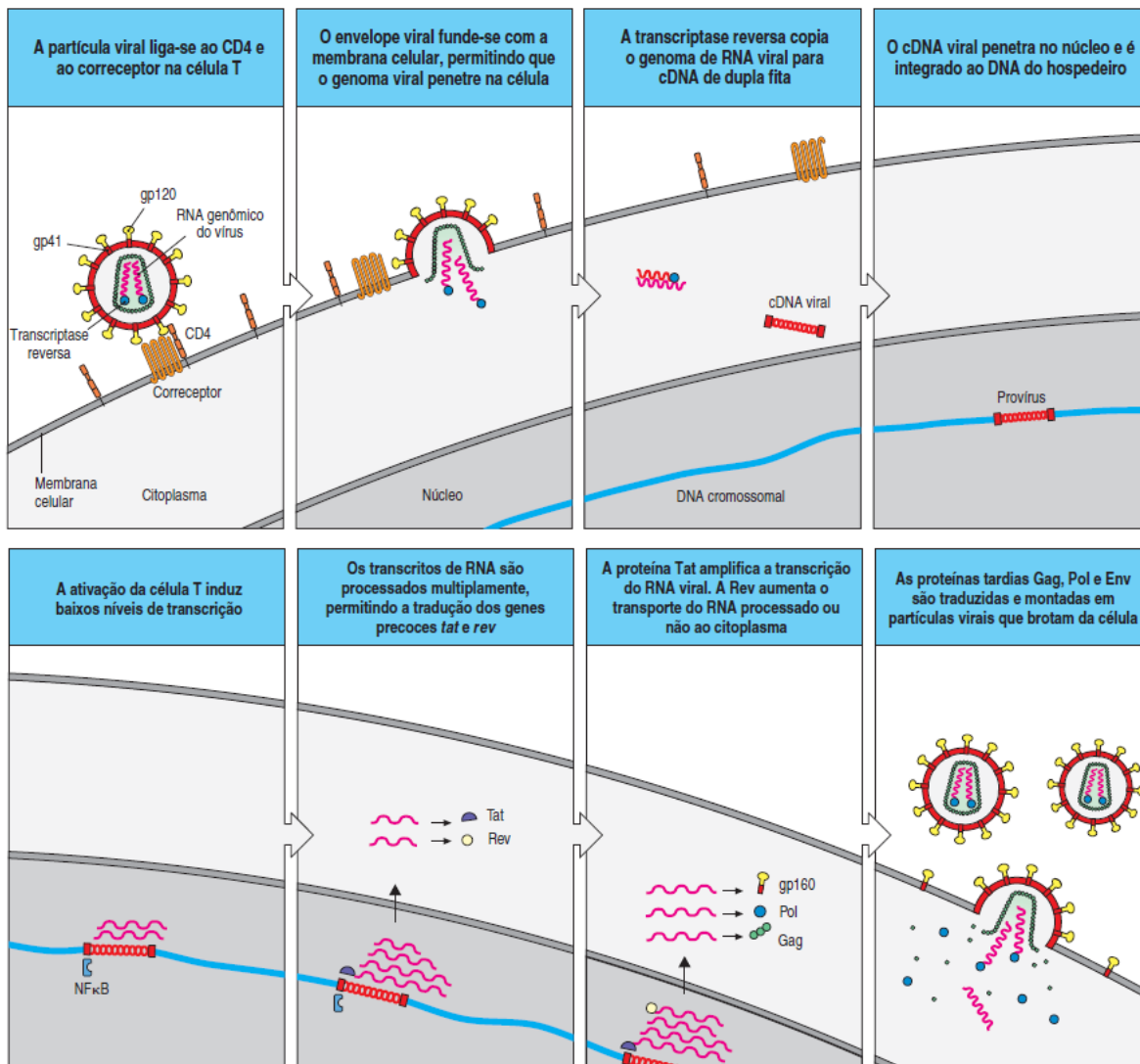
O HIV-1 é um retrovírus envelopado que apresenta uma membrana lipídica em sua superfície, pertencente à família Retroviridae do gênero Lentivirus, devido sua capacidade de replicação por anos sem o início de sinais clínicos da doença. Este retrovírus apresenta de 100 a 120 nm de diâmetro, seu genoma é composto por 2 fitas de RNA simples de polaridade positiva e seu genoma possui aproximadamente 9,8 Kilobases (Kb) apresentando 9 genes e duas regiões LTR (*Long Terminal Repeats*) que contém elementos que controlam a integração, transcrição e poliadenilação dos RNA mensageiros. Dentre os nove genes citados, três são estruturais sendo estes: Gag, responsável pela codificação de proteínas virais no núcleo do vírus; Pol, que codifica as enzimas que participam da integração e replicação viral (integrase, protease e transcriptase reversa); Env, codificador de glicoproteínas do envelope. Dois são genes regulatórios, Tat e Rev, fundamentais para a replicação viral e quatro são genes acessórios, Nef, Vif, Vpr e Vpu, que são essenciais para produção *in vivo* do vírus (FOCACCIA et al., 2010; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).



**Figura 1** – Representação da estrutura do HIV  
**Fonte:** MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010.

A infecção pelo HIV se inicia com a entrada do vírus na célula por meio de duas glicoproteínas de superfície, gp 120 e gp 41. A porção gp 120 une-se com o linfócito TCD4+ por meio de receptores na superfície celular, após esta ligação o gp 41 causa a fusão do envelope viral com a membrana celular permitindo assim, a entrada do genoma e proteínas virais no citoplasma. Entretanto, o linfócito TCD4+ não é o único receptor do HIV, moléculas CCR5 (expressas em células TCD4+ de memória, macrófagos e células dendríticas) e CXCR4 (expressas em células T ativadas) são correceptores do HIV permitindo assim, a entrada do vírus (FOCACCIA et al., 2010; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

Durante as 6 horas iniciais após a infecção, o RNA viral é transcrito em uma cópia de DNA complementar (cDNA), no citoplasma celular, pela transcriptase reversa e ribonuclease H e este cDNA é integrado ao genoma da célula pela enzima integrase, permanecendo na célula até sua morte. O processo de replicação do HIV é dinâmico e contínuo, durante a fase aguda da doença a carga viral varia entre  $10^5$  a  $10^7$  cópias/ml caindo aproximadamente 100 vezes após 8 a 10 semanas. 93 – 99% das partículas virais são produzidas por Linfócitos TCD4+ ativados que possuem meia vida de um dia, porém 1-7% são provenientes de macrófagos, cuja meia vida é de 14 dias ou de células T de memória com tempo de meia vida de 44 meses, dificultando as tentativas de erradicação da infecção. Outro fator limitador da busca pela cura é a alta taxa de variabilidade genética do HIV que ocorre devido a mutações durante a replicação viral, que incorpora erroneamente por volta de  $10^{-4}$  bases a cada ciclo replicativo, permitindo um escape do reconhecimento por anticorpos ou células T citotóxicas e resistências aos antirretrovirais, principalmente quando se usa a monoterapia (FOCACCIA et al., 2010; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).



**Figura 2** – Ciclo viral do HIV  
**Fonte:** MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010

### 1.1.3. Fases da doença

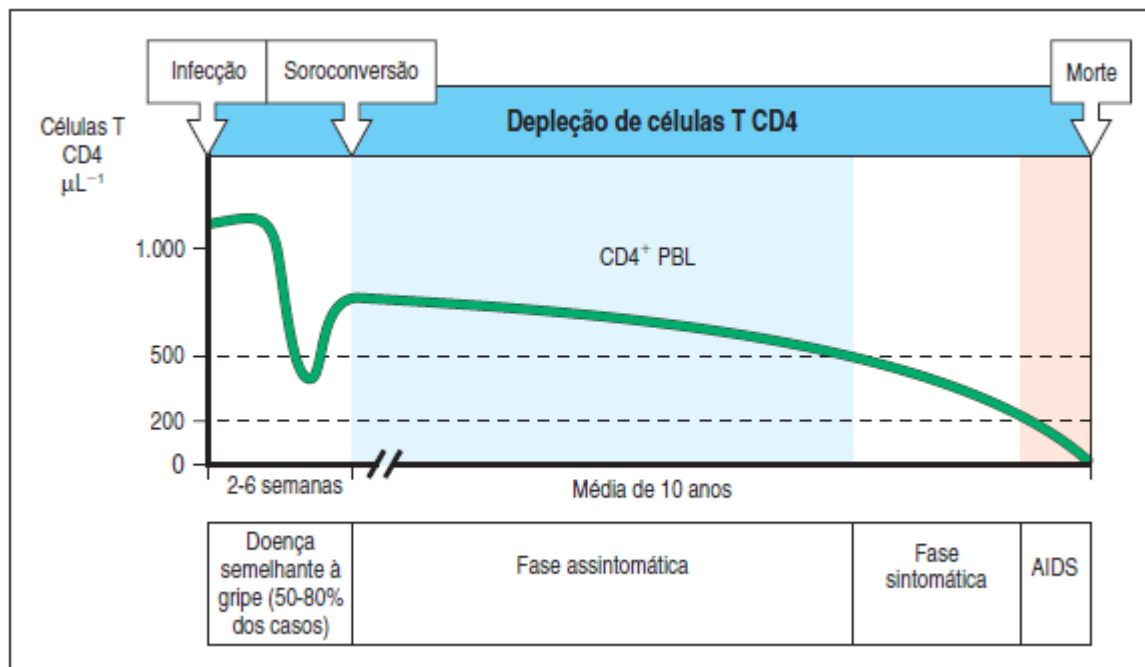
Após a entrada do vírus no organismo humano, dá-se início a infecção que diante de seu amplo espectro de variações pode ser dividido em 3 fases, sendo essas:

Infecção aguda: é definida como o período entre o início da infecção até o soroconversão, ou seja, o aparecimento de anticorpos anti-HIV. É caracterizada

pelo aumento abundante na quantidade de vírus circulante no sangue periférico, resultando em um indivíduo altamente infectante, e pela queda acentuada do número de células TCD4+ devido à grande quantidade de mortes destas células seja por efeitos citopáticos dos vírus ou por apoptose induzida pela ativação. Nesta fase os sintomas são parecidos a outras infecções virais agudas, como a gripe, dentre os sintomas apresentados os principais são: febre, adenopatia, faringite, exantema, mialgia e cefaleia, também podem estar presentes sintomas gastrointestinais, como vômito, diarreia e perda de peso. Esta síndrome é denominada Síndrome Retroviral Aguda (SRA) e devido sua semelhança com demais quadros infecciosos o diagnóstico nesta fase é remoto exceto quando há grandes suspeitas de que a infecção ocorreu. Geralmente estes sintomas desaparecem em 3 a 4 semanas e seu prolongamento por mais de 14 semanas está associado a uma progressão mais rápida da doença (BRASIL, 2013; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

**Fase de Latência Clínica:** Esta fase é delimitada entre o final da fase aguda até o aparecimento de doenças oportunistas e pode durar entre 6 meses a mais de 20 anos. Nesta fase o único achado clínico comum é a linfadenopatia generalizada, que pode embasar o diagnóstico diferencial, podendo ainda estar presentes alguns achados laboratoriais como plaquetopenia, anemia e leucopenia leves. Há também uma queda gradual da função e número de linfócitos TCD4+, mas permanecendo acima de 350 células/mm<sup>3</sup> (BRASIL, 2013; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

**Aids:** Última fase da doença, caracterizada pela queda do número de linfócitos TCD4+ abaixo de 200 células/mm<sup>3</sup> e início das infecções oportunistas, principalmente: pneumocistose, neurotoxoplasmose, tuberculose pulmonar, meningite criptocócica e retinite por citomegalovírus e neoplasias, destacando-se: sarcoma de Kaposi, linfomas não Hodgkin e câncer de colo uterino. (BRASIL, 2013; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).



**Figura 3** - Fases da infecção pelo HIV  
**Fonte:** MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010

#### 1.1.4. Epidemiologia

No Brasil, desde o início da epidemia até junho de 2014 foram notificados 757.042 casos de aids, sendo que o maior número de casos encontram-se nas regiões sul e sudeste que representam 20% e 54,4% do total de casos, respectivamente. Destes casos, 491.747 foram diagnosticados em homens e 265.251 em mulheres. Já o número de óbitos notificados soma 278.306 casos desde 1980, sendo 198.534 entre os homens e 79.655 entre as mulheres. Até o ano de 2008 o número de mulheres diagnosticadas com aids vinha aumentando linearmente chegando a proporção de 1,5 : 1,0 (homens : mulheres), entretanto após esta data vem se observando queda no número de caso entre mulheres e aumento entre os homens, resultando em um proporção de 1,8: 1,0. Em ambos os sexos, a maior concentração dos casos de aids ocorre entre as idades de 25 e

39 anos representando 50,3% dos casos entre as mulheres e 54% entre os homens. (BRASIL, 2014a)

No ano de 2014, foi estimado que 743 mil pessoas vivessem com HIV/aids representando uma prevalência de 0,4%. Já entre a população de 15 a 49 anos a prevalência é de 0,6%, sendo 0,7% entre a população masculina e 0,4% entre a feminina. 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 mais acentuado na região norte e apenas o sudeste apresentou tendência de queda. Neste mesmo período foi observada queda no número de óbitos tendo como causa base a aids e entre o ano de 2004 e 2013 ocorreu redução de 6,6% destes casos, porém entre as mulheres o número de óbitos vem aumentando significativamente (BRASIL, 2014a).

## **1.2. Papilomavírus**

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

O Papilomavirus é um pequeno vírus DNA de até 55nm de diâmetro, com biologia molecular complexa, não encapsulado, que possui 72 capsômeros e infectam animais vertebrados. Possuem genoma circular composto por dupla fita de DNA e comprimento de 8 kb que normalmente possuem 8 genes, sendo o L1 o principal deles (BRAVO et al., 2010; FOCACCIA et al., 2010; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

Foi isolado pela primeira vez há aproximados 40 anos (GISSMAN et al., 1976), porém apenas em 2003 foi aceito, pelo ICTV, sua classificação com base na semelhança de sequências de nucleotídeos L1 (VILLIERS et al., 2004; VILLIERES et al. 2013). Estes são pertencentes à família Papilomaviridae e

classificados de acordo com a porcentagem de semelhança de nucleotídeos do gene L1 em: gêneros, que apresentam mais de 23% de semelhança na sequência de nucleotídeo L1, porém menos de 43% de diferença, em espécies, que dentro de um gênero precisam apresentar entre 60% e 70% de semelhança de nucleotídeo e em tipos, que dentro de uma espécie é necessário que um genoma completo clonado apresente entre 71% e 89% de semelhança na sequência de nucleotídeos L1 além de associação de doenças e diferentes ciclo de vida. (BERNARD et al., 2010; VILLERES et al., 2004).

## 1.2.2. Papilomavirus Humano

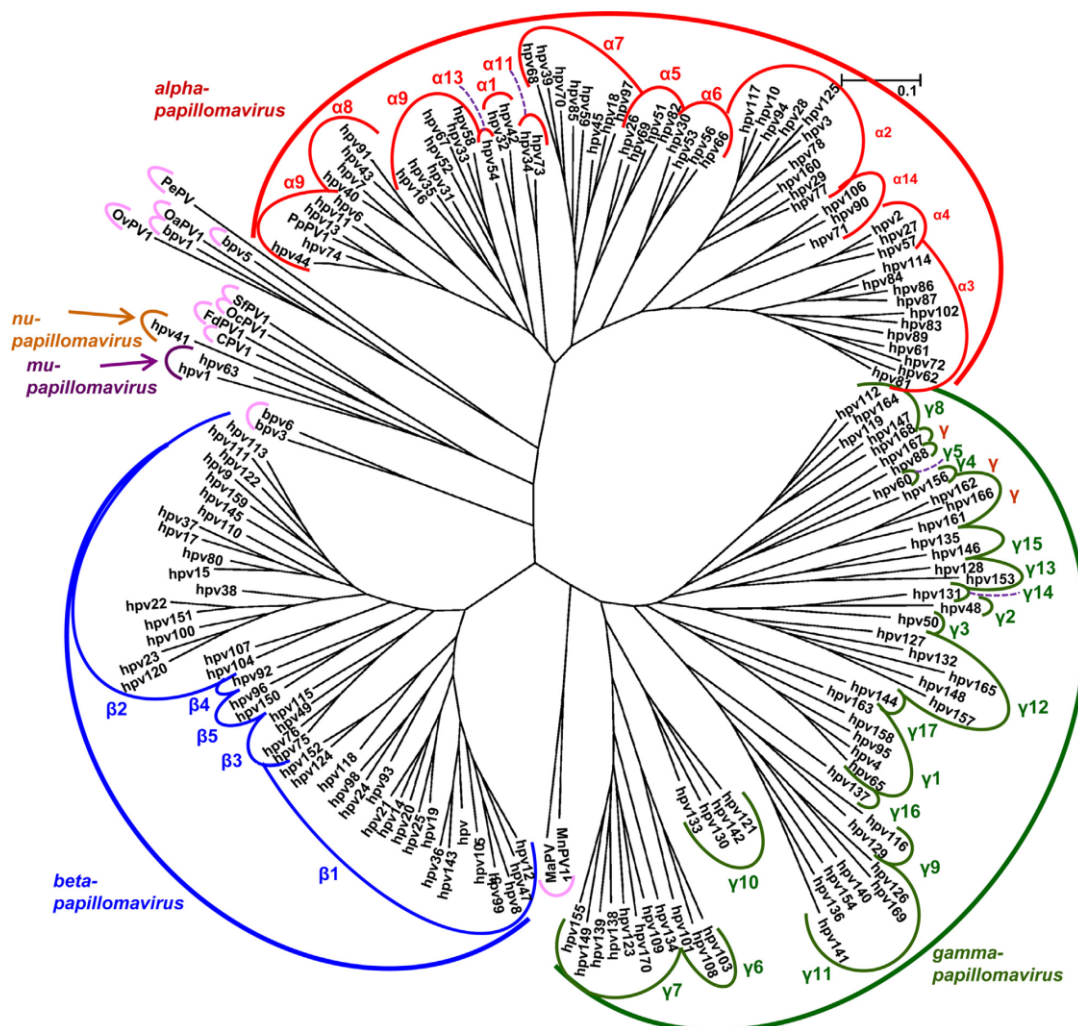
### 1.2.2.1. Organização genômica, classificação, transmissão e infecção

Papilomavirus humano (HPV) são todos os papilomavirus que infectam o ser humano. Estes possuem o genoma viral dividido em 3 segmentos: região *early* (E) que compreende E1, E2, E4-E7 e contem estruturas proteicas necessárias para a ocorrência da replicação viral, região *late* (L) que consistem em L1 e L2 e possui o código para formação de proteínas do capsídeo viral e região longa de controle (LCR), essencial na regulação da replicação viral e transcrição dos genes (MORSHED et al, 2014; FOCACCIA et al, 2010).

Dentre todos os gêneros conhecidos, apenas 5 englobam todos os HPVs, Alphapapillomavirus; Betapapillomavirus; Gammapapillomavirus; Mupapapillomavirus; Nupapillomavirus (BERNARD et al., 2010; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010). Estes vírus também podem ser divididos em três grupos principais sendo eles: HPV cutâneo, que atingem predominantemente áreas não genitais estando associados a lesões verrucosas benignas e são representados, em sua maioria, pelo gênero Beta, HPV associado a *epidermodisplasia verruciforme*, doença autossômica recessiva e HPV



mucocutâneo que causam infecção principalmente na mucosa genital e são representados pelo gênero alfa (BERNARD et al., 2010; FOCACCIA et al., 2010).

