

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO**

MARIANA RODRIGUES SANTIAGO

**Expressão das moléculas HLA-G em tecido placentário de
mulheres infectadas ou não pelo HIV-1**

Ribeirão Preto

2013

MARIANA RODRIGUES SANTIAGO

**Expressão das moléculas HLA-G em tecido placentário de
mulheres infectadas ou não 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: problemática e estratégias de enfrentamento

Orientador: Ana Paula Morais Fernandes

Ribeirão Preto

2013

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

Santiago, Mariana Rodrigues

Expressão das moléculas HLA-G em tecido placentário de mulheres infectadas ou não pelo HIV-1. Ribeirão Preto, 2013.

100 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. HLA-G. 3. Expressão. 4. Placenta.

FOLHA DE APROVAÇÃO

SANTIAGO, Mariana Rodrigues

Expressão das moléculas HLA-G em tecido placentário de mulheres infectadas ou não 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: _____

À minha família, por compreender o motivo da minha ausência e me incentivar a superar as limitações. Em especial, à minha nova família, Erick e Theo, por serem meus fiéis companheiros nessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Ao meu grande amor Erick, que tornou minha vida ainda melhor com seu amor, dedicação, paciência, companheirismo e incentivo, “ *car ma vie, car mes joies, aujourd'hui ça commence avec toi*” (Michel Vaucuire / Charles Dumont).

À minha mãe Neide, minha irmã Gabriela, minha sobrinha e afilhada Ana Luiza por serem meu porto seguro. Agradeço também às minhas tias Adalgisa e Vânia, minha avó Terezinha e aos meus primos Marina, Vinícius e Murilo, e a minha sogra Roseli.

Às minhas grandes amigas doutorandas Larissa e Cibele, por me incentivarem a ingressar no mestrado e me apoiarem academicamente e, acima de tudo, por serem minhas grandes parceiras nos momentos bons e ruins. Amo vocês.

Às minhas queridas amigas Fernanda, Maria Cristina, Marília e Vanessa. Não há palavras para agradecer a amizade, o carinho e o companheirismo de vocês.

À minha companheira de projeto Juliana, o caminho foi tortuoso, mas o resultado foi gratificante. Com certeza só conseguimos alcançar nosso objetivo porque verdadeiramente fomos uma equipe.

À Prof^a. Dr^a. Ana Paula Morais Fernandes por ter aceitado me orientar nesse trabalho, que me proporcionou crescimento profissional e pessoal, acreditando no meu potencial e me encorajando a explorar minhas habilidades.

Ao Prof. Dr. Eduardo Antonio Donadi, pela co-orientação e sugestões que favoreceram a realização de um trabalho ainda melhor.

Ao Prof. Dr. Gyl Eanes Barros Silva pela imensa ajuda ao longo da realização desse trabalho. Agradeço também ao doutorando Renan Augusto Pereira pelo auxílio e pela atenção dispensada no decorrer do trabalho.

Ao patologista Dr. Diego Agra de Souza pela sua participação imprescindível na realização da leitura das lâminas. Não seria possível ter realizado esse belo trabalho sem a sua participação.

Ao Prof. Dr. Roberto Silva Costa e aos funcionários do seu laboratório, Guilherme e Flávio, por nos prestarem um auxílio impagável durante o emblocamento e montagem das lâminas.

Ao Prof. Dr. Fernando Chahud e às funcionárias do seu laboratório, Laura e Márcia, que também nos prestaram auxílio e nos ajudaram a superar alguns imprevistos ocorridos ao longo desse trabalho.

Aos funcionários do Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, Ana Beatriz e Osmar, e especialmente a Ana Maria Anselmi, por se disponibilizar incansavelmente a nos ajudar na adaptação do protocolo de imunoistoquímica. MUITÍSSIMO Obrigada.

À Prof^a. Dr^a. Christiane Soares, por permitir a realização de parte dos experimentos em seu laboratório. Agradeço também a atenção e empenho da Dr^a. Tarsia Giabardo Alves Silva e da Prof^a. Dr^a. Janaína Cristiana de Oliveira Crispim Freitas, na realização dos primeiros experimentos.

À Dr^a Silvana Maria Quintana, à Enf^a Ana Paula, gerente de enfermagem do Centro de Referência em Saúde da Mulher – Mater, e a toda equipe do Centro Obstétrico pelo auxílio durante a coleta de dados.

É preciso força pra sonhar e perceber

Que a estrada vai além do que se vê

(Marcelo Camelo)

RESUMO

SANTIAGO, M. R. Expressão das moléculas HLA-G em tecido placentário de mulheres infectadas ou não pelo HIV-1. 2013. 100 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

A gravidez humana é permeada por diversos mecanismos de adaptação para evitar a rejeição do feto, que, por se tratar de um tecido semialogênico, deveria ser rejeitado pelo sistema imunológico materno. A molécula HLA-G, presente na interface materno-fetal, apresenta uma característica imunossupressora que age proporcionando inibição contra a citotoxicidade das células NK e linfócitos T citotóxicos, conferindo efeito modulador benéfico à gestação. Entretanto, devido a suas propriedades imunossupressoras, essa molécula pode estar envolvida na persistência e progressão da infecção pelo HIV-1. Nosso objetivo foi avaliar a expressão das moléculas HLA-G em tecidos placentários de mulheres infectadas ou não pelo HIV-1. Trata-se de um estudo transversal e descritivo, para o qual foram coletadas biópsias placentárias de 100 mulheres infectadas pelo HIV-1 e 100 mulheres não infectadas. Ao realizar a análise dos dados sócio-demográficos, pudemos observar que o perfil das mulheres atendidas num hospital de referência no município de Ribeirão Preto assemelha-se ao encontrado nacionalmente. A faixa etária prevalente foi de 20 a 29 anos (48%); em relação à cor da pele, a grande maioria (71%) era branca; quanto à escolaridade, a população estudada apresentou maior frequência de ensino fundamental (61%); e a maioria (68%) não desempenhava atividade remunerada. Quanto à via de parto, 56,7% das mulheres foram submetidas a cesárea eletiva e 100% fizeram uso de antirretroviral injetável no momento do parto, conforme preconização do Ministério da Saúde. A técnica laboratorial utilizada foi imunoistoquímica, cuja análise foi realizada por um patologista. Os resultados obtidos não mostraram associação entre a expressão das moléculas HLA-G e os biomarcadores da infecção pelo HIV-1, como carga viral (cópias/mL) e células CD4⁺ (células/mm³), nem em relação ao uso de terapia antirretroviral (TARV). Contudo, observamos que as placentas das mulheres infectadas pelo HIV-1 apresentaram redução na expressão de HLA-G em comparação com as mulheres que não apresentam a infecção ($p < 0,01$), sugerindo que essa redução possa ser um mecanismo de escape viral, que acarreta a redução da apresentação de peptídeos virais para os linfócitos T CD8⁺. Para melhor compreensão do padrão de expressão das moléculas HLA-G em placentas de mulheres infectadas pelo HIV-1, faz-se necessária a realização de outros estudos utilizando metodologias distintas.

Palavras-chave: HIV-1. HLA-G. Expressão. Placenta.

ABSTRACT

SANTIAGO, M. R. The HLA-G expression in placental tissue of both HIV-1 infected and uninfected women. 2013. 100 p. Dissertation (Master's) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

In order to prevent the rejection of the semiallogenic tissue of the fetus by the maternal immune system, human pregnancy presents a variety of adaptation mechanisms. The HLA-G molecule in the maternal-fetal interface, presents an immunosuppressant feature that inhibits the cytotoxicity of NK cells and T lymphocytes, with a positive modulating effect over the pregnancy. Nevertheless, due to its immunosuppressive properties, the HLA-G molecule might be related to the continuance and the progression of the HIV-1 infection. Our objective was to analyse the expression of HLA-G in placental tissues of both HIV-1 infected and uninfected women. As a descriptive and cross-sectional study, placental biopsies were collected from 100 HIV-1 infected women and 100 from uninfected ones. When socio-demographic data were analysed, it was observed that the profile of women taken care at the referential hospital in Ribeirão Preto resembled the ones found nationwide: the most prevalent age group was the 20-29 years (48%); the vast majority was of white people (71%); there was a higher frequency of primary education in this group (61%); and most of them did not perform any paid activity (68%); 56.7% of them underwent elective cesarean; and 100 % of them made use of injectable antiretroviral at the delivery, as prescribed by the Ministry of Health. The laboratorial technique used was immunohistochemical, which was performed by a pathologist. Final results showed no association between the expression of HLA-G and the biomarkers of the HIV-1, such as viral load (copies/mL) and CD4⁺ cell counting (cells/mm³) or even the use of antiretroviral therapy (ART). Nevertheless, in the placenta of women infected with HIV-1, the expression of the HLA-G proved to be reduced in comparison to women who did not have the infection ($p < 0.01$), suggesting that this reduction could be a mechanism for viral escape which entails the reduction of viral peptides to CD8⁺ T lymphocytes. To understand the full extension of the expression pattern of the HLA-G in HIV-1 infected women, it is necessary to perform further studies using different methodologies.

Keywords: HIV-1. HLA-G. Expression. Placenta.

RESUMEN

SANTIAGO, M.R. La expresión de la molécula HLA-G en lo tejido de la placenta de las mujeres infectadas y no infectadas por VIH-1. 2013. 100 p. Tesis (Maestría) - Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Con el fin de evitar el rechazo del tejido semialogénico del feto por el sistema inmunológico de la madre, lo embarazo humano presenta una variedad de mecanismos de adaptación. La molécula de HLA-G en la interfase materno-fetal, presenta una característica inmunosupresora que inhibe la citotoxicidad de las células NK y de los linfocitos T, con efecto modulador positivo durante el embarazo. Sin embargo, debido a sus propiedades inmunosupresoras, la molécula de HLA-G podría estar relacionada con la permanencia y la progresión de la infección por VIH-1. Nuestro objetivo he sido analizar la expresión de HLA-G en los tejidos de la placenta de las mujeres infectadas y no infectadas por VIH-1. En un estudio descriptivo y transversal, fueran recogidas 100 biopsias placentarias de mujeres infectadas por el VIH y 100 de las no infectadas. Cuando se analizaron los datos socio-demográficos, se observó que el perfil de las mujeres atendidas en el hospital de referencia en Ribeirão Preto parecía a los que se encuentran en todo el país: el grupo de edad más frecuente fue de los 20-29 años (48%); la gran mayoría era de blancos (71%); se observó una mayor frecuencia de la educación primaria en este grupo (61%); la mayoría de ellos no realiza ninguna actividad remunerada (60%); 56,7 % de ellas se sometió a una cesárea electiva; y 100 % de ellas hizieran uso de antirretrovirales inyectables en el momento de la entrega, según lo prescrito por el Ministerio de Salud. La técnica de laboratorio utilizada fue inmunohistoquímica, que fue realizada por un patólogo. Los resultados finales no mostraron ninguna asociación entre la expresión de HLA-G y los biomarcadores de la epidemia del VIH-1, como las tales de carga viral (copias/mL) y el conteo de células CD4+ (células/mm³), o incluso el uso de la terapia antirretroviral (TAR) . Sin embargo, en la placenta de las mujeres infectadas con VIH - 1 , la expresión de la molécula HLA-G resultó ser reducido en comparación con las mujeres que no tenían la infección ($p < 0,01$), lo que sugiere que esta reducción podría ser un mecanismo para el virus escapar, lo que implica en la reducción de los péptidos virales a los linfocitos T CD8 + . Para entender la extensión completa del patrón de expresión de la HLA - G en las mujeres infectadas por VIH-1, es necesario realizar otros estudios utilizando diferentes metodologías.

Palabras clave: VIH - 1. HLA-G. Expresión. Placenta.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Representação da estrutura e replicação do HIV-1. | 22 |
| Figura 2 - Mecanismos de tolerância materna ao feto decorrente das adaptações na interface materno-fetal. | 36 |
| Figura 3 - Diagrama esquemático da placenta ilustrando suas estruturas. | 39 |
| Figura 4 - Isoformas de HLA-G geradas por edição alternativa do transcrito primário do gene. Os éxons delidos são representados em pontilhado. | 44 |
| Figura 5 - Potenciais receptores de HLA-G em células-alvo do sistema imunológico. | 45 |
| Figura 6 - Expressão das moléculas HLA-G em tecido placentário no grupo PHIV+. A reação de imunistoquímica foi realizada com o anticorpo monoclonal anti-HLA-G clone 5A6G7 (obtidas com o microscópio Olympus BX51 acoplado a câmera Olympus SC30 - programa AnalySIS-get_IT). De acordo com o escore utilizado, podemos observar: (A) Expressão $\leq 5\%$; (B) Expressão 6-25% ; (C) Expressão 26-50% ; (D) Expressão 51-75% ; (E) Expressão $> 75\%$ | 73 |
| Figura 7 - Expressão das moléculas HLA-G em tecido placentário no grupo PHIV-. A reação de imunistoquímica foi realizada com o anticorpo monoclonal anti-HLA-G clone 5A6G7 (obtidas com o microscópio Olympus BX51 acoplado a câmera Olympus SC30 - programa AnalySIS-get_IT). De acordo com o escore utilizado, podemos observar: (A) Expressão $\leq 5\%$; (B) Expressão 6-25% ; (C) Expressão 26-50% ; (D) Expressão 51-75% ; (E) Expressão $> 75\%$ | 74 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1 – Classificação da infecção pelo HIV-1 em estágios. | 25 |
| Quadro 2 – Escore utilizado para classificação quantitativa do nível de expressão das moléculas HLA-G. | 72 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|---|----|
| Gráfico 1 - Distribuição das mulheres PHIV+ por idade (anos). Ribeirão Preto – SP – Brasil, 2013. Fonte: Sistema HC | 65 |
| Gráfico 2 - Distribuição das mulheres PHIV+ por terapia antirretroviral (TARV) utilizada. Ribeirão Preto – SP – Brasil, 2013. Fonte: Sistema HC | 67 |
| Gráfico 3 - Distribuição das mulheres PHIV+ por carga viral em cópias/mL durante o período gestacional. Ribeirão Preto – SP – Brasil, 2013. Fonte: Sistema HC | 67 |
| Gráfico 4 - Distribuição das mulheres PHIV+ por contagem de células CD4+ por mm ³ durante o período gestacional. Ribeirão Preto – SP – Brasil, 2013. Fonte: Sistema HC | 68 |
| Gráfico 5 - Distribuição das mulheres PHIV- por idade (anos). Ribeirão Preto – SP – Brasil, 2013. Fonte: Questionário PHIV- | 69 |
| Gráfico 6- Distribuição das mulheres PHIV+ de acordo com o nível de expressão das moléculas HLA-G. Ribeirão Preto – SP – Brasil, 2013. Fonte: Pesquisa de Campo..... | 75 |
| Gráfico 7 - Distribuição das mulheres PHIV- de acordo com o nível de expressão das moléculas HLA-G. Ribeirão Preto – SP – Brasil, 2013. Fonte: Pesquisa de Campo..... | 75 |
| Gráfico 8 – Diferença nos níveis de expressão das moléculas HLA-G entre os grupos PHIV+ e PHIV-. Ribeirão Preto – SP – Brasil, 2013. Fonte: Pesquisa de Campo | 76 |
| Gráfico 9 - Representação do intervalo de confiança e do valor do <i>Odds Ratio</i> referente à associação entre a expressão de HLA-G e as variáveis HIV-1 e aborto. Ribeirão Preto – SP – Brasil, 2013. Fonte: Pesquisa de Campo | 79 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Distribuição das mulheres PHIV+ por variáveis sociodemográficas. Ribeirão Preto – SP – Brasil, 2013. Fonte Sistema HC | 66 |
| Tabela 2 - Distribuição das mulheres PHIV+ em relação aos antecedentes e histórico obstétrico. Ribeirão Preto – SP – Brasil, 2013. Fonte Sistema HC..... | 69 |
| Tabela 3 - Distribuição das mulheres PHIV- por variáveis sociodemográficas. Ribeirão Preto – SP – Brasil, 2013. Fonte Questionário PHIV- | 70 |
| Tabela 4 - Distribuição das mulheres PHIV- em relação aos antecedentes e histórico obstétrico. Ribeirão Preto – SP – Brasil, 2013. Fonte Questionário PHIV- | 71 |
| Tabela 5 - Distribuição das variáveis sócio-demográficas e obstétricas entre os grupos PHIV+ e PHIV-. Ribeirão Preto-SP-Brasil, 2013. Fonte: pesquisa de campo..... | 71 |
| Tabela 6 - Distribuição do nível de expressão das moléculas HLA-G de acordo com as variáveis HIV, aborto, carga viral (cópias/mL), CD4+ (células/mm ³) e terapia antirretroviral (TARV) utilizada. Ribeirão Preto – SP – Brasil, 2013. Fonte Pesquisa de Campo..... | 77 |
| Tabela 7 - Distribuição da expressão das moléculas HLA-G de acordo com as variáveis presença ou não da infecção pelo HIV-1 e aborto. Ribeirão Preto – SP – Brasil, 2013. Fonte: Pesquisa de Campo..... | 78 |
| Tabela 8 - Distribuição das biópsias de acordo com a associação entre a marcação das moléculas HLA-G $\leq 25\%$ e $> 25\%$ no grupo PHIV+ e as variáveis carga viral (cópias/mL), CD4+ (células/mm ³) e terapia antirretroviral (TARV) utilizada. Ribeirão Preto – SP – Brasil, 2013. Fonte Pesquisa de Campo | 80 |
| Tabela 9 - Distribuição das biópsias de acordo com a associação entre a marcação das moléculas HLA-G $\leq 25\%$ e $> 75\%$ no grupo PHIV+ e as variáveis carga viral (cópias/mL), CD4+ (células/mm ³) e terapia antirretroviral (TARV) utilizada. Ribeirão Preto – SP – Brasil, 2013. Fonte Pesquisa de Campo | 81 |