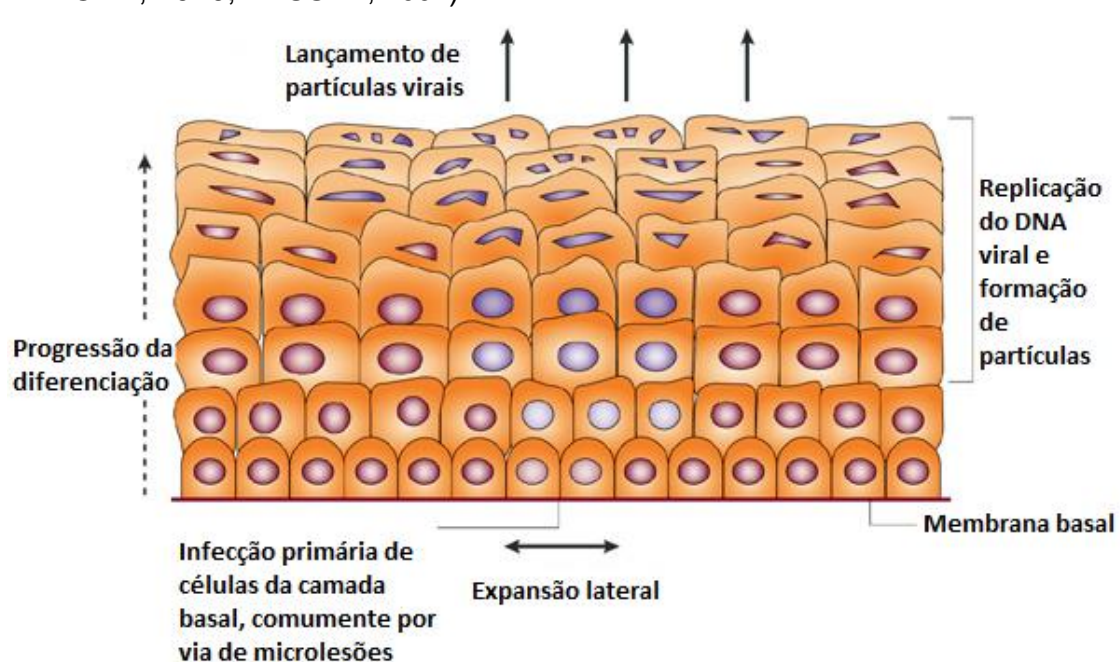


**Figura 4** - Árvore filogenética de 170 tipos de HPV  
**Fonte:** VILLIERS, 2013

Até o momento são conhecidos cerca de 200 tipos de HPV que infectam pele ou mucosa, número que cresce a cada ano. Dentre estes, mais de 40 tipos estão fortemente associados ao desenvolvimento de patologias do trato genital e de acordo com seu potencial oncogênico, são classificados em HPV de baixo (LR) ou de alto risco (HR) para o desenvolvimento de câncer. (FOCACCIA et al., 2010; PAASO et al. 2015; TOMMASINO, 2013; VILLIERS, 2013). Os HPVs de baixo risco estão fortemente associados ao desenvolvimento de lesões condilomatosas 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 por: HPVs 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73 (NOWAKOWSKI et al., 2014), sendo que os tipos 16 e 18 são mundialmente os mais frequentemente encontrados em câncer cervical invasivo (ICC) (SANJOSE et al., 2010).

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, por auto ou hétero inoculação do vírus (CUBIE, 2013; DE PALO; VECCHIONE, 1996; FOCACCIA et al., 2010; SMITH, E. et al. 1991). O HPV infecta o epitélio escamoso e penetra na pele, geralmente por microlesões na pele ou mucosa, infectando a camada de células basais da epiderme. Após ser infectada, a célula se divide e, inicialmente, se espalha de forma lateral, entretanto algumas destas células infectadas migram para a camada suprabasal, onde ocorre a ativação dos genes virais, a replicação do DNA viral e a formação das proteínas do capsídeo. Segue-se então, a formação de partículas virais que são liberadas na superfície podendo infectar tecidos adicionais (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010; HAUSEN, 2002).



**Figura 5** - Ciclo de vida do HPV  
**Fonte:** HAUSEN, 2002 (adaptado)

Após a entrada do vírus, existem três possibilidades de evolução da infecção:

- Permanência da infecção na forma latente, na qual o DNA viral não se liga ao DNA do hospedeiro, ou seja, mantém-se na forma episomal e não produz alteração no tecido. Esta fase pode durar por tempo indeterminado e em menos 10% dos casos pode perdurar a vida toda ou, se tornar ativa por fatores como a imunodepressão (FOCACCIA et al., 2010; VELDHUIJZEN et al., 2010).
- Infecção clínica ou subclínica, na qual os vírus se reproduzem rapidamente causando lesões celulares como espessamento epitelial, multinucleação e atipias celulares. Estas alterações podem ser vistas a olho nú ou com a utilização de ferramentas adicionais sendo classificadas como clínica ou subclínica, respectivamente (CUBIE, 2013; FOCACCIA et al., 2010).
- Eliminação do vírus pelo sistema imunológico, que ocorre na maioria dos casos, sendo que 70% são eliminados no primeiro ano podendo atingir 90% de eliminação após dois anos da infecção. (FOCACCIA et al., 2010; VELDHUIJZEN et al., 2010).

#### **1.2.2.2. Epidemiologia**

Estima-se que, cerca de 80% das mulheres com vida sexual ativa vão ser infectadas pelo HPV em alguma fase da vida, dentre estas apenas em 10%-20% dos casos ocorrerá a progressão para o câncer cervical, associado com o longo período de latência entre a infecção e o surgimento das lesões neoplásicas. Já nos demais casos, a infecção permanecerá assintomática sendo eliminada pelo sistema imunológico (HAUSEN, 2002; TOMMASINO, 2013). 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 de alto grau há prevalência aproximada de 94% (NOWAKOWSKI et al., 2014).

Os mais frequentes genótipos de HPV encontrados em câncer cervical em todo o mundo são os HPV16 e HPV18, estes são detectados em aproximadamente 55% e 15% dos casos, respectivamente, seguidos pelos tipos 31, 33, 35, 45 e 52, 58 que juntos, são responsáveis por 18% dos casos. (JEMAL et al., 2011; MUNOZ et al., 2003; SANJOSE et al., 2010; SMITH, J. et al., 2007).

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. Em todo o mundo 265 mil mortes foram causadas por esta neoplasia somente no ano de 2012, sendo que 87% destes ocorreram em países em desenvolvimento os quais apresentam o dobro da incidência apresentada em países desenvolvidos (BRASIL, 2014b; 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 4º e 5º entre as mulheres do Sudeste e Sul, respectivamente. Para o ano de 2014, foram esperados 15.590 novos casos no país o que deve se repetir este ano (BRASIL, 2014b).

### **1.2.2.3. Vacinas**

As primeiras vacinas para HPV foram licenciadas 2006, sendo aprovadas a Gardasil (Gardasil / Silgard® , a Merck & Co., Whitehouse Station, NJ EUA), uma vacina quadrivalente que é eficaz contra os HPVs 6, 11, 16 e 18, ou seja, protege contra o desenvolvimento de condiloma, lesões vulvares, vaginais e cervicais e a vacina Cervarix (Cervarix® , GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Bélgica), bivalente, que protege apenas contra a infecção pelos HPVs 16 e 18. (NOVAES et al., 2014). Em 2014, uma nova vacina foi aprovada, Gardasil 9 (Gardasil® 9, Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, EUA) esta protege contra os HPVs

---

6/11/16/18 / 31/33/45/52/58 (BRUNI et al., 2015). No Brasil, a Gardasil quadrivalente foi aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) também em 2006 e a Cervarix apenas em 2008. Após a aprovação, ambas ficaram disponíveis apenas em clínicas particulares (HERRERO; GONZÁLES; MARKOWITZ, 2015; NOVAES et al. 2014).

As duas primeiras vacinas aprovadas são elaboradas a partir de proteínas L1 (principal proteína estrutural do vírus) montadas em partículas semelhantes ao vírus. Após sua introdução no organismo, induzem o início de uma grande resposta humoral. (STANLEY; PINTO; TRIMBLE, 2012). Tal resposta imune confere uma eficácia de 97,6% contra o desenvolvimento de lesões cervicais de alto grau causada pela infecção pelo HPV 16 e 100% pelos demais tipos presentes na vacina quadrivalente. Já para lesões vulvares e vaginais a eficácia observada foi de 100% independentemente do tipo de HPV. Tais dados foram obtidos após seguimento médio de 42 meses de mulheres vacinadas ou que receberam placebo. (KJAER et al., 2009).

Até o início de 2012, no mínimo 39 países já haviam incluído a vacinação contra o HPV em seus programas de vacinação, sendo que na América Latina os primeiros países a incorporá-la foram o Peru e Argentina. (MARKOWITZ et al., 2012). Em nosso país, apenas em março de 2014 se iniciou a vacinação com a Gardasil quadrivalente seguindo o esquema de vacinação apenas entre meninas de 11 a 13 anos, no ano seguinte entre 9 e 13 anos, para então, em 2015, fixar a idade de 9 anos no calendário nacional de imunização. (NOVAES et al., 2014).

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

#### **1.3.1. Classificação**

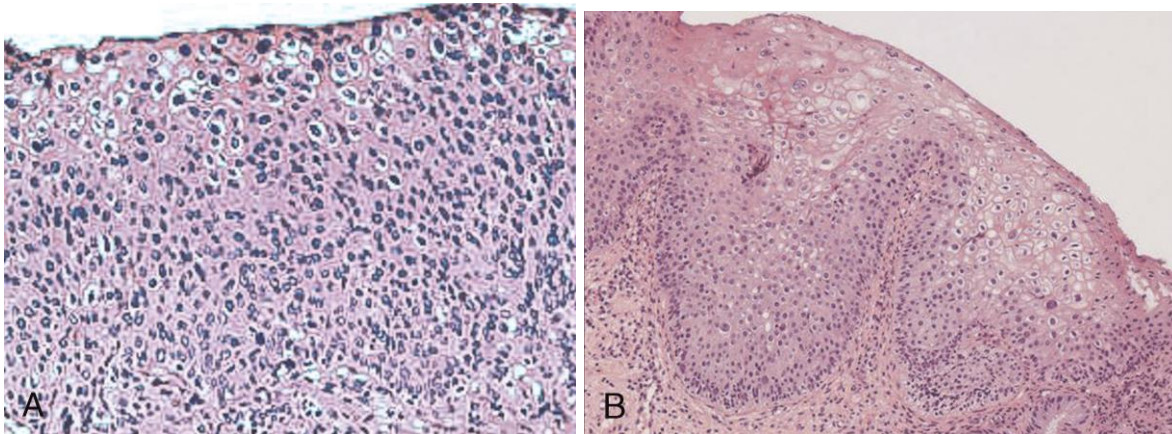
A primeira descrição de lesões cervicais pré-cancerígenas foi realizada por John Williams em 1988 (DARRAGH et al., 2012) e sofreu sua primeira mudança significativa na terminologia em 1967 quando o pesquisador Richart introduziu o termo neoplasia intraepitelial cervical (NIC), comumente dividindo em 3 grupos de acordo com a histologia: NIC I – atipias celulares no terço inferior do epitélio escamoso, NICII – ocupação de atipias por dois terços inferiores do epitélio e NIC 3 – comprometimento superior a dois terços do epitélio ou sua totalidade. (AIDÉ et al., 2009; DARRAGH et al., 2012). Em 1988, na tentativa de unificar a terminologia e melhorar o manejo das lesões cervicais, foi publicada uma classificação colpocitológica chamada de Sistema Bethesda no qual as NIC-1 foram classificadas como lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (LSIL) e NIC-2 e 3 agrupadas em lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (HSIL) (AIDÉ et al., 2009; DARRAGH et al., 2012; RICHART, 1990). Esta é terminologia mais aceita e indicada para descrição de tais lesões conseguindo reunir aspectos citológicos e histológicos (DARRAGH et al. 2012, MANIAR; NAYAR 2014) e também, tem seu uso recomendado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2012).

De acordo com esta terminologia, as lesões cervicais são classificadas em:

LSIL: Caracterizada por proliferação de células escamosas com alterações nucleares tais como, aumento do tamanho do núcleo ou irregularidade em suas membranas. Há pouca maturação citoplasmática no terço inferior do epitélio, porém apresenta-se normal no terço superior (DARRAGH et al., 2012; MANIAR; NAYAR, 2014).

HSIL: Caracterizada por proliferação de células escamosas ou metaplasicas com alterações nucleares. Há rara ou inexistente diferenciação citoplasmática no terço médio e superior do epitélio e a mitose anormal pode ser observada por todo o epitélio inclusive no terço superior (DARRAGH et al., 2012; MANIAR; NAYAR, 2014).





**Figura 6** – Lesões intraepiteliais escamosas: A – Lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL), B – Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau LSIL

**Fonte:** DARRAGH et al., 2012

### 1.3.2. Fatores de risco

O fator de risco principal para o desenvolvimento de LSIL, HSIL e câncer do colo do útero é presença da infecção pelo HPV e aspectos virais como o genótipo do vírus e sua carga viral (BRASIL, 2014b; NOWAKOWSKI et al., 2014), porém há outros fatores que podem influenciar no desenvolvimento das lesões cervicais, entre estes, destacam-se:

Método anticoncepcional hormonal: segundo estudos multicêntricos conduzido pela Agência Internacional de Investigação do Câncer (IARC), o uso prolongado de anticoncepcionais orais combinados por mais de 5 anos por mulheres HPV+ resulta em um risco aumentado em 4 vezes para desenvolvimento de ICC quando comparado com mulheres que não fazem uso destes (MARKS et al., 2011; MORENO et al., 2002 SMITH J et al., 2003). Diversos outros estudos também encontraram associação entre o uso de anticoncepcionais hormonais com a infecção pelo HPV e/ou desenvolvimento de lesões cervicais (LEE et al., 2014; LESLIE et al., 2014; SARIAN et al., 2009; STENSE et al., 2015; VINODHINI et al., 2012).

---

A hipótese sugerida para este risco aumentado encontra-se nos hormônios esteroides presentes nos anticoncepcionais combinados, que podem atuar induzindo o aumento da atividade transformadora dos oncogenes do HPV interferindo na resposta do hospedeiro e na resolução das lesões cervicais (MARKS et al., 2011; PINTO; TÚLIO; CRUZ, 2002). Estes hormônios também podem contribuir para o aumento da expressão de oncogenes, em especial E6 e E7, por meio da ligação de progesterona e de receptores de glicocorticóides à LCR do HPV (KWASNIEWSKA et al., 2011).

Comportamento sexual: a idade precoce de início da vida sexual é um fator associado ao aumento do risco para infecção pelo HPV, entretanto este dado está fortemente associado ao número de parceiros sexuais, pois quanto mais precoce ocorre o início das atividades sexuais, maior a possibilidade de número de parceiros e quanto maior o número de parceiros sexuais, maiores são as chances de adquirir o HPV (ALMONTE et al., 2008; LIN et al., 2015; PLUMMER; PRETO; FRANCESCHI, 2012; SARIAN et al., 2009; VINODHINI et al., 2012).

Paridade: Na literatura é possível encontrar diversos estudos que associam a paridade com a infecção pelo HPV ou com lesões cervicais, mas com abordagens distintas. Um estudo de 2008 aponta que mulheres com 7 ou mais gestações apresentam risco aumentado para o desenvolvimento de câncer de colo uterino em comparação as mulheres que tiveram até 2 gestações a termo. (ALMONTE et al., 2008). Outro estudo de 2009 concluiu que uma única gestação é suficiente para aumentar os riscos de desenvolvimento de HSIL em comparação com as nuligestas (SARIAN et al., 2009). Uma pesquisa de 2012 mostrou que três ou mais gestações é um fator de risco para infecção pelo HPV (VINODHINI et al., 2012). Já um recente estudo de 2015, não encontrou relação entre a persistência da infecção pelo HPV com o número de gestações (STENSE et al., 2015). Como nota-se, não há clareza quando a associação da paridade com a infecção e persistência do HPV ou com o desenvolvimento de lesões cervicais.

Doenças Sexualmente Transmissíveis (DSTs): A principal DST associada ao risco aumentado de desenvolvimento de lesões cervicais é o HIV, uma vez que devido à imunodeficiência há risco aumentado para a persistência do HPV. Outras



DSTs como a clamídia, herpes simples e condiloma também estão associadas ao aumento do risco de desenvolvimento de câncer cervical entre mulher HPV+ (ALMONTE et al., 2008; IMAI et al., 2015; LEE et al., 2014; SMITH, J. et al., 2002; SMITH, J. et al., 2004; STENSE et al., 2015).

Tabagismo: A incidência de HPV e lesões cervicais são maiores entre mulheres fumantes e 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). Além disso, entre as fumantes há diminuições da regressão das LSIL que geralmente ocorre em até 2 anos após a infecção. (MATSUMOTO et al., 2010). Na literatura há uma ampla disponibilidade de estudos que confirmam a existência de associação entre a prevalência e persistência do HPV e desenvolvimento de lesões cervicais com o hábito de fumar (IMAI et al., 2015; LEE et al., 2014; LIN et al., 2015; SIMEN-KAPEU et al., 2009; SYRJANEN et al., 2007; TRAN et al., 2015).

A influência do tabagismo sobre as lesões cervicais pode ser explicada por dois mecanismos principais, pela exposição direta do DNA de células epiteliais cervicais com as substâncias cancerígenas do tabaco, principalmente com a nicotina e cotidina e pelos prejuízos na imunidade celular e humoral do hospedeiro (PINTO; TÚLIO; CRUZ, 2002). A imunidade celular dentre as fumantes de longo prazo fica afetada devido à redução da contagem de linfócitos TCD4+, o que contribuiu com a susceptibilidade para adquirir infecções (ARCAVI; BENOWITZ, 2004) e pela diminuição do número de células de Langerhans na cérvix das fumantes, importantes na apresentação de antígenos (PINTO; TÚLIO; CRUZ, 2002; SYRJANEN et al., 2007). Já a imunidade humoral é afetada pela redução dos níveis de IgA, IgG e IgM em 20% dentre as fumantes (ARCAVI; BENOWITZ, 2004).

Fatores imunogenéticos: Qualquer alteração no sistema imunológico que diminua a resposta imune é um fator de risco para incidência e persistência da infecção pelo HPV e progressão para lesões cervicais (YANG et al., 2013). Dentre as possíveis causas estão as variações genéticas, em especial do *HLA-G* que será abordada no decorrer deste trabalho.

#### 1.4. Co-infecção HPV – HIV

O HIV, assim como outras doenças sexualmente transmissíveis, é um fator de risco para o desenvolvimento de lesões cervicais. Em mulheres portadoras do vírus, a prevalência de LSIL é de aproximadamente 36,8% e de HSIL de 5,3%. Neste grupo, a prevalência de infecção pelo HPV é dependente da população estudada, do grau de imunocomprometimento e das técnicas de detecção viral, variando entre 36% e 84% (CLIFFORD et al., 2006; URSU et al., 2015; ZHANG et al., 2012) e na população geral, varia entre 22,6% e 42,2% (URSU et al., 2015; VINODHINI et al., 2012). Considerando apenas a população vivendo com HIV/aids com HSIL, o HPV está presente em aproximadamente 84% a 90% dos casos, semelhante ao encontrado na população geral (CLIFFORD et al., 2006; MARKS et al., 2015).

Diferenças maiores são encontradas em relação à infecção por mais de um genótipo de HPV simultaneamente e quanto à persistência da infecção quando comparado os grupos com ou sem a infecção pelo HIV-1. O risco de infecção por mais de um genótipo de HPV é maior entre as mulheres vivendo com HIV/aids quando comparado com a população geral, ocorrendo em 20,8% e 3,1% dos casos, respectivamente. Quando associado com HSIL, este achado ocorre em 41,4% dos casos dentre as mulheres com a infecção pelo HIV-1 e em 6,7% dos casos na população geral 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). Já a persistência do HPV, após acompanhamento por 12 meses, é de 47,5% dentre as mulheres vivendo com HIV/aids e de apenas 21,1% entre as mulheres sem a infecção por este vírus (ZAHANG et al., 2012).