LISTA DE SIGLAS

| | |
|---------|---|
| HIV | Vírus da Imunodeficiência Humana |
| RNA | Ácido Ribonucleico |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| mRNA | Ácido Ribonucleico mensageiro |
| MHC | <i>Major Histocompatibility Complex</i> |
| Aids | <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> |
| CDC | <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> |
| UNAIDS | <i>Joint United Nations Program on HIV/AIDS</i> |
| Sinan | Sistema Nacional de Agravos e Notificações |
| SIM | Sistema de Informação sobre Mortalidade |
| Siscel | Sistema de Informações de Exames Laboratoriais |
| Siclom | Sistema de Controle Logístico de Medicamentos |
| BIPAIDS | Base Integrada Paulista de aids |
| GVE | Grupo de Vigilância Epidemiológica |
| SVE | Sistema de Vigilância Epidemiológica |
| HSH | Homem que faz Sexo com outro Homem |
| UDI | Usuário de Drogas Injetáveis |
| DST | Doenças Sexualmente Transmissíveis |
| TMI | Transmissão Materno-Infantil |
| SUS | Sistema Único de Saúde |
| TARV | Terapia Antirretroviral |
| AZT | Zidovudina |
| 3TC | Lamivudina |
| HAART | <i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i> |
| INTR | Inibidores Nucleosídeos de Transcriptase Reversa |
| D4T | Estavudina |
| ddI | Didosina |

| | |
|--------------|---|
| ABC | Abacavir |
| IP | Inibidores de Protease |
| LPV/r | Lopinavir/ritonavir |
| IDV | Indinavir |
| SQV | Saquinavir |
| ATZ | Atazanavir |
| FPV | Fosamprenavir |
| NFV | Nelfinavir |
| NVP | Nevirapina |
| INNTR | Inibidores Não-Nucleosídeos da Transcriptase Reversa |
| EFZ | Efavirenz |
| HLA | <i>Human Leukocyte Antigen</i> |
| NK | <i>Natural Killer</i> |
| TEV | Trofoblasto Extraviloso |
| hCG | Gonadotrofina Coriônica Humana |
| ILT-2 | <i>Immunoglobulin-Like Transcript 2</i> |
| ILT4 | <i>Immunoglobulin-Like Transcript 4</i> |
| KIR2DL4 | <i>Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor 2DL4</i> |
| HSV | Vírus Herpes Simples tipo 1 |
| RABV | Vírus da Raiva |
| HCV | Vírus da Hepatite C |
| HBV | Vírus da Hepatite B |
| CMV | Citomegalovírus |
| 3'UTR | Região 3' Não Traduzida |
| Th1 | Linfócito T helper 1 |
| Th2 | Linfócito T helper 2 |
| TNF α | Fator de Necrose Tumoral alfa |
| AMIGO | Ambulatório de Moléstias Infecciosas em Ginecologia e Obstetrícia |
| HC-FMRP/USP | Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo |

| | |
|-------|-----------------------------------|
| PHIV+ | Mulheres Infectadas pelo HIV-1 |
| PHIV- | Mulheres Não-Infectadas pelo HIV- |
| dp | Desvio Padrão |
| OR | <i>Odds Ratio</i> |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 20 |
| 1.1 HIV-1 | 20 |
| 1.1.1 Estrutura e replicação viral | 20 |
| 1.1.2 Imunopatogênese e história natural da doença | 23 |
| 1.1.3 Classificação dos estágios da infecção pelo HIV-1 | 24 |
| 1.1.4 Aspectos históricos e epidemiológicos | 26 |
| 1.1.5 Feminização da epidemia | 28 |
| 1.2 Transmissão Materno-Infantil do HIV-1 | 29 |
| 1.2.1 Aspectos epidemiológicos | 29 |
| 1.2.2 Profilaxia | 31 |
| 1.2.3 Mecanismos da transmissão materno-infantil | 33 |
| 1.3 Imunologia da interface materno-fetal | 35 |
| 1.3.1 Aspectos imunológicos da gestação | 35 |
| 1.3.2 Fecundação e embriologia da placenta | 36 |
| 1.3.3 Placenta: estruturas e funções | 38 |
| 1.3.4 Interação placenta - HIV-1 | 39 |
| 1.3.5 Decídua: ambiente imunologicamente privilegiado | 40 |
| 1.4 Antígenos Leucocitários Humanos – HLA | 41 |
| 1.4.1 Conceitos e definições | 41 |
| 1.4.2 HLA-G | 42 |
| 1.4.3 HLA-G em infecções virais | 46 |
| 1.4.4 HLA-G e HIV-1 | 47 |
| 1.4.5 HLA-G e TARV | 48 |
| 1.5 Aplicabilidade clínica do conhecimento sobre HLA-G | 49 |
| 1.6 O avanço do conhecimento científico e o impacto na qualidade da assistência de enfermagem | 51 |
| | |
| 2 JUSTIFICATIVA | 53 |
| | |
| 3 OBJETIVOS | 55 |
| 3.1 Objetivo Geral | 55 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 55 |

| | |
|--|-----------|
| 4 CASUÍSTICA E MÉTODO..... | 57 |
| 4.1 Delineamento do estudo | 57 |
| 4.2 Local do Estudo | 57 |
| 4.3 População do Estudo | 58 |
| 4.4 Instrumentos para Coleta de Dados | 59 |
| 4.5 Coleta e Parafinização dos Fragmentos de Tecido Placentário | 59 |
| 4.6 Imunoistoquímica das amostras de Tecidos Placentários..... | 60 |
| 4.7 Análise da Expressão das Moléculas HLA-G | 62 |
| 4.8 Aspectos Éticos | 62 |
| 4.9 Análise Estatística | 62 |
| | |
| 5 RESULTADOS | 65 |
| 5.1 Caracterização da Amostra..... | 65 |
| 5.1.1 Mulheres Infectadas pelo HIV-1 (PHIV+)..... | 65 |
| 5.1.2 Mulheres Não-Infectadas pelo HIV-1 (PHIV-)..... | 69 |
| 5.2 Comparação entre os grupos PHIV+ e PHIV- | 71 |
| 5.3 Análise Histológica do Nível de Expressão das Moléculas HLA-G..... | 72 |
| | |
| 6 DISCUSSÃO | 83 |
| | |
| 7 CONCLUSÃO..... | 87 |
| | |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 89 |
| | |
| APÊNDICES | 98 |
| APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PHIV - | 98 |
| APÊNDICE B - QUESTIONÁRIO PHIV-..... | 99 |

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 HIV-1

1.1.1 Estrutura e replicação viral

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um retrovírus do gênero *Lentivirus*, com aproximadamente 100 nm de diâmetro e formato esférico. Possui genoma RNA de duas fitas simples, uma matriz proteica e um capsídeo viral de forma cônica envolto por um envelope com dupla camada lipídica (HOGLUNDO et al., 1992; VERONESI, 2005; GROTTTO; PARDINI, 2006; PINTO; STRUCHINER, 2006; CELSI et al., 2013).

O genoma do HIV é composto por genes estruturais, regulatórios e acessórios. Os genes estruturais *gag*, *pol* e *env* são comuns a todos os retrovírus. O gene *gag* codifica as proteínas estruturais p24 e p7 do nucleocapsídeo e a proteína p17, que compõe a matriz proteica. O gene *pol* codifica as enzimas virais protease (cliva polipeptídeos precursores), transcriptase reversa (transcreve o genoma de RNA em DNA) e integrase (integra o DNA viral ao DNA do hospedeiro). O gene *env* codifica as glicoproteínas do envelope gp120 e gp41 (VERONESI, 2005; CELSI et al., 2013).

Os genes regulatórios *tat* e *rev* são necessários na replicação viral. O gene *tat* codifica a proteína Tat, que atua na transcrição dos genes virais. O gene *rev* codifica a proteína Rev, que atua no transporte de RNA mensageiros (mRNA) tardios do núcleo para o citoplasma. Os genes acessórios são *nef*, *vif*, *vpr* e *vpu*. O gene *nef* codifica a proteína Nef, que reduz a quantidade de proteínas CD4 e de proteínas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH ou mais comumente utilizado MHC do inglês *Major Histocompatibility Complex*) classe I (que será abordado posteriormente) na superfície das células infectadas, e induz a morte das células T citotóxicas não infectadas. O gene *vif* codifica a proteína Vif que intensifica a infectividade por meio da inibição da enzima APOBEC3G, responsável por provocar hipermutação no DNA viral. O gene *vpr* codifica a proteína Vpr, que atua no transporte do cerne viral do citoplasma para o núcleo de células que não se encontram em processo de divisão, e, por fim, o gene *vpu*, que codifica a proteína Vpu, responsável por intensificar a liberação de vírus pela célula infectada (VERONESI, 2005; LEVINSON, 2010).

O HIV é classificado em dois tipos: 1 e 2. O tipo 1 é responsável pela pandemia mundial e apresenta uma subdivisão em três grupos M (*major*), O (*outlier*) e N (*new*). Dentro do grupo M foram descritos doze subtipos: A1, A2, A3, B, C, D, F1, F2, G, H, J e K. Também foram descritas 32 formas recombinantes circulantes (CRF – *Circulating Recombinant Form*). No Brasil, a epidemia é causada pelo grupo M do tipo 1, sendo mais prevalente o subtipo B, seguido pelos subtipos F1 e C. Já o HIV-2 tem infectividade e patogenicidade menor que o HIV-1, sendo responsável por epidemias localizadas na costa oeste da África (HOGLUND et al., 1992; VERONESI, 2005; BELLO et al., 2007).

A infecção pelo HIV inicia-se com a entrada do vírus na célula do hospedeiro, por meio da ligação das glicoproteínas de superfície gp120 e gp41 com a molécula CD4. A glicoproteína gp120 permite o reconhecimento da célula alvo e determina o tropismo celular do receptor CD4 a um dos vários co-receptores de quimiocinas, mais frequentemente CXCR4 e CCR5. As linhagens virais com tropismo por células T ligam-se ao co-receptor CXCR4, enquanto as linhagens com tropismo por macrófagos ligam-se ao co-receptor CCR5. A glicoproteína gp41 promove a fusão da membrana viral com a celular, liberando o nucleocapsídeo viral no interior da célula hospedeira (VERONESI, 2005; LEVINSON, 2010; CELSI et al., 2013).

Após entrar na célula, o RNA viral é convertido em DNA pelas enzimas transcriptase reversa e ribonuclease H. A dupla fita de DNA formada é integrada ao genoma do hospedeiro por meio da enzima integrase. A liberação do vírus é feita por brotamento, nessa fase a enzima protease processa as proteínas precursoras Pol e Gag, tornando a partícula viral madura e capaz de infectar uma nova célula. A replicação viral ocorre principalmente nos órgãos linfóides, na região perifolicular dos centros germinativos (ABBAS; LICHTMAN, 2005; VERONESI, 2005). A figura 1 ilustra o processo de replicação viral.

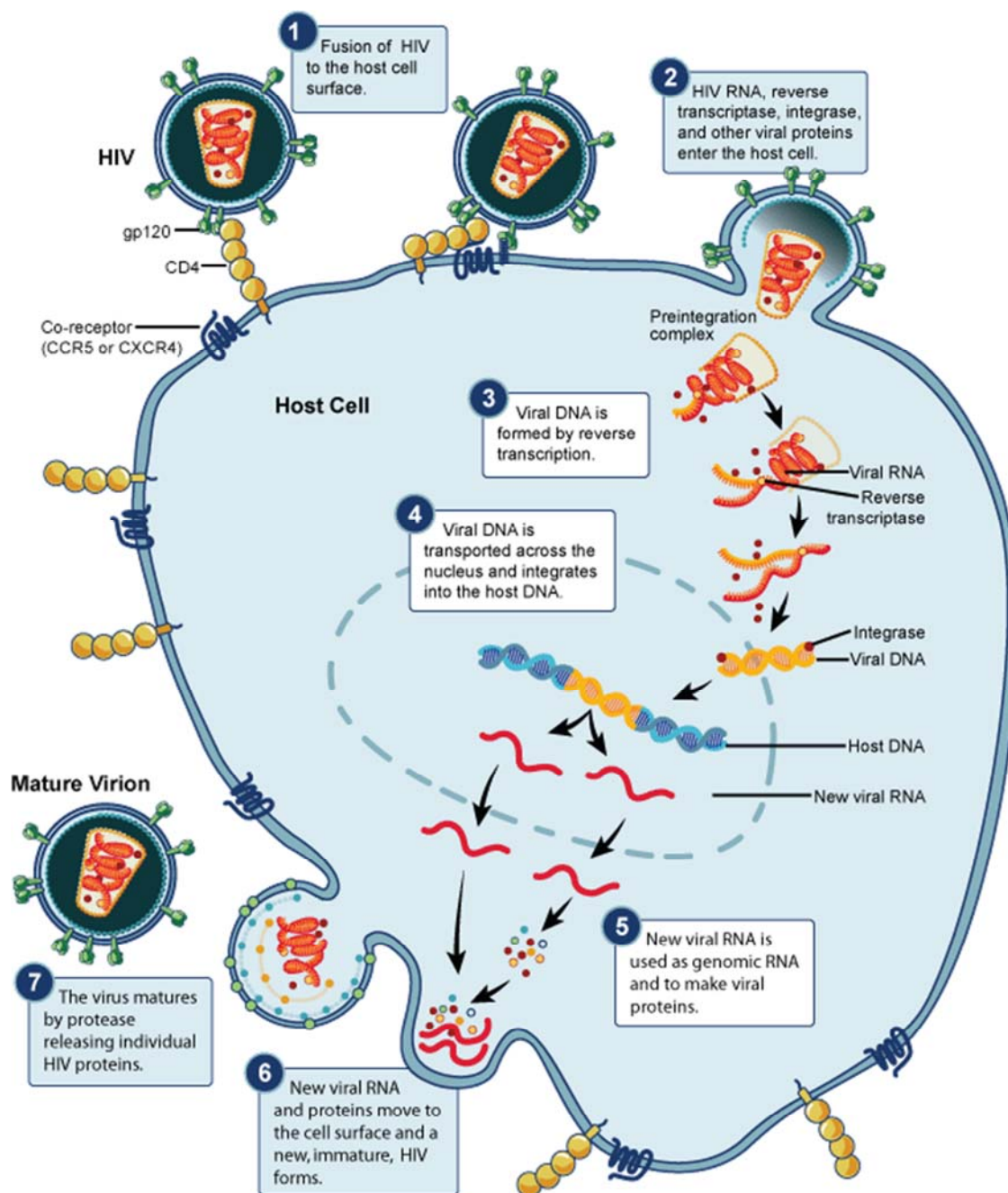


Figura 1- Representação da estrutura e replicação do HIV. Fonte: NIAID, 2013.

A alta variabilidade genética que o HIV possui, inclusive a capacidade de conceber formas recombinantes, é decorrente, dentre outros mecanismos, da ação da transcriptase reversa, pois ela faz com que ocorra uma substituição nucleotídica a cada ciclo replicativo, fazendo com que a população viral tenha poucos ou nenhum genoma idêntico. Por esse motivo o HIV é denominado uma “quasispécie” (VERONESI, 2005).

1.1.2 Imunopatogênese e história natural da doença

O HIV-1 infecta preferencialmente os linfócitos T (CD4) auxiliares, mas pode infectar outras células que apresentem a proteína CD4 em sua superfície, resultando em perda da imunidade mediada por essas células (LEVINSON, 2010). A maioria das partículas virais (93 a 97%) são produzidas em linfócitos CD4+, cuja meia-vida é de aproximadamente um dia, seguida por uma pequena quantidade proveniente em macrófagos, cuja meia-vida é de 14 dias. As células T de memória são responsáveis por menos de 1% das partículas virais presentes no plasma, contudo, como sua meia-vida gira em torno de 145 dias, a descoberta de um tratamento curativo contra o HIV-1 fica comprometida (VERONESI, 2005).

As partículas virais que iniciam a infecção geralmente estão no sangue, no sêmen ou em outros fluidos corporais de um indivíduo infectado, e são transmitidas a outro indivíduo por contato sexual, picadas de agulha ou verticalmente, no caso da gestante infectada para seu conceito (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Dependendo do sítio de exposição inicial ao vírus, células T CD4+ e macrófagos dentro de tecidos da mucosa podem ser as primeiras células infectadas. Alguns dias após a primeira exposição ao HIV-1, a replicação viral abundante pode ser detectada nos linfonodos. De duas a quatro semanas após a infecção, inicia-se um quadro agudo, em que o indivíduo infectado pode apresentar febre, cefaléia, ardência na orofaringe, linfadenopatia generalizada e exantema. Pelo fato dos sintomas assemelharem-se aos de uma mononucleose, o diagnóstico nessa fase é difícil. Ainda que o processo infeccioso seja controlado parcialmente pela resposta imunológica adaptativa, a infecção avança para os tecidos linfóides periféricos (ABBAS; LICHTMAN, 2005; VERONESI, 2005).

Na segunda fase da doença, o sistema imunológico permanece competente para lidar com a maioria das infecções oportunistas e, normalmente, nenhuma manifestação clínica causada pelo HIV-1 pode ser observada. Os linfonodos e o baço tornam-se os pontos de replicação e destruição celular contínua pelo HIV-1. Essa fase é denominada período de latência, e a maior parte das células T do sangue periférico não abriga o vírus. Contudo, a destruição das células T CD4+ dentro dos tecidos linfóides progride lentamente, e o número de células T CD4+ em circulação no sangue declina de modo progressivo (ABBAS; LICHTMAN, 2005; VERONESI, 2005).

A progressão da infecção pelo HIV-1 para a fase crônica torna o indivíduo suscetível a outras infecções, e as respostas imunológicas a essas infecções podem estimular a replicação

viral e acelerar a destruição dos tecidos linfóides. A fase final da doença, também conhecida como Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (sigla aids, proveniente de sua denominação na língua inglesa *Acquired Immunodeficiency Syndrome*), é resultado de uma destruição maciça do tecido linfóide periférico, sendo que a contagem de células T CD4⁺ cai abaixo de 200 células/mm³. Além disso, o aumento da viremia é drástico, e a replicação viral em outros reservatórios acelera-se sem controle (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

As células TCD4⁺ auxiliares são essenciais para a resposta imunológica, tanto aquela mediada por células, quanto as humorais, sendo que sua perda é a principal razão da suscetibilidade dos pacientes com aids aos diferentes tipos de infecções. A infecção pelo HIV-1 resulta, ao final, em prejuízo no funcionamento do sistema imunológico, tanto o inato, quanto o adaptativo. O desenvolvimento da aids está ligado à capacidade do HIV-1 de destruir o sistema imunológico do hospedeiro e à incapacidade de resposta imunológica do hospedeiro em erradicar o vírus (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

1.1.3 Classificação dos estágios da infecção pelo HIV-1

A infecção pelo HIV-1 teve impacto mundial, e, nesse contexto, foi necessário estabelecer critérios que possibilitassem padronizar a definição dos casos, bem como dos métodos diagnósticos e terapêuticos. O *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), agência do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos da América (EUA), tem como um de seus objetivos prover informações para embasar decisões quanto à saúde, concentrando sua atenção no desenvolvimento da prevenção e controle de doenças infectocontagiosas. Essa agência elaborou diretrizes que são seguidas globalmente e auxiliam no reconhecimento da infecção pelo HIV-1, além de nortear a terapêutica adequada (CDC, 2013).

Essas diretrizes classificam a infecção pelo HIV em diferentes estágios, levando em consideração as evidências clínicas e laboratoriais. Como o avanço científico frente à infecção pelo HIV-1 é rápido, essas diretrizes são constantemente revisadas. Em 2008 foi realizada a última revisão dessa classificação pelo CDC. Dentre os itens que sofreram alteração estão a definição dos casos de aids e infecção pelo HIV. Foi definido que a aids está englobada na infecção pelo HIV, sendo seu estágio mais avançado. Nessa revisão, o papel dos linfócitos T CD4⁺ também foi revisto e ganhou maior importância, tendo em vista tratar-se de um marcador objetivo de imunossupressão. A aferição pela contagem de células T CD4⁺ é

significativamente vantajosa, tanto para instituir a terapêutica, quanto para os programas de vigilância, pois apresenta ampla disponibilidade nos serviços de saúde em geral (CDC, 2013).

O quadro abaixo apresenta os estágios definidos na revisão de 2008, levando em consideração as evidências clínicas e laboratoriais.

| Estágio | Evidência Laboratorial | Evidência Clínica |
|----------------|--|---|
| 1 | Confirmação laboratorial do HIV | Não exigida (porém não há condição) |
| | Contagem de Linfócitos T CD4+ \geq 500 células/mm ³ ou Porcentagem de Linfócitos T CD4+ \geq 29 | |
| 2 | Confirmação laboratorial do HIV | Não exigida (porém não há condição definidora de aids) |
| | Contagem de Linfócitos T CD4+ entre 200-499 células/mm ³ ou Porcentagem de Linfócitos T CD4+ entre 14-28 | |
| 3 | Confirmação laboratorial do HIV | Documentação de uma condição definidora de aids (com confirmação laboratorial para infecção pelo HIV) |
| | Contagem de Linfócitos T CD4+ $<$ 200 células/mm ³ ou Porcentagem de Linfócitos T CD4+ $<$ 14 | |
| Desconhecido | Confirmação laboratorial do HIV Sem informação da contagem ou porcentagem de células T CD4+ | Sem informação ou presença de condições definidoras de aids |

Quadro 1 – Classificação da infecção pelo HIV-1 em estágios. Adaptado CDC, 2008.

1.1.4 Aspectos históricos e epidemiológicos

Os primeiros casos da infecção pelo HIV-1 que evoluíram para a aids foram descritos em homossexuais do sexo masculino nos EUA no ano de 1981, seguidos de casos de hemofílicos, hemotransfundidos, usuários de drogas, crianças nascidas de mães infectadas e parceiros sexuais de indivíduos infectados (VERONESI, 2005).

Desde então a infecção pelo HIV-1 tornou-se uma pandemia, acometendo globalmente 34 milhões de pessoas até o final de 2011. Estima-se que os adultos infectados com idade entre 15 e 49 anos representem 0,8% da população mundial. De todos os continentes, o africano foi o mais severamente afetado, mais especificamente a África Subsaariana, que concentra 69% de todos os casos (UNAIDS, 2012).

No Brasil a epidemia está presente há pouco mais de 30 anos e acometeu 656.701 indivíduos, de acordo com os casos notificados no Sinan (Sistema Nacional de Agravos e Notificações), declarados no SIM (Sistema de Informação sobre Mortalidade) e registrados no Siscel/Siclom (Sistema de Informações de Exames Laboratoriais/Sistema de Controle Logístico de Medicamentos) de 1980 a junho de 2012, sendo que desses casos, 426.459 (64,9%) referem-se ao sexo masculino e 230.161 (35,1%) ao sexo feminino (BRASIL, 2012).

Analisando a epidemia por região, no mesmo período, temos 367.540 casos (56%) na região Sudeste, 130.942 (19,9%) na região Sul, 88.830 (13,5%) na região Nordeste, 37.244 (5,7%) na região Centro-Oeste e 32.140 (4,9%) na região Norte. No ano de 2011, a taxa de incidência do HIV-1 no Brasil foi de 20,2/100.000 habitantes. Quando verificamos a taxa de incidência por região, observamos que a região Sul apresenta a maior taxa com 30,9/100.000 habitantes, seguida pela região Sudeste (21,0), pela região Norte (20,8), pela região Centro-Oeste (17,5) e pela região Nordeste (13,9). A incidência de casos de HIV-1 entre os anos de 2002 e 2011 apresentou um aumento importante nas regiões Norte (+90,8%) e Nordeste (+49,7%), e uma diminuição nas regiões Sudeste (-23,7%), Sul (-8,3%) e Centro-Oeste (-5,4%) (BRASIL, 2012).

Na região Sudeste, o maior número de casos concentra-se no estado de São Paulo (217.367), de acordo com os registros da Base Integrada Paulista de AIDS (BIPAIDS). Desses casos, 149.827 (68,9%) são do sexo masculino e 67.522 (31,1%) do sexo feminino (SÃO PAULO, 2012; BRASIL, 2012).

Mesmo concentrando o maior número de casos da região Sudeste, o estado de São Paulo apresentou uma diminuição de 30,1% na taxa de incidência dos casos de HIV-1 no período compreendido de 2002 a 2011. No período compreendido de 1980 a junho de 2012, a

maioria dos casos de HIV-1 no estado de São Paulo concentrou-se no Grupo de Vigilância Epidemiológica (GVE) da capital, representando 39,4% do total (SÃO PAULO, 2012; BRASIL, 2012).

O GVE de Ribeirão Preto, composto por 25 municípios, registrou no mesmo período um total de 6.034 casos de infecção pelo HIV-1, sendo a quarta maior região em casos notificados no estado de São Paulo. Sua taxa de incidência no ano de 2010 foi de 27,2/100.000 habitantes. O total de óbitos registrados nesse GVE no período de 1990 a 2011 foi de 2.872, o terceiro maior do estado (SÃO PAULO, 2012).

Quando nos referimos à via de transmissão do HIV-1, podemos observar que ocorreram modificações importantes no período anteriormente mencionado, culminando em três fases distintas da epidemia. Na primeira fase, que vai até 1986, temos a transmissão por via sexual como a mais importante, especialmente em homens que faziam sexo com outros homens (HSH), sendo que a transmissão por transfusão sanguínea também era comum nesse período. Na segunda fase, que vai do final da década de 80 até o início da década de 90, o aumento na transmissão do HIV-1 entre usuários de drogas injetáveis (UDI) foi significativo, sendo que houve também um aumento da epidemia na região sudeste. A terceira fase se estende do início da década de 90 até os dias atuais, sendo caracterizada pelo aumento da transmissão de casos de aids na prática heterossexual, com contaminação crescente da população feminina (SANTOS et al., 2009; SÃO PAULO, 2011).

No estado de São Paulo, nos últimos 30 anos, dos 189.392 casos de HIV-1 notificados em indivíduos com 13 anos ou mais, 42,6% pertencem à categoria de exposição heterossexual, 20,3% eram HSH, 20,8% UDI e 15,7% não possuem qualquer informação sobre a via de transmissão (SANTOS et al., 2009).

No início da epidemia, mais especificamente em 1985, para cada 26 homens infectados havia uma mulher infectada. Após 15 anos, essa relação passou para 1,7 homem infectado para cada mulher. Apesar do número de homens infectados pelo HIV ser maior do que o de mulheres (196.298 homens infectados a mais do que mulheres), o crescimento da epidemia entre as mulheres é maior (SANTOS et al., 2009; BRASIL, 2012).

Um fator que nos ajuda na compreensão desse fenômeno é a diminuição expressiva da mortalidade em indivíduos infectados pelo HIV-1 na população masculina quando comparada com a feminina. Entre os anos de 2002 e 2011, foi observado um aumento médio anual de óbitos de 0,5% entre os homens, e 2,0% entre as mulheres (BRASIL, 2011, 2012).

Os fatores descritos anteriormente contribuíram para uma alteração significativa no perfil epidemiológico das pessoas vivendo com HIV-1, dentre os quais, a feminização da

epidemia certamente é o que representa maior impacto. Dentre os casos de HIV notificados em mulheres no estado de São Paulo no período de 2005 a 2009, 74,1% eram heterossexuais e a via de transmissão foi sexual (BRASIL, 2012; SÃO PAULO, 2012).

1.1.5 Feminização da epidemia

A questão da feminização da infecção pelo HIV-1 nos remete a uma discussão das diferenças de gênero, levando em consideração que a hegemonia masculina tem acompanhado o processo civilizatório ao longo da história, impondo distintos papéis sociais ao homem e à mulher. Nesse contexto, observamos que o homem é respeitado como um ser pensante, sendo que à mulher, coube tão somente o papel da procriação, sem direitos civis e nenhum poder de decisão, nem mesmo sobre seu corpo, sendo que o comportamento sexual também acompanhou essa dicotomia (CARVALHO; PICCININI, 2008).

As mulheres que não atendiam às condições impostas socialmente eram consideradas prostitutas e tinham o estigma de passar doenças aos homens de família. Com a transmissão materno-infantil (TMI) de doenças sexualmente transmissíveis (DST) em mulheres que haviam tido contato sexual com apenas um parceiro, tentou-se dar explicações religiosas a este fenômeno (CARVALHO; PICCININI, 2008).

O movimento feminista, iniciado na década de 60 do século passado, possibilitou à mulher, dentre outras conquistas, o poder de decidir sobre o próprio corpo. Essas mudanças sociais trouxeram benefícios à mulher moderna, porém também trouxeram os riscos da liberação sexual, como o contágio por DSTs, dentre as quais a infecção pelo HIV-1 (CARVALHO; PICCININI, 2008).

O início da epidemia da infecção pelo HIV-1 foi marcado pela associação da contaminação à promiscuidade e desvios sexuais. Isso se deve ao fato de os casos iniciais terem sido restringidos a um grupo populacional específico (HSH, UDI, profissionais do sexo), criando o conceito de grupo de risco. Apenas com o aumento progressivo dos casos de HIV-1 em mulheres monogâmicas que não pertenciam à categoria UDI e que não apresentavam nenhum comportamento de risco que justificasse a infecção pelo HIV-1, esse conceito caiu por terra (CARVALHO; PICCININI, 2008).

O conceito de grupo de risco foi então substituído pelo de comportamento de risco, embora sua construção tenha sido baseada na exposição como uma questão de decisão

individual (risco assumido pelo indivíduo). Ainda assim, esse conceito não se mostrou suficiente para explicar as mudanças no perfil dos indivíduos acometidos pelo HIV-1, dificultando a elaboração de políticas de saúde voltadas para a prevenção da infecção. No universo acadêmico, após muitos estudos, verificou-se que o curso da epidemia do HIV-1 era condicionado a um grupo de fatores estruturais, dentre os quais gênero, sexualidade, raça/cor e condições socioeconômicas. A partir de então, foi adotado o conceito de vulnerabilidade social (SOUSA; ESPIRITO SANTO; MOTTA, 2008).

O bissexualismo masculino (que tem maior aceitabilidade para a sociedade que o homossexualismo), além da condição social menos favorecida das mulheres, que as colocam numa posição inferior em relação aos homens, dada sua sexualidade tradicionalmente relacionada à reprodução, são fatores que certamente aumentam a vulnerabilidade social da população feminina, especialmente para aquelas que apresentam condições socioeconômicas desfavoráveis (GIACOMOZZI; CAMARGO, 2004).

Dentre os inúmeros fatores que contribuíram para essa realidade, a difícil negociação acerca do uso do preservativo masculino pelo parceiro, principalmente no caso de relações estreitas e duradouras, teve grande impacto no aumento da vulnerabilidade feminina. Quando a utilização do preservativo é exigida com outra finalidade que não a contracepção, as mulheres enfrentam críticas relacionadas à afetividade, dentre outras formas de discriminação cultural e de gênero, dado o preconceito disseminado às mulheres que mostram conhecimento e iniciativa sexual (FELIX; CEOLIM, 2012).

As questões de gênero certamente contribuíram para o aumento da vulnerabilidade feminina frente à epidemia causada pelo HIV-1. Além disso, são bastante evidentes os riscos, quando a mulher engravida, de transmitir a infecção para seu filho no período perinatal (GIACOMOZZI; CAMARGO, 2004).

1.2 Transmissão Materno-Infantil do HIV-1

1.2.1 Aspectos epidemiológicos

No Brasil, foram notificados ao Sinam 69.500 casos de infecção pelo HIV-1 em gestantes no período compreendido de 2000 a junho de 2012. Desses casos, 42,4% se

concentraram na região Sudeste, 31,4% na região Sul, 14,6 na região Nordeste, 5,9% na região Norte e 5,7% na região Centro-Oeste. A taxa de detecção nacional de casos de HIV-1 em gestantes no ano de 2011 correspondeu a 2,3 casos por 1.000 nascidos vivos (BRASIL, 2012).

No estado de São Paulo foram notificadas 18.360 gestantes entre os anos de 1999 e junho de 2012. Isto se deve ao fato da notificação do binômio mãe-filho ser compulsória a partir do ano 2000, incluindo, dessa forma, os casos de gestações de 1999 finalizadas em 2000. Houve uma diminuição dos casos notificados nos anos de 2007 e 2010 de 24%, as explicações possíveis para esse fato podem ser um atraso no Sistema de Vigilância Epidemiológica (SVE), a subnotificação dos casos ou a real diminuição de gestantes infectadas (SÃO PAULO, 2012).

Quando analisamos as notificações por regiões no estado de São Paulo, verificamos que o GVE de Ribeirão Preto apresentou no período mencionado anteriormente um total de 840 casos de gestantes infectadas pelo HIV-1. Quando nos referimos às notificações de gestantes infectadas em relação ao domicílio, temos que o município de Ribeirão Preto é o quarto maior do estado, representando 60,12% do total de gestantes do seu GVE (SÃO PAULO, 2012).

A notificação de casos de HIV-1 em crianças menores de cinco anos constitui um indicador importante para monitorar a TMI. Em 2011 foram registrados 745 casos de HIV-1 em menores de cinco anos no país. Destes 36,8% foram notificados na região Sudeste, 23,4% na região Sul, 21,6% na região Nordeste, 13,4% na região Norte e 4,8% na região Centro-Oeste (BRASIL, 2012).

A taxa de incidência nacional de casos de HIV-1 em menores de cinco anos foi de 5,4/100.00 habitantes. As regiões Sul e Norte apresentaram taxas de incidência maiores que a nacional (9,8 e 6,3, respectivamente), enquanto as regiões Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste conseguiram manter taxas menores que a nacional (5,2, 3,8 e 3,3 respectivamente). Nos últimos dez anos, observou-se uma diminuição da incidência nacional de casos de HIV-1 em menores de cinco anos. As regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul mantiveram a tendência de diminuição nacional, contudo, as regiões Norte e Nordeste apresentaram um aumento dos casos em 85% e 27%, respectivamente (BRASIL, 2012)

O município de Ribeirão Preto apresenta a segunda maior taxa de incidência de casos notificados em menores de cinco anos infectados pelo HIV-1 do estado de São Paulo (5,5/100.000). No período de 2000 a 2012 foram notificados 157 casos no município, representando 71,69% de todos os casos de seu GVE (SÃO PAULO, 2012).

A prevenção da mortalidade materno-infantil é um componente importante do Pacto pela Saúde do Ministério da Saúde, implantado em 2006. Dentre as metas estabelecidas, temos a redução da TMI do HIV-1. O acesso à assistência pré-natal, o diagnóstico precoce e o tratamento adequado são medidas fundamentais para o controle da TMI. O estado de São Paulo, que registra uma cobertura de assistência pré-natal de 97% e profilaxia de TMI com antirretrovirais de 85,5%, apresentou em 2006 uma taxa de TMI de 2,7% (BRASIL, 2011).

1.2.2 Profilaxia

O fornecimento de antirretrovirais gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS) é uma conquista para as pessoas que convivem com HIV-1 desde 1996. Graças a essa terapêutica, foi observado nos últimos anos o prolongamento da sobrevivência, a melhoria da qualidade de vida, a diminuição dos episódios mórbidos, bem como a diminuição do número e frequência de internações (FELIX; CEOLIM, 2012).

Durante a gestação, a utilização de medicamentos requer atenção redobrada, pois é sabido que inúmeros fármacos apresentam a capacidade de atravessar a barreira placentária e cair na corrente sanguínea do feto, dentre os quais os antirretrovirais. Contudo, a necessidade de instituir uma profilaxia efetiva para evitar a TMI do HIV-1 fez com que fosse padronizado um protocolo de utilização da terapia antirretroviral (TARV) para todas as gestantes, mesmo que as condições clínicas e imunológicas dispensassem a necessidade de tratamento antes da gestação (BRASIL, 2010; IMAM et al., 2012).

A profilaxia instituída no período gestacional às mulheres infectadas pelo HIV-1 é iniciada entre a 14^a e 28^a semana gestacional e deve ser suspensa após o parto. Essa medida representa uma redução de 25 a 30% da taxa de TMI do HIV-1, considerando que desse percentual, 25% refere-se à transmissão intraútero e 75% à transmissão intraparto (BRASIL, 2010).

Os primeiros estudos realizados com gestantes infectadas pelo HIV-1 e sob uso de TARV, evidenciaram que a instituição de monoterapia com Zidovudina (AZT) na 14^a semana gestacional, AZT endovenoso quatro horas antes do parto e AZT solução oral ao recém-nascido, resultou numa redução de 67,5% da taxa de TMI. Contudo, a aplicação dessa monoterapia, a longo prazo, em pacientes com carga viral elevada, determinou o desenvolvimento de mutações que conferiam resistência ao AZT (BRASIL, 2010).

Posteriormente, outros estudos demonstraram que a utilização de esquemas combinados associando AZT com Lamivudina (3TC) representavam uma redução na taxa de TMI cinco vezes maior quando comparados com a utilização de monoterapia. Em 2002 foi publicado um estudo que avaliou 1.442 gestantes estratificadas de acordo com a terapêutica utilizada, obtendo os seguintes resultados: a taxa de TMI foi de 20% no grupo sem uso de TARV, 10,4% no grupo que fazia monoterapia com AZT, 3,8% no grupo que utilizou terapia dupla, e 1,2% no grupo que utilizou esquemas terapêuticos altamente ativos ou HAART (sigla do termo em inglês *Highly Active Antiretroviral Therapy*), combinando três antirretrovirais (BRASIL, 2010).

As recomendações para a utilização de TARV no período gestacional têm o intuito de melhorar a saúde da mulher, além de ser uma medida profilática efetiva para a TMI do HIV-1. A introdução de três antirretrovirais de duas classes diferentes (HAART) demonstrou bons resultados, e por esse motivo é instituída nos serviços de saúde brasileiros. A associação de dois antirretrovirais da classe dos Inibidores Nucleosídeos de Transcriptase Reversa (INTR) é amplamente utilizada por adultos infectados pelo HIV-1, por esse motivo compõe a dupla de primeira escolha do esquema antirretroviral inicial. Para as gestantes, a combinação mais indicada é AZT + 3TC, por apresentar uma resposta virológica satisfatória e por ser bastante tolerado pelo feto, além de possuir a comodidade de estar disponível em coformulação (IMAM et al., 2012; BRASIL, 2010).

Os medicamentos dessa classe de antirretroviral atuam na enzima transcriptase reversa, impedindo a formação de DNA a partir do RNA viral. Além das drogas mencionadas anteriormente, também pertencem a essa classe de antirretroviral a Estavudina (d4T), a Didanosina (ddI) e o Abacavir (ABC) (VERONESI, 2005; BRASIL, 2010, 2013).

A classe de antirretrovirais Inibidores de Protease (IP), juntamente com a combinação dos INTRs AZT + 3TC, compõem o esquema de primeira escolha para a profilaxia da TMI do HIV. Essa classe de antirretroviral atua na enzima protease, bloqueando sua ação e impedindo a maturação da partícula viral. A droga de escolha é o Lopinavir/ritonavir (LPV/r), pois a utilização do ritonavir como adjuvante proporciona níveis sanguíneos de IP mais elevados e estáveis, diminuindo o risco de mutações virais. Pertencem a essa classe também o Indinavir (IDV), o Saquinavir (SQV), o Atazanavir (ATZ), o Darunavir, o Fosamprenavir (FPV) e o Nelfinavir (NFV) (VERONESI, 2005); BRASIL, 2010, 2013).

A Nevirapina (NVP) é a droga de escolha da classe de antirretrovirais Inibidores Não Nucleosídeos da Transcriptase Reversa (INNTR), devido à teratogenicidade do Efavirenz (EFZ). Essa classe de antirretrovirais atua bloqueando diretamente a ação da enzima

transcriptase reversa de forma não competitiva, impedindo desta forma que o RNA viral se transforme em DNA complementar. Devido a sua longa meia-vida, a Nevirapina deve ser interrompida duas semanas antes dos demais antirretrovirais com o intuito de reduzir o risco de mutações virais e resistência a essa droga (BRASIL, 2010, 2013).

As mulheres que utilizavam TARV antes da gestação são avaliadas em relação à eficácia e segurança do esquema em uso para o binômio mãe/feto, especialmente no primeiro trimestre gestacional, quando a toxicidade do fármaco representa um risco elevado de teratogenicidade (BRASIL, 2010).

1.2.3 Mecanismos da transmissão materno-infantil

A TMI do HIV-1 é bastante complexa devido ao fato de sua patogênese estar relacionada a múltiplos fatores, dentre os quais podemos citar os maternos, os anexiais, os fetais, os virais e os pós-natais (DUARTE; QUINTANA; EL BEITUNE, 2005; BRASIL, 2010).

Dentre os fatores maternos, certamente a quantificação da carga viral do HIV-1 merece destaque. Não se sabe exatamente quais valores de carga viral podem ser considerados fatores de proteção ou de risco para TMI, contudo, é sabido que cargas virais menores que 1.000 cópias apresentam uma probabilidade muito pequena, mas não nula, de infectar o concepto. A fase da doença em que a gestante se encontra é um ponto importante, assim, na fase aguda, na qual a replicação viral é mais intensa, e na fase crônica, em que ocorre degradação do sistema imunológico e piora do quadro clínico, aumentam as chances da TMI do HIV-1 (DUARTE; QUINTANA; EL BEITUNE, 2005; BRASIL, 2010; LUO et al., 2013).

Outro ponto importante em relação aos fatores maternos da TMI do HIV-1 são os comportamentais. É comprovado que a parceria sexual múltipla e relações sexuais desprotegidas provocam uma exposição genital a formas mutantes do HIV-1. Além disso, o risco de contrair outras DSTs aumenta, fator que pode provocar, dentre outras intercorrências, a ruptura das membranas corioamnióticas (DUARTE; QUINTANA; EL BEITUNE, 2005; BRASIL, 2010).

O uso de drogas ilícitas pelas gestantes infectadas pelo HIV-1, assim como o tabagismo, favorecem a formação de áreas microinfartadas na placenta, aumentando sua permeabilidade e com isso favorecendo a exposição do feto ao vírus. Além disso, predispõe

ao descolamento prematuro da placenta, à restrição do crescimento fetal intraútero e ao trabalho de parto pré-termo (DUARTE; QUINTANA; EL BEITUNE, 2005; BRASIL, 2010).

Os fatores anexiais são de extrema importância quando pensamos na TMI intraútero, pois em torno de 30% dos casos decorrem de passagem transplacentária do vírus. Todas as situações predisponentes a corioamniorrexe prolongada favorecem o acesso do HIV-1 ao feto. Os fatores obstétricos seguem a mesma lógica, o rompimento das membranas, decorrente de procedimentos invasivos ou de trabalho de parto prolongado, favorece a exposição do feto ao HIV-1. Por esse motivo, em muitos casos, a cesárea eletiva é a via de parto de primeira escolha para essas gestantes (DUARTE; QUINTANA; EL BEITUNE, 2005; LUO et al., 2013; BRASIL, 2010).

Os fatores fetais relacionados à TMI são a integridade da pele, a prematuridade, o baixo peso ao nascer, a resposta imune celular e a presença constitucional de genes que irão expressar receptores secundários do HIV-1. Estudos demonstram que fetos que apresentam mutação homozigótica do gene que expressa o receptor secundário CCR5 apresentam um fator de proteção contra a TMI pelo HIV-1 (DUARTE; QUINTANA; EL BEITUNE, 2005; BRASIL, 2010).

A variabilidade genética do HIV-1 certamente corresponde ao fator viral de maior importância, portanto, a introdução de TARV com drogas que induzem mutação viral deve ser evitada no período gestacional. Por fim, temos o aleitamento materno como fator pós-natal mais importante, sendo responsável por 14% da TMI em mulheres na fase crônica da infecção e de 29% em mulheres na fase aguda. Certamente a presença do vírus no leite materno e seu potencial infectante são responsáveis pelo percentual de TMI mencionado (DUARTE; QUINTANA; EL BEITUNE, 2005).

Ainda não está claro por que alguns recém-nascidos são infectados enquanto outros não, apesar da significativa e contínua exposição ao HIV-1. Além dos fatores independentes citados anteriormente estarem sabidamente associados à TMI do HIV-1, alguns fatores imunogenéticos também parecem estar envolvidos nesse fenômeno, dentre os quais podemos citar os polimorfismos genéticos dos antígenos leucocitários humanos (HLA- abreviação do inglês *Human Leukocyte Antigen*) (FERNANDES et al., 2003; LUO et al., 2013).

1.3 Imunologia da interface materno-fetal

1.3.1 Aspectos imunológicos da gestação

A gravidez humana é permeada por diversos mecanismos de adaptação envolvendo os mais distintos sistemas, dentre os quais podemos citar o neuroendócrino e o imunológico. A atuação hormonal representa importante papel na tolerância materna ao feto. A progesterona, hormônio derivado do ovário, apresenta uma ação imunossupressora que afeta as células do sistema imune, lembrando a ação desempenhada pelos corticóides (HUNT; LANGAT, 2009).