De forma geral, a imunodeficiência, em especial a redução do número de linfócitos TCD4+ (<250 células), está associada com maior prevalência e persistência da infecção pelo HPV e desenvolvimento das lesões cervicais. Já o uso de antirretrovirais por 2 anos ou mais confere efeito protetor. 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).

Entretanto, além da persistência da infecção pelo HPV e progressão das SIL devido a interferência da infecção pelo HIV-1 na função imunológica do indivíduo, algumas interações moleculares são observadas, a proteína TAV, do HIV-1, parece estar associada à proliferação celular diante da infecção pelo HPV favorecendo o crescimento tumoral (NYAGOL et al., 2006). Já a proteína TAT 1, também do HIV, pode interagir com a proteína E2 do HPV e causar sua inibição, resultando no aumento da expressão das proteínas E6 e E7 do HPV (KIM et al., 2008).

## **1.5. Antígeno Leucocitário Humano-G (HLA-G)**

### **1.5.1. Caracterização e definição**

O complexo principal de histocompatibilidade (MHC) foi descrito pela primeira vez em 1937 durante estudos sobre transplantes realizados em camundongos, pelo pesquisador Peter Gorer. O MHC é uma região encontrada no genoma de todo vertebrado e é constituído por genes com importantes funções imunológicas. (ABBAS; LICHTMAN, 2005; GORER, 1937). Estes genes estão localizados no braço curto do cromossomo 6, que ocupa uma região de aproximadamente 7,6 megabases de DNA, contendo 421 loci com 252 genes expressos (HORTON et al., 2004).

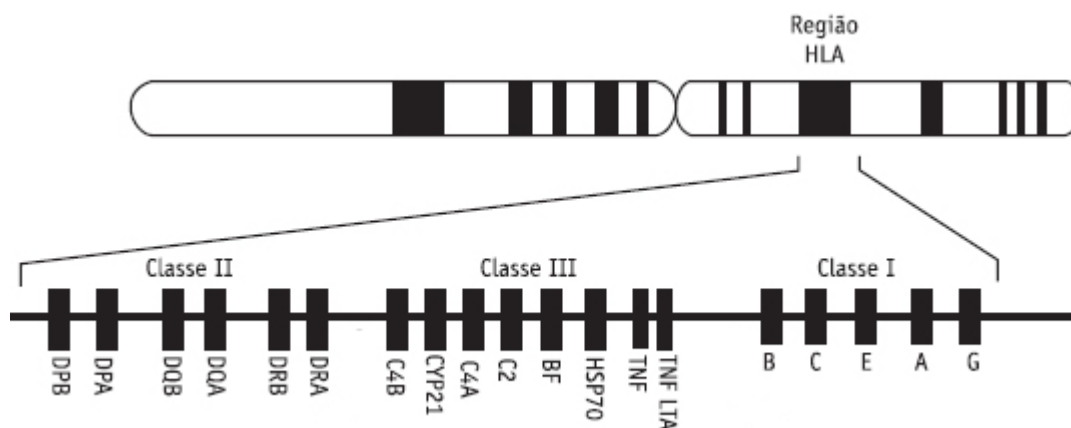
Os antígenos leucocitários humanos (HLA) são moléculas codificadas pelos genes do MHC que atuam na imunossupressão e imunomodulação das respostas antitumorais e divididas didaticamente em 3 grupos, de acordo com sua estrutura e função dos produtos gênicos (DONADI et al., 2011). Sendo estes:

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: Não codificam moléculas de histocompatibilidade mas sim, várias proteínas do sistema imune, incluindo componentes do sistema complemento e moléculas envolvidas na inflamação (ACTOR, 2007).



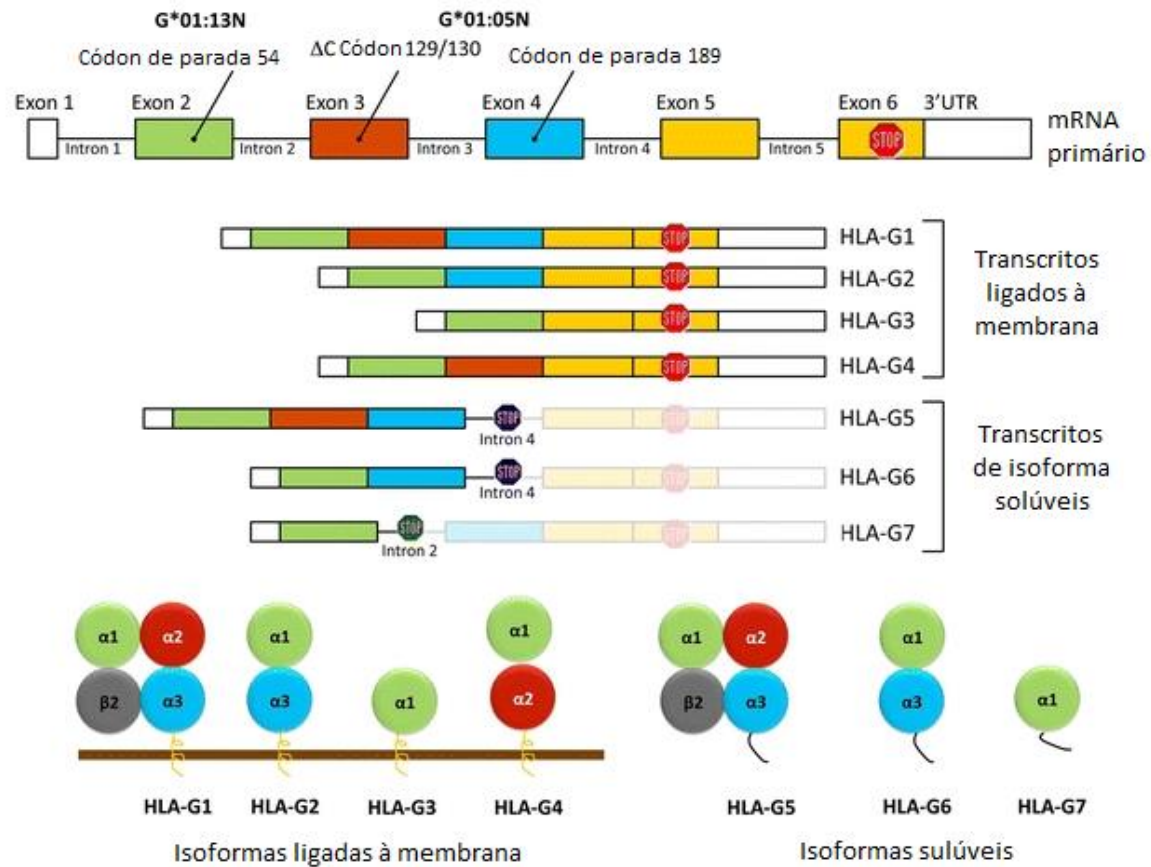
**Figura 7** - Localização do HLA no cromossomo 6.

**Fonte:** UTIYAMA; REASON; KOTZE, 2004

Ocupando papel de destaque dentre as moléculas HLA, encontra-se a molécula HLA-G, descrita inicialmente em 1987 por Geraghty, (GERAGHTY; KOLLER; ORR, 1987), é uma molécula de histocompatibilidade de classe I não clássica que tem sido fortemente associada ao mecanismo de escape do reconhecimento e destruição das células tumorais. (DONADI et al., 2011; TRIPATHI et al., 2006). Esta molécula difere de outras HLA I clássicas devido a algumas de suas características, tais como: (i) variabilidade proteica limitada, (ii) presença de várias isoformas solúveis e ligadas à membrana, geradas por splicing alternativo do transcrito primário, (iii) possui uma reduzida cauda citoplasmática, (vi) atua na modulação da resposta imune, e (v) apresenta expressão restrita ao tecido (DONADI et al., 2011).

Já as características moleculares do HLA-G se aproximam das encontradas nas moléculas clássicas e estas também apresentam uma cadeia pesada constituída por até 3 domínios, não-covalentemente associada a  $\beta$ 2-microglobulina, além disso apresentam um domínio citoplasmático encurtado uma vez que possui um códon de paragem prematuro no exon 6. (CAROSELLA et al., 2008; DONADI et al., 2011; GONZÁLES et al., 2012). Assim como a molécula, o gene *HLA - G* também se apresenta semelhante aos loci dos HLA clássicos, exibindo 7 introns e 8 exons, responsáveis pela codificação da cadeia pesada da molécula e estão localizados no cromossomo 6. O exon 1 codifica o peptídeo de sinal, os exons 2, 3 e 4, codificam os domínios extracelulares  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 e  $\alpha$ 3, respectivamente, e os exons 5 e 6 a transmembrana e o domínio citoplasmático da cadeia pesada, já o éxon 7 sempre está ausente do RNAm maduro e, devido ao já citado códon de parada, o éxon 8 não é traduzido e é conhecido como região 3'UTR não traduzida (CAROSELLA et al., 2008; DONADI et al., 2011).

O transcrito primário produzido pela transcrição do gene *HLA-G* pode sofrer splicing alternativo podendo produzir 7 isoformas, dentre estas encontram-se 4 ligadas à membrana (HLA-G1, G2, G3 e G4) e 3 solúveis (HLA-G5, G6 e G7). A isoforma HLA-G1 é completa, pois possui estrutura semelhante a molécula HLA clássica, ou seja, possui os 3 domínios alfa e está ligada a  $\beta$ 2-microglobulina, a HLA-G2 possui os domínios  $\alpha$ 1 e  $\alpha$ 3, a HLA-G3 apenas o domínio  $\alpha$ 1 e a isoforma HLA-G4 é composta por  $\alpha$ 1 e  $\alpha$ 2. Já entre as isoformas solúveis, a HLA-G5 e a HLA-G6 apresentam os mesmos domínios que as formas solúveis HLA-G1 e HLA-G2, respectivamente, e são geradas por transcritos conservando o íntron 4, que bloqueia a tradução do domínio transmembrana (exão 5). A região 5' do íntron, durante a fase de leitura do éxon 4, é traduzida até à geração de um códon de parada, que confere a estas duas isoformas solúveis uma cauda de 21 aminoácidos resultando na sua solubilidade. A última isoforma solúveis, HLA-G7, apresenta apenas o domínio  $\alpha$ 1 conservando dois aminoácidos codificados pelo íntron 2. Os transcritos alternativos não possuem o exão 7 (DONADI et al. 2011; GONZÁLES et al., 2012; ISHITANI; GERAGHTY, 1992).



**Figura 8** - Estrutura do gene *HLA-G* e suas isoformas  
**Fonte:** Donadi, et al. 2011 (adaptado)

### 1.5.2. Funções

O HLA-G é uma molécula imunossupressora e tolerogênica capaz de inibir todos os tipos de células imunocompetentes. Este efeito é mediado pela ligação direta das isoformas solúveis ou ligadas à membrana em receptores inibitórios tipo imunoglobulina expressas por linfócitos T, linfócitos, B, Células NK e monócitos (LILRB1) e por macrófagos, células dendríticas e também monócitos (LILRB2). Tais receptores interagem também com moléculas HLA de classe I clássicas, no entanto apresenta de 3 a 4 vezes maior afinidade de ligação com HLA-G. Já as células NK expressam um receptor específico para HLA-G, KIR2DL4, que

diferentemente dos demais receptores inibidores, pode também mediar a ativação. (AMIOT; VU; SAMSON, 2014; CAROSELLA, 2011; DONADI et al., 2011).

O *HLA-G* atua na modulação da resposta inata e adaptativa interagindo com os linfócitos T e B, células NK ou células polimorfonucleares e pode exercer propriedades inibitórias em todas as etapas da resposta imunológicas tais como: diferenciação, proliferação, citólise, secreção de citocina e produção de imunoglobulina. Podem ainda, alterar a apresentação de antígenos aos linfócitos T através da inibição da função e maturação de células dendríticas e por efeitos específicos nos linfócitos T e B gerados durante as atividades efetoras (AMIOT; VU; SAMSON, 2014).

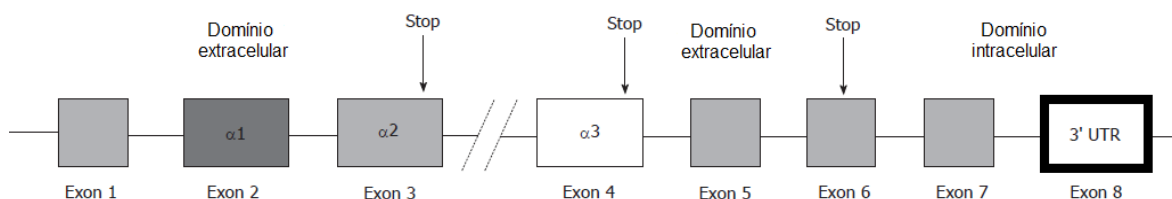
As principais funções do *HLA-G* podem ser divididas em 3 grupos sendo estes: (i) funções imunológicas inibitórias diretas por meio do bloqueio de células efetoras, que ocorre pela interação do *HLA-G* com receptores inibitórios levando a inibição da função citolítica e proliferação de células de defesa; (ii) funções imunológica inibitórias indiretas por geração de células reguladoras, que diferentemente do grupo de funções anteriores, geram funções tolerogênicas a longo prazo, como por exemplo, ao estimular linfócitos TCD4+ e TCD8+ o *HLA-G* faz com ocorra a diferenciação em células T reguladoras capaz de inibir a reatividade de outras células T; (iii) outras funções que resulte em inibição da resposta imune, tais funções são menos conhecidas e descobertas a menos tempo e incluem funções como a capacidade do *HLA-G* de influenciar a expressão e liberação de IFN- $\gamma$  por células NK e modulação de receptores de citocinas e quimiocinas (CAROSELLA, 2011; GONZÁLES et al., 2014).

Em resumo, as principais e mais conhecidas propriedades imunossupressoras exercidas pelo *HLA-G* incluem: inibição da função citolítica de células T e NK e de sua proliferação, inibição da proliferação de linfócitos B, indução da apoptose por células NK e T CD8+ ativadas, inibição da função dos neutrófilos, inibição da ativação e proliferação de linfócitos TCD4+, maturação de células dendríticas e indução de células T reguladoras (AMIOT; VU; SAMSON, 2014; CAROSELLA, 2011; CONTINI et al., 2003; LE ROND et al., 2006).

### 1.5.3. Polimorfismo de inserção/deleção de 14pb na região 3'UTR

Polimorfismos genéticos são um dos temas definidos como prioridades de pesquisa em saúde segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2008a). Apresentam importante relação, dentre outras, com a predisposição para infecções e doenças autoimune (DONADI et al, 2011).

O éxon 8, conhecido como região 3' não traduzida (UTR), apresenta vários sítios polimórficos que potencialmente podem influenciar na estabilidade do mRNA, no volume, na mobilidade e no padrão de splicing afetando assim, o papel biológico do gene. Nesta região, há uma numerosa variação de nucleotídeos o que pode influenciar na expressão e distribuição do HLA-G em tecidos saudáveis ou ainda em condições patológicas. O aumento da expressão de HLA-G resulta em uma diminuição da resposta imune facilitando a progressão de infecções ou, nos casos de enxertos, sua expressão aumentada é benéfica, pois diminui as taxas de rejeições (DONADI et al., 2011). O HLA-G, diferentemente dos *HLA- I* clássicos, apresenta um baixo nível de polimorfismo. (KOBATS et al., 1990).



**Figura 9-** Localização da região 3'UTR na gene *HLA-G*  
**Fonte:** BORTOLOTTI et al., 2014 (adaptado)

O polimorfismo de Inserção/Deleção de 14 pares de base (pb) na região 3'UTR do gene *HLA-G* é caracterizado pelo aumento ou perda de um fragmento de 14pb (5'-ATTTGTTTCATGCCT-3'), respectivamente (HARRISON et al., 1993). A inserção e deleção estão associados, principalmente, com a expressão de HLA-G devido a diferenças na estabilidade do mRNA e pelo padrão de splicing.



Diversos estudos tem avaliado a associação entre o polimorfismo de 14pb com a expressão de HLA-G, entretanto os resultados são controversos. Grande parte destes, apontam que o alelo inserção está associado com uma diminuição na produção de mRNA e da expressão de isoformas solúveis e ligadas à membrana. (CASTELI et al., 2014; HVIID et al., 2003; HVIID, et al., 2004; HVIID et al., 2006; MARTELLI-PALOMINO et al., 2013), entretanto um recente estudo sugere que o alelo inserção aumente a expressão do HLA-G1 (SVENDIZEN et al., 2013). Ademais, devido a ocorrência de uma etapa adicional de splicing alternativo, que ocorre apenas quando há inserção de 14pb no transcrito primário, ocorre a retirada de 92pb do mRNA, (incluindo a própria sequência de 14pb) gerando assim, transcritos menores que se mostram mais estáveis. Entretanto, esta perda de 92pb ocorre apenas em uma fração dos mRNA que apresentam a sequência de 14pb (ROUSSEAU at al., 2003) e não se mostra suficiente para explicar a possível ocorrência de aumento da expressão de HLA-G. Além disso, este splicing alternativo pode não ocorrer apenas pela inserção de 14pb, mas pela associação com outros sítios polimórficos em desequilíbrio de ligação com a inserção de 14pb (CASTELI et al., 2014; DONADI et al., 2011).

#### **1.5.4. HLA-G em infecções virais (HIV e HPV)**

Alguns vírus desenvolveram estratégia para escapar das respostas imunes do hospedeiro. Dentre estas, encontra-se a baixa regulação de HLA de classe I clássicas, prevenindo a exibição de peptídeos virais resultando no escape da citólise por linfócitos T. Nesta situação, as células infectadas pelo vírus deveriam ficar susceptíveis a ação das NK, entretanto estes vírus também desenvolveram algumas estratégias para escape do reconhecimento por células NK entres estas, a indução da expressão de HLA-G, que devido as suas funções imunossupressoras, pode contribuir com a susceptibilidade e persistência de infecções virais (DONADI et al., 2011; GONZÁLES et al., 2012).

A expressão de HLA-G, como já citado, é influenciada, dentre outros fatores, por polimorfismos na região promotora e 3'UTR. O polimorfismo de 14pb, em especial, vem sendo apontado como influenciador do resultado da infecção. Em um estudo recente foi identificado que pessoas com o vírus HIV que apresentam o alelo inserção apresentam maior sobrevida quando comparadas com indivíduos homozigotos para deleção de 14pb. Tal pesquisa aponta ainda que dentre o grupo de indivíduos que apresentam o genótipo del/del a contagem de linfócitos TCD4+ é menor que entre indivíduos com o alelo inserção (LARSEN et al., 2013)

Em infecções pelo HIV há ainda um aumento de sHLA-G durante a fase aguda da doença retornando aos níveis normais em sua fase crônica, contudo entre pacientes que apresentam progressão rápida para aids os níveis de sHLA-G continuam elevados (LARSEN et al., 2013). Com o aumento de sHLA-G, ocorre uma desregulação de sinalização de CXCR3 devido à deficiência de CXCL10 levando a uma resposta antiviral prejudicada uma vez que os sHLA-G regulam negativamente os níveis de CXCR3 (AMIOT; VU; SAMSON, 2014). Esta queda de sHLA-G está associada com a introdução da terapia antirretroviral (TARV) e favorece o aumento de células CD8+ e recuperação de sua função citotóxica (MURCADA et al., 2009).

Outra importante função da TARV, que influencia na evolução da infecção, foi apresentada em um estudo comparativo entre diferentes classes de antirretrovirais, mostrando que os inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (INTR) aumentam a expressão de HLA-G em monócitos e linfócitos T, principais células que expressam HLA-G em infecções virais, já os inibidores da protease (IP) não apresentam tal característica (AMIOT; VU; SAMSON, 2014; RIVERO et al., 2007). Esta diferença se mostra importante uma vez que a presença de HLA-G na superfície de monócitos dificulta sua destruição por linfócitos T e células NK funcionando como um importante reservatório viral (RIVERO et al., 2007).

Já em relação ao HPV, em todos os casos de infecção por este vírus associado com ICC há baixos níveis de expressão de HLA-G5. Existe ainda, um

possível envolvimento do HPV E5 na diminuição da expressão do pseudogene HLA-G na superfície celular uma vez que, oncoproteínas de HPV 16 e 18 podem inibir os promotores de genes de HLA de classe I de cadeia pesada e podem modular os níveis do transportador associado com o processamento de antígenos (AMIOT; VU; SAMSON, 2014).

Referente ao papel do polimorfismo de 14pb, um estudo com 1372 mulheres saudáveis, com HSIL e ICC identificou relação significativa entre o genótipo homozigoto de inserção de 14pb de HLA-G e a progressão de HSIL para câncer invasivo (FERGUSON et al., 2012). Outro estudo com 219 participantes concluiu que mulheres com o alelo G\* 0103 ou o genótipo G0101/0104 podem ter uma maior proteção em relação ao desenvolvimento de lesões cervicais. Já as que apresentam co-infecção por HPV 16 e 18, que possuem o haplótipo G0104/ins, apresentam risco aumentado para o desenvolvimento de HSIL quando comparadas com mulheres infectadas por outro genótipo de HPV ou sem a infecção (SIMOES et al., 2009). Já a participação dos polimorfismos do gene HLA-G na persistência da infecção pelo HPV é reforçada pela conhecida associação do genótipo del/del como sendo um fator de risco para infecção viral. (BORTOLOTTI, et al. 2014; GIMENES et al., 2014).

Sendo assim, o genótipo ins/ins está associado com maior progressão das lesões intraepiteliais cervicais e o genótipo del/del vem sendo considerado um fator de risco para infecção pelo HPV. Tais ocorrências podem ser possíveis, pois sendo um baixo produtor de HLA-G, o alelo inserção age como um facilitador na criação de um ambiente inflamatório que, na presença da infecção pelo HPV, pode aumentar a progressão das lesões cervicais (BORTOLOTTI et al., 2014)

## **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 com intuito de melhoria da qualidade de vida do indivíduo. (FLÓRIA-SANTOS et al., 2013). O enfermeiro é o profissional que representa a maior força de trabalho na equipe de saúde em todo o mundo e que permanece o maior tempo junto ao paciente. Além disso, sua formação possibilita uma abordagem holística do cuidado, englobando aspectos biológicos, físicos, ambientais, culturais, sociais e espiritual de cada indivíduo (FLÓRIA-SANTOS; NASCIMENTO, 2006). Neste contexto, o enfermeiro é um profissional que apresenta potencial para atuação junto a uma equipe interdisciplinar, em todos os níveis do cuidado, incluindo pesquisas, planejamento, execução e avaliação.

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 na busca de elucidação da fisiopatologia e desenvolvimento de novas medidas terapêuticas para condições patológicas raras ou comuns que envolvem alterações genéticas para sua ocorrência, desenvolvimento ou resposta terapêutica (LEA et al., 2011). As já descritas funções inibitórias do HLA-G e as grandes possibilidades de sua aplicabilidade clínica no diagnóstico, tratamento e evolução de doenças o faz um importante marcador imunológico e merecedor de investimentos em pesquisas e difusão de conhecimento, uma vez que seu uso já é uma realidade na prática clínica e apresenta tendência linear de expansão de utilização (CAROSSELA, 2011; DONADI et al., 2011; GONZÁLES et al., 2012). Por tais razões, para acompanhar as mudanças, descobertas e aplicabilidade clínica na área da imunogenética, permitindo assistência fundamentada e de alta qualidade é imprescindível ao enfermeiro a inserção em grupos de estudo e pesquisa sobre a temática.

***HIPÓTESE***

## 2. HIPÓTESE

Uma vez que mulheres vivendo com HIV/aids apresentam infecções mais persistentes pelo HPV e um maior número de casos de infecção por mais de um genótipo do vírus, que a infecção pelo HIV está associada com fatores moleculares e com a imunossupressão, e que juntos facilitam a infecção pelo HPV e a progressão das lesões cervicais, e ainda que os polimorfismos de 14pb da região 3'UTR do gene *HLA-G* vem sendo associados com a infecção pelo HPV e progressão de SIL; a principal hipótese deste estudo é que o polimorfismo de 14pb da região 3'UTR do gene *HLA-G* possa estar associado com o desenvolvimento de diferentes graus de SIL entre as mulheres apresentando ou não a infecção pelo HIV-1.

## ***OBJETIVOS***

### **3. OBJETIVOS**

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

Avaliar a associação do polimorfismo de 14 pb na região 3'UTR do gene *HLA-G* com os diferentes graus de SIL em mulheres apresentando ou não a infecção pelo HIV-1.

#### **3.2. Específicos:**

- 1) Caracterizar a população estudada de acordo com os dados sociodemográficos e clínicos;
- 2) Identificar, de acordo com as técnicas de biologia molecular, os genótipos de HPV encontrados em mulheres apresentando as lesões cervicais;
- 3) Tipificar o polimorfismo de inserção/deleção de 14pb do gene *HLA-G* (região 3'UTR);
- 4) Associar o polimorfismo do gene *HLA-G* com os genótipos de HPV, os diferentes graus SIL e com a presença ou não da infecção pelo HIV-1.



## ***MATERIAL E MÉTODOS***

## **4. MATERIAL 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 116 mulheres com LSIL ou HSIL atendidas no AMIG no período de julho de 2013 a janeiro de 2015. Estas, estão divididas em dois grupos:

- a) Grupo HIV+: composto por 53 mulheres com LSIL ou HSIL com sorologia positiva para HIV-1;
- b) Grupo HIV-: composto por 63 mulheres com LSIL ou HSIL com sorologia negativa para HIV-1;

### **4.3. Critérios de inclusão**

#### **a) Grupo HIV+:**

- Ter idade superior ou igual 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 superior ou igual 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 (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 ATHOS são referentes ao número de linfócitos TCD4+, carga viral e antirretrovirais utilizados na terapêutica da paciente, dentre as portadoras do HIV-1 e grau SIL e presença de HPV para todas as participantes.

#### **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 uterino. 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 colocada em microtubo tipo *Eppendorf* de 1,5 ml previamente identificado e contendo 1ml de solução salina. Este microtubo foi congelado em freezer a -80°C.

A biópsia cervical 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). A seguir, foi aplicado solução de ácido acético a 5% para identificação da junção escamocolunar (JEC) e zona de transformação (ZT). Para finalizar, foi aplicado solução de lugol a 2% (Teste de Schiller). A biópsia, quando indicada, 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. Obtenção de amostras de sangue periférico**

Foram coletados 10 ml de sangue venoso periférico de cada mulher, em tubos Vacutainer (Beckton & Dickinson, USA), contendo EDTA K3 (0.054 ml/tubo), para realização da extração de DNA e posterior tipificação do polimorfismo do gene *HLA-G*. Tal procedimento foi realizado após a aplicação do questionário.

#### **4.6.3. Exame anatomopatológico**

Os fragmentos de colo uterino coletados foram processados no 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).

#### **4.6.4. 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'TGAGGGCACAAAGAAGCCCCT 3') para verificar a eficiência da extração do DNA.

#### 4.6.5. Extração do DNA de células do sangue periférico

O DNA das células do sangue periférico foi extraído por "salting out", utilizando-se o procedimento descrito por MILLER et al, (1988). Assim, cerca de 10 mL do sangue total foram transferidos para um tubo de polipropileno de 50 mL, sendo adicionado quatro volumes de tampão de lise de glóbulos vermelhos (sacarose 0,3 M, TRIS-HCl 10 mM pH 7,5, MgCl 5 mM e TRITON X100 646,87g/mol a 1%). A solução era homogeneizada por inversão e centrifugada a 2400xg, por cinco minutos, a 4 °C. O sobrenadante era cuidadosamente desprezado e ao precipitado, adicionado 5 mL de tampão de lise de glóbulos brancos (NaCl 0,075 M, Na-EDTA 0,024 M, pH 8,0) em seguida 125 µL de SDS 10% e 1,1 mL de perclorato de sódio. A preparação foi agitada vigorosamente por dez segundos à temperatura ambiente.

Para a extração de proteínas, foram adicionados 2 mL de NaCl saturado, agitando-se os tubos vigorosamente por 15 segundos. Após a centrifugação a 1500xg por cinco minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi recolhido em um tubo de polipropileno de 50 mL e adicionados 7 mL de isopropanol absoluto, misturando-se cuidadosamente. Como etapa final da extração, a precipitação do DNA ocorreu por inversão manual lenta. O DNA precipitado foi retirado com auxílio de uma pipeta Pasteur selada e transferido para um tubo do tipo *ependorf* de 1 mL. O DNA foi lavado duas vezes em 1mL de etanol a 70% e redissolvido em 100 a 300 µL de água bidestilada desionizada e esterilizada (H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>).

O DNA assim extraído foi quantificado por espectrofotometria em 260 e 280 nm. O grau de pureza do DNA extraído foi calculado pela razão entre as absorvâncias obtidas em 260 e 280 nm (A<sub>260</sub>: A<sub>280</sub>), sendo considerada adequada entre os valores 1,50 a 1,90. Quando os valores dessa razão foram

inferiores a 1,5, o DNA foi precipitado novamente com álcool isopropílico seguindo descrição acima (etapa final da extração).

## **4.7. Análise das amostras**

### **4.7.1. Detecção e tipificação do HPV**

#### **4.7.1.1. Amplificação do DNA Viral**

O material extraído foi submetido à uma PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores GP5+ (5-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3) e GP6+ (5-CTTATACTAAATGTCAAATAAAAA-3), que amplificam uma seqüência de 150pb correspondente à região L1 do genoma do HPV. As reações foram processadas em 50µL, contendo Tampão 1X, dNTP mix (0,08mM), MgCl<sub>2</sub> (2,5mM), oligonucleotídeo iniciador GP5+ e GP6+ (0,5pmol), *Taq DNA Polymerase* (*Fermentas Molecular Biology Tools/Thermo Scientific*, Pittsburgh PA, USA) (5U/µL) e 5µL do produto extraído. Em todas as reações, um dos tubos não recebeu DNA, sendo o controle negativo da reação, e outro tubo recebeu o DNA da linhagem (CaSki), sendo o controle positivo da reação. 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 150pb.

#### 4.7.1.2. 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 500µL do reagente *Capture buffer type 3*. Posteriormente, essa mistura foi transferida para a coluna de purificação, sendo submetida à centrifugação a 16000 x g por 30 segundos. Na sequência, foram adicionados 500µL do reagente *Wash buffer type 1* à coluna, seguindo-se centrifugação a 16000 x g por 30 segundos. Para eluição, foram adicionados 25µL 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.

#### 4.7.1.3. 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 10,0µL contendo: 2,0 µL de *Big Dye Terminator*, 2,0µL de Tampão de Sequenciamento (5X), 1µL de cada oligonucleotídeo iniciador a 10pmol (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 2,0µL EDTA 125 mM, 2,0µL 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 70µL 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 10µL de formamida às amostras, que foram centrifugadas por 1 minuto a 1.000 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)*.

#### **4.7.1.4. Análise das sequências**

Os eletroferogramas obtidos no sequenciamento foram analisados pelo programa de análise de qualidade de sequências *Eletroferogram Quality Analysis* disponível on-line em <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>.

#### **4.7.2. Tipificação do polimorfismo do *HLA-G***

#### 4.7.2.1. Amplificação dos segmentos de DNA

O DNA extraído das células sanguíneas periféricas foi submetido à ensaios de PCR realizados utilizando-se uma mistura de reação constituída por 19,41 µL de água destilada, 3,5 µL de tampão buffer (10XPCR), 0,25 µL de solução de dNTP, 0,5 µL de Primer HLA-G8F (5' TGTGAAACAGCTGCCCTGTGT 3'), 0,5 µL de Primer HLA-G8R (5'GTCCTCCATTTATTTGTCTCT 3'), 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 0,1 µL de TAQ Platinum, 1 µL de cada amostra do DNA genômico. O volume de cada um dos componentes, utilizados na mistura de reação da PCR, foi multiplicado pelo número de amostras a serem analisadas e misturados em um microtubo para garantir a homogeneidade das reações.

Uma alíquota de 1µL de cada amostra do DNA genômico estocado foi distribuída em microtubos, devidamente identificados, aos quais foi adicionada de 25 µL da mistura de reação preparada, obtendo-se um volume final de 26 µL. Imediatamente após esta etapa, foram submetidas ao programa correspondente ao loco a ser analisado pela termocicladora( TABELA 1). Em todas as análises, foi utilizado como controle negativo um tubo sem acréscimo de DNA.

**Tabela 1. Programa utilizado na termocicladora para tipificar os alelos HLA-G (região 3`UTR)**

Numero de Repetições	1	30	30	30	1	1
Temperatura (°C)	94°	94°	56°	72°	72°	4°
Tempo (minutos)	5:00	0:45	0:45	0:25	7:00	∞

#### 4.7.2.2. Separação Eletroforética dos Produtos Amplificados

Para visualizar os segmentos de DNA, os produtos das PCRs foram devidamente preparados e aplicados em géis de poliacrilamida não desnaturantes 7% preparados utilizando-se 25ml do mix não-desnaturante 7% (preparado com

46,67ml de Acrilamida; 117,23ml de água destilada, 20ml de tampão TBE 10X [Tampão de eletroforese-Tris-borato-EDTA} e 14ml de Glicerol), 500 $\mu$ L de Solução saturada de persulfato de potássio e 16 $\mu$ L de TEMED

Após preparada esta solução, a mesma foi vertida em cassetes previamente montados. Estes cassetes foram compostos por duas placas de vidro, sendo uma com recorte na borda superior, separadas com espaçadores laterais de 0,4 mm de espessura e presas com grampos de aço. Logo após verter os géis entre as placas, foi colocado um pente na borda superior, como molde para os poços de aplicação das amostras e dos padrões. Cerca de 30 minutos após, os géis estavam polimerizados e foram lavados com água destilada para serem acoplados as cubas de eletroforese vertical, contendo TBE 1X em ambos os pólos.

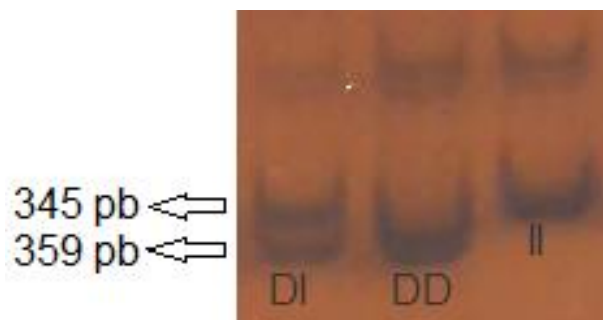
Feito isto, foi realizada uma mistura com 4  $\mu$ L de azul de bromofenol e 5  $\mu$ L do produto de cada PCR, totalizando 9  $\mu$ L, que foram aplicados em cada poço. No último poço foi aplicada uma mistura composta por 4  $\mu$ L de azul de bromofenol e 2  $\mu$ L de marcador de massa molecular (ladder) de 100pb. As amostras e os padrões foram aplicados nos poços e as cubas foram ligadas à fonte com a seguinte programação: 250V/400mA/100mV, por 2 horas e 30 minutos.

#### **4.7.2.3. Coloração com Nitrato de Prata**

Ao término da eletroforese, o gel foi posto em 100 ml de solução fixadora (250 ml de álcool etílico, 2 ml de ácido acético e 500 ml de água deionizada) e mantido sob agitação por 2 minutos, em seguida, foi adicionado 1 ml de Nitrato de Prata 10%. O conjunto foi mantido sob agitação por mais 3 minutos, após os quais a solução fixadora foi desprezada e o gel lavado em água destilada por 15 a 30 segundos. Imediatamente após a lavagem, foi preparado uma mistura com 100 ml de solução reveladora aquecida por 30 segundos acrescida de 1ml de formaldeído em temperatura ambiente, a qual foi colocada em contato com o gel, mantido em

agitação, juntamente com a solução, por 5 minutos. Após isto, esta solução era descartada e a reação bloqueada com solução fixadora para que a leitura fosse realizada.

Para a secagem, o gel foi colocado entre duas folhas de papel celofane, embebidas em água, sobre uma placa de vidro, à temperatura ambiente, por 1 dia. Após esta etapa, esse estava pronto para leitura e, após sua secagem, para o armazenamento. Um exemplo dos resultados visualizados nos géis podem ser verificados na figura a seguir.



**Figura 10** - Formação de bandas no gel de poliacrilamida não desnaturantes 7% após coloração e secagem. (DD- Deleção/Deleção, DI- Deleção/Inserção, II- Inserção/Inserção).

#### 4.8. Análise estatística

Os dados coletados foram armazenados em planilhas no software Excel 2013, em dupla digitação e posteriormente foi realizada validação das planilhas a fim de corrigir qualquer erro. As variáveis quantitativas foram descritas em média e desvio padrão e as variáveis categóricas em porcentagem.

Para avaliar associação entre duas variáveis categóricas, foi utilizado o Teste Qui-Quadrado de Pearson ou, quando ocorreram categorias com valores 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 para comparação entre dois grupos foi utilizado o Teste de Mann-Whitney e entre três grupos o Teste de Kruskal-Wallis (SIEGEL; CASTELLAN, 2006).

Todos os testes foram realizados utilizando o programa SPSS versão 22 e em todos os casos, o nível de significância adotado foi de 5% ( $\alpha = 0,05$ )

## ***RESULTADOS***

## 5. RESULTADOS

Este estudo envolveu a participação de 116 mulheres divididas em 2 grupos, sendo 63 (54,3%) participantes do grupo HIV- e 53 (45,7%) do grupo HIV+. A média de idade das participantes  $\pm$  desvio padrão (DP) foi de 35 anos  $\pm$  9,18, dentre as mulheres sem a infecção pelo HIV-1 de 34 anos  $\pm$  9,49 e entre as mulheres vivendo com HIV/aids de 36 anos  $\pm$  8,66. A maioria das participantes referem ser branca, heterossexuais, ter parceiro sexual fixo e possuem baixa escolaridade. Dentre as participantes do grupo HIV- a maioria exerce algum tipo de atividade remunerada e nega o tabagismo, já entre as participantes do grupo HIV+ o oposto é observado.

A distribuição detalhada das participantes segundo cor da pele, atividade ocupacional, escolaridade e orientação sexual encontra-se na Tabela 2 e a distribuição segundo parceiro sexual, doenças sexualmente transmissíveis prévias, uso de métodos contraceptivos e tabagismo encontra-se na Tabela 3.

Tabela 2. Distribuição das 116 participantes segundo cor da pele, atividade ocupacional, escolaridade e orientação sexual. AMIG, 2013-2015.

Variáveis	HIV- (n=63) n (%)	HIV+ (n=53) n (%)	TOTAL n	P-value
Cor da Pele				0,090*
Branca	37 (63,8)	21 (36,2)	58	
Negra	8 (38,1)	13 (61,9)	21	
Parda	18 (48,6)	19 (51,4)	37	
Atividade Ocupacional				<b>0,010**</b>
Atividade Remunerada	37 (63,8)	21 (36,2)	58	
Sem Atividade Remunerada	26 (49,1)	27 (50,9)	53	
Aposentada	0	5 (100)	5	
Escolaridade				0,438*
EF*** Incompleto	22 (53,7)	19 (46,3)	41	
EF Completo	7 (36,8)	12 (63,2)	19	
EM**** Incompleto	14 (66,7)	7 (33,3)	21	
EM Completo	13 (43,3)	17 (56,7)	30	
Ensino Superior	3 (60,0)	2 (40,0)	5	
Orientação Sexual				0,330**
Heterossexual	62 (55,4)	50 (44,6)	112	
Bissexual	1 (25,0)	3 (75,0)	4	

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

Tabela 3. Distribuição das 116 participantes segundo parceiro sexual, DSTs prévias, anticoncepcional hormonal e tabagismo. AMIG, 2013-2015.