Por se tratar de um tecido semialogênico, diversos estudos têm sido realizados para compreender quais são os fatores imunológicos envolvidos para que o organismo materno não rejeite o feto, assim como ocorre nos transplantes de órgãos (HUNT et al., 2005).

Medawar (1953) foi o primeiro a tentar compreender os mecanismos de tolerância do organismo materno ao feto, o resultado de seus estudos foram as seguintes teorias: o útero representaria um local imunologicamente privilegiado; a placenta atuaria como barreira neutra entre mãe e feto, e essa separação física entre tecidos maternos e fetais favoreceria a diminuição da resposta imunológica; e, por fim, a falta de antígenos fetais e a baixa antigenicidade do trofoblasto favoreceriam a tolerância ao feto no período gestacional. Esse autor acreditava que durante o período gestacional ocorreria um estado de imunossupressão materna.

Atualmente algumas dessas teorias já foram elucidadas e sabe-se que a tolerância imunológica entre mãe e feto é resultado da integração de inúmeros mecanismos que atuam em sinergia. Dentre os quais podemos citar o fato da circulação sanguínea materna e fetal ser completamente separadas; o aparecimento de antígenos fetais ocorrerem tardiamente; e a interface materno-fetal ser reconhecidamente um local imunologicamente privilegiado (HUNT et al., 2005; DAHER; MATTAR, 2009).

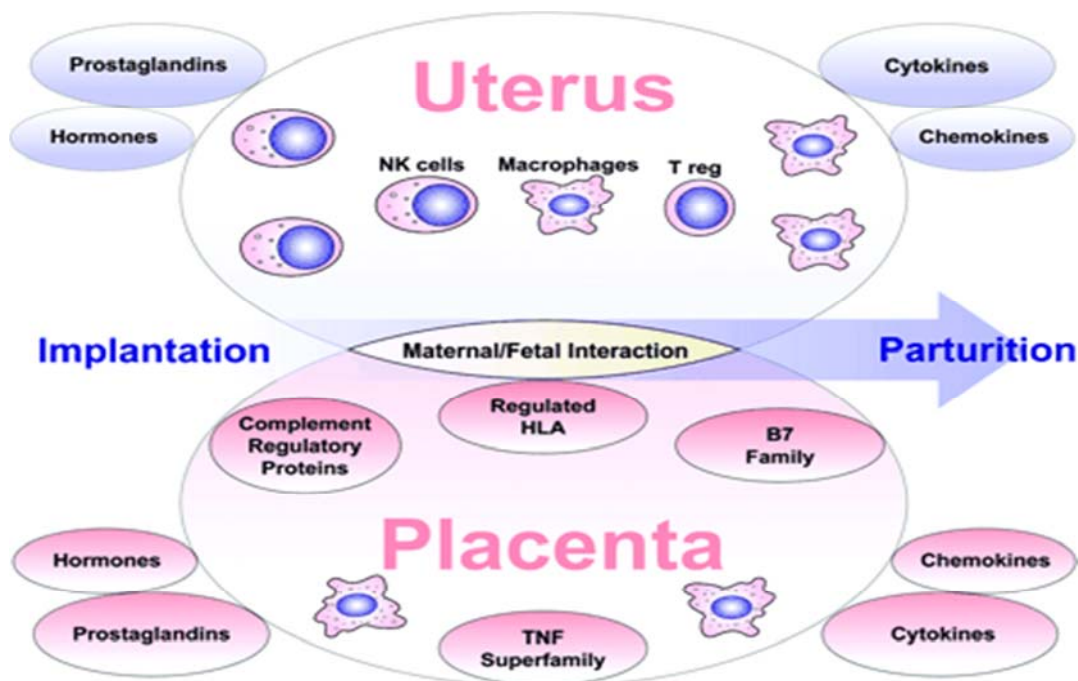


Figura 2 - Mecanismos da tolerância materna ao feto decorrente das adaptações ocorridas na interface materno-fetal. Fonte: Hunt et al., 2005.

Essa característica da interface materno-fetal ser imunologicamente privilegiada (Figura 2) tem sido associada ao padrão anormal de expressão de moléculas do MHC de classe Ib, não clássicas, localizadas inicialmente no trofotoderma e, posteriormente, no trofoblasto extraviloso, como será descrito mais adiante (JURISICOVA et al., 1996; COPEMAN et al., 2000; HUNT et al., 2005).

1.3.2 Fecundação e embriologia da placenta

A fecundação é uma complexa sequência de eventos moleculares coordenados, cuja duração é de 24 horas. Inicia-se após o contato entre os gametas masculino e feminino (espermatozoide e ovócito), culminando na fusão dos cromossomos maternos e paternos para a formação do zigoto (embrião unicelular) (MOORE; PERSAUD, 2008).

Quando o zigoto passa pela tuba uterina em direção ao útero, inicia-se a clivagem. Nesse processo, os blastômeros tornam-se cada vez menores e numerosos a cada divisão. Aproximadamente quatro dias após a fecundação, a mórula, composta por 12 a 32 blastômeros, chega ao útero (MOORE; PERSAUD, 2008).

Nessa fase, o interior da mórula apresenta um espaço preenchido por fluido denominado cavidade blastocística, convertendo-se a partir desse momento em blastocisto. O blastocisto libera-se da zona pelúcida e expõe ao epitélio da mucosa uterina seu revestimento epitelial denominado trofotoderma, formado por células pavimentosas externas (KIERSZENBAUM, 2008; MOORE; PERSAUD, 2008; CUNNINGHAM et al., 2012).

A implantação do blastocisto no endométrio envolve três fases, iniciada pela adesão instável do blastocisto à superfície do endométrio, chamada aposição, seguida por uma fase de adesão estável e, por fim, a decidualização do estroma endometrial - alterações vasculares do endométrio, mediadas pela ação hormonal, para tornar-se então o ambiente ideal à implantação do blastocisto (KIERSZENBAUM, 2008).

O trofotoderma é o mediador inicial da invasão do embrião no endométrio materno, que ocorre seis dias após a fecundação. Após a implantação da decídua circundante, originam-se as células trofoblásticas maduras e especializadas da placenta: citotrofoblasto, sinciotrofoblasto e trofoblasto extraviloso (TEV) (MOORE; PERSAUD, 2008; ZHU et al., 2012).

As células citotrofoblásticas são mononucleadas e mitoticamente ativas. Já o sinciotrofoblasto consiste numa massa citoplasmática multinucleada localizada no pólo embrionário voltado para o endométrio. O TEV tem papel importantíssimo no processo de implantação do blastocisto, e pode ser subdividido em intersticial e endovascular (KIERSZENBAUM, 2008; MOORE; PERSAUD, 2008; CUNNINGHAM et al., 2012).

O TEV intersticial possui uma característica invasiva, penetrando na decídua para formar o leito placentário, além de circundar as artérias espiraladas uterinas. O processo invasivo do TEV intersticial é extremamente potente, formando colunas de células que se estendem desde o endométrio até o terço interno do miométrio (COPEMAN et al., 2000; CUNNINGHAM et al., 2012).

Já o TEV endovascular penetra na luz das artérias espiraladas, substituindo o revestimento endotelial e criando vasos de baixa resistência, assegurando dessa forma um fluxo ininterrupto de sangue materno para o leito placentário. Esse processo de modulação vascular possibilita as trocas materno-embriônicas de gases, nutrientes e produtos de excreção (MOORE; PERSAUD, 2008; CUNNINGHAM et al., 2012; TELUGU et al., 2013).

No final da segunda semana, as células citotrofoblásticas proliferam sob a influência do mesoderma extraembrionário e se estendem até o sinciotrofoblasto, formando as vilosidades (ou vilos) primárias. As vilosidades coriônicas secundárias são formadas por um núcleo central de mesenquima, circundado por uma camada interna de citotrofoblasto e uma

camada externa de sinciciotrofoblasto. Já as vilosidades coriônicas terciárias se formam a partir da vascularização das vilosidades secundárias (KIERSZENBAUM, 2008; ROSS; PAWLINA, 2008).

1.3.3 Placenta: estruturas e funções

A placenta é o órgão característico exclusivo do período gestacional que proporciona a interface entre mãe e feto, pois apresenta funções primordiais como metabolismo (p.ex. síntese de glicogênio, colesterol e ácidos graxos), transporte de gases, de nutrientes e de secreção endócrina (p.ex. gonadotrofina coriônica humana – hCG). Sem essas atividades não seria possível a manutenção da gravidez e o desenvolvimento do feto (MOORE; PERSAUD, 2008).

Tendo como principal característica possibilitar a relação entre mãe e feto, a placenta apresenta duas porções: uma fetal e uma materna. A porção fetal é formada pelo córion viloso, região na qual as vilosidades coriônicas são originadas e projetam-se para o espaço interviloso, que contém sangue materno; já a porção materna é formada pela decídua basal (MOORE; PERSAUD, 2008; ROSS; PAWLINA, 2008).

A invasão da decídua basal pelas vilosidades coriônicas, durante a formação da placenta, forma erosões que aumentam o espaço interviloso, produzindo várias áreas cuneiformes na decídua denominados septos da placenta. Esses septos dividem a parte fetal da placenta em áreas convexas irregulares denominadas cotilédones (MOORE; PERSAUD, 2008).

O sangue materno chega ao espaço interviloso vindo das artérias espiraladas da decídua basal. Essas artérias passam por fendas da capa citotrofoblástica e lançam sangue no espaço interviloso. A drenagem desse sangue, após as trocas, é feita pelas veias endometriais que também atravessam a capa citotrofoblástica. Nos espaços intervilosos acontecem as principais trocas de nutrientes e gases entre mãe e feto (MOORE; PERSAUD, 2008).

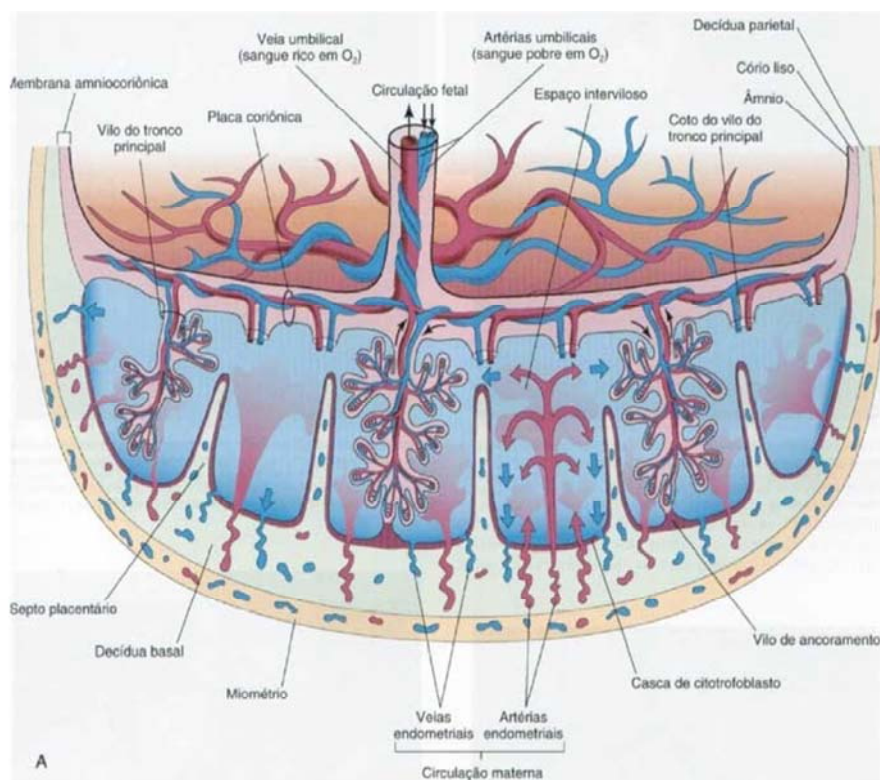


Figura 3 - Diagrama esquemático da placenta ilustrando suas estruturas. Fonte: Callen, 2000.

A placenta madura tem aproximadamente três centímetros de espessura, 20 centímetros de diâmetro e pesa cerca de 500 gramas. O lado fetal é liso e associado à membrana amniótica, o lado materno é parcialmente dividido pelos septos deciduais em 25 a 35 cotilédones (ROSS; PAWLINA, 2008).

A placentação – desenvolvimento da placenta - é um processo fisiológico complexo que pode durar até o 5º mês de gestação. Alterações ocorridas nesse processo de desenvolvimento placentário, especialmente no primeiro trimestre, resultam numa invasão ineficaz do TEV e está associado com a patogênese do abortamento espontâneo, pré-eclâmpsia e restrição de crescimento fetal (KIERSZENBAUM, 2008; APLIN, 2010; ZHU et al., 2012).

1.3.4 Interação placenta - HIV-1

Para que a TMI do HIV-1 intraútero ocorra, o vírus precisa atravessar várias camadas celulares na placenta e adaptar-se sequencialmente a três ambientes imunes: a um hospedeiro

imunologicamente desenvolvido, a uma placenta imunologicamente embotada e a uma criança imunologicamente imatura (KUMAR et al., 2011).

A passagem transplacentária viral e as respostas imunológicas na interface materno-fetal desempenham um papel crítico na ocorrência da infecção pelo HIV-1. Os mecanismos de passagem do HIV-1 pela placenta pode ocorrer tanto pela veiculação de linfócitos maternos infectados, quanto pela perda de integridade placentária. Estudo realizado na África do Sul com placentas de mulheres infectadas pelo HIV-1 observou que o peso desse órgão era 10% menor que o esperado para a idade gestacional. Também foi observado que as mulheres infectadas pelo HIV-1 com contagem de linfócitos CD4+ menor que 200 células/mm³, apresentavam regiões infartadas localizadas marginalmente no parênquima placentário (VERMAAK, 2012). Dentre outras causas da perda de integridade desse órgão podemos citar a formação de microinfartos causados pelo hábito de fumar e o uso de drogas ilícitas, como por exemplo, cocaína (DUARTE; QUINTANA; EL BEITUNE, 2005; LUO et al., 2013).

Os vírus maternos podem ser selecionados de acordo com sua capacidade de infectar as células da placenta e/ou para escapar de anticorpos neutralizantes. Há evidências de que, nos casos em que ocorre a TMI intraútero, há presença preferencial de vírus com tropismo para infectar macrófagos (MENU et al., 1999).

Levantamento bibliográfico realizado por Ackerman e J. (2013) com diversos estudos que analisaram as alterações placentárias causadas pelo HIV-1, levantou a hipótese de que a infecção dos macrófagos (e possivelmente linfócitos) presentes no útero antes do início da gestação pode causar uma inflamação intrauterina desfavorável para a implantação normal do blastocisto, o que explicaria a ocorrência de muitos dos eventos perinatais adversos, tais como abortamento espontâneo, restrição de crescimento fetal intrauterino, baixo peso ao nascer, parto prematuro, corioamnionite e morte fetal.

1.3.5 Decídua: ambiente imunologicamente privilegiado

A decídua é a porção do endométrio que sofre alterações vasculares, mediadas pela ação hormonal, para tornar-se o ambiente ideal à implantação do blastocisto. Considerando o local de implantação, podemos dividi-la em três regiões: decídua basal, parte que fica abaixo do conceito, formando o componente materno da placenta; decídua capsular, parte superficial da decídua que cobre o conceito; e, por fim, a decídua parietal, que consiste em todo o

restante da decídua (MOORE; PERSAUD, 2008; DAHER; MATTAR, 2009; HUNT; LANGAT, 2009).

Na decídua fica concentrada uma quantidade expressiva de células do sistema imunológico, mais especificamente células *Natural Killer* (NK), linfócitos T e as células apresentadoras de antígenos, como macrófagos e células dendríticas. Também é observada a presença de células mesenquimais e células de Hofbauer (células fagocíticas predominantes no início da gestação). Essas células são importantes para o reconhecimento e eliminação de antígenos, promovendo a defesa contra proteínas estranhas. O feto por ser um tecido semialogênico, deveria ser rejeitado pelo sistema imunológico materno. Entretanto, a capacidade de fornecer um ambiente imunotolerante deve-se à presença de células inibitórias e à produção de substâncias imunossupressoras. Tem sido descrito que o mecanismo de imunotolerância ao feto envolve interações entre receptores na superfície dos leucócitos citotóxicos, especificamente as moléculas HLA de classe Ib, não clássicas (KIERSZENBAUM, 2008; ROSS; PAWLINA, 2008; DAHER; MATTAR, 2009; HUNT; LANGAT, 2009).

1.4 Antígenos Leucocitários Humanos – HLA

1.4.1 Conceitos e definições

Nos seres humanos, os genes que codificam as moléculas HLA são os genes do MHC que se localizam no braço curto do cromossomo 6. Didaticamente, esses genes podem ser reunidos em três grupos, de acordo com sua localização cromossomal (DONADI, 2000; HUNT; LANGAT, 2009).

Na região de classe I estão englobados os *loci HLA-A, B, C, E, F, G, H, J, K e L*. Os genes *HLA-A, B e C* codificam as moléculas de histocompatibilidade presentes em praticamente todas as células nucleadas, por esse motivo são consideradas moléculas clássicas de classe Ia. Já os genes *HLA-E, F e G* codificam moléculas que são restritas a alguns tipos teciduais, sendo consideradas moléculas não-clássicas, de classe Ib. As moléculas HLA de classe Ia são caracterizadas por seu alto grau de polimorfismo, e as moléculas de classe Ib são

caracterizadas pelo limitado polimorfismo (DONADI, 2000; FERNANDES et al., 2003; HUNT; LANGAT, 2009; MURDACA et al., 2009).

Na região de classe II estão presentes os genes *HLA-DRA*, *DRBI-9*, *DQA1,2*, *DQB1,3*, *DOA*, *DOB,DMA*, *DMB*, *DPA1,2*, *DPB1,2*, *TAP1,2*, *LMP2,7*, *MICA-E*. Os genes de maior importância clínica nessa classe são os *HLA-DR*, *DP* e *DQ*. Eles codificam as moléculas clássicas de histocompatibilidade classe II, cuja atuação está envolvida na rejeição contra enxertos e na apresentação de peptídeos aos linfócitos T (DONADI, 2000).

A região classe III contém genes que codificam alguns componentes do sistema de complemento, dentre os quais C4A, C4B e fator B. Nessa classe também encontramos genes para as enzimas 21-hidroxilase (21B e 21A), para a proteína Hsp 70-relacionada ao choque térmico, bem para os fatores de necrose tumoral α e β (DONADI, 2000).

As moléculas de histocompatibilidade são glicoproteínas de superfície e apresentam três porções em comum: uma citosólica, responsável pela transdução de sinais intracelulares; uma transmembranosa, que mantém a molécula acoplada à camada bilipídica; e uma extracelular, responsável pela apresentação de peptídeos às células T (DONADI, 2000).

Especificamente, as moléculas HLA de classe I são heterodímeros, compostas por uma cadeia pesada α , contendo os domínios $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$. Essa cadeia α apresenta uma associação não covalente com a $\beta 2$ -microglobulina. Os domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$ são responsáveis pelo grande polimorfismo dessas moléculas, enquanto o domínio $\alpha 3$ é basicamente não polimórfico e apresenta homologia estrutural com as cadeias pesadas das imunoglobulinas. Dentre as inúmeras funções dessa classe de moléculas, certamente a apresentação de peptídeos endógenos e virais às células T CD8⁺ é de extrema importância (DONADI, 2000; HUNT et al., 2005).

1.4.2 HLA-G

Descrito pela primeira vez em 1987, a molécula HLA-G foi descoberta na interface materno-fetal, sendo sua expressão restrita à população de células do TEV, conferindo uma tolerância imunológica materna ao feto semialogênico (GERAGHTY; KOLLER; ORR, 1987; FERNANDES et al., 2003; HUNT et al., 2005; MOODLEY; BOBAT, 2011; ZHU et al., 2012).

Assim como os genes HLA clássicos (*HLA-A,-B,-C*), o gene *HLA-G* apresenta 7 íntrons e 8 éxons que codificam uma cadeia pesada associada de maneira não covalente a β_2 -microglobulina. O éxon 1 codifica o peptídeo sinal, os éxons 2, 3 e 4 codificam os domínios extracelulares α_1 , α_2 e α_3 , respectivamente, o éxon 5 codifica o domínio transmembrana, e os outros éxons codificam o domínio citoplasmático da cadeia pesada. Contudo, a presença de um códon de parada no início do éxon 6 do gene *HLA-G* reduz a 6 aminoácidos o domínio citoplasmático da proteína (HUNT et al., 2005; DONADI et al., 2011; GONZÁLEZ et al., 2012).