Variáveis	HIV- (n=63) n (%)	HIV+ (n=53) n (%)	TOTAL n	P-value*
Parceiro Sexual Fixo				0,364
Sim	42 (57,5)	31 (42,5)	73	
Não	21 (48,8)	22 (51,2)	43	
DSTs Prévias				<b>0,001</b>
Condiloma	26 (49,1)	27 (50,9)	53	
Candidíase	2 (9,5)	19 (90,5)	21	
Herpes	1 (7,7)	12 (92,3)	13	
Sífilis	2 (16,7)	10 (83,3)	12	
HCV	0	6 (100)	6	
HBV	0	2 (100)	2	
Anticoncepcional hormonal				0,075
Não	30 (46,9)	34 (53,1)	55	
Sim	33 (63,5)	19 (36,5)	52	
Tabagismo				0,272
Tabagista	18 (42,9)	24 (57,1)	42	
Tabagista Irregular	2 (50,0)	2 (50,0)	4	
Ex Tabagista	9 (56,3)	7 (43,8)	16	
Não Tabagista	34 (63,0)	20 (37,0)	54	

\*Teste de associação Qui-Quadrado de Pearson.

Ainda referente ao tabagismo, a média de tempo decorrido entre o início do uso de cigarros e a aplicação do questionário foi de 18 anos  $\pm$  9,51 entre as participantes com a infecção pelo HIV e de 16 anos  $\pm$  8,92 dentre as participantes sem a infecção. Já o número médio de cigarros fumados por dia foi 16  $\pm$  11,57 entre as mulheres vivendo com HIV/aids e 13  $\pm$  11,80 entre as mulheres sem esta infecção.

Após teste estatístico de associação, foi encontrando significância apenas entre a presença de DSTs prévias e estar no grupo HIV+ e exercer atividade remunerada e pertencer ao grupo HIV-. As demais variáveis não apresentaram associação estatisticamente significativa entre os grupos

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 4. Tais variáveis se mostraram semelhantes nos dois grupos e



não foram consideradas estatisticamente significativas após o teste não paramétrico.

Tabela 4. Distribuição das 116 participantes segundo idade na menarca, idade na primeira relação sexual, idade na primeira gestação e número de gestações. AMIG, 2013-2015.

<b>Variáveis</b>	<b>HIV- (n=61) Média ± DP**</b>	<b>HIV+ (n=50) Média ± DP</b>	<b>P-value*</b>
Idade Menarca	13 ± 1,88	13 ± 1,76	
Idade Primeira Relação Sexual	16 ± 2,63	17 ± 3,05	0,159
Idade Primeira Gestação	18 ± 4,26	20 ± 4,71	
Número de Gestações	3 ± 1,96	3 ± 1,71	0,817

\*Teste não paramétrico de Mann-Whitney. \*\*Desvio Padrão.

Todas as participantes deste estudo foram diagnosticadas com lesões 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 presente em 60 amostras de conteúdo cervicavaginal (52% do total de amostras). Dentre as amostras tipificadas, 47 (78%) são HR-HPV e apenas 3 (5%) LR-HPV. Os tipos de lesões cervicais, tipo e genótipos mais frequentes de HPV estão dispostos na tabela 5.

Tabela 5. Distribuição das 116 participantes segundo grau de lesão intraepitelial cervical e infecção pelo papilomavirus humano AMIG, 2013-2015.

<b>Variáveis</b>	<b>HIV- (n=63) n (%)</b>	<b>HIV+ (n=53) n (%)</b>	<b>TOTAL N</b>	<b>P-value*</b>
Lesão cervical (n=116)				0,157
LSIL	25 (47,2)	28 (52,8)	53	
HSIL	38 (60,0)	25 (39,7)	63	
Tipo de HPV (n=60)				0,528
LR-HPV	1 (33,3)	2 (66,7)	3	
HR-HPV	29 (61,7)	18 (38,3)	47	
Não Classificável	5 (50,0)	5 (50,0)	10	
HPVs mais frequentes (n=60)				
16	16 (72,2)	5 (23,8)	21	
90	3 (60,0)	2 (40,0)	5	
31	3 (75,0)	1 (25)	3	
35	0	4 (100)	4	
18	1 (33,3)	2 (66,7)	3	
67	1 (33,3)	2 (66,7)	3	

\*Teste de associação Qui-Quadrado de Pearson.

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 (16 casos), 31, 58 e 90 (3 casos cada), 33 e 45 (2 casos cada) 6, 18, 51, 56, 67 e 85 (1 caso cada). No grupo HIV+, a sequência decrescente foi: HPV 16 (5 casos), 35 (4 casos), 18, 52, 66, 67, 90 (2 casos cada), 31, 42, 56, 59, 69, 70 e 102 (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 45,7% 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 deste estudo.

No grupo composto por pacientes com a infecção pelo HIV, algumas variáveis clínicas foram avaliadas. Dentre estas participantes, o tempo médio entre o diagnóstico da infecção pelo HIV e o desenvolvimento da lesão cervical avaliada neste estudo foi de 8,25 anos  $\pm$  6,02, a média da contagem de linfócitos TCD4+ foi de 418  $\text{cél}/\text{mm}^3 \pm 327,28$ , sendo que apresentou uma variação entre 9 e 1181  $\text{cél}/\text{mm}^3$ .

Referente ao uso de antirretrovirais, apenas uma participante não soube informar sobre o uso destes, 21% não estavam fazendo uso no momento do diagnóstico da lesão cervical e, dentre as 78,8% 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 53 participantes com a infecção pelo HIV segundo carga viral, contagem de linfócitos TCD4+ e antirretrovirais em uso encontra-se disposta na tabela 6.

Tabela 6. Distribuição das 53 participantes do grupo HIV+, segundo carga viral, contagem de linfócitos TCD4+ e classe de antirretrovirais em uso. AMIG 2013-2015.

<b>Variáveis</b>	<b>HIV+ (n=53) n (%)</b>
Carga Viral (n 53)	
Indetectável (< 50 cópias/ml)	26 (49,1)
Detectável (> 50 cópias/ml)	27 (50,9)
Contagem de LTCD4+ (n 51)	
<200 cél/mm <sup>3</sup>	18 (35,3)
200-500 cél/mm <sup>3</sup>	15 (29,4)
>500 cél/mm <sup>3</sup>	18 (35,3)
Antirretrovirais (n 52)	
II*	1 (1,9)
IP**	24 (46,1)
INTR***	41 (78,8)
INNTR****	16 (30,8)
Não faz uso	11 (21,1)

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

Para avaliação dos principais fatores de risco no desenvolvimento e na evolução das lesões intraepiteliais escamosas encontrados na literatura, foi realizado o cruzamento entre tais variáveis e os graus de lesões da amostra. Já entre as participantes do grupo HIV+ também foi realizado o cruzamento das variáveis clínicas e tratamento da doença com o grau de lesão cervical.

Após teste de associação entre o grau de lesão cervical e as variáveis acima citadas, apenas as doenças sexualmente transmissíveis prévias foram significantes estatisticamente. Referente a esta variável, 56,5% das participantes com DSTs prévias apresentavam LSIL e 43,5% HSIL.

A distribuição dos cruzamentos entre tabagismo, uso de anticoncepcional hormonal, histórico de doenças sexualmente transmissíveis prévias, relato de parceiro sexual fixo e a classificação do papilomavirus humano com o grau de lesão cervical encontra-se na tabela 7 e os cruzamentos entre carga viral, contagem de linfócitos TC4 e uso de antirretrovirais com o grau de lesão cervical encontra-se na tabela 8.

Tabela 7. Distribuição dos cruzamentos entre os graus de lesão cervical das 116 participantes com seus principais fatores de risco (tabagismo, uso de anticoncepcional hormonal, doenças sexualmente transmissíveis prévias, parceiro sexual e tipo de papilomavirus humano). AMIG, 2013-2015.

<b>Variáveis</b>	<b>LSIL n (%)</b>	<b>HSIL n (%)</b>	<b>TOTAL n</b>	<b>P-value</b>
Tabagismo				0,576*
Tabagista/Ex tabagista	25 (43,1)	33 (56,9)	58	
Não Tabagista/Tabagista Irregular	28 (48,3)	30 (51,7)	58	
Anticoncepcional Hormonal				0,401*
Sim	26 (50,0)	26 (50,0)	52	
Não	27 (42,2)	37 (57,8)	64	
DSTs Prévias				<b>0,005*</b>
Sim	39 (56,5)	30 (43,5)	69	
Não	14 (29,8)	33 (70,2)	47	
Parceiro Sexual Fixo				0,601*
Sim	32 (43,8)	41 (56,2)	73	
Não	21 (48,8)	22 (51,2)	43	
HPV				0,549**
LR-HPV	2 (66,7)	1 (33,3)	3	
HR-HPV	17 (36,2)	30 (63,8)	47	

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

Tabela 8. Distribuição dos cruzamentos entre grau de lesão cervical com carga viral, contagem de linfócitos TCD4+ e uso de antirretrovirais entre as 53 participantes do grupo HIV+. AMIG, 2013-2015.

<b>Variáveis</b>	<b>LSIL n (%)</b>	<b>HSIL n (%)</b>	<b>Total</b>	<b>p-value*</b>
Carga Viral				0,685
Indetectável**	13 (50,0)	13 (50,0)	26	
Detectável***	15 (55,6)	12 (44,4)	27	
LTCD4+				0,441
<200	10 (55,6)	8 (44,4)	18	
200 – 500	10 (66,7)	5 (33,3)	15	
>500	8 (42,2)	10 (57,8)	18	
Uso de Antirretroviral				0,664
Sim	21 (51,2)	20 (47,2)	41	
Não	7 (58,3)	5 (41,7)	12	

\*Teste de associação Qui-Quadrado de Pearson. \*\*<50cópias/ml. \*\*\*>50cópias/ml.

O polimorfismo de 14pb na região 3'UTR do gene *HLA-G* de todas as participantes foram analisados e a frequência encontrada de alelos e genótipos encontra-se detalhada na tabela 9.

Tabela 9. Distribuição das 116 participantes segundo polimorfismo de 14 pb do gene *HLA-G* na região 3'UTR. AMIG, 2013-2015.

Variáveis	HIV- (n=63) n (%)	HIV+ (n=53) n (%)	TOTAL n	P-value*
Alelo				
Inserção (ins)	40 (54,1)	34 (45,9)	74	0,941
Deleção (del)	58 (54,2)	49 (45,8)	107	0,938
Genótipo				0,993
Ins/del	35 (53,8)	30 (46,2)	65	
Ins/ins	5 (55,6)	4 (44,4)	9	
Del/del	23 (54,8)	19 (45,2)	42	

\*Teste de associação Qui-Quadrado de Pearson

Para avaliação da associação entre os alelos inserção e deleção e os genótipos ins/ins, del/del e ins/del com o histórico de DSTs prévias e genótipo de HPV encontrados nas amostras, foi realizado o cruzamento destas variáveis, que encontra-se detalhado nas tabelas 10 e 11.

Tabela 10. Distribuição dos cruzamentos entre os tipos de HPV e DSTs prévias com os alelos identificados nas 116 participantes. AMIG, 2013-2015.

Variáveis	Inserção n (%)	p-value	Deleção n (%)	P-value
Tipo HPV		1,000**		1,000**
LR-HPV (n 3)	2 (66,7)		3 (100)	
HR-HPV (n 47)	29 (61,7)		45 (95,7)	
DSTs Prévias		<b>0,050*</b>		0,648*
Sim (n 69)	49 (71,0)		63 (91,3)	
Não (n 47)	25 (53,2)		44 (93,6)	

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

Tabela 11. Distribuição dos cruzamentos entre os tipos de HPV e DSTs prévias com os genótipos identificados nas 116 participantes. AMIG, 2013-2015.

Variáveis	Ins/Ins n (%)	Del/Del n (%)	Ins/Del n (%)	Total n	P-value
Tipo HPV					0,911
LR-HPV	0	1 (33,3)	2 (66,7)	3	
HR-HPV	2 (4,2)	18 (38,3)	27 (57,5)	47	
DSTs Prévias					0,146
Sim	6 (8,7)	20 (29,0)	43 (62,3)	69	
Não	3 (6,4)	22 (46,8)	22 (46,8)	47	

\*Teste de associação Qui-Quadrado de Pearson.

Após teste estatístico foi encontrada associação significativa entre ter algum tipo de DST prévia, além do HPV ou a co-infecção HIV/HPV, e apresentar o alelo inserção. Das 74 participantes que apresentam o alelo inserção, 49 (66,2%) possuem DSTs prévias e 25 (33,8%) não tem histórico de outras DSTs. Para a variável tipo de HPV não foram encontradas associações significativas com os alelos (inserção e deleção) ou com os genótipos (ins/ins, del/del, ins/del).

A associação entre as variáveis indicativas do quadro clínico do paciente com a infecção pelo HIV, também foram avaliadas por meio do cruzamento entre carga viral e contagem de linfócitos TCD4+ ativados (LTCD4+) com os alelos inserção e deleção e com os genótipos ins/ins, del/del, ins/del e estão detalhadas nas tabelas 12 e 13, respectivamente.

Tabela 12. Distribuição dos cruzamentos entre carga viral e contagem de linfócitos TCD4+ com os alelos identificados nas 53 participantes do grupo HIV+. AMIG, 2013-2015.

Variáveis	Inserção n (%)	p-value	Deleção n (%)	P-value
Carga Viral		0,854*		1,000**
Indetectável*** (n 26)	17 (65,4)		24 (92,3)	
Detectável**** (n 27)	17 (63)		25 (92,6)	
LTCD4+ (cél/mm <sup>3</sup> )		0,735*		0,298*
<200 (n 18)	10 (55,5)		18 (100)	
200 – 500 (n 15)	10 (66,7)		13 (86,7)	
>500 (n 18)	12(66,7)		16 (88,9)	

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

\*\*\*<50cópias/ml. \*\*\*\*>50cópias/ml.

Tabela 13. Distribuição dos cruzamentos entre carga viral e contagem de linfócitos TCD4+ com os genótipos identificados nas 53 participantes do grupo HIV+. AMIG, 2013-2015.

Variáveis	Ins/Ins n (%)	Del/Del n (%)	Ins/Del n (%)	Total n	P-value*
Carga Viral					0,983
Indetectável**	2 (7,7)	9 (34,6)	15 (57,7)	26	
Detectável***	2 (7,4)	10 (37,0)	15 (55,6)	27	
LTCD4+					0,622
<200	0	8 (44,4)	10 (55,6)	18	
200 – 500	2 (13,3)	5 (33,3)	8 (53,3)	15	
>500	2 (11,1)	6 (33,3)	10 (55,6)	18	

\*Teste de associação Qui-Quadrado de Pearson. \*\*<50cópias/ml. \*\*\*>50cópias/ml.

Após análise estatística, não foram encontradas associações significantes entre a carga viral e contagem de linfócitos TCD4+ com os alelos inserção e deleção ou com os genótipos ins/ins, del/del e ins/del.

A verificação de uma possível associação entre grau de SIL com a ocorrência dos alelos e genótipos estudados nesta pesquisa foi realizada por meio do cruzamento desta variável com a ocorrência dos alelos inserção e deleção e com os genótipos ins/ins, del/del e ins/del. Tais cruzamentos foram realizados separadamente entre as participantes com ou sem a infecção pelo HIV-1 e encontram-se detalhados na tabela 14

Após análise estatística identificamos associação significativa entre a ocorrência do alelo inserção e do genótipo ins/del com a ocorrência de HSIL entre mulheres com a infecção pelo HIV-1, estando o alelo inserção presente em 61,8% dos casos de HSIL e apenas em 38,2% dos casos de LSIL e o genótipo ins/del em 66,7% dos casos de HSIL e 33,3% de LSIL. Associação contrária foi observada, neste mesmo grupo de mulheres, na presença do genótipo del/del e ins/ins, estando o genótipo del/del presente em 79% dos casos de LSIL e 21% dos casos de HSIL e o genótipo ins/ins em 75% e 25% dos casos, respectivamente. Já entre as mulheres sem a infecção pelo HIV, não foi encontrada associação significativa entre o grau de SIL e o polimorfismo de inserção/deleção de 14pb do gene *HLA-G*.

Tabela 14. Distribuição dos cruzamentos entre grau de lesão cervical com os alelos e genótipos identificados nas 116 participantes separadas por grupo estudado. AMIG 2013-2015.

Grupos	Variáveis	LSIL n (%)	HSIL n (%)	TOTAL n	P-value
HIV- (n = 63)	Alelo Inserção				0,547*
	Sim	17 (42,5)	23 (57,5)	40	
	Não	8 (34,8)	15 (65,2)	23	
	Alelo Deleção				1,000*
	Sim	23 (39,7)	35 (60,3)	58	
	Não	2	3	5	
HIV+ (n=53)	Genótipos				0,828*
	Ins/ins	2 (40)	3 (60)	5	
	Del/del	8 (34,8)	15 (65,2)	23	
	Ins/del	15 (42,9)	20 (57,1)	35	
	Alelo Inserção				<b>0,009**</b>
	Sim	13 (38,2)	21 (61,8)	34	
HIV+ (n=53)	Não	15 (79)	4 (21)	19	
	Alelo Deleção				0,613**
	Sim	25 (51)	24 (49)	49	
	Não	3 (75)	1 (25)	4	
	Genótipos				<b>0,003**</b>
	Ins/ins	3 (75)	1 (25)	4	
Del/del	15 (79)	4 (21)	19		
Ins/del	10 (33,3)	20 (66,7)	30		

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

A associação entre os dois grupos deste estudo com o grau de lesão cervical, também foi avaliada após ajuste pela presença do alelo inserção, do alelo deleção e por genótipos ins/ins, del/del, ins/del, entretanto não foi observada associação entre estas variáveis após o ajuste por polimorfismo. Na tabela 15 encontra-se exposto os dados estratificado pela presença do alelo inserção, na tabela 16 estratificados pela presença do alelo deleção e na tabela 17 estratificado pela presença dos genótipos ins/ins, del/del e ins/del.



Tabela 15. Distribuição das 63 participantes HIV- e das 53 participantes HIV+, segundo grau de lesão cervical estratificado pelo alelo inserção. AMIG, 2013-2015.

Inserção	Grupo	LSIL n (%)	HSIL n (%)	Total N	P-value*
Sim	HIV-	17 (42,5)	23 (57,5)	40	0,215
	HIV+	13 (38,2)	21 (61,8)	34	
Não	HIV-	8 (34,8)	15 (65,2)	23	
	HIV+	15 (78,9)	4 (21,1)	19	

\*Qui-quadrado de Mantel-Haenszel

Tabela 16. Distribuição das 63 participantes HIV- e das 53 participantes HIV+, segundo grau de lesão cervical estratificado pelo alelo deleção. AMIG, 2013-2015.

Deleção	Grupo	LSIL n (%)	HSIL n (%)	Total N	P-value*
Sim	HIV-	23 (39,7)	35 (60,3)	58	0,221
	HIV+	25 (51,0)	24 (49,0)	49	
Não	HIV-	2 (40,0)	3 (60,0)	5	
	HIV+	3 (75,0)	1 (25,0)	4	

\*Qui-quadrado de Mantel-Haenszel

Tabela 17. Distribuição das 63 participantes HIV- e das 53 participantes HIV+, segundo grau de lesão cervical estratificado pela ocorrência dos genótipos ins/ins, del/del e ins/del. AMIG, 2013-2015.

Genótipos	Grupo	LSIL n (%)	HSIL n (%)	Total N	P-value*
Ins/ins	HIV-	2 (40,0)	3 (60,0)	5	0,212
	HIV+	3 (75,0)	1 (25,0)	4	
Del/del	HIV-	8 (34,8)	15 (65,2)	23	
	HIV+	15 (78,9)	4 (21,1)	19	
Ins/del	HIV-	15 (42,9)	20 (57,1)	35	
	HIV+	10 (33,3)	20 (66,7)	30	

\*Qui-quadrado de Mantel-Haenszel

## ***DISCUSSÃO***

## 6. DISCUSSÃO

Entre as mulheres vivendo com HIV/aids, há um maior número de casos de infecções persistentes pelo HPV (ZAHANG et al., 2012) ou causada por mais de um genótipo deste (CLIFFORD et al., 2006). Estes fatores somados com a imunodeficiência decorrente da infecção pelo HIV (BRASIL, 2013) resultam em um risco aumentado para o desenvolvimento de lesões intraepiteliais escamosas (SIL). Além da infecção pelo HPV e HIV, o histórico de outras DSTs prévias (IMAI et al., 2015), o comportamento sexual (LIN et al., 2015), número de gestações (ALMONTE et al., 2008), tabagismo (SARIAN et al., 2009), uso de anticoncepcional hormonal (STENSE et al., 2015) e fatores imunogénéticos (SIMÕES et al., 2009) vem sendo considerados como importantes fatores de risco para o desenvolvimento das SIL. Diante disso, este estudo caracterizou as participantes dos dois grupos estudados de acordo com as características sociodemográficas e presença dos fatores de risco associados ao desenvolvimento de lesões cervicais, com ênfase no polimorfismo de 14pb do gene *HLA-G*.

A média de idade das participantes foi de 35 anos não apresentando diferença significativa entre os dois grupos. Tal idade está de acordo ao encontrado na literatura uma vez que a incidência maior de HPV é encontrada na população de mulheres jovens, com menos de 30 anos (SMITH, J. et al., 2008) e a faixa etária de maior ocorrência de casos de câncer cervical encontra-se entre 40 e 60 anos (CARVALHO; QUEIROZ, 2011). Sendo assim, um maior número de casos de SIL são esperados para a faixa etária intermediária entre o pico de infecção pelo HPV e o desenvolvimento de câncer cervical.

Em relação a cor da pele declarada pelas participantes do estudo, 50% referem ser brancas. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2011 a população brasileira era composta por aproximadamente 47% de indivíduos brancos, seguidos por 52% de pardos e negros (BRASIL, 2011). Sendo assim, nossa amostra apresenta distribuição, quanto a cor da pele,

semelhante ao encontrado na população brasileira. Em relação ao risco para desenvolvimento de SIL, a cor da pele não vem sendo apresentado na literatura como um fator de risco para seu desenvolvimento (GAMBERINI et al., 2008) e em nosso estudo também não encontramos associação entre os dois fatores.

Em nossa amostra, 52% das participantes possuem 8 anos ou menos de escolaridade, apenas 4% estão cursando ou concluíram o ensino superior e 46% não exercem atividade profissional remunerada ou recebem aposentadoria. Estes dois fatores, o baixo nível de escolaridade e a qualificação profissional, vem sendo associado com a aquisição da infecção pelo HIV e com a evolução das SIL. Um estudo com 120 mulheres com SIL, sendo 76,7% com lesões de alto grau (HSIL) apresentou uma amostra na qual 70% das participantes possuíam 8 anos ou menos de estudo e apenas 10% cursavam ou haviam concluído o ensino superior; também nesta amostra, 43% das mulheres não exerciam atividade remunerada. A hipótese levantada pelos autores é que a baixa escolaridade e renda possam influenciar na compreensão da doença e no seguimento de seu tratamento (CARVALHO; QUEIROZ, 2011). Em nossa amostra, exercer atividade remunerada foi significativamente associado à não infecção pelo HIV-1 ( $P = 0,010$ ). Confirmando outro estudo que aponta o baixo nível de escolaridade e o não exercício de atividade remunerada como sendo considerados fatores que contribuem com a vulnerabilidade feminina para adquirir aids, podendo interferir na aquisição da infecção pelo HIV e na adesão ao tratamento (HERRERA; CAMPERA et al., 2002; BRASIL, 2008b).

O comportamento sexual feminino está fortemente relacionado com o risco de infecção pelo HPV e conseqüente desenvolvimento de SIL. Relacionamentos casuais e idade precoce na primeira relação sexual estão associados indiretamente ao aumento da prevalência e persistência da infecção pelo HPV, pois estes dois fatores levam a um número aumentado de parceiros sexuais elevando o risco de exposição ao vírus (ALMONTE et al., 2008; LIN et al., 2015; PLUMMER; PRETO; FRANCESCHI, 2012; IMAI et al., 2015; VINODHINI et al., 2012). Além disso, a imaturidade do colo uterino pode aumentar a vulnerabilidade facilitando infecções cervicais. (CIRINO; NICHATA; BORGES, 2010;

NASCIMENTO; VARGA, 2008). Um estudo multicêntrico com 12.076 mulheres identificou que não ter um parceiro sexual fixo (OR = 1,6; IC = 1,4 - 1,9) e ter se relacionado sexualmente com 5 ou mais parceiros (OR = 1,8; 95% IC = 1,4 - 2,2) aumenta o risco de infecção por HPV de alto risco (SARIAN et al., 2009). O número de gestações também vem sendo investigado por alguns autores por sua possível associação com a infecção pelo HPV ou com lesões cervicais. A hipótese levantada seria que as alterações sofridas no colo uterino em consequência das gestações facilitariam a infecção viral. Um estudo de 2008 aponta a existência de risco aumentado para câncer de colo uterino entre as mulheres com 7 ou mais gestações (ALMONTE et al., 2008). Já outro estudo, sugere que 3 gestações sejam suficientes para aumentar o risco de infecção pelo HPV (VINODHINI et al., 2012).

Em nosso estudo, apenas 37% das participantes não eram casadas ou viviam em união estável, a média de gestações foi 3 em ambos os grupos ( $\pm 2,63$  entre o grupo HIV- e  $\pm 3,05$  entre o grupo HIV+) e a primeira relação sexual ocorreu em média aos 16 anos entre o grupo HIV-  $\pm 1,96$  e aos 17 anos entre as mulheres com a infecção pelo HIV-1  $\pm 1,71$ . Entre as variáveis acima discutidas, não encontramos diferenças em suas distribuições entre os dois grupos abordados, com a ocorrência de infecção pelos tipos de HPV ou com desenvolvimento de SIL. Embora estas variáveis venham sendo consideradas fatores de risco, há pesquisas que assim como nosso estudo, não encontram relação significativa. Um recente estudo transversal, com a participação de 1.183 mulheres não encontrou associação entre iniciação sexual precoce e o risco de infecção pelo HPV (UMAI et al., 2015). Outro estudo do mesmo ano, com 40.000 mulheres dinamarquesas, com idade média de 30 anos, avaliou fatores de risco para persistência da infecção pelo HPV com consequente desenvolvimento de SIL, porém assim como nosso estudo, não encontraram relação entre o número de gestações e a persistência da infecção pelo HPV (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 esteroides podem favorecer a ocorrência de

---

infecção persistente pelo HPV por meio da ligação desses, em especial a progesterona, e de receptores de glicocorticóides à LCR do HPV, levando ao aumento da expressão de oncogenes E6 e E7 do vírus (KWASNIEWSKA et al., 2011), além da influência na expressão de oncogenes, os hormônios esteroides induzem o aumento da atividade transformadora de E6 e E7 resultando em uma diminuição da resposta imunológica do hospedeiro e na resolução das lesões cervicais (MARKS et al., 2011; PINTO; TÚLIO; CRUZ, 2002). Ademais, a progesterona pode inibir a transativação transcricional de genes mediada por p53 envolvidos na interrupção do ciclo celular e na apoptose e também reduzir a expressão de antígenos leucocitários humanos de classe I e II resultando em uma influência negativa na resposta imunológica (PINTO; TÚLIO; CRUZ, 2002).

Com base nesta possível interação entre os hormônios esteroides e o HPV, diversos estudos avaliaram e encontraram associação significativa entre o uso de anticoncepcionais hormonais combinados com o aumento da prevalência (LEE et al., 2014; MARKS et al., 2011) e persistência (STENSE et al., 2015) da infecção pelo HPV, com o aumento da probabilidade de desenvolvimento de HSIL, dentre mulheres vivendo com HIV/aids (LESLIE et al., 2014) e com o aumento do risco de ocorrência de carcinoma in situ conforme o aumento do tempo de uso destes e diminuição do risco após a interrupção do uso (SMITH J et al., 2003). Entretanto, um outro estudo com 3.390 participantes não encontrou associação entre o uso de anticoncepcional hormonal com a ocorrência de infecção pelo HPV (SILVA et al., 2014). Em nossa pesquisa, 52% das mulheres sem a infecção pelo HIV e 35% das com a infecção faziam uso de anticoncepcional hormonal, dentre estas 50% apresentavam lesões de baixo grau (LSIL) e 50% HSIL, sendo assim não encontramos associação entre o uso de anticoncepcional hormonal com a progressão das SIL.

O tabaco é um fator de risco para diversas doenças, este é composto por muitas substâncias cancerígenas, sendo que as mais discutidas são a nicotina e a cotidina. A exposição direta, a longo prazo, do DNA de células epiteliais cervicais com estas substâncias presentes no tabaco, pode interferir na proliferação celular, na inibição da apoptose e levar à uma redução do número de células de

---

Langerhans na cérvix das fumantes, importantes na apresentação de antígenos (PINTO; TÚLIO; CRUZ, 2002; SYRJANEN et al., 2007). Além disso, neste grupo de mulheres ocorre uma redução da contagem de linfócitos TCD4+ no colo uterino levando à imunossupressão local e contribuindo com a susceptibilidade para adquirir infecções. Já a imunidade humoral das fumantes é afetada pela ocorrência de redução de 20% dos níveis de imunoglobulinas IgA, IgG e IgM (ARCAVI; BENOWITZ, 2004).

O exposto acima fundamenta os resultados de grande parte das pesquisas que avaliam a associação entre o tabagismo, a infecção pelo HPV e o desenvolvimento de SIL. Na literatura, encontramos que o tabagismo aumenta os riscos de infecção pelo HPV (SYRJANEN et al., 2007) e por HR-HPV (IMAI et al., 2015), que a prevalência da infecção aumenta 4 vezes entre as fumantes quando comparadas com mulheres que nunca fumaram (IMAI et al., 2015), que a prevalência de HR-HPV aumenta de 16%, entre as não fumantes, para 22% entre as fumantes e que os achados entre as fumantes e ex-fumantes são semelhantes (SARIAN et al., 2009), que não há variação entre a frequência dos diversos genótipos do HPVs entre os grupo de fumantes e não fumantes (MATSUMOTO et al., 2010), que o tabagismo não está associado com um risco aumentado de ocorrência de infecções simultâneas por mais de um genótipo deste vírus (SIMENKAPÉU et al., 2009), mas pode aumentar a prevalência de infecções por genótipos diferentes em um curto espaço de tempo (SMITHI M et al., 2014) e que o tabagismo aumenta os riscos para persistência da infecção pelo HPV e de LSIL, sendo que a esperada regressão da lesão em 2 anos ocorre em 69% das não fumantes e em apenas 49% das tabagistas há mais de 10 anos, entretanto este hábito não está associado com maiores taxas de progressão de LSIL para HSIL (MATSUMOTO et al., 2010).

No presente estudo, 43% das participantes do grupo HIV- e 58% do grupo HIV+ referiram ser tabagistas ou ex-tabagistas e dentre estas, 43% apresentavam LSIL e 57% HSIL. Embora seja claro na literatura a ocorrência de associação entre o HPV e SIL com o tabagismo e nossos resultados apresentarem um

aumento de casos de HSIL dentre as fumantes, não encontramos associação estatisticamente significativa entre estas variáveis.

Outro fator de risco para desenvolvimento de SIL é o histórico de algum tipo de DST prévia. Um recente estudo com 40.000 mulheres seguidas por 4 anos, já citado anteriormente, concluiu que episódio prévio de condiloma aumenta a persistência da infecção pelo HPV (OR = 1,35; IC = 1,04 – 1,74) (STENSE et al., 2015). Já outro estudo do mesmo ano, encontrou uma maior prevalência da infecção pelo HPV dentre as participantes com histórico de clamídia (UMAI et al., 2015), que também foi associada com um risco aumentado de infecção simultânea por mais genótipo do vírus, em uma pesquisa realizada no Canadá com a participação de 537 mulheres acompanhadas semestralmente por dois anos (SMITHI M et al., 2014).

Em nosso estudo, a ocorrência de DSTs prévias relatadas pelas participantes foi significativamente maior dentre as mulheres vivendo com HIV/aids ( $P = 0,001$ ), estando de acordo com outro estudo realizado no Brasil, no qual 21% das mulheres com a infecção pelo HIV-1 e apenas 17% sem a infecção apresentavam DSTs prévias ( $P = 0,05$ ) (SANTOS et al., 2009). Encontramos ainda, associação entre o grau de lesão cervical com esta variável, sendo que 56% das participantes com DSTs prévias apresentavam LSIL e 44% HSIL, sugerindo que a influencia na ocorrência de SIL, entre estas, esteja relacionada com a incidência e persistência da infecção pelo HPV e não diretamente com a progressão da lesão.

A presença de infecção pelo HPV, o principal fator de risco e amplamente relatado na literatura por sua forte relação com o desenvolvimento de SIL, foi um dos critérios de inclusão em nosso estudo. Em 90% dos casos de infecção pelo HPV o sistema imunológico elimina o vírus em até 2 anos após ao início da infecção (VELDHUIJZEN et al., 2010) e somente de 10 a 20% destas progredem para o desenvolvimento de SIL (HAUSEN, 2002; TOMMASINO, 2013). Os dois tipos mundialmente mais frequentes de HPV são os 16 e 18 e por isso são o foco nas vacinas recentemente disponíveis para prevenção da infecção por este vírus (HERRERO; GONZÁLES; MARKOWITZ, 2015).



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 (ICC), a prevalência do HPV é de aproximadamente 91% (MUÑOZ et al., 2003), sendo o HPV16 é responsável por 61% dos casos de infecção e o HPV18 por 10% (SANJOSE et al., 2010), entre as mulheres com HSIL, a prevalência fica em torno de 82% (SIMEN-KAPEU et al., 2009) e estes dois genótipos mais frequentes são responsáveis por 52% dos casos (SMITH J et al., 2007). Já em mulheres assintomáticas com citologia normal ou alterada, a prevalência de HPV é de 9 a 20% (IMAI et al., 2015; LEE et al., 2014; MARKS et al. 2015, TRAN et al., 2015; VINODHINI et al., 2012). Já a associação entre o HPV e o desenvolvimento de SIL foi avaliada por um recente estudo de acompanhamento de 3.390 mulheres com LSIL, o qual aponta a ocorrência de 12% de casos que evoluíram para HSIL, sendo que dentre estes, 86% eram HPV+ (SILVA et al., 2014).

Os dados disponíveis na literatura, aponta para a existência de associação entre o aumento das taxas de prevalência da infecção pelo HPV com a incidência e evolução de lesões cervicais. Em nosso estudo selecionamos apenas participantes com resultando positivo para infecção pelo HPV e após genotipagem, identificamos que 78% da nossa amostra possuíam infecção por HR-HPV, 5% por LR-HPV e 17% por HPV não classificáveis. Estando assim, de acordo com o encontrado na literatura a qual nos traz que os LR-HPV estão associados com lesões condilomatosas diferentemente dos HR-HPV que são 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 52% destas.

Referente a frequência de ocorrência dos diversos genótipos de HPV, encontramos diferenças em sua distribuição entre os dois grupos estudados. Dentre as mulheres do grupo HIV- a frequência dos HPV, em ordem decrescente, foi: HPV 16 (45,7% dos casos), 31, 58 e 90 (8,6% cada genótipo), 33 e 45 (5,7% cada genótipo) 6, 18, 51, 56, 67 e 85 (2,9% cada genótipo). No grupo HIV+, a sequência decrescente foi: HPV 16 (20% dos casos), 35 (16% dos casos), 18, 52,

66, 67, 90 (8% cada genótipo), 31, 42, 56, 59, 69, 70 (4% cada genótipo). Diferenças na distribuição dos genótipos de HPV entre as mulheres com ou sem a infecção pelo HIV-1 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 com a infecção pelo HIV-1 o qual relata um aumento de chances de infecção pelo HPV18 e HPV52 entre as mulheres vivendo com HIV/aids em comparação com a população em 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).

Diferenças encontradas quando a incidência, persistência e evolução de diversas doenças entre a população geral e pessoas vivendo com HIV/aids estão relacionadas com o estado clínico e fase da doença. Uma carga viral detectável e linfócitos TCD4+ < 500cél/mm<sup>3</sup> indicam um estado imunológico deprimido facilitando a ocorrência e progressão de doenças (BRASIL, 2013). Neste contexto, a implementação do tratamento antirretroviral altamente ativo - principal fator associado com a supressão quase total da replicação viral e reconstituição imune, mantendo a contagem de LTCD4+ > 500cél/mm<sup>3</sup> - é fator fundamental para diminuição da morbidade e mortalidade dos indivíduos vivendo com HIV/aids contribuindo assim, para sua classificação como doença crônica e controlável e gerando impacto positivo na qualidade de vida destes indivíduos (BRASIL, 2008b; BRASIL, 2013).

Diante da importância destes marcadores em relação ao estado imunológico do indivíduo, este estudo também avaliou a associação destes com a ocorrência dos diferentes graus de lesão cervical. Dentre as 35% das mulheres com linfócitos TCD4+ < 200 células/mm<sup>3</sup>, 56% apresentavam LSIL e entre as mulheres com LTCD4 > 500cél/mm<sup>3</sup>, apenas 42% apresentavam lesões de baixo grau, resultados estes que contribuíram para ocorrência de não associação entre as taxas de LTCD4+ e os graus de lesão ( $P = 0,441$ ). Este resultado está em concordância com outro estudo brasileiro, no qual a média de LTCD4+ foi de 339cél/mm<sup>3</sup> dentre as participantes com HSIL e de 276,5cél/mm<sup>3</sup> entre as mulheres com LSIL, assim como no presente estudo a número encontrado de

LTCD4+ foi maior dentre as mulheres com lesões de alto grau, porém após análise de variância não foi encontrada associação entre o número de LTCD4+ com o grau de lesão cervical ( $P = 0,901$ ) (ZIMMERNMANN et al., 2006).

Embora não tenhamos encontrado associação entre as variáveis discutidas acima, sabemos que a prevalência da infecção pelo HPV está fortemente associada com a ocorrência de SIL e seu aumento está diretamente relacionado com a piora do grau da lesão cervical (MARKS et al., 2015 NOWAKOWSKI et al., 2014) e, entre a população feminina com a infecção pelo HIV, a contagem de linfócitos TCD4+ é fator associado com o aumento da prevalência da infecção pelo HPV, quando esta contagem é maior que 200cél/mm<sup>3</sup> a prevalência de infecção pelo HPV é de 33% e quando é menor que 200cél/mm<sup>3</sup> de 66% (URSU et al., 2015). Ademais, a queda no número de LTCD4+ resulta em maior número de casos de múltiplas infecções pelo HPV entre mulheres com ICC ( $p < 0,001$ ) (VUISTY et al., 2012). Além da prevalência e múltiplas infecções, a persistência da infecção pelo HPV também é aumentada entre as mulheres com a infecção pelo HIV, segundo um estudo que acompanhou mulheres por 12 meses, a persistência da infecção pelo HPV neste intervalo de tempo foi de 47,5 dentre as mulheres vivendo com HIV/aids e apenas 21,1 no grupo sem infecção pelo HIV (ZHANG et al., 2012). Mais uma vez, a queda do número de LTCD4+ está associado com este aumento que resulta no prolongamento da infecção pelo HPV, facilitando a progressão das SIL (VUISTY et al., 2012). Desta forma, um aumento do número de casos de HSIL dentre as mulheres vivendo com HIV/aids com baixa contagem de LTCD4+ era esperado, porém não foi observado em nossa pesquisa.