A molécula HLA-G apresenta sete isoformas proteicas, HLA-G1 a HLA-G7, geradas por edição alternativa do transcrito primário (Figura 4). As quatro primeiras são isoformas de membrana: HLA-G1 é a forma completa com estrutura de molécula HLA clássica associada a β_2 -microglobulina, transportando um peptídeo de sequência comum; HLA-G2 é desprovida do domínio α_2 codificada pelo éxon 3; HLA-G3 não possui os domínios α_2 e α_3 codificados pelos éxon 3 e 4; HLA-G4 perdeu o domínio α_3 codificado pelo éxon 4 (HUNT et al., 2005; DONADI et al., 2011; GONZÁLEZ et al., 2012).

As três últimas isoformas são solúveis: HLA-G5 e HLA-G6 possuem os mesmos domínios extraglobulares que HLA-G1 e HLA-G2, respectivamente, sendo geradas por transcritos que conservaram o íntron 4, havendo bloqueio da tradução do domínio transmembrana (éxon 5). A região 5' do íntron, em fase de leitura do éxon 4, é traduzida até um códon de parada que confere às isoformas HLA-G5 e HLA-G6 uma cauda de 21 aminoácidos específicos implicados na sua solubilidade. A outra forma solúvel, HLA-G7, apresenta estrutura limitada ao domínio α_1 , conservando 2 aminoácidos específicos do íntron 2. Os transcritos alternativos são todos desprovidos do éxon 7 (HUNT et al., 2005; DONADI et al., 2011).

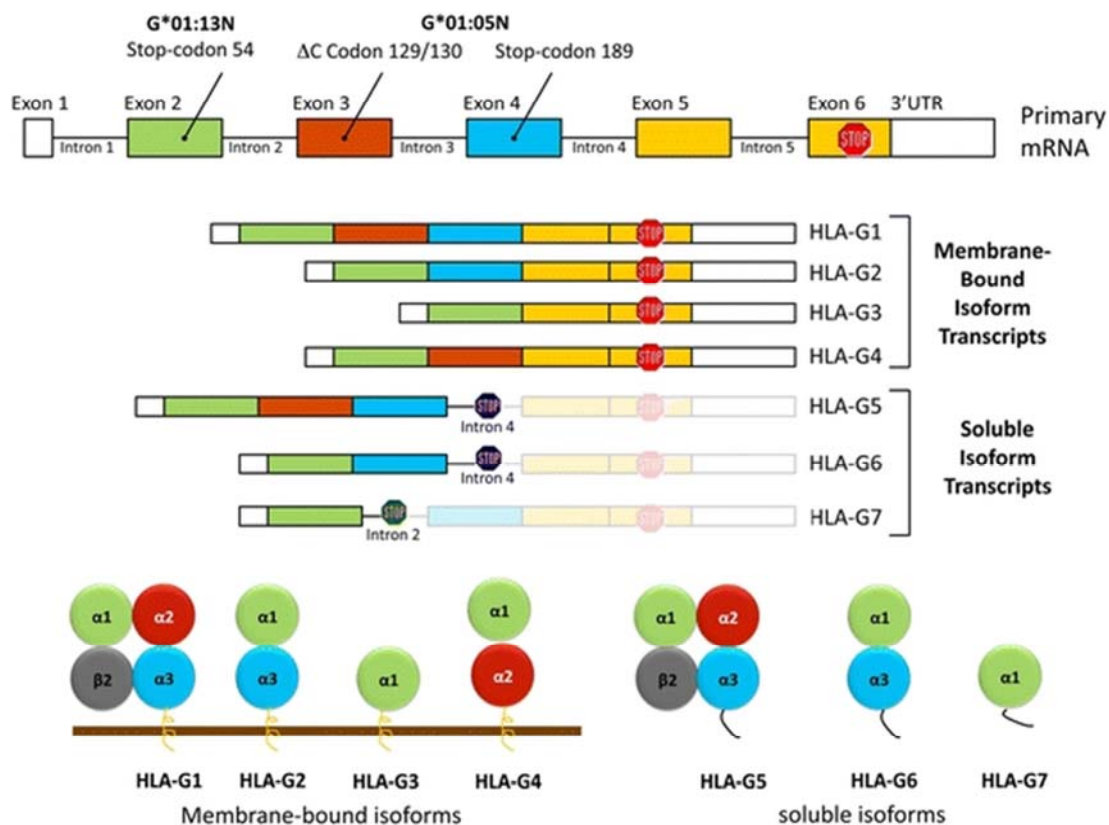


Figura 4: Isoformas de HLA-G geradas por edição alternativa do transcrito primário do gene. Os éxons delidos são representados em pontilhado. Fonte: Donadi et al., 2011.

Essas características genômicas resultam na expressão mais lenta e prolongada da HLA-G na superfície da célula, e, eventualmente, numa apresentação de peptídeos exógenos ineficiente. Isso pode evidenciar que a função primária da HLA-G não é a apresentação de antígenos, mas sim a atuação como um ligante inibidor para as células do sistema imunológico, especialmente as NK (HUNT et al., 2005).

A HLA-G é uma molécula imunossupressora que age tanto na imunidade inata quanto adaptativa, proporcionando inibição contra a citotoxicidade das células NK e linfócitos T citotóxicos. Essa característica confere a HLA-G um efeito modulador benéfico à gestação, doenças autoimunes e inflamatórias, e efeitos negativos no câncer e em infecções virais (MOODLEY; BOBAT, 2011; SVENDSEN et al., 2013).

O mecanismo de ação da molécula HLA-G é inibir o reconhecimento dos receptores inibitórios das células com atividade citotóxica (HUNT et al., 2005). Evidências apontam para a afinidade da HLA-G em ligar-se aos receptores ILT-2 e ILT-4, que também interagem com outras moléculas HLA de classe I e com o receptor KIR2DL4, que é específico para a HLA-G

(CAROSELLA *et al.*, 1999; HUNT *et al.*, 2005; BHALLA *et al.*, 2006; GONZÁLEZ *et al.*, 2012).

O receptor ILT-2 é expresso em subconjuntos de células imunocompetentes, tais como NK, linfócitos T, monócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos B. Já o receptor ILT-4 é encontrado em todos os monócitos, macrófagos e células dendríticas. Por fim o receptor KIR2DL4 é expresso por células NK e linfócitos T CD8+. Isso demonstra que as interações da HLA-G são importantes na inibição da resposta imune materna inata e adquirida contra o feto, pois anulam os sinais de ativação recebidos por essas células (CAROSELLA *et al.*, 1999; HUNT *et al.*, 2005; BHALLA *et al.*, 2006; GONZÁLEZ *et al.*, 2012).

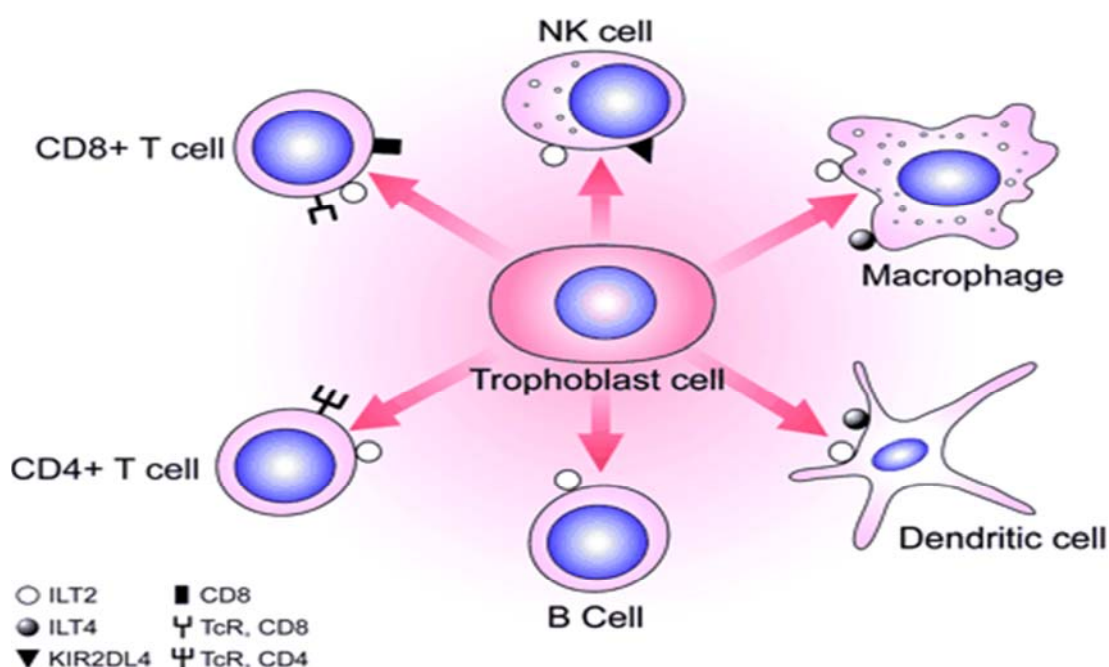


Figura 5 - Potenciais receptores de HLA-G em células-alvo do sistema imunológico. Fonte: Hunt *et al.*, 2005.

A expressão da molécula HLA-G sofre alterações ao longo da gestação, de acordo com a idade gestacional. Estudo realizado na China com amostras placentárias do primeiro, segundo e terceiro trimestre gestacional de mulheres que tiveram aborto eletivo, pré-eclâmpsia e um grupo controle saudável demonstrou que o nível de expressão da molécula HLA-G alcançou um pico máximo entre a 6ª e 7ª semana de gestação, e foi diminuindo gradativamente no segundo e terceiro trimestre (ZHU *et al.*, 2012). Jurisicova e colaboradores (1996) demonstraram, por meio do uso de técnicas laboratoriais como PCR e

imunocitoquímica, que a HLA-G é expressa durante o período crítico de desenvolvimento e pré-implantação do embrião, favorecendo o processo de invasão do blastocisto.

Conforme dito anteriormente, é conhecida a expressão da HLA-G em tecidos placentários durante o período gestacional. Devido a sua importância na interação materno-fetal, por meio da modulação de citocinas e fatores de crescimento, além da inibição da atividade lítica das células NK, a expressão da HLA-G pode ser utilizada como um parâmetro de bom prognóstico da gestação quando elevada e, por outro lado, quando diminuída, pode estar associada às intercorrências obstétricas como falha na implantação, abortamento espontâneo de repetição ou pré-eclâmpsia (DAHER; MATTAR, 2009).

1.4.3 HLA-G em infecções virais

O papel do vírus na modulação da expressão da HLA-G é bem estudado. A expressão de HLA-G em células neuronais foi observada após a infecção pelo vírus da raiva (RABV) e pelo vírus herpes simples tipo 1 (HSV -1). Esses vírus neurotrópicos aumentam a expressão da HLA G, sendo que o RABV expressa principalmente a HLA-G1, enquanto o HSV-1 induz principalmente a HLA-G3 e a HLA-G5. Acredita-se que a expressão aumentada da HLA-G possa estar envolvida no escape de certos vírus à resposta imune no sistema nervoso (LAFON et al., 2005).

Nas infecções pelo vírus da hepatite C (HCV) e da hepatite B (HBV), a HLA-G também favorece a evasão viral do sistema imunitário, inibindo a imunidade tanto inata quanto adaptativa, favorecendo dessa forma a progressão da infecção. Os níveis séricos de HLA-G solúveis são aumentados em pacientes infectados tanto pelo HBV quanto pelo HCV (HAN et al., 2012; AMIOT et al., 2013).

A superexpressão da molécula HLA-G pode facilitar a evasão imune, devido a sua atividade inibitória da lise mediada pelas células NK. Alguns sítios polimórficos localizados na região 3' não traduzida (3' UTR) podem influenciar o padrão de expressão dessa molécula, dentre os quais podemos citar a presença (inserção) ou ausência (deleção) de um fragmento de 14 pares de base (14 pb), que está associada à susceptibilidade à infecção por citomegalovírus (CMV) (DONADI et al., 2011; AGHAFAR et al., 2012).

A isoforma solúvel da HLA-G1, decorrente de derramamento ou clivagem proteolítica a partir da membrana celular, tem sido associada à indução de apoptose de células T CD8+ e à

supressão da resposta das células T CD4⁺. Estudos recentes sugerem que, em condições patológicas, a expressão de HLA-G1 pode ser induzida em células que normalmente não expressam essa molécula, caso de alguns tipos de tumores. Além disso, a expressão da HLA-G1 pode ser aumentada em monócitos durante a fase crônica das infecções virais. Outra característica da HLA-G-1 é a capacidade de apresentar péptidos virais para as células T CD8⁺ citotóxicas, sugerindo que esta molécula de classe Ib também pode desempenhar esse papel (DERRIEN et al., 2004; REBMANN et al., 2007).

1.4.4 HLA-G e HIV-1

Propriedades imunossupressoras da molécula HLA-G podem estar envolvidas na persistência e progressão da infecção pelo HIV-1. Recentes estudos têm demonstrado que vários polimorfismos do *HLA-G* influenciam na susceptibilidade à infecção pelo HIV-1 e que a expressão da HLA-G na superfície de monócitos e células T está aumentada em pacientes soropositivos para o HIV-1 (LOZANO et al., 2002; DONAGHY et al., 2007).

Um estudo utilizando linhagens celulares de glioblastoma (U87) que expressavam o receptor CD4 e o co-receptor CXCR4, inoculadas com o vírus do HIV-1, demonstrou que a expressão da isoforma que interage com a membrana HLA-G1 é seletivamente suprimida pelo HIV-1, e que a modulação da expressão dessa molécula se deve a mecanismos da proteína Vpu, codificada pelo HIV-1 (DERRIEN et al., 2004).

Para avaliar os níveis plasmáticos das isoformas solúveis de HLA-G em pacientes infectados pelo HIV-1 em diferentes estágios de progressão clínica, pesquisadores analisaram amostras de sangue periférico de 24 pacientes. Os resultados demonstraram que pacientes na fase inicial da infecção apresentavam níveis elevados de HLA-G solúvel, enquanto na fase crônica, esses níveis foram restaurados para normalidade. Esses resultados demonstraram a capacidade do sistema imunitário para controlar a infecção pelo HIV-1. Por outro lado, os níveis de HLA-G solúvel permaneceram elevados em pacientes que apresentaram progressão rápida para aids (LAJOIE et al., 2009).

Há evidências de que a diminuição da expressão de HLA-G induz a resposta pelo linfócito T helper 1 (Th1), ao passo que níveis elevados de HLA-G induzem a resposta pelo linfócito T helper 2 (Th2). A resposta inflamatória Th1 é caracterizada por níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no soro materno,

que pode levar à inflamação da membrana placentária e facilitar a passagem do HIV-1, aumentando o risco da TMI. Estudo desenvolvido com filhos de mulheres infectadas pelo HIV-1 observou que a presença do alelo deleção do fragmento de 14pb foi mais frequente nas crianças não infectadas. Isso sugere que esse polimorfismo pode favorecer o aumento da expressão de HLA-G, contribuindo para a criação de uma resposta imunitária local do tipo Th2, diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α (FABRIS et al., 2009).

Relativo à associação entre polimorfismos dos alelos HLA e a TMI do HIV-1, estudo realizado no Quênia sugere que a concordância de alelos HLA de classe I entre mãe e filho está associado com o aumento do risco para TMI do HIV-1 (POLYCARPOU et al., 2002; MACKELPRANG et al., 2008), e a discordância nesses alelos pode conferir um efeito protetor contra TMI do HIV-1 (MACDONALD et al., 1998). Evidências sugerem que isso acontece por uma ligação alterada desses alelos aos peptídeos derivados do vírus, resultando numa reduzida capacidade das células infectadas de apresentar esses peptídeos aos linfócitos T CD8+ (CTL).

Esses estudos são importantes para entender fatores imunogenéticos que possam estar associados com a TMI do HIV. Entretanto, estudos que avaliam a expressão das moléculas HLA-G nesse contexto são raros. Apenas um estudo analisou a expressão do HLA-G em tecidos placentários e mostrou aumento da expressão desta molécula em mães infectadas pelo HIV que tiveram a ocorrência da TMI do HIV (MOODLEY; BOBAT, 2011).

1.4.5 HLA-G e TARV

Embora tenha sido demonstrada a eficácia da TARV no tratamento do HIV-1, é sabido que esse tratamento apresenta certas limitações, tais como a incapacidade de controlar completamente a replicação viral, eliminar os reservatórios do vírus ou ajudar na recuperação do sistema imunológico do paciente (RIVERO et al., 2007).

Estudos analisando a interferência dos antirretrovirais na modulação da expressão do HLA-G com possível influência na resposta imunológica têm sido publicados nos últimos anos. Cabello e colaboradores (2003) mostraram aumento do número de monócitos expressando a molécula HLA-G em pacientes que receberam antirretrovirais em comparação com os que não foram tratados. Estudo adicional avaliou a expressão do HLA-G nos

diferentes esquemas terapêuticos de pacientes infectados com HIV e revelou que os INTRs foram capazes de aumentar a expressão do HLA-G em monócitos e linfócitos T CD4+ circulantes, e que os IPs não mostraram esta capacidade (RIVERO et al., 2007). Tais estudos são extremamente importantes porque podem oferecer novas perspectivas imunológicas sobre a terapia antirretroviral.

Visto que a imunotolerância induzida pelo HLA-G ocorre após o aumento da expressão dessa molécula em células de pacientes infectados pelo HIV recebendo a terapia antirretroviral, essa imunotolerância induzida pelo tratamento pode ter consequências significativas no curso da infecção, permitindo que as células infectadas se evadam dos mecanismos citotóxicos e se mantenham como reservatórios, facilitando a transmissão da infecção.

Ao avaliar os níveis séricos das isoformas solúveis do HLA-G, verificou-se que indivíduos infectados pelo HIV-1, independentemente do estágio da doença, apresentam níveis mais elevados quando comparados aos indivíduos saudáveis. Contudo, após o início da TARV, esses níveis diminuíram gradativamente até alcançar os níveis de indivíduos saudáveis. Além disso, a diminuição dos níveis séricos de HLA-G solúvel causada pela TARV favorece a reconstituição da atividade citotóxica das células CD8+ contra os patógenos, aumentando seu número absoluto no sangue periférico (MURDACA et al., 2009; 2011).

Pelo fato do HLA-G ser um ligante de alguns receptores inibitórios como de células NK, esses resultados sugerem que a TARV baseada em IP (que são incapazes de induzir o HLA-G) representa um interesse clínico, pois a ausência de HLA-G na superfície dos monócitos facilita a destruição desses por linfócitos T citotóxicos e NK em pacientes tratados. Isso sugere que os IPs podem ser mais benéficos contra a infecção devido a seu efeito antiviral, facilitando simultaneamente a destruição dos monócitos infectados (RIVERO et al., 2007).

1.5 Aplicabilidade clínica do conhecimento sobre HLA-G

A característica imunomodulatória das moléculas HLA-G, observada inicialmente na interface materno-fetal, também tem sido descrita em condições patológicas como doenças autoimunes, tumores e infecções virais. O aumento da expressão de HLA-G em pacientes

acometidos por infecções virais e câncer mostrou-se prejudicial, devido ao seu efeito inibitório da resposta imunológica. Entretanto, em pacientes submetidos a transplantes alogênicos e nos portadores de doenças autoimunes, altos níveis de expressão de HLA-G podem representar resultados benéficos (DONADI, 2011).

Considerando esse conhecimento acerca do comportamento dos níveis de expressão de HLA-G, sua utilização na projeção tanto de estratégias diagnósticas quanto terapêuticas, passou a ser considerada em diversas áreas da medicina (BRENOL et al., 2012). Tem sido demonstrado que a utilização da quantificação de HLA-G configura-se como um marcador de qualidade dos embriões nos tratamentos para reprodução assistida (GONZÁLEZ, 2012).

Estudos realizados com pacientes submetidos a transplantes alogênicos de coração (LILA et al., 2000), fígado (NAJI et al., 2007), rim (QIU et al., 2006) e fígado-rim (LE ROND et al., 2006), demonstraram que a mensuração dos níveis de HLA-G no enxerto ou no plasma pode ser utilizada como um indicador preditivo do risco de rejeição aguda e crônica, pois a diminuição dos níveis de HLA-G (solúvel ou ligado à membrana) foi associada ao maior risco de rejeição (DESCHASEAUX et al., 2011; JIN et al., 2012).

A expressão de moléculas HLA-G em tumores sólidos foi amplamente investigada, e os dados mostraram que essas moléculas foram preferencialmente detectadas nas lesões tumorais, e raramente no tecido não tumoral adjacente. Esses achados sugerem que as moléculas HLA-G podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento tumoral, portanto, representam um potencial clínico, sendo utilizadas como marcador tumoral no diagnóstico e prognóstico de diversos tipos de cânceres (YAN, 2011).

A proposta terapêutica para pacientes com câncer utilizando HLA-G é baseada na inibição de sua expressão nessas linhagens, impedindo que as células tumorais escapem da atuação do sistema imunológico. Acredita-se que a associação de imunoterapia, com a utilização de anticorpos neutralizantes dos efeitos inibitórios do HLA-G, associada às drogas anticancerígenas, poderia maximizar os efeitos terapêuticos dessas drogas e diminuir seus efeitos colaterais (YAN, 2011).