Em nossa amostra, 79% das participantes faziam uso de ARV, sendo 80% usuárias INTR, 46% IP e 31% INNTR, demonstrando predomínio do esquema 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% das participantes em uso de ARV e em 58% das participantes que não estavam fazendo uso, não se mostrando uma variável associada com os diferentes graus de lesão ( $P = 0,664$ ). Já em relação à carga viral, dentre as 49% participantes com

a infecção pelo HIV apresentando carga viral detectável, 50% apresentavam HSIL, resultado maior que o encontrado entre as mulheres com CV indetectável, as quais 44% apresentavam HSIL, porém esta diferença não foi suficiente para demonstrar associação significativa entre CV detectável e ocorrência de lesão cervical de alto grau ( $P = 0,685$ ).

A presença de carga viral detectável está diretamente associada com o não uso da terapia ARV, uma vez que estes medicamentos afetam a replicação viral, como já exposto. Assim como em nosso estudo, outra pesquisa brasileira com 494 mulheres HIV+, também não encontrou relação significativa entre o uso de ARV e o risco de desenvolvimento de SIL, entretanto neste estudo, diferentemente do nosso, foi avaliado um grupo de mulheres sem lesões cervicais e outro com lesões cervicais. Neste mesmo estudo, embora tenham encontrado um aumento da CV no grupo de mulheres com lesão, este não foi identificado como um fator de risco independente para desenvolvimento de SIL (TEIXEIRA et al., 2012).

Os fatores imunogenéticos envolvidos na aquisição e progressão de doenças vem sendo investigados mais fortemente nas últimas décadas, sendo os polimorfismos genéticos incluídos nas prioridades de pesquisa em saúde (BRASIL, 2008a). Em especial, o gene *HLA-G* é conhecido por atuar na modulação da resposta imunológica inata e adaptativa exercendo propriedades inibitórias em todas as etapas da resposta imunológica (AMIOT; VU; SAMSON, 2014), que são mais amplamente estudadas na progressão de tumores (SELIGER; SCHLAF, 2007), sucesso de transplantes (BRUGIÈRE et al., 2009; Wu et al., 2009) e doenças virais (CORDERO et al., 2009; Bortolotti et al., 2014; Lozano et al., 2002; YAN et al., 2009), dentre muitas outras. Polimorfismos na região 3'UTR do gene *HLA-G* - alvo deste estudo – podem afetar o papel biológico do gene influenciando na expressão e distribuição do *HLA-G*, sendo que o aumento de sua expressão resulta na diminuição da resposta imunológica facilitando a progressão de infecções (DONADI et al., 2011).

Frente ao importante papel do gene *HLA-G* no resultado da aquisição e combate de infecções virais e progressão de tumores, avaliamos a correlação entre o polimorfismo de inserção/deleção de 14pb do gene *HLA-G* com o

regressão das SIL em mulheres portadoras ou não da infecção pelo HIV. Em nossa amostra, 64% das participantes apresentam o alelo deleção e 36% o alelo inserção, já o genótipo ins/del foi o mais frequente ocorrendo em 56% dos casos, seguido por del/del com 36% e por ins/ins ocorrendo em apenas 8% dos casos. A frequência do alelo inserção está de acordo com um estudo com 312 mulheres africanas com infecção ou não pelo HIV, no qual foi encontrada uma frequência de 35% (LARSEN et al., 2013), entretanto em um outro estudo com mulheres brasileiras e francesas a frequência deste alelo foi de 43% na população brasileira (MARTELLI-PALOMINO et al., 2013). Em nossa amostra, não foi identificada associação entre a frequência do alelo inserção ( $P = 0,941$ ), do alelo deleção ( $P = 0,938$ ) ou dos genótipos ( $P = 0,993$ ) e pertencer a algum dos grupos estudados, assim como ocorreu no já citado estudo africano, no qual também não foram encontradas diferenças dos genótipos entre os grupos HIV+ e HIV- ( $P = 0,56$ ) (LARSEN et al., 2013).

Em relação a alguns fatores de risco para desenvolvimento de SIL, não encontramos associação entre o tipo de HPV (HR ou LR) com a frequência do alelo inserção ( $P = 1,000$ ), do alelo deleção ( $P = 1,000$ ) ou com os genótipos ins/ins, del/del e ins/del ( $P = 0,911$ ), resultado foi semelhante, em relação aos alelos, ao encontrado em um estudo com mulheres diagnosticadas com ICC, LSIL, condiloma e saudáveis, no qual não foi encontrada associação entre estas variáveis ( $P = 0,17$ ), entretanto neste estudo citado, foi observado um aumento da frequência do genótipo del/del entre as pacientes infectadas por HR-HPV ( $P = 0,0031$ ), sugerindo que a ocorrência de aumento da produção de HLA-G na presença do genótipo del/del possa facilitar as infecções por HR-HPV (BERTOLOTTI et al., 2014). Resultado oposto foi encontrado em um recente estudo, no qual o genótipo ins/ins foi associado com o aumento de risco de infecção pelo HPV 18, um dos mais frequentes HR-HPV (XU et al., 2014). Vale ressaltar, que o baixo número de casos com LR-HPV ( $n=3$ ) possa ter atuado como um fator limitante para adequada análise desta variável em nosso estudo.

Por outro lado, a presença de outras DSTs prévias foi um fator associado significativamente com a ocorrência do alelo inserção, sendo encontrado em 71%

das pacientes com DSTs prévias e em apenas 53% das pacientes sem este histórico ( $P = 0,050$ ). Já o alelo deleção ( $P = 0,648$ ) e os genótipos ( $P = 0,146$ ) não mostraram associação significativa. Tal resultado, se mostra oposto ao esperado uma vez que na presença do genótipo del/del ocorre um aumento de sHLA-G ( $p < 0,05$ ) (MARTELLI-PALOMINO et al., 2013), resultando em diminuição da reposta imune, facilitando a progressão de infecções (DONADI et al., 2011), já o alelo inserção vem sendo associado com baixa expressão de HLA-G (CASTELI et al., 2014; HVIID et al., 2003; HVIID, et al., 2004; HVIID et al., 2006).

Entre as participantes do grupo HIV+, também buscamos possíveis associações entre os alelos e genótipos com a contagem de linfócitos TCD4+ - importante marcador imunológico - e com carga viral do HIV. Em nossa amostra, não foi encontrada associação significativa entre as diferentes taxas de LTCD4+ com a presença do alelo inserção ( $P = 0,735$ ), com a presença do alelo deleção ( $P = 0,298$ ) ou com a presença dos diferentes genótipos ( $P = 0,622$ ). O mesmo ocorreu ao avaliarmos a associação com a carga viral, não encontrando associação com a presença do alelo inserção ( $P = 0,854$ ), com a presença do alelo deleção ( $P = 1,000$ ) ou com os genótipos ( $P = 0,983$ ). Diferente de nossos resultados, um estudo já citado, encontrou queda do número de linfócitos TCD4+ na presença do genótipo del/del ( $P = 0,01$ ) e carga viral aumentada na presença deste mesmo genótipo ( $P = 0,004$ ). Este mesmo estudo, observou diminuição do risco de mortalidade entre indivíduos vivendo com HIV/aids que apresentam o alelo inserção (LARSEN et al., 2013). Corroborando com os achados já citados, no qual o genótipo del/del vem sendo associado com o aumento da expressão de isoformas solúveis e ligadas a membrana resultando na progressão de infecções (CASTELLI et al., 2014; DONADI et al., 2011).

Em relação a associação entre o polimorfismo de 14pb do gene *HLA-G* com a progressão das SIL entre as mulheres do grupo HIV+, identificamos que a presença do alelo inserção está significativamente aumentado dentre as mulheres com HSIL ( $P = 0,009$ ) diferentemente do alelo deleção, o qual apresentou distribuição semelhante entre o grupo com LSIL e o com HSIL ( $P = 0,613$ ). Em em relação aos genótipos, 79% das mulheres do grupo HIV+ que apresentam del/del,

33% que apresentam ins/del e 75% das que apresentam ins/ins possuem LSIL ( $P = 0,003$ ), desta forma a ocorrência do alelo inserção e do genótipo deleção/inserção estão associados significativamente com a presença aumentada no grupo de mulheres vivendo com HIV/aids com HSIL, podendo ser classificado como um fator de risco para a progressão das SIL e a ocorrência do genótipo del/del e ins/ins estão associadas com a presença aumentada dentre as mulheres HIV+ com LSIL, podendo ser considerado um fator protetor na progressão das SIL, entretanto devido ao pequeno número de participantes com o genótipo ins/ins, a análise da associação deste genótipo com a progressão das SIL fica prejudicada. Já entre as mulheres sem a infecção pelo HIV, não foram encontradas associações significantes entre a progressão de SIL com a presença do alelo inserção ( $P = 0,547$ ), do alelo deleção ( $P = 1,000$ ) ou com os genótipos ( $P = 0,828$ ).

O alelo deleção, como já citado, é reconhecido pela sua associação com o aumento da expressão de isoformas solúveis e ligadas à membrana (CASTELLI et al., 2014; HVIID et al., 2003) e este aumento da expressão de HLA-G contribui para susceptibilidade e persistência de infecções virais (DONADI et al., 2011; GONZÁLES et al., 2012). Já no que se refere à progressão das SIL, estudos vem mostrando que o alelo inserção está relacionado à progressão destas lesões, assim como encontramos em nosso grupo de mulheres com a infecção pelo HIV-1. A hipótese levantada para justificar tal ocorrência é que sendo um baixo produtor de HLA-G, o alelo inserção possa facilitar a criação de um ambiente inflamatório aumentando a progressão das lesões cervicais, quando associado à infecção pelo HPV (BORTOLOTTI et al., 2014). Mesmo não sendo comumente associado com a progressão de lesões cervicais, o genótipo ins/del, quando comparado ao del/del, também apresenta uma expressão da proteína solúvel HLA-G diminuída ( $P = 0,0313$ ) (HVIID et al., 2003), este não vem sendo associado com a proteção ou progressão de SIL, embora devido a esta expressão reduzida, também possa contribuir com a criação de um ambiente inflamatório.

Corroborando com estes achados, um importante estudo com a participação de 1.372 mulheres, sendo 833 controles saudáveis, 395 com HSIL e

144 com ICC concluiu que a presença do alelo inserção está associada ao risco aumentado para desenvolvimento de ICC ( $P = 0,020$ ) e o genótipo ins/ins está associado com a progressão de HSIL para ICC (OR = 2,0; IC = 1,01 – 3,98;  $P = 0,048$ ) (FERGUSON et al., 2012). Bertolotti e colaboradores sugerem que este mesmo genótipo possua associação com a progressão das lesões cervicais devido à ausência de ins/ins entre os casos de condiloma e sua presença aumentada entre as participantes com LSIL ou ICC ( $P = 0,011$ ) (BERTOLOTTI et al., 2014). Já Silva e colaboradores, concluíram que o genótipo del/del atua de forma protetora para o desenvolvimento de SIL (OR = 0,40; IC = 0,170 – 0,977;  $P = 0,050$ ) ao encontrar este genótipo em maior proporção dentre as participantes sem SIL em comparação com as participantes com HSIL ou ICC (SILVA et al., 2013). Já em relação ao genótipo ins/del, este não vem sendo associado com a progressão de SIL, porém indivíduos com a infecção pelo HIV-1, com este genótipo apresentam uma maior sobrevivência em 4 anos (80%) em comparação aos participantes com del/del (66%), reforçando seu papel na baixa expressão de HLA-G quando comparado estes dois genótipos (LARSEN et al., 2013).

Tais pesquisas apresentadas, reforçam os resultados obtidos em nosso estudo no grupo HIV+, no qual o alelo inserção e o genótipo ins/del podem ser considerados um fator de risco para progressão de SIL e o genótipo del/del um fator protetor. Já em nosso grupo HIV- nenhuma associação foi encontrada. Embora tenhamos observado esta diferença entre os grupos, não encontramos diferenças significativas entre os grupos e o grau de lesão cervical ajustado pelos alelos inserção (OR = 1,682, IC = 0,813 – 3,483), alelo deleção (OR = 1,706, IC = 0,815 – 3,571) ou genótipos (OR = 1,685, IC = 0,814 – 3,485).

Diante de todo o exposto na literatura, sabemos que o gene *HLA-G* é um importante marcador de doenças infecciosas relacionadas ao agente patogênico e/ou à resposta imune, tendo potencial para se tornar um grande alvo terapêutico (AMIOT, VU, SAMSON et al., 2014), no qual a indução de sua expressão seria importante em casos de doenças auto-imunes e a supressão benéfica em casos de tumores (GONZÁLES et al., 2012). Portanto, identificar o papel do polimorfismo de inserção/deleção de 14pb com a ocorrência, persistência e progressão de



doenças, correlacionando com seu efeito na expressão de HLA-G se mostra importante para desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Neste contexto de evolução tecnológica e dos saberes, cabe ao enfermeiro enfrentar o desafio de participar ativamente na busca pela elucidação da fisiopatologia e desenvolvimento de novas medidas terapêuticas para condições patológicas que envolvem alterações genéticas. (LEA et al., 2011). Ademais, sua formação possibilita uma abordagem holística do cuidado, englobando aspectos biológicos, físicos, ambientais, culturais, sociais e espiritual de cada indivíduo (FLÓRIA-SANTOS; NASCIMENTO, 2006) facilitando a integração entre o conhecimento advindo de pesquisas com a prática clínica, resultando em uma assistência de enfermagem fundamentada, especializada e de alta qualidade.

Ressaltamos que este estudo apresenta algumas limitações, que incluem: o baixo número de participantes, dificultando as análises e limitando a aplicação dos resultados para além da amostra estudada; seleção amostral por conveniência realizada em um hospital terciário, resultando na dificuldade de seleção de mulheres com SIL de baixo grau; impossibilidade de tipificação do HPV de todas as amostras coletadas, impedindo a avaliação da distribuição dos LR-HPV e HR-HPV nos diferentes graus de lesão; baixa presença do genótipo ins/ins, dificultando a real identificação do efeito de sua ocorrência com o desenvolvimento de SIL. Entretanto, mesmo apresentando limitações, os resultados deste estudo contribuem para elucidação do papel do polimorfismo de 14pb na região 3'UTR do gene *HLA-G* no desenvolvimento de SIL, em especial entre as mulheres vivendo com HIV/aids.

## **CONCLUSÃO**

---

## 7. CONCLUSÃO

1. Após análise dos dados sociodemográficos e clínicos, observamos que a idade das participantes está de acordo com a faixa etária de maior ocorrência de SIL, a distribuição da amostra segundo cor da pele foi semelhante ao encontrado na população brasileira e a ocorrência de grande número de casos de mulheres com baixa escolaridade e sem exercer atividade remunerada, comum em outros estudos semelhantes. Não encontramos relação entre ter parceiros sexuais casuais, idade precoce na primeira relação sexual, número de gestações, uso de anticoncepcionais hormonais e tabagismo, com a presença da infecção pelo HIV, diferenças no grau de SIL ou tipo de HPV. Já em relação a ocorrência de outras DSTs prévias, foi observado um aumento significativo no grupo HIV+ e entre as mulheres com LSIL. Dentre as participantes vivendo com HIV/aids, não foi encontrada associação significativa entre os biomarcadores da infecção pelo HIV-1 (LTCD4+, CV e uso de ARV) com a progressão de SIL ou com tipo de HPV;

2. Dentre as 60 amostras genotipadas, encontramos um grande predomínio de infecção por HR-HPV e variação na distribuição dos genótipos entre os dois grupos estudados. Apesar das diferenças encontradas, o HPV 16 foi predominante em ambos os grupos, já o HPV 35 apresentou importante representatividade entre as mulheres com a infecção pelo HIV-1 e não foi encontrado entre as mulheres sem a infecção.

3. A frequência dos alelos inserção e deleção encontradas neste estudo foram semelhante ao relatado na literatura. Não encontramos associação entre a distribuição dos alelos e genótipos com a presença ou não da infecção pelo HIV-1 ou com a contagem de LTCD4+ e com a CV. Também não encontramos associação entre o polimorfismo de inserção/deleção de 14pb com diferenças na ocorrência de infecção por HR-HPV ou LR-HPV. Já em relação às SIL, o alelo inserção e o genótipo ins/del são fatores de risco para progressão das SIL entre as mulheres com a infecção pelo HIV-1 e o genótipo del/del um fator protetor. Dentre as mulheres sem a infecção pelo HIV, nenhuma associação significativa entre estas variáveis foi observada.

***REFERÊNCIAS***

---

## 8. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. O complexo principal de histocompatibilidade. In: **Imunologia celular e molecular**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 65-81.

ACTOR, J. K. **Imunologia e microbiologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

AIDÉ, S. et al. Neoplasia Intraepitelial Cervical. **J bras Doenças Sex Transm**, v. 21, n. 4, p. 166-70, 2009.

ALEGRE, E. et al. Some Basic Aspects of HLA-G Biology. **J Immunol Res**, v. 2014, p. 1-10, 2014.

ALMONTE, M. et al. Risk factors for Human Papillomavirus Exposure and Co-factors for Cervical Cancer in Latin America and the Caribbean. **Vaccine**, v. 26S, p. L16-36, 2008.

AMIOT, L.; VU, N.; SAMSON, M. Immunomodulatory Properties of HLA-G in Infectious Diseases. **J Immunol Res**, v. 2014, p. 1-14, 2014.

ARCAVI, L.; BENOWITZ, N. L. Cigarette smoking and infection. **Arch Intern Med**, v. 164, n. 20, p. 2206-16, 2004.

BORTOLOTTI, D. et al. Implication of HLA-G 3' untranslated region polymorphisms in human papillomavirus infection. **Tissue Antigens**, v. 83, n. 2, p. 113-8, 2014.

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 Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. **Agenda Nacional de Prioridades de Pesquisa em Saúde**. 2ªed. Brasília, DF, 2008a. 68p.

---

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, 2008b. 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://serieestatisticas.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, 2014a. 80p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2014: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, RJ: INCA, 2014b. 125p.

BERNARD, H. U. et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, v. 401, p. 70-9, 2010.

BRAVO, I. G.; SANJOSE, S.; GOTTSCHLING, M. The clinical importance of understanding the evolution of papillomaviruses. **Trends Microbiol**, v. 18, p. 432-8, 2010.

BRIGIDO, L. F. M. et al. Southern Brazil HIV Type 1 C Expansion into the State of São Paulo, Brazil. **AIDS Res Human Retroviruses**, v. 27, n. 3, p. 339-44, 2011.

BRUGIERE, O. et al. Immunohistochemical study of HLA-G expression in lung transplant recipients. **Am J Transplant**, v. 9, n. 6, p. 1427-38, 2009.

---

BRUNI, L. et al. Vacuna frente al virus del papilloma humano. Eficacia y seguridad. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 33, n. 5, p. 342-54, 2015.

CAROSELLA, E.D. The tolerogenic molecule HLA-G. **Immunol Lett**, v. 138, p. 22-4, 2011.

CAROSELLA, E. D. et al. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. **Blood**, v. 111, n. 10, p. 4862-70, 2008.

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. **J bras Doenças sex Transm**, v. 23, n. 1, p. 28-33, 2011.

CASTELLI, E. C. et al. Transcriptional and Posttranscriptional Regulations of the *HLA-G* Gene. **J Immunol Res**, v. 2014, p. 1-15, 2014.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Pneumocystis Pneumonia – Los Angeles **MMWR**, v. 30, p 1-3, 1981. Disponível em: <[http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/june\\_5.htm](http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/june_5.htm)>. Acesso em: 23 jan 2015.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Human T-Cell Leukemia Virus Infection in Patients with Acquired Immune Deficiency Syndrome: Preliminary Observations. **MMWR**, v.32, p. 233-234, 1983. Disponível em < <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00000075.htm> >. Acesso em: 23 jan 2015.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **HIV/AIDS basic**. Atlanta, GA, 2006. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/hiv/basics/whatishiv.html>>. Acesso em: 16 jan 2015.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. AIDS: The Early Years and CDC's Response. v. 60, p 64-69, 2011. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/su6004a11.htm>>. Acesso em: 23 jan 2015.