Podemos então considerar o HLA-G como um marcador imunológico de diversas patologias, sendo que sua aplicabilidade pode ir além dos laboratórios de pesquisa. Tendo em vista que o HLA-G solúvel é liberado na circulação sanguínea, a mensuração dos seus níveis séricos pode constituir uma ferramenta diagnóstica valiosa, podendo também ser utilizada no acompanhamento da eficácia da resposta ao tratamento das patologias mencionadas, além de ser indicativo do prognóstico das mesmas (GONZÁLEZ, 2012).

1.6 O avanço do conhecimento científico e o impacto na qualidade da assistência de enfermagem

A incorporação de novas tecnologias é uma realidade no mundo contemporâneo, e certamente a área da saúde se beneficiou muito com esses avanços. A produção de conhecimento científico na área da saúde tem como objetivo a melhoria da qualidade de vida dos indivíduos, iniciando com pesquisas realizadas em laboratório até sua aplicação, na prestação do cuidado. Nesse contexto, a enfermagem tem avançado e passou a explorar novos campos do conhecimento, ampliando o espectro nas áreas de pesquisa, com temáticas até então não exploradas por enfermeiros, caso da imunogenética que norteia o presente trabalho, corroborando no desenvolvimento do conhecimento científico e de tecnologias a serem utilizadas (FERNANDES et al., 2005).

O conhecimento acerca das aplicabilidades clínicas do HLA-G encaixa-se no contexto que a enfermagem vivencia atualmente. Considerando o avanço das pesquisas focadas nas práticas clínicas pautadas pelo HLA-G, seu uso como marcador imunológico no diagnóstico, na terapêutica e no prognóstico de inúmeras patologias será empregado em breve, o que resultará na aquisição do conhecimento dessa temática para a prestação de assistência de enfermagem de maior qualidade.

JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

A vulnerabilidade da mulher frente à epidemia de infecção pelo HIV-1 resultou em um aumento crescente dos casos notificados na população feminina. Levando em consideração que muitas dessas mulheres se encontram em idade fértil, temos uma outra população em situação de vulnerabilidade: seus filhos.

A importância clínica do *HLA-G* como um marcador imunogenético que exerce funções benéficas no período gestacional está bem consolidada. Além disso, o *HLA-G* tem sido associado à progressão e persistência de infecções virais, conforme descrito no referencial teórico. Com o intuito de compreender a associação do HLA-G com o HIV-1 em gestantes, objetivou-se desenvolver este estudo para avaliar a expressão das moléculas HLA-G em tecidos placentários de mulheres infectadas ou não pelo HIV-1, verificando seu comportamento na presença do vírus.

Alguns questionamentos motivaram a realização deste estudo. No referencial teórico foram utilizados estudos mostrando a inibição das respostas imunológicas na presença da molécula HLA-G. Como a expressão da molécula HLA-G na placenta se comporta na presença da infecção pelo HIV-1? E na presença da terapia antirretroviral? O presente estudo não tem por objetivo analisar a TMI do HIV-1, pois trabalhamos somente com a placenta materna. Entretanto, nossos resultados fornecem subsídios para que outros estudos sejam realizados com essa finalidade.

O presente estudo mostra-se importante devido à escassez de trabalhos que abordam a expressão das moléculas HLA-G em tecidos placentários, e contribui para o desenvolvimento de conhecimentos e tecnologias em saúde que possam ser aplicadas nas intervenções especializadas e na prestação de cuidados, atividades diretamente relacionadas à enfermagem.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a expressão das moléculas HLA-G em tecidos placentários de mulheres infectadas ou não pelo HIV-1.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Quantificar e comparar a expressão da molécula HLA-G em tecidos placentários de mulheres infectadas ou não pelo HIV-1;
- b) Identificar as drogas antirretrovirais instituídas na gestação e no parto em mulheres infectadas pelo HIV-1;
- c) Analisar possíveis associações da expressão das moléculas HLA-G com as drogas antirretrovirais utilizadas na gestação;
- d) Contribuir para aprofundar o entendimento dos mecanismos imunogenéticos envolvidos na gestação e na infecção pelo HIV-1.

CASUÍSTICA E MÉTODO

4 CASUÍSTICA E MÉTODO

4.1 Delineamento do estudo

O desenho do presente estudo é transversal e descritivo, cuja realização visou avaliar, quantificar e comparar a expressão de moléculas HLA-G em tecidos placentários de mulheres infectadas ou não pelo HIV-1.

4.2 Local do Estudo

O estudo foi realizado no Ambulatório de Moléstias Infecciosas em Ginecologia e Obstetrícia (AMIGO) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP/USP) e no Centro de Referência em Saúde da Mulher - Mater.

O HC-FMRP/USP é um hospital geral universitário, situado na cidade de Ribeirão Preto e está integrado ao Sistema Único de Saúde (SUS). Com suas atividades baseadas na assistência, ensino e pesquisa, realiza atendimento ao usuário por meio de internações hospitalares e consultas ambulatoriais. O AMIGO consiste em um ambulatório para atendimento de gestantes portadoras de moléstias infecciosas, dentre as quais a infecção pelo HIV-1, da cidade de Ribeirão Preto e região.

Inaugurada em 1998, a Maternidade do Complexo Aeroporto - Mater, consiste hoje em um centro de referência às mulheres usuárias do SUS gerenciado pelo HC-FMRP/USP. Realiza atualmente consultas ambulatoriais, internação e atendimento a partos de baixo e médio risco, internações ginecológicas e obstétricas em caráter de urgência e emergência, e atividades voltadas à saúde da mulher.

4.3 População do Estudo

A análise da expressão proteica das moléculas HLA-G foi realizada por imunohistoquímica em fragmentos de tecidos placentários de 200 mulheres infectadas ou não pelo HIV-1, subagrupadas em duas categorias:

- a) 100 Mulheres infectadas pelo HIV-1 (PHIV+),
- b) 100 Mulheres não infectadas pelo HIV-1 (PHIV-).

As amostras do grupo de PHIV+, ou seja, os blocos parafinados com tecido placentário das 100 mulheres PHIV+, foram obtidos no arquivo do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP).

As amostras do grupo de PHIV-, ou seja, amostras de tecido placentário de 100 mulheres PHIV-, que consentiram participar do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 1), foram coletadas logo após o parto, ainda na sala de parto, no Centro de Referência em Saúde da Mulher – Mater.

Para o recrutamento da população de estudo, foram seguidos os seguintes critérios de inclusão e exclusão:

- a) Critérios de inclusão do Grupo Mulheres infectadas pelo HIV-1 (PHIV+):

- Placentas de mulheres soropositivas para anticorpos contra o HIV-1;
- Idade superior a 18 anos;
- Placentas de 3º trimestre de gestação;
- Utilização ou não da terapia antirretroviral durante a gestação/parto;

- b) Critérios de inclusão do Grupo Mulheres não infectadas pelo HIV-1 (PHIV-):

- Mulheres não infectadas pelo HIV-1;
- Idade superior a 18 anos;
- 3º trimestre de gestação;
- Mulheres híginas, que não apresentem qualquer doença crônico-degenerativa;
- Pacientes que aceitaram participar do estudo;

- c) Critérios de exclusão para os dois grupos (PHIV+ e PHIV-):

- Mulheres com idade inferior a 18 anos;

- Placentas de 1º ou 2º trimestre gestacional;
- Sorologia para anticorpos contra o HIV-1 indefinida;
- Pacientes que não concordarem em participar do estudo;

4.4 Instrumentos para Coleta de Dados

Os dados das mulheres PHIV+ foram coletados no prontuário eletrônico da paciente no sistema de rede informatizada do Hospital das Clínicas da FMRP-USP (Sistema HC), no qual foram levantados aspectos sócio-demográficos, históricos gestacionais e antecedentes obstétricos, quantificação da carga viral (cópias/mL), contagem de células TCD4+ (células/mm³) e TARV utilizada durante a gestação, além de outras patologias ou intercorrências no período gestacional.

Para as mulheres PHIV-, as entrevistas foram realizadas após a obtenção do consentimento livre e esclarecido (Apêndice 1), na sala do pré-parto do serviço de saúde descrito anteriormente, sendo preservado o sigilo e anonimato. Com o auxílio de um questionário estruturado (Apêndice 2), foram levantados aspectos sócio-demográficos dessas mulheres, histórico gestacional e antecedentes obstétricos. Não houve necessidade de consulta ao prontuário médico.

4.5 Coleta e Parafinização dos Fragmentos de Tecido Placentário

A coleta das amostras do grupo de PHIV- ocorreu da seguinte maneira. Para cada paciente, um fragmento de tecido com dimensões de 1 X 2 cm foi recortado da placenta logo após sua expulsão, garantindo-se no corte a presença das faces materna (decídua basal) e fetal (córion). Essa amostra, em seguida, foi armazenada em cassetes histológicos e fixada em formol tamponado a 10%, e assim mantida até a inclusão em parafina.

O processo de inclusão em parafina foi realizado pelo Laboratório de Proliferação Celular do Departamento de Patologia da FMRP-USP, mediante as seguintes etapas:

O tamanho e superfície de cortes dos fragmentos foram corrigidos, recolocados nos cassetes histológicos, lavados com água destilada e mergulhados na cuba de álcool 70%. Para

o processo de desidratação, os fragmentos passaram por 5 banhos de álcool 100% por 30 minutos/cada. Para a diafanização, as amostras passaram por 3 banhos de xilol por 20 minutos/cada. Foram realizados dois banhos de parafina (na temperatura de 60°C), sendo o primeiro com duração de 1 hora e o segundo de 2 horas. Os fragmentos de cada cassete foram incluídos dentro das forminhas com parafina a 60°C, obedecendo a orientação dos cortes histológicos.

Após a inclusão, foram realizados cortes histológicos de 3µm de espessura, fixados em lâminas silanizadas e submetidos ao processamento imunistoquímico para avaliação da expressão proteica das moléculas HLA-G.

As amostras do grupo de PHIV+ foram originadas de blocos parafinados com tecido placentário das 100 mulheres PHIV+, obtidos no arquivo do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP).

4.6 Imunoistoquímica das amostras de Tecidos Placentários

Com o auxílio de alunos de pós-graduação e de técnicos dos laboratórios de imunistoquímica da Universidade do Estado de São Paulo (UNESP) de Araraquara e do Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas da FMRP-USP, foram realizados 5 protocolos pilotos para que se estabelecesse um protocolo definitivo.

No primeiro teste realizado, as lâminas não apresentaram marcação do anticorpo estudado (primário) e apresentaram ligações inespecíficas (*background*). Para o segundo teste, alterou-se o tipo de bloqueio das ligações inespecíficas, o anticorpo primário ficou incubado no tecido placentário por uma noite e diminuiu-se a diluição do cromógeno. As lâminas ainda apresentaram *background* e a marcação do anticorpo primário ainda era bastante insatisfatória. Ao final desses testes, o Complexo Ultra Estreptavidina - Biotina - Peroxidase (Starr Treck – Biocare Medical, EUA), utilizado nos experimentos, se esgotou, e devido a processos burocráticos não foi possível realizar sua compra, exigindo a identificação de um novo sistema de detecção. Realizou-se então um terceiro teste utilizando um polímero-HPR de uma etapa (EasyLink One – EasyPath, Brasil). Nesse teste, foi verificada a eliminação de *background*, contudo, não houve melhora na marcação do anticorpo primário. Foram efetuadas algumas modificações no protocolo, tais como: bloqueio da proteína com BSA 1%; diluição do DAB 1 gota-1ml e tempo de ação de 1 minuto e modificado o tempo do Xylol que

precede à montagem das lamínulas para 10 minutos. A marcação do anticorpo primário apresentou uma melhora em relação aos outros testes mais ainda não era satisfatória. Efetuamos então a compra de um anticorpo novo e testamos diversas diluições até encontrarmos uma marcação satisfatória com a medida 1/50 em BSA 1% (1 microlitro de anticorpo para cada 50 microlitros de BSA 1%).

Dessa forma, estabeleceu-se o seguinte protocolo a ser utilizado para todo o estudo:

As lâminas foram incubadas em estufa à 60° por no mínimo 1 e no máximo 12 horas, para auxiliar na desparafinização. Posteriormente foram submetidas a banhos consecutivos em baterias de xilol e álcool (Synth-Diadema, SP), para a completa desparafinização e posterior hidratação. A recuperação antigênica foi feita com solução de citrato de sódio modificado (citrato de sódio 2,94g, EDTA 0,372g, água destilada destilada 1000 ml) pH6,0 (Synth-Diadema, SP) em panela à vapor *steam-cuisine* (T-FAL, Industria de Aparelhos Médicos LTDA) durante 40 minutos a 96 °C. Após o resfriamento em temperatura ambiente por 20 minutos, as lâminas foram lavadas três vezes em PBS 0,01M (pH 7,6), por 5 minutos cada lavagem. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado pela incubação das lâminas em metanol 0,5% por 10 minutos. Posteriormente as lâminas foram lavadas com PBS (pH 7,0) 3 vezes e TBST (pH 7,6) 1 vez por 3 minutos. O anticorpo HLA-G (clone 5A6G7, EXBIO Antibodies, Republica Tcheca), diluído 1/50 em leite Molico 1,5% (1,5g para 100 ml de Tris HcL pH 7,6) ficou incubado no tecido em temperatura ambiente e em câmara úmida por 2 horas. Após esse período, as lâminas foram lavadas com TBST (pH 7,6) 3 vezes e incubadas com o polímero EasyLink One (EasyPath, Brasil) por 30 minutos abrigado da luz. Os cortes foram então lavados com TBST (pH 7,6) 3 vezes por 3 minutos, e a reação revelada com a aplicação de diaminobenzidina (DAB) por 5 minutos. As lâminas foram lavadas com água destilada, coradas com hematoxilina de Mayer por 3 minutos e lavadas com água corrente por 2 minutos, em seguida foram mais novamente lavadas com água destilada por dois minutos. A desidratação foi feita com álcool e xilol em diferentes concentrações, e a montagem com meio de montagem VER, Mount e lamínula.

Para confirmar a eficácia do experimento, foi utilizado como controle negativo biópsias de baço e biópsias de placenta sem o anticorpo primário.

- PBS = Cloreto de Sódio (NaCl) anidro 180g; Fosfato de Sódio Bibásico (Na_2HPO_4) anidro 48g; Fosfato de Sódio Monobásico ($\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}_2$) 4,8g; H_2O destilada 1000ml (solução 20x concentrada)

- TBST = Cloreto de sódio (NaCl) 80,0g; Tris (PM 121,1g) 6,05g; H_2O destilada – 1000ml; Tween 20% 5ml (solução 10x concentrada).

4.7 Análise da Expressão das Moléculas HLA-G

As biópsias submetidas à reação de imunistoquímica foram analisadas por um patologista, com o uso de microscópio de Olympus BX51. A análise quantitativa da área de marcação do TEV foi realizada de acordo com a classificação utilizada no estudo de Li et al.(2012), sendo negativa quando a marcação foi $\leq 5\%$, e positiva quando foi superior a esse valor. A marcação positiva foi agrupada em 1+ quando a região marcada correspondeu de 6-25%, 2+ quando correspondeu de 26-50%, 3+ quando correspondeu de 51-75% e 4+ quando correspondeu a uma região $> 75\%$.

4.8 Aspectos Éticos

Por se tratar de uma pesquisa com seres humanos, ela foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, no qual foi aprovado, conforme parecer N° 1330/2011. É de comprometimento dos pesquisadores aderirem à Resolução 196/96, garantindo que serão seguidas todas as exigências éticas de uma pesquisa envolvendo seres humanos.

4.9 Análise Estatística

As informações coletadas foram registradas em uma planilha do programa *Microsoft Office Excel 2007*. Posteriormente foi realizada uma análise exploratória das variáveis: expressão das moléculas HLA-G e abortamento prévio (tanto para os grupos PHIV+ quanto para o PHIV-). Para o grupo PHIV+ foram analisadas também as variáveis: contagem de células CD4+, quantificação de carga viral e TARV utilizada. O objetivo básico dessa análise foi sintetizar uma série de valores de mesma natureza, permitindo que se tivesse uma visão global da variação desses valores, organizando e descrevendo os dados por meio de medidas descritivas com o auxílio do software SAS® 9.0, utilizando a PROC FREQ.

Com o intuito de verificar a associação da variável categórica expressão da molécula HLA-G com cada uma das demais variáveis estudadas (HIV, abortamento prévio, contagem de CD4+, quantificação de carga viral e TARV utilizada), foi proposto o teste Exato de Fisher e Qui-Quadrado. Este procedimento foi realizado por meio do software SAS® 9.0, utilizando a PROC FREQ.

Após a verificação das associações demonstradas nos testes Qui-Quadrado, optamos pela realização do modelo logístico multinomial (Agresti, 2002). Esse modelo permite o ajuste para variáveis dependentes que possuam mais de duas categorias de resposta. Como variável dependente, consideramos a expressão das moléculas HLA-G por meio do escore de marcação proposto anteriormente, e como variáveis independentes, consideramos o HIV nos dois grupos estudados e a ocorrência de abortamento em gestações anteriores. Para realização dessa análise foi estimado o *Odds Ratio* (OR) bruto e ajustado com intervalo de confiança de 95% (IC 95%). Esse procedimento foi realizado por meio do software SAS® 9, utilizando a PROC CATMOD.

A medida de associação foi interpretada da seguinte forma: se o valor estimado do OR for maior que 1, a chance da A ocorrer é “X” vezes a chance de B (fator de risco); se o valor estimado de OR for menor que 1, significa que a chance de B ocorrer é maior que a chance de A (fator de proteção). Mas, se o intervalo de confiança contiver o número 1, significa que não existem evidências de que essa variável influenciou a variável dependente.

O nível de significância adotado foi de 5% para todos os testes utilizados ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da Amostra

5.1.1 Mulheres Infectadas pelo HIV-1 (PHIV+)

Foram analisados fragmentos de tecido placentário de 100 mulheres PHIV+, que realizaram seu parto no Hospital das Clínicas da FMRP-USP durante o período de dezembro de 2008 a junho de 2012. A idade variou entre 18 e 41 anos ($\bar{X} = 28$; $dp = 6,53$) sendo sua distribuição representada no Gráfico 1.

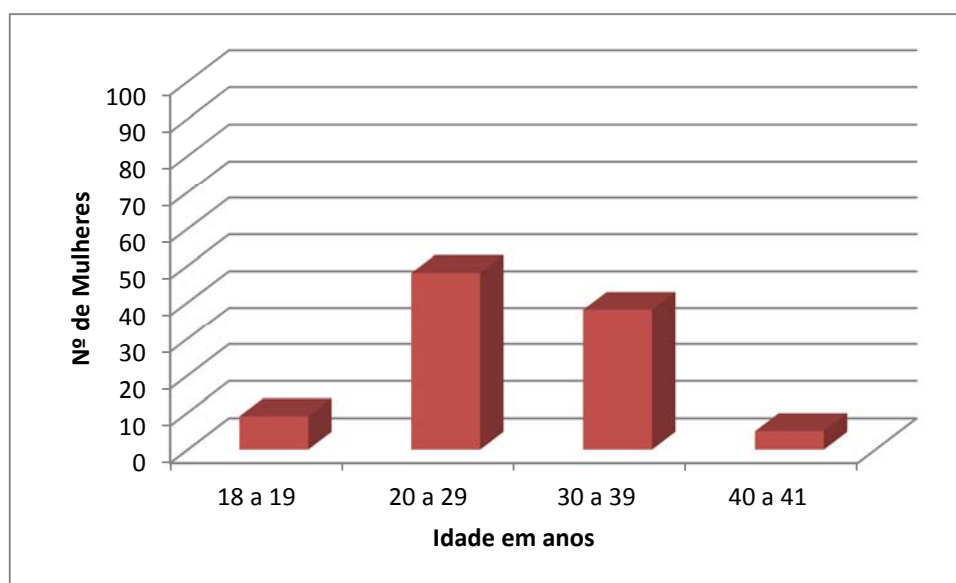


Gráfico 1 - Distribuição das mulheres PHIV+ por idade (anos). Ribeirão Preto-SP-Brasil, 2013. Fonte: Sistema HC.

Ao analisar os dados sócio-demográficos da população infectada pelo HIV-1, identifica-se predomínio de mulheres solteiras (57%), cor de pele branca (71%), com escolaridade de nível fundamental (61%) e não exercendo atividade remunerada (68%), conforme Tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição das mulheres PHIV+ por variáveis sócio-demográficas. Ribeirão Preto-SP-Brasil, 2013. Fonte: Sistema HC.

| Variáveis | % |
|-----------------------------|----------|
| Estado Civil | |
| Solteira | 57 |
| Casada | 15 |
| Amasiada | 20 |
| Separada | 3 |
| Divorciada | 4 |
| Viúva | 1 |
| Cor de pele | |
| Branca | 71 |
| Mulata | 19 |
| Negra | 10 |
| Escolaridade | |
| Ensino Fundamental | 61 |
| Ensino Médio | 31 |
| Ensino Superior | 6 |
| Desconhecido | 2 |
| Atividade Remunerada | |
| Sim | 32 |
| Não | 68 |

Em relação ao uso de antirretrovirais, 25% das pacientes não apresentavam informações quanto ao uso de TARV durante o período gestacional no sistema HC. Dentre as gestantes que utilizaram TARV, 63/75 (84%) tiveram como terapia utilizada, a combinação de INTRs e IP, conforme Gráfico 2.

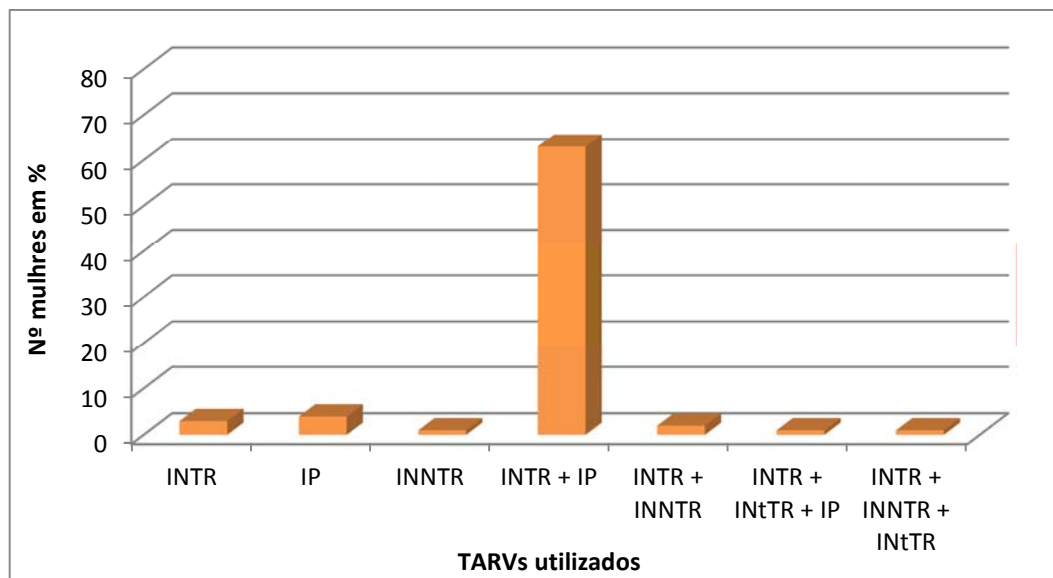


Gráfico 2 - Distribuição das mulheres PHIV+ por terapia antirretroviral (TARV) utilizada. Ribeirão Preto-SP-Brasil, 2013. Fonte: Sistema HC.

Legenda:

TARV: Terapia Antirretroviral

IP: Inibidores de Protease

INTR: Inibidores Nucleosídeos de Transcriptase Reversa

INNTR: Inibidores Não Nucleosídeos de Transcriptase Reversa

INtTR: Inibidor Nucleotídeo de Transcriptase Reversa

No momento do parto, a carga viral (CV) de todas (100/100) as mulheres desse estudo era indetectável ou estava entre 50 a 65 cópias. Durante a gestação, 98% das pacientes apresentaram a informação sobre a CV, sendo que 40% dessas pacientes apresentaram CV < 50 cópias/mL, considerada indetectável. Segue o gráfico da CV das pacientes (Gráfico 3).

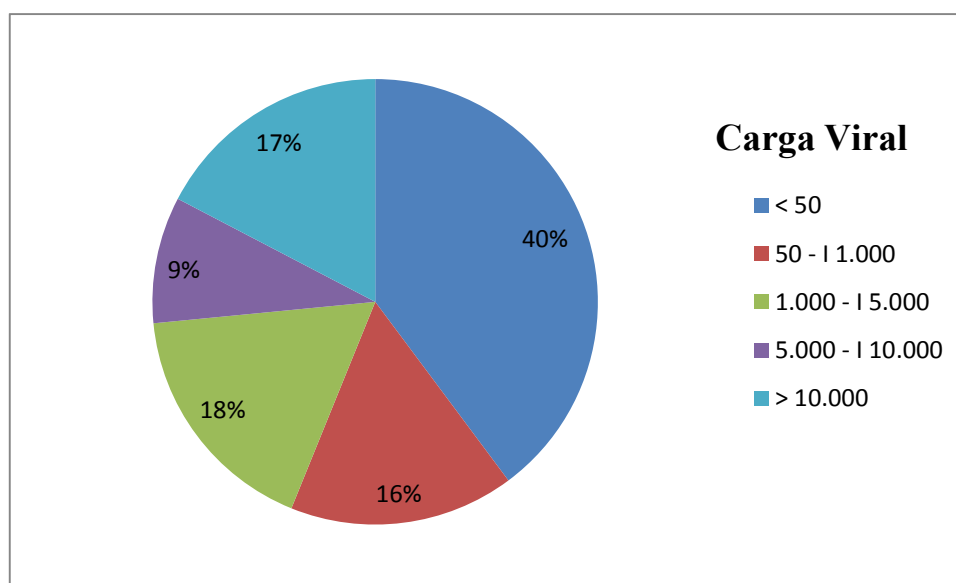


Gráfico 3 - Distribuição das mulheres PHIV+ por carga viral em cópias/mL durante o período gestacional. Ribeirão Preto-SP-Brasil, 2013. Fonte: Sistema HC.

Importante marcador imunológico da infecção pelo HIV-1, a contagem de células CD4⁺ foi investigada nas participantes dessa pesquisa. Contudo, não foi possível identificar no prontuário eletrônico a contagem de células CD4⁺ no 3º trimestre gestacional de 38 mulheres. Para as demais mulheres, a contagem de células CD4⁺ predominou entre 200-499 células mm³, conforme Gráfico 4.

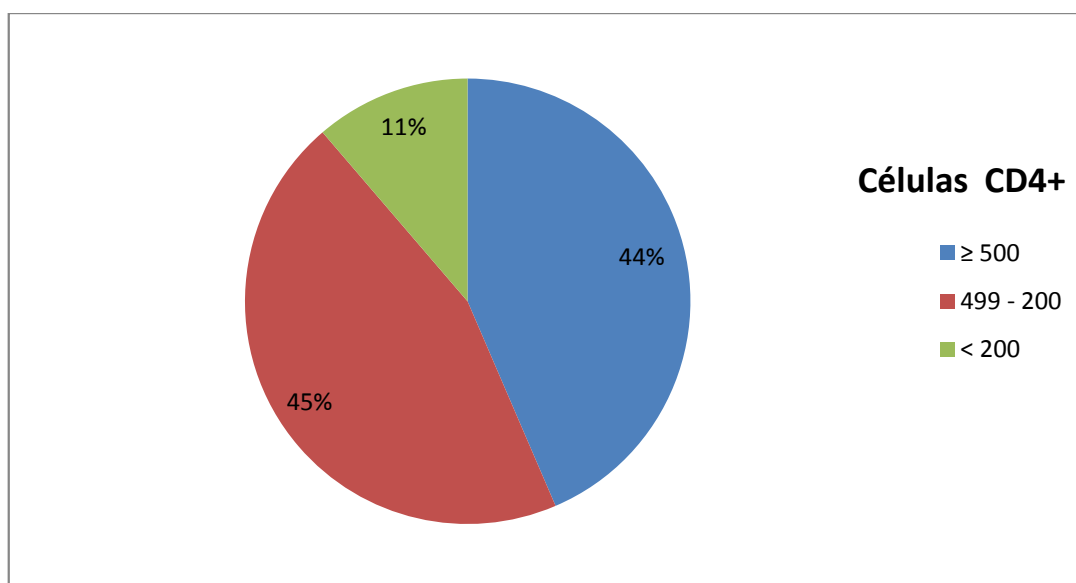


Gráfico 4 - Distribuição das mulheres PHIV+ por contagem de células CD4⁺ por mm³ durante o período gestacional. Ribeirão Preto-SP-Brasil, 2013. Fonte: Sistema HC.

Quanto aos antecedentes obstétricos, as mulheres PHIV+ tiveram de 1 a 10 filhos ($\bar{X} = 3$ filhos) e 14% delas sofreram algum aborto. Na Tabela 2 é possível observar que na gestação atual, 88% das gestantes fizeram pré-natal, 53% foram submetidas ao parto cesáreo e 12% apresentaram hipertensão arterial sistêmica gestacional, neoplasia intraepitelial cervical, diabetes mellitus gestacional, papiloma vírus humano, pré-eclâmpsia, hepatite B ou descolamento prematuro de placenta.

Tabela 2 - Distribuição das mulheres PHIV+ em relação aos antecedentes e histórico obstétrico. Ribeirão Preto-SP-Brasil, 2013. Fonte: Sistema HC.

| Variáveis | % |
|--------------------------------|----------|
| Realização de Pré-natal | |
| Sim | 88 |
| Não | 12 |
| Tipo de parto | |
| Natural | 47 |
| Cesárea | 53 |
| Patologias associadas | |
| Sim | 12 |
| Não | 88 |

5.1.2 Mulheres Não-Infetadas pelo HIV-1 (PHIV-)

Também foram coletados fragmentos de tecido placentário de 100 mulheres não infectadas pelo HIV-1 no período de novembro de 2011 a outubro de 2012 no Centro de Referência em Saúde da Mulher – Mater. Suas idades variaram entre 18 e 38 anos ($\bar{X} = 24$; $dp = 5,54$). O gráfico 5 ilustra essa distribuição.

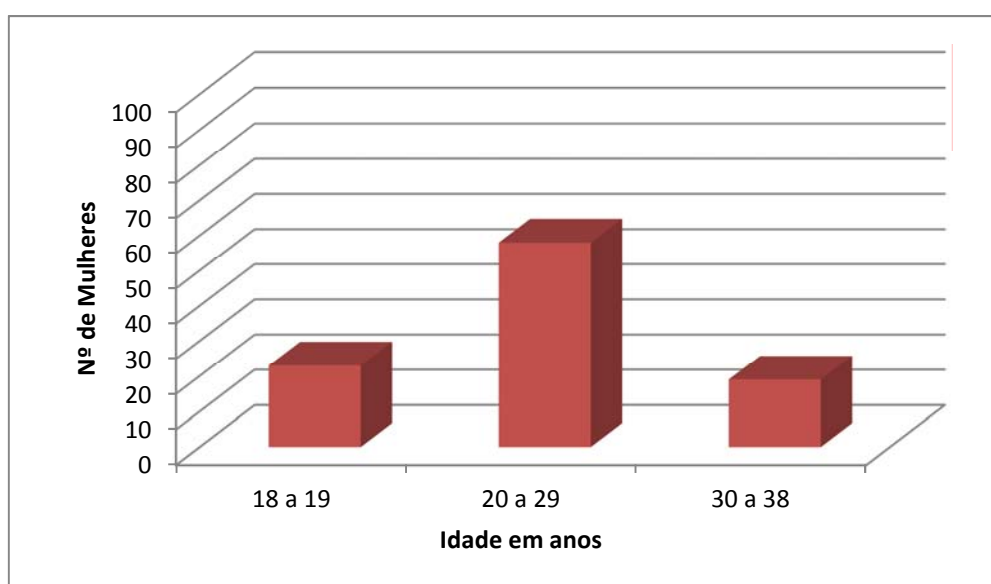


Gráfico 5- Distribuição das mulheres PHIV- por idade (anos). Ribeirão Preto-SP-Brasil, 2013. Fonte: Questionário PHIV-.

Os dados sócio-demográficos da população PHIV- mostram predomínio de mulheres amasiadas (59%), de cor branca (53%), com ensino médio (63%) e não exercendo atividade remunerada (69%), conforme tabela 3.

Tabela 3- Distribuição das mulheres PHIV- por variáveis sócio-demográficas. Ribeirão Preto-SP-Brasil, 2013. Fonte: Questionário PHIV-.

| Variáveis | % |
|-----------------------------|----------|
| Estado Civil | |
| Solteira | 14 |
| Casada | 24 |
| Amasiada | 59 |
| Separada | 0 |
| Divorciada | 3 |
| Viúva | 0 |
| Cor de pele | |
| Branca | 53 |
| Negra | 47 |
| Escolaridade | |
| Ensino Fundamental | 37 |
| Ensino Médio | 63 |
| Ensino Superior | 0 |
| Atividade Remunerada | |
| Sim | 31 |
| Não | 69 |

Quanto aos antecedentes obstétricos, as mulheres HIV- tiveram entre 1 e 7 filhos ($\bar{X}=2$ filhos), sendo que 14% delas sofreram aborto. Na atual gestação, 100% das pacientes alegaram ter realizado pré-natal, 74% realizaram parto natural e 77% não apresentaram nenhum processo patológico durante a gestação. A patologia relatada por essas gestantes foi infecção do trato urinário (ITU) (23%).

Tabela 4- Distribuição das mulheres PHIV- em relação aos antecedentes e histórico obstétrico. Ribeirão Preto-SP-Brasil, 2013. Fonte: Questionário PHIV-.

| Variáveis | % |
|------------------------------|-----|
| Pré-natal | |
| Sim | 100 |
| Não | 0 |
| Tipo de parto | |
| Natural | 74 |
| Cesárea | 26 |
| Patologias associadas | |
| Sim | 23 |
| Não | 77 |

5.2 Comparação entre os grupos PHIV+ e PHIV-

Na comparação das variáveis sociodemográficas e obstétricas entre os grupos de mulheres infectadas pelo HIV-1 e não infectadas pelo HIV-1, foram observadas as seguintes associações estatísticas (Tabela 5).

Tabela 5 - Distribuição das variáveis sociodemográficas e obstétricas entre os grupos PHIV+ e PHIV-. Ribeirão Preto-SP-Brasil, 2013. Fonte: pesquisa de campo.

| Variáveis sociodemográficas | | Variáveis obstétricas | |
|-----------------------------|----------|--------------------------------|----------|
| PHIV+ vs PHIV- | | PHIV+ vs PHIV- | |
| | p-valor* | | p-valor* |
| Situação conjugal | | Realização de pré-natal | |
| Não vive em união vs | <0,0001 | Sim vs Não | <0,0002 |
| Vive em união | | | |
| Cor de pele | | Tipo de parto | |
| 3Branca vs | 0,0130 | Natural VS | 0,0002 |
| Mulata/Negra | | Cesárea | |
| Escolaridade | | Patologias associadas | |
| Até 9 anos vs | 0,0006 | Sim vs Não | 0,0419 |
| Mais que 9 anos | | | |
| Atividade remunerada | | | |
| Sim vs Não | 0,8796 | | |

*Teste Exato de Fisher com nível de significância $\alpha= 0,05$

Diante dessas variáveis sociodemográficas, o resultado estatístico demonstra que no grupo PHIV+ houve frequência significativamente maior de mulheres que não vivem em união conjugal ($p < 0,0001$), declaram sua cor de pele branca ($p = 0,0130$) e estudaram até 9 anos (0.0006). A realização de atividade remunerada não mostrou diferença estatística significativa, indicando que a frequência é semelhante entre os grupos. Em relação às variáveis obstétricas, o resultado estatístico demonstrou que no grupo PHIV+ houve ocorrência significativamente menor de processos patológicos durante o período gestacional ($p < 0,0419$), maior frequência de mulheres que não realizaram o pré-natal ($p = 0,0002$) e que realizaram parto cesáreo ($p = 0,0002$).

5.3 Análise Histológica do Nível de Expressão das Moléculas HLA-G

As amostras de tecido placentário dos dois grupos (100 PHIV+ e 100 PHIV-) foram submetidas à reação de imunistoquímica para detecção do nível de expressão das moléculas HLA-G. Nos dois grupos de mulheres, os fragmentos teciduais correspondiam à placenta de terceiro trimestre gestacional.

A reação de imunistoquímica com marcação positiva para as moléculas HLA-G na região do TEV ocorreu em 100% das amostras. Entretanto, em 17/200 (8,5%) das amostras não havia quantidade suficiente de TEV para que a análise pudesse ser feita pelo patologista.

Quando contabilizamos essa perda por grupo estudado, temos que 10/100 (10%) são referentes ao PHIV- e 7/100 (7%) ao PHIV+. Pelos motivos expostos, esses indivíduos foram retirados do estudo nessa fase da análise, que contará então com 90 amostras placentárias submetidas à imunistoquímica no grupo PHIV- e 93 amostras no PHIV+, totalizando 183 amostras.

O escore utilizado para leitura das biópsias submetidas à imunistoquímica, conforme descrito na metodologia do presente trabalho, possibilitou uma análise quantitativa do nível de expressão da molécula HLA-G na região do TEV. O quadro 3 ilustra o escore utilizado.

| Nível de expressão da molécula HLA-G | |
|---|------------|
| Negativa | $\leq 5\%$ |
| 1+ | 6-25% |
| 2+ | 26-50% |
| 3+ | 50-75% |
| 4+ | $> 75\%$ |

Quadro 3: Escore utilizado para a classificação quantitativa do nível de expressão das moléculas HLA-G. Adaptado de Li et al., 2012.

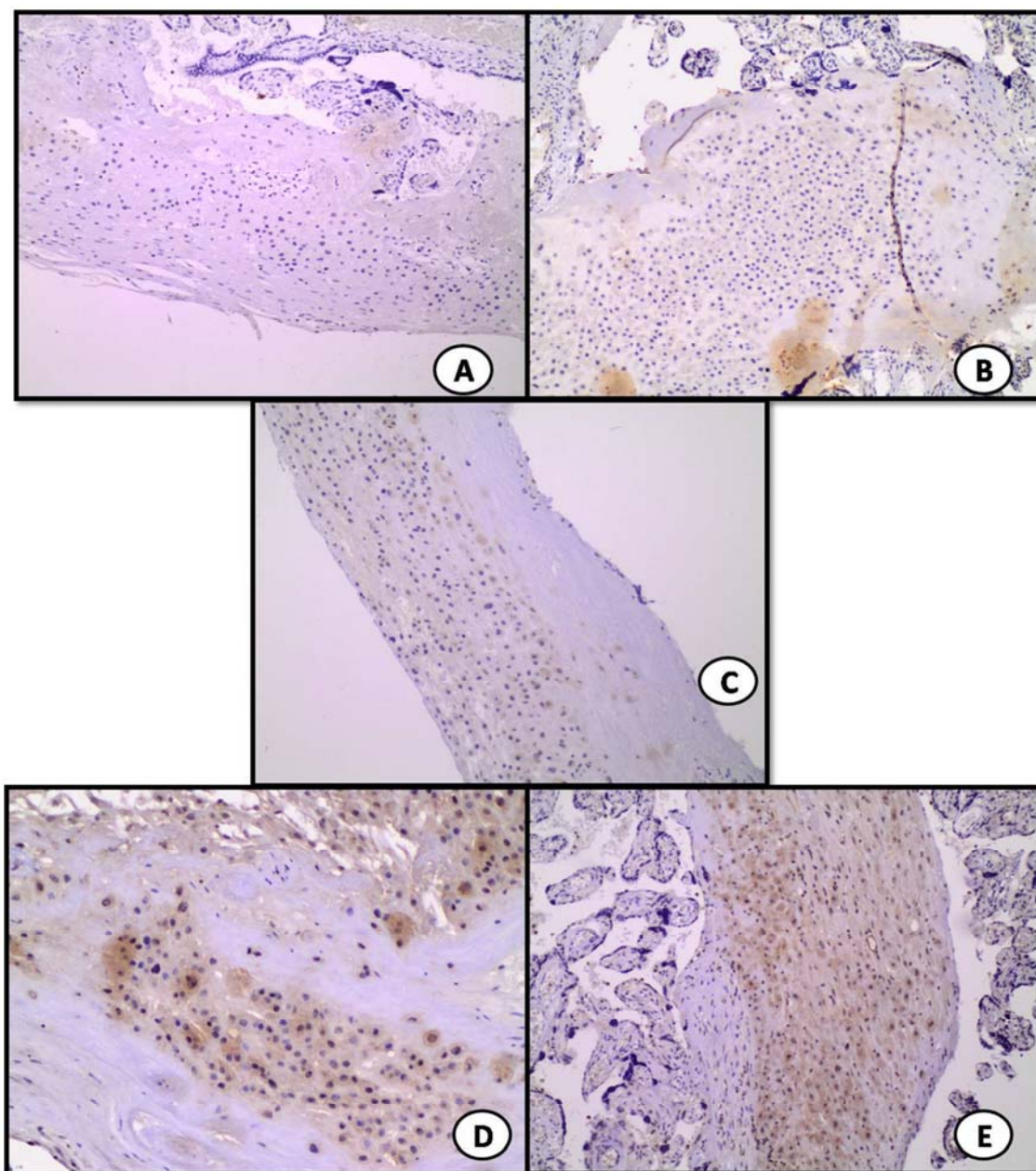


Figura 6- Expressão das moléculas HLA-G em tecido placentário no grupo PHIV+. A reação de imunistoquímica foi realizada com o anticorpo monoclonal anti-HLA-G clone 5A6G7 (obtidas com o microscópio Olympus BX51 acoplado a câmera Olympus SC30 - programa AnalySIS-get_IT). De acordo com o escore utilizado, podemos observar: (A) Expressão $\leq 5\%$; (B) Expressão 6-25% ; (C) Expressão 26-50% ; (D) Expressão 51-75% ; (E) Expressão $> 75\%$.