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. **Esc. Anna Nery**, v. 14, n. 1, p. 126-34, 2010.

---

CLIFFORD, G. M. et al. Human papillomavirus types among women infected with HIV: a meta-analysis. **AIDS**, v. 20, n. 18, p. 2337-44, 2006.

COHEN, J. Early AIDS virus may have ridden Africa's rails. **Science**, v. 346, n. 6205, p. 21-2, 2014.

CONTINI, P. et al. HLA-A, -B, -C and -G molecules induce apoptosis in T and NK CD8+ cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation. **Eur. J. Immunol.**, v. 33, n. 1, p. 125-34, 2003.

CORDERO, E. A. et al. HLA-G polymorphism influences the susceptibility to HCV infection in sickle cell disease patients. **Tissue Antigens**, v. 74, n. 4, p. 308-13, 2009.

CUBIE, H. A. Diseases associated with human papillomavirus Infection. **Virology**, v. 445, 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. **Arch Pathol Lab Med**, v. 136, p. 1266-97, 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.

DONADI, E. A. et al. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. **Cell Mol Life Sci**, v. 68, n. 3, p. 369-95, 2011.

FARIA, N. R. et al. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. **Science**, v. 346, p. 61, 2014.

FERGUSON, R. et al. Human leukocyte antigen G polymorphism is associated with an increased risk of invasive cancer of the uterine cervix. **Int. J. Cancer**, v. 131, n. 3, p. E312-9, 2012.



---

FERNANDES, A. P. M. et al. Influence of the HPV-16 on IL-10 intralesional production in immunogenetically responsive women carrying HIV-1 infection. **J Bras Doenças Sex Transm**, v. 16, n. 3, p. 67-72, 2004.

FLÓRIA-SANTOS, M. et al. Oncology nursing practice from the perspective of genetics and genomics. **Texto contexto – enferm**, v. 22, n. 2, p. 526-33, 2013.

FLÓRIA-SANTOS, M.; NASCIMENTO, L. C. Perpesctivas históricas do Projeto Genoma e a evolução da enfermagem. **Ver Bras Enferm**, v. 59, n. 3, p. 358-61, 2006.

FOCACCIA, R. et al. Tratado de Infectologia v.1, 4. ed., Editora Atheneu, São Paulo, 2010. p. 131-277, 681-98.

GALLO et al. Isolation of Human T- Cell Leukemia Virus in Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). **Science**, v. 220, n. 4599, p. 865-7, 1983. Disponível em: < <http://www.sciencemag.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=6601823>>, Acesso em: 23 jan 2015.

GAMBERINI, K. S. T. et al. Relação entre raça/cor e a freqüência de lesões intra-epiteliais de alto grau (NIC II e NIC III). **Saúde Coletiva**, v. 5, n. 20, p. 51-56, 2008.

GERAGHTY, D. E.; KOLLER, B. H.; ORR H.T. A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. **Proc Natl Acad Sci**, v. 84, p. 9145–9, 1987.

GIMENES, F. et al. Human leukocyte antigen (HLA)-G and cervical câncer immunoediting: A candidate molecule for therapeutic intervention and prognostic biomarker? **Biochim Biophys Acta**, v. 1846, n. 2, p. 576-89, 2014.

GISSMANN, L., HAUSEN H. Z. Human papiloma virus DNA: Physical mapping and genetic heterogeneity. **Medical Sciences**, v. 73, n. 4, p. 1310-3, 1976. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC430256/>>. Acesso em: 04 fev 2015.

---

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. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 114, n. 2, p. 221-7, 2004.

GONZÁLES, A. et al. The Immunosuppressive molecule HLA-G and its clinical implications. **Crit Rev Clin Lab Sci**, v. 49, n. 3, p. 63-84, 2012.

HAUSEN, H. Z. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342-50, 2002.

GORER, P. A. The genetic and antigenic basis of tumour transplantation. **J Phatol Bacteriol**, v. 44, n. 3, p. 691-7, 1937. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/path.1700440313/abstract>>. Acesso em: 02 mar 2015.

HARRISON, G. A. et al. A 14 pb deletion polymorphism in the *HLA-G* gene. **Hum Mol Genet**, v. 2, n.12, p. 2200, 1993.

HERRERA, C.; CAMPERA, L. La vulnerabilidad e invisibilidad de las mujeres ante el VIH/SIDA: constantes y câmbios em el tema. **Salud Pub Mex**, v. 44, p. 555-564, 2002.

HERRERO, R.; GONZÁLES, P.; MARKOWITZ, L. Present status of human papillomavirus vaccine development and implementation. **Lancet Oncol**, v. 16, p 206-16, 2015.

HVIID, T. V. et al. HLA-G polymorphisms in couples with recurrent spontaneous abortions. **Tissue Antigens**. v. 60, n. 2, p. 122-32, 2002.

HVIID, T. V. et al. HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels, **Immunogenetics**, v. 55, n. 2, p. 63-79, 2003.

HVIID, T. V. et al. HLA-G and IL-10 in serum in relation to HLA-G genotype and polymorphisms. **Immunogenetics**, v. 56, n. 3, p. 135-41, 2004.

---

HVIID, T. V. et al. Polymorphism in the 5' Upstream Regulatory and 3' Untranslated Regions of the *HLA-G* Gene in Relation to Soluble HLA-G and IL-10 Expression. **Hum Immunol**, v. 67, n. 1-2, p. 53-62, 2006.

HORTON, R. L. et al. Gene map of the extended human MHC. **Nat. Rev. Genet.**, v. 5, p. 889-99, 2004.

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.; GERAGHTY, D. E. Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens. **Proc Natl Acad Sci**, v. 89, p. 3947-51, 1992.

JEMAL, A. et al. Global Cancer Estatistics. **CA Cancer J Clin**, v. 61, p. 69-90, 2011.

KIM, R. H. et al. HIV-1 Tat enhances replicative potential of human oral keratinocytes harboring HPV-16 genome. **Int J Oncol**, v. 33, n. 4, p. 777-82, 2008.

KJAER, S. K., et al. A Pooled Analysis of Continued Prophylactic Efficacy of Quadrivalent Human Papillomavirus (Types 6/11/16/18) Vaccine against High-grade Cervical and External Genital Lesions. **Cancer Prev Res**, v. 10, n. 2, p.868- 78, 2009.

KOVATS, S. et al. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. **Science**, v. 248, p. 220–3, 1990.

KWASNIEWSKA, A. et al. Estrogen and progesterone receptor expression in HPV-positive and HPV-negative cervical carcinomas. **Oncol Rep**, v. 26, n. 1, p. 153-60, 2011.

LARSEN, M. H. et al. HLA-G 3' untranslated region 14-base pair deletion: association survival in an HIV-1-infected Zimbabwean population. **J Infect Dis**, v. 207, p. 903–6, 2013.

---

LE ROND, S. et al. Evidence to support the role of HLA-G5 in allograft acceptance through induction of immunosuppressive/regulatory T cells. **J. Immunol.**, v. 176, n. 5, p. 3266-76, 2006.

LEA, D. H. et al. Implications for Educating the Next Generation of Nurses on Genetics and Genomics in the 21st Century. **J Nurs Scholarsh**, v. 43, n. 1, p. 3-12, 2011.

LEE, H. et al. Risk factors associated with human papillomavirus infection status in Korea cohort. **Epidemiol. Infect.**, v. 142, p. 1579-89, 2014.

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.

LIN, L. 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. **J Ypmed**, v. xxx, n. 2015, p. 1-4, 2015. Disponível em: < [www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091743515002790](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091743515002790)?nP =y > Acesso em: 15 jun 2015.

LOZANO, J. M. et al. Monocytes and T lymphocytes in HIV-1-positive patients express HLA-G molecule. **AIDS**, v. 16, n. 3, p. 347-51, 2002.

MANIAR, K. P.; Nayar, R. HPV-related Squamous Neoplasia of the Lower Anogenital Tract: An Update and Review of Recent Guidelines. **Adv Anat Pathol**, v. 21, n. 5, p. 341-58, 2014.

MARKOWITZ, L. E. et al. Human Papillomavirus Vaccine Introduction – The First Five Years. **Vaccine**, v. 30s, p. F139-48, 2012.

MARKS, M. A.; KLEIN, S. L.; GRAVITT, P. E. Hormonal contraception and HPV: a tale of differing and overlapping mechanisms. **Contraception**, v. 2, p. 161-74, 2011.

MARKS, M. A. et al. Prevalence and correlates of among women attending family-planning clinics in Thailand. **BCM Infectious Diseases**, v. 15, p. 159, 2015.

---

MARTELLI-PALOMINO, G. et al. Polymorphic Sites at the 3'Untranslated Região of the *HLA-G* Gene Are Associated with Differential HLA-G Soluble Levels in the Brazilian and French Population. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. 1-10, 2013.

MATSUMOTO, K. et al. Tobacco smoking and regression of low-grade cervical abnormalities. **Cancer Sci**, v. 101, n. 9, p. 2065-73, 2010.

MILLER, A. S. et al. A simple salting-out procedure for extraction of DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, p.1255, 1988.

MUÑOZ, N. et al. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. **N Engl J Med**, v. 348, p. 518-27, 2003.

MONTAGNIER, L. et al. Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). **Science**, v. 220, p. 868-71, 1983.

MORENO, V. 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, p. 1085-92, 2002.

MURDACA, G. et al. Behavior of non-classical soluble HLA class G antigens in human immunodeficiency virus 1-infected patients before and after HAART: Comparison with classical soluble HLA-A, -B, -C antigens and potential role in immune-reconstitution. **Clin Immunol**, v. 133, n. 2, p. 238-44, 2009.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunologia de Janeway**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 525-51.

NASCIMENTO, V. T.; VARGA, V. R. A. Freqüência de citologias atípicas em adolescentes no Laboratório Osvaldo Cruz, município de Santo Ângelo - RS. **Rev. Bras. Far.**, v. 89, n. 4, p. 347-51, 2008.

NOVAES, H. M. D. et al. Cost-effectiveness analysis of introducing universal human papillomavirus vaccination of girls aged 11 years into the National Immunization Program in Brazil. **Vaccine**, v. 33S, p. A135-42, 2014.

---

NOWAKOWSKI, A. et al. HPV-Type Distribuição and Reproducibility of Histological Diagnosis in Cervical Neoplasia in Poland. **Pathol Oncol Res**, v. 21, n. 3, p. 703-11, 2014.

NYAGOL, J. et al. The effects of HIV-1 Tat protein on cell cycle during cervical carcinogenesis. **Cancer Biol Ther**, v. 5, n. 6, p. 684-90, 2006.

PAASO, 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. **J Transl Med**, v 163, n. 13, p. 1-11, 2015.

PINTO, A. P.; TULIO, S.; CRUZ, O. R. Co-fatores do HPV na Oncogênese Cervical. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 48, n. 1, p. 73-8, 2002.

PLUMMER, M.; PETO, J.; FRANCESCHI, S. Time since first sexual intercourse and the risk of cervical cancer. **Int J Cancer**, v. 130, n. 11, p. 2638-44, 2012.

RICHART, R. M. A modified terminology for cervical intraepithelial neoplasia. **Obstet. Gynecol.**, v. 75, p. 131, 1990.

RIVERO, A. et al. Nucleoside Reverse transcriptase inhibitors are able and protease inhibitors unable to induce the tolerogenic molecule HLA-G1 on monocytes from HIV-1 infected patients. **Hum Immunol**, v. 68, n. 4, p. 303-6, 2007.

ROURA, E. et al. Smoking as a major risk factor for cervical cancer and pre-cancer: Results from the EPIC cohort. **Int J Cancer**, v. 135, n. 2, p. 453-66, 2014.

ROUSSEAU, P. et al. The 14 pb Deletion-Insertion polymorphism in the 3'UT region of the *HLA-G* gene influences HLA-G mRNA stability. **Hum Immunol**, v. 64, n. 11, p. 1005-10, 2003.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci**, v. 74, n. 12, p. 5463-7, 1977. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC431765/>> Acesso em: 05 de jun de 2015.

---

SANJOSE, S. et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. **Lancet Oncol**, v. 11, p. 1048-56, 2010.

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. **Sex Transm Dis**, v. 36, n. 4, p. 241-8, 2009.

SANTOS, N. J. S. et al. Contextos de vulnerabilidade para o HIV entre mulheres brasileiras. **Cad. Saúde Pública**, v. 25, n. 2, p.S321-33, 2009

SELIGER, B.; SCHLAF, G. Structure, expression and function of HLA-G in renal cell carcinoma. **Semin Cancer Biol**, v. 17, p. 444–50, 2007.

SHARP, P. M.; HAHN, B. H. The evolution of HIV-1 and the origin of AIDS. **Phil. Trans. R. Soc. B.**, v. 365, p. 2487-94, 2010.

SIEGEL, S. CASTELLAN, N. J. J. **Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 448p.

SILVA, I. D. et al. HLA-G 3'UTR polymorphisms in high grade and invasive cervica-vaginal cancer. **Hum Immunol**, v. 74, n. 4, p. 452-8, 2013.

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 Med J**, v. 132, n. 2, p. 92-6, 2014.

SIMEN-KAPEU, A. et al. Tobacco smoking and chewing as risk factors for multiple human papillomavirus infections and cervical squamous intraepithelial lesions in two countries (Côte d' Ivoire and Finland) with different tobacco exposure. **Cancer Causes Control**, v. 20, p. 163-170, 2009.

SIMÕES, R. T. et al. HLA-G polymorphisms in women with squamous intraepithelial lesions harboring human papillomavirus. **Mod Pathol**, v. 22, n. 8, p. 1075-82, 2009.

---

SMITH, E. M. et al. Perinatal vertical transmission of human papillomavirus and subsequent development of respiratory tract papillomatosis. **Ann Otol Rhinol Laryngol**, v. 100, p. 479-83, 1991.

SMITH, M. A. et al. Determinantes of human papillomavirus coinfections among Montreal university students: The influence of behavioral and biologic factors. **Cancer. Epidemiol Biomarkers**, v. 23, n. 5, p. 812-22, 2014.

SMITH, J. S. et al. Herpes Simplex Virus-2 as a Human Papillomavirus Cofactor in the Etiology of Invasive Cervical Cancer. **J Natl Cancer Inst**, vol. 94, n. 21, p.1604-13, 2002.

SMITH, J. S. et al. Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review. **The lancet**, v. 361, n.9364, p. 1159-67, 2003.

SMITH, J. S. et al. Chlamydia Trachomatis and invasive cervical cancer: A pooled analysis of the IARC multicentric case-control study. **Int. J. Cancer**, v. 11, p. 431-39, 2004.

SMITH, J. S. et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update. **Int. J. Cancer**, v. 121, p. 621–32, 2007.

SMITH, J. S. et al. Age-specific prevalence of infection with human papillomavirus in females: a global review. **J Adolesc Health**, v. 43, n. 4, p. S5-25, 2008.

STANLEY, M.; PINTO, L. A.; TRIMBLE, C. Human Papillomavirus Vaccines – Immune Responses. **Vaccine**, v. 30S, p. F83-7, 2012.

STENSE, S. et al. Factors associated with type-specific persistence of high-risk human papillomavirus infections: A population-base study. **Int. J. Cancer.**, v. 00, p. 00-00, 2015. Disponível em: < [onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.29719/full](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.29719/full) > Acesso em: 13 jun 2015.

SVENDIZEN, S. G. et al. The expression and functional activity of membrane-bound human leukocyte antigen-G1 are influenced by the 30-untranslated region. **Human Immunology**, v. 74, p. 818-27, 2013.



SYRJANEN, K. et al. Smoking is an independent risk factor for oncogenic human papillomavirus (HPV) infections but not for high-grade CIN. **Eur J Epidemiol**, v. 22, n. 10, p. 723-35, 2007.

TAYLOR, B. S. et al. The Challenge of HIV-1 Subtype Diversity. **N Engl J Med**, v. 358 p.1590-1602, 2008

TEIXEIRA, N. C. P. Prevalence and risk factors for cervical intraepithelial neoplasia among HIV-infected women. **J Infect Dis Braz**, v. 16, n. 2, p. 164-9, 2012.

TOMMASINO, M. The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. **Semin Cancer Biol**, v. 26, p. 13-21, 2013.

TRAN, L. T. H. et al. Risk factors for high-risk and multi-type Human Papillomavirus infections among women in Ho Chi Minh city, Vietnam: a cross-sectional study. **BMC Women's Health**, v. 15, n. 16, p. 1-9, 2015.

TRIPATHI, P.; AGRAWAL, S. Non-classical HLA-G antigen and its role in the cancer progression. **Cancer Invest.**, v. 24, n. 2, p.178-86, 2006.

URSU, R. G. 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 test. **PLoS One**, v.10, n. 7, p. 1-11, 2015.

UTIYAMA, S. R. R.; REASON, I. T. M.; KOTZE, L. M. S. O sistema complementar nas doenças: genética e patogenia. **Rev Bras Reumatol**, v. 44, n. 4, p. 277-86, 2004.

VELDHUIJZEN, N. J. et al. Factors affecting transmission of mucosal human papillomavirus. **Lancet Infect Dis**, v. 10, p. 862-74, 2010.

VILLIERS, E. M. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, p 17-27, 2004.

VILLIERS, E. M. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 445 p. 2-10, 2013.

---

VINODHINI, K. et al. Prevalence and risk factors of HPV infections among women from various provinces of the world. **Arch. Gynecol. Obstet.**, v. 285, n. 3, p. 771-7, 2012.

VUYST, H. et al. Prevalence of human papillomavirus in women with invasive cervical carcinoma by HIV status in Kenya and South Africa. **Int J Cancer**, v. 131, n. 4, p. 949-55, 2012.

WU, J. et al. Isoforms of human leukocyte antigen-G and their inhibitory receptors in human kidney allograft acceptance. **Hum Immunol**, v. 70, p. 988-94, 2009.

XU, H. H. et al. HLA-G 3'untranslated region polymorphisms influence the susceptibility for human papillomavirus infections. **Tissue Antigens**, v. 84, n. 2, p. 216-22, 2014.

YAN, W. H. et al. Induction of both membrane-bound and soluble HLA-G expression in active human cytomegalovirus infection. **J Infect Dis**, v. 200, n. 5, p. 820-6, 2009.

YANG, Y. C. et al. Human leucocyte antigen-G polymorphisms are associated with cervical squamous cell carcinoma risk in Taiwanese women. **Eur J Cancer**, v. 50, n. 2, p. 469-74, 2014.

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. 185-90, 2012.

ZIMMERMAN, J. B. et al., Associação entre a contagem de linfócitos TCD4+ e a gravidade da neoplasia intra-epitelial cervical diagnosticada pela histopatologia em mulheres infectadas pelo HIV. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 28, n. 6, p. 345-51, 2006.

***APÊNDICES***

## APÊNDICE I – INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

### IDENTIFICAÇÃO

Iniciais: \_\_\_\_\_ Nº de registro: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
 Telefone: \_\_\_\_\_ Endereço: \_\_\_\_\_  
 Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Raça: (1) Branca (2) Negra (3) Parda  
 Procedência \_\_\_\_\_ Profissão: \_\_\_\_\_  
 Escolaridade: (1) Analfabeta (2) Ensino Fundamental Incompleto (3) Ensino Fundamental Completo  
 (4) Ensino Médio Incompleto (5) Ensino Médio Completo (6) Ensino Superior Incompleto (7)  
 Ensino 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 TCD4+. 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 M. P. Matos

---

Participante do estudo

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

---

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

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

***ANEXOS***



---

## 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