A análise das reações de imunistoquímica nesse estudo reforça a tese de que a expressão do HLA-G em tecido placentário humano ocorre principalmente na região do TEV, mas não em vilosidades. Considerando esse aspecto, a classificação quantitativa da expressão da molécula baseou-se na porcentagem das células do TEV que estavam marcadas nas biópsias. Essa porcentagem foi calculada de forma subjetiva pelo patologista (Figuras 6 e 7).

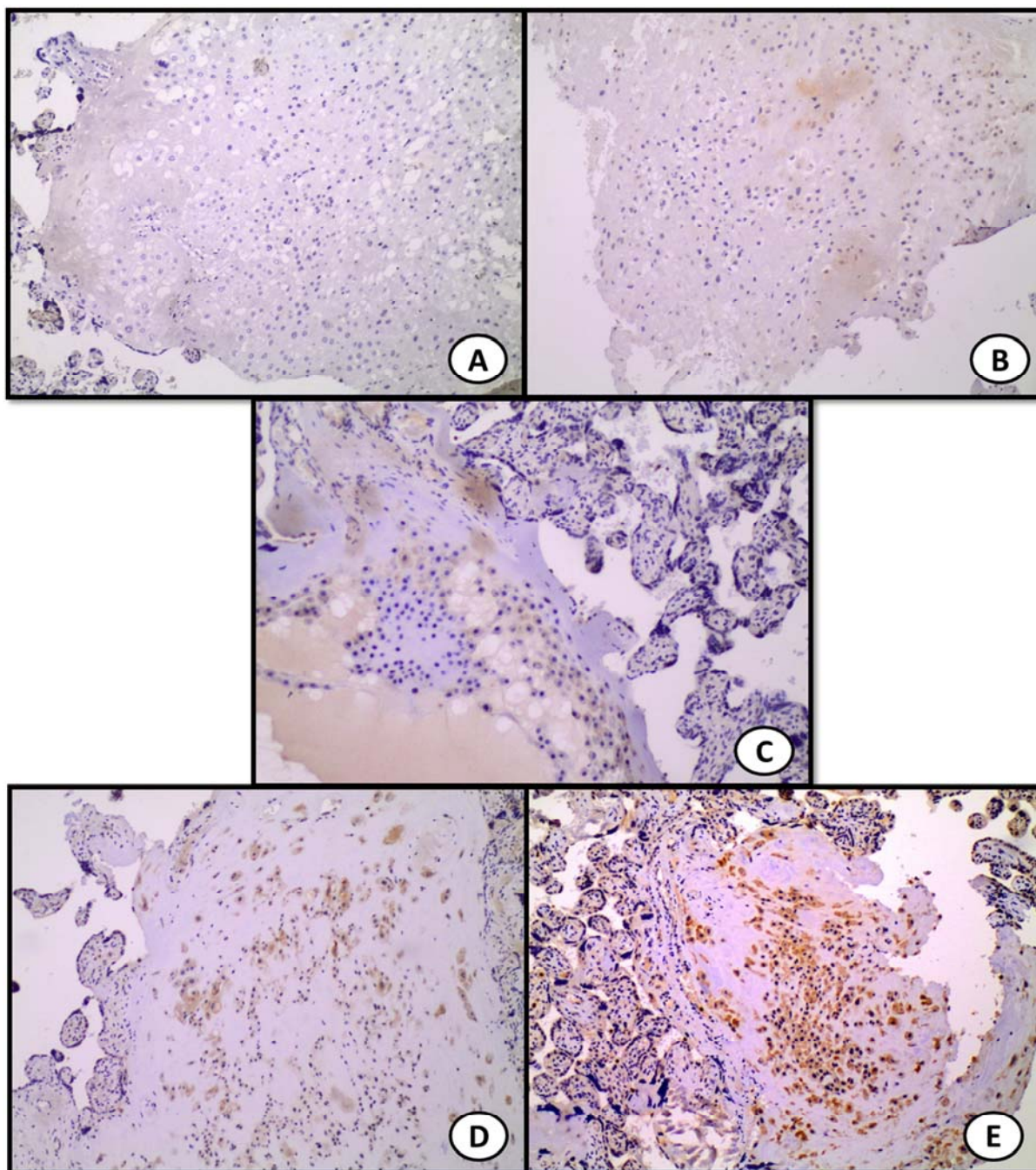


Figura 7- Expressão das moléculas HLA-G em tecido placentário no grupo PHIV-. A reação de imunohistoquímica foi realizada com o anticorpo monoclonal anti-HLA-G clone 5A6G7 (obtidas com o microscópio Olympus BX51 acoplado a câmera Olympus SC30 - programa AnalySIS-get_IT). De acordo com o escore utilizado, podemos observar: (A) Expressão $\leq 5\%$; (B) Expressão 6-25% ; (C) Expressão 26-50% ; (D) Expressão 51-75% ; (E) Expressão $> 75\%$.

Ao analisarmos os níveis de expressão das moléculas HLA-G no grupo PHIV+, verificamos uma frequência elevada da expressão negativa ($n= 28$; 30,11%), seguida das expressões $>75\%$ ($n= 23$; 24,73%), 6 a 25% ($n= 18$; 19,36%), 51-75% ($n= 14$; 15,05%) e, por fim, 26-50% ($n= 10$; 10,75%). O gráfico 6 evidencia nitidamente esse fenômeno.

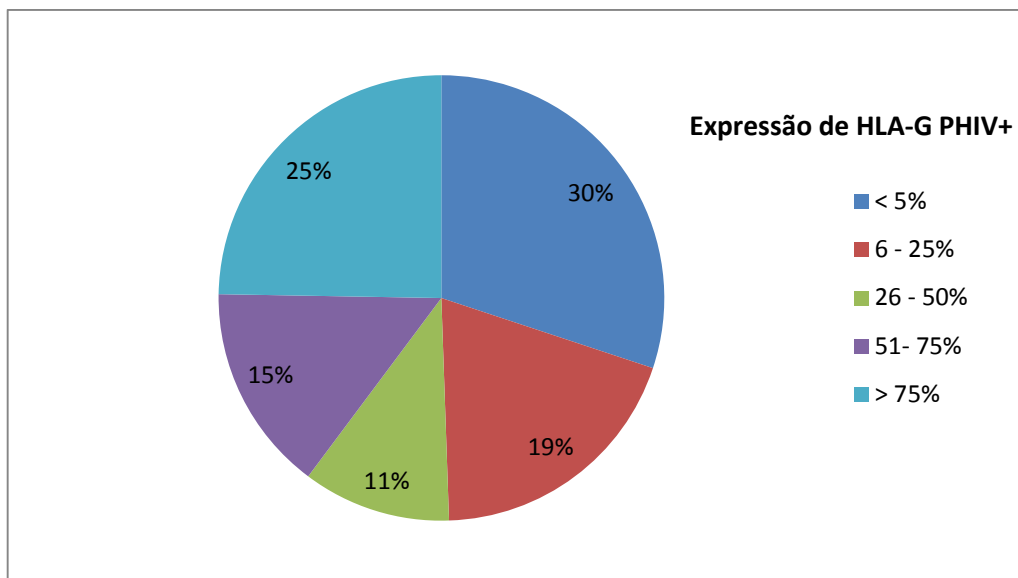


Gráfico 6 - Distribuição das mulheres PHIV+ de acordo com o nível de expressão das moléculas HLA-G. Ribeirão Preto - SP – Brasil, 2013. Fonte: Pesquisa de Campo.

De acordo com o nível de expressão das moléculas HLA-G no grupo PHIV-, a maioria das mulheres (n = 30; 33,33%) apresentaram níveis de expressão acima de 75%, seguida pela expressão 51 a 75% (n= 26; 28,89%), 26 a 50% (n = 18; 20%) e 6 a 25% (n = 10; 11,11%). A expressão negativa para a molécula HLA-G estava presente em apenas 6 mulheres (6,67%). O gráfico 7 ilustra os diferentes níveis de expressão das moléculas HLA-G nesse grupo.

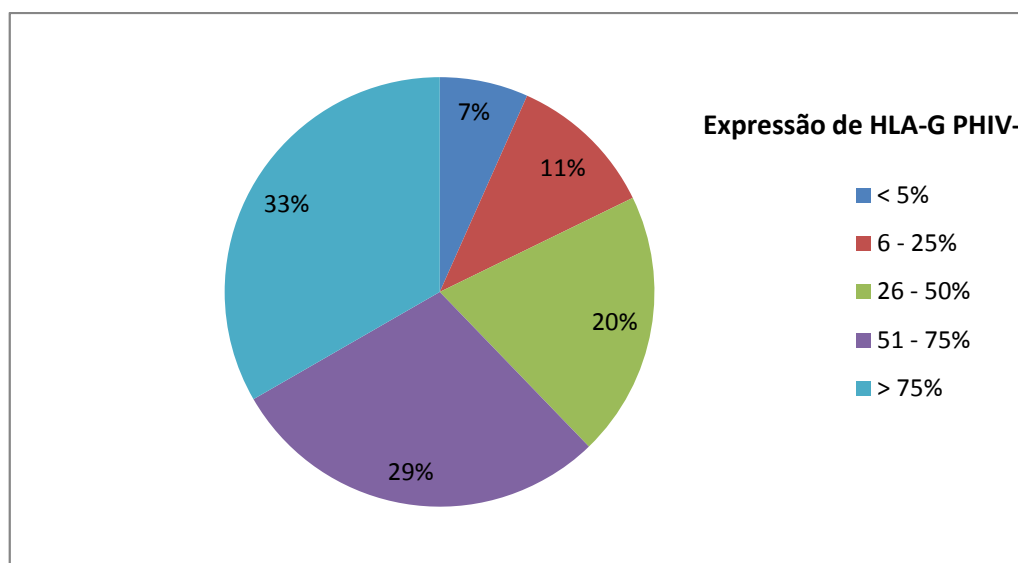


Gráfico 7 - Distribuição das mulheres PHIV- de acordo com o nível de expressão das moléculas HLA-G. Ribeirão Preto - SP – Brasil, 2013. Fonte: Pesquisa de Campo.

É interessante verificar a diferença nos níveis de expressão das moléculas HLA-G entre os grupos PHIV+ e PHIV- nas categorias avaliadas. No grupo PHIV+, temos uma concentração de 49% de amostras que apresentam marcação $\leq 25\%$, enquanto no grupo PHIV-, apenas 18% das amostras apresentam marcação $\leq 25\%$. O gráfico 8 ilustra essa diferença nos níveis de marcação de HLA-G.

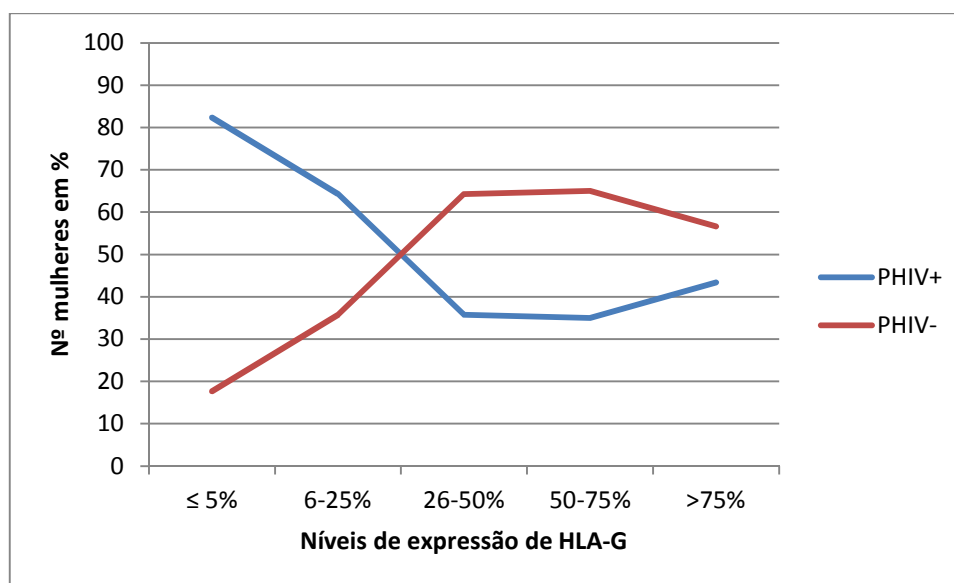


Gráfico 8 – Diferença nos níveis de expressão das moléculas HLA-G entre os grupos PHIV+ e PHIV-. Ribeirão Preto - SP – Brasil, 2013. Fonte: Pesquisa de Campo.

Ao comparar os grupos de mulheres portadoras ou não da infecção pelo HIV-1, podemos observar uma diferença significativa entre os níveis de expressão das moléculas HLA-G e a variável HIV. Buscando identificar associações entre essas variáveis, foi realizada uma análise descritiva associando os grupos PHIV+ e PHIV-, utilizando o teste estatístico Qui-Quadrado.

Os níveis de expressão das moléculas HLA-G foram categorizados em cinco diferentes escores, entretanto, o número reduzido de pacientes distribuídos em cada categoria prejudicou a análise estatística. Por esse motivo, optou-se por um novo agrupamento dos escores que não interferisse no resultado final. De todos os modelos testados optou-se por trabalhar com o agrupamento dos escores da seguinte forma: 0 (marcação negativa), 1, 2 e 3 (categoria que englobou as marcações de 6 a 75%) e 4 (categoria que contemplou a marcação maior que 75%).

A análise estatística evidenciou o que já havia sido observado nas apresentações gráficas, indicando que existe associação entre a marcação das moléculas HLA-G e a variável HIV ($p < 0,01$), ou seja, existe uma relação de dependência entre essas variáveis (Tabela 6).

Para analisar com mais propriedade essa associação, foram estimados o *odds ratio* bruto e ajustado e seus respectivos intervalos de confiança (IC) de 95% por meio do modelo logístico multinomial simples e múltiplo. Os resultados obtidos demonstraram que as mulheres que não apresentaram a infecção pelo HIV-1 (grupo PHIV-) possuíam 2,47 vezes a chance de apresentar níveis de expressão > 75% das moléculas de HLA-G em relação a níveis de expressão <5% (OR= 2,47; IC: 1,47-4,14). Ao analisarmos as chances desse mesmo grupo apresentar níveis de expressão de 6% a 75% das moléculas HLA-G em relação a níveis de expressão <5%, não observamos qualquer diferença significativa em relação ao observado na análise anterior (OR= 2,45; IC: 1,51-3,98). O cálculo do *odds ratio* ajustado não apresentou diferença significativa em relação ao *odds ratio* bruto, demonstrando que não existe uma força de associação entre essas variáveis (Tabela 7).

Tabela 6- Distribuição do nível de expressão das moléculas HLA-G de acordo com as variáveis aborto, carga viral (cópias/mL), CD4+ (células/mm³) e terapia antirretroviral (TARV) utilizada. Ribeirão Preto-SP. 2013. Fonte: Pesquisa de Campo.

| | Marcação HLA-G | | | Valor p* |
|---------------------------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|
| | 0 | 1,2,3 | 4 | |
| | (≤ 5%) N (%) | (6-75%) N (%) | (>75%) N (%) | |
| <i>HIV</i> | | | | |
| Não | 6 (17,65) | 54 (56,25) | 30 (56,60) | |
| Sim | 28 (82,35) | 42 (43,75) | 23 (43,40) | <0,01 |
| <i>Aborto</i> | | | | |
| Não | 31 (91,80) | 78 (81,25) | 41 (77,36) | |
| Sim | 3 (8,82) | 18 (18,75) | 12 (22,64) | 0,25 |
| <i>Carga Viral</i> | | | | |
| < 10.000 cópias/mL | 24 (85,71) | 35 (85,37) | 18 (81,82) | |
| ≥ 10.000 cópias/mL | 4 (14,29) | 6 (14,63) | 4 (18,18) | 0,92 |
| <i>CD4+</i> | | | | |
| ≥ 500 células/mm ³ | 6 (75,00) | 11 (37,93) | 8 (42,11) | |
| 200-499 células/mm ³ | 2 (25,00) | 13 (44,83) | 9 (47,37) | |
| < 200 células/mm ³ | 0 (0,00) | 5 (17,24) | 2 (10,53) | 0,37 |
| <i>TARV</i> | | | | |
| Sem IP | 2 (9,09) | 3 (37,93) | 2 (10,53) | |
| Com IP | 20 (90,91) | 26 (89,66) | 17 (89,47) | 0,99 |

TARV= Terapia Antirretroviral

IP=Inibidores de Protease

*Teste Qui-Quadrado

A análise dos resultados evidencia que a presença da infecção pelo HIV-1 interfere negativamente nos níveis de expressão das moléculas HLA-G. Para compreender esse fenômeno analisamos a associação dos níveis de expressão das moléculas HLA-G com as variáveis relacionadas à infecção pelo HIV-1, quantificação da carga viral, contagem de células CD4+ e com o uso de TARV no grupo PHIV+, utilizando o mesmo agrupamento dos padrões de expressão e análise descritiva mencionada na variável HIV-1 (Tabela 6).

Ao analisarmos os níveis de expressão das moléculas HLA-G e os valores de carga viral ($p=0,92$), contagem de células CD4+ ($p=0,37$) e TARV ($p=0,99$), observamos que não houve associação significativa. Nessa ocasião, a TARV analisada foi classificada de acordo com o uso ou não dos IPs.

Considerando os achados na literatura acerca da relação entre os níveis de expressão de HLA-G com a ocorrência de abortamento, foi realizada a análise da associação entre a variável aborto em gestações anteriores (independente de pertencer ao grupo PHIV- e PHIV+) e os níveis de expressão das moléculas HLA-G. Utilizamos os mesmos critérios destinados à análise descritiva das variáveis carga viral, contagem de células CD4+ e TARV utilizada, e, assim como nessas variáveis, não houve associação significativa ($p = 0,25$) (Tabela 6).

Tabela 7- Distribuição da expressão das moléculas HLA-G de acordo com as variáveis presença ou não da infecção pelo HIV-1 e aborto. Ribeirão Preto-SP. 2013. Fonte: Pesquisa de Campo.

| Variável | Odds Ratio Bruto | | | Odds Ratio Ajustado | | | | | |
|--------------------------------------|------------------|----------------------------|------|---------------------|------------|----------------------------|------|----------|--|
| | Odds Ratio | Intervalo de Confiança 95% | | Valor p* | Odds Ratio | Intervalo de Confiança 95% | | Valor p* | |
| <i>HIV - Marcação 4 vs 0</i> | | | | | | | | | |
| Não | 2,47 | 1,47 | 4,14 | < 0,01 | 2,58 | 1,53 | 4,35 | < 0,01 | |
| Sim | | | | Ref | | | | | |
| <i>Aborto - Marcação 4 vs 0</i> | | | | | | | | | |
| Não | | | | Ref | | | | | |
| Sim | 1,74 | 0,89 | 3,41 | 0,11 | 1,93 | 0,97 | 3,86 | 0,06 | |
| <i>HIV - Marcação (1,2,3) vs 0</i> | | | | | | | | | |
| Não | 2,45 | 1,51 | 3,98 | < 0,01 | 2,53 | 1,55 | 4,12 | < 0,01 | |
| Sim | | | | Ref | | | | | |
| <i>Aborto- Marcação (1,2,3) vs 0</i> | | | | | | | | | |
| Não | | | | Ref | | | | | |
| Sim | 1,54 | 0,81 | 2,94 | 0,19 | 1,71 | 0,88 | 3,32 | 0,11 | |

*Modelo logístico multinomial simples e múltiplo

Assim como realizado com a variável HIV, foi utilizado o modelo logístico multinomial e estimado o *odds ratio*. Nesse caso, verificamos que não existe associação entre as variáveis estudadas, pois os valores obtidos tanto na comparação dos níveis de expressão das moléculas HLA-G > 75% em relação a < 5% (OR= 1,74; IC0,89-3,41), quanto na comparação dos níveis de expressão de 6% a 75% em relação a < 5% (OR=1,54; IC: 0,81-2,94), a ocorrência de abortamentos prévios independente da infecção pelo HIV-1 (grupos PHIV+ e PHIV-) (Tabela 7). Pelo fato do valor 1 estar contido no intervalo de confiança, podemos concluir que não há evidências de que a variável abortos prévios influencie a marcação das moléculas HLA-G.

Assim como já havia sido demonstrado na análise com o teste Qui-Quadrado, a variável aborto (tanto sua ocorrência quanto sua não ocorrência) não possui associação com a variável marcação das moléculas HLA-G, caracterizando-se como uma variável independente.

O gráfico 9 ajuda-nos a visualizar o *odds ratio* das associações mencionadas anteriormente.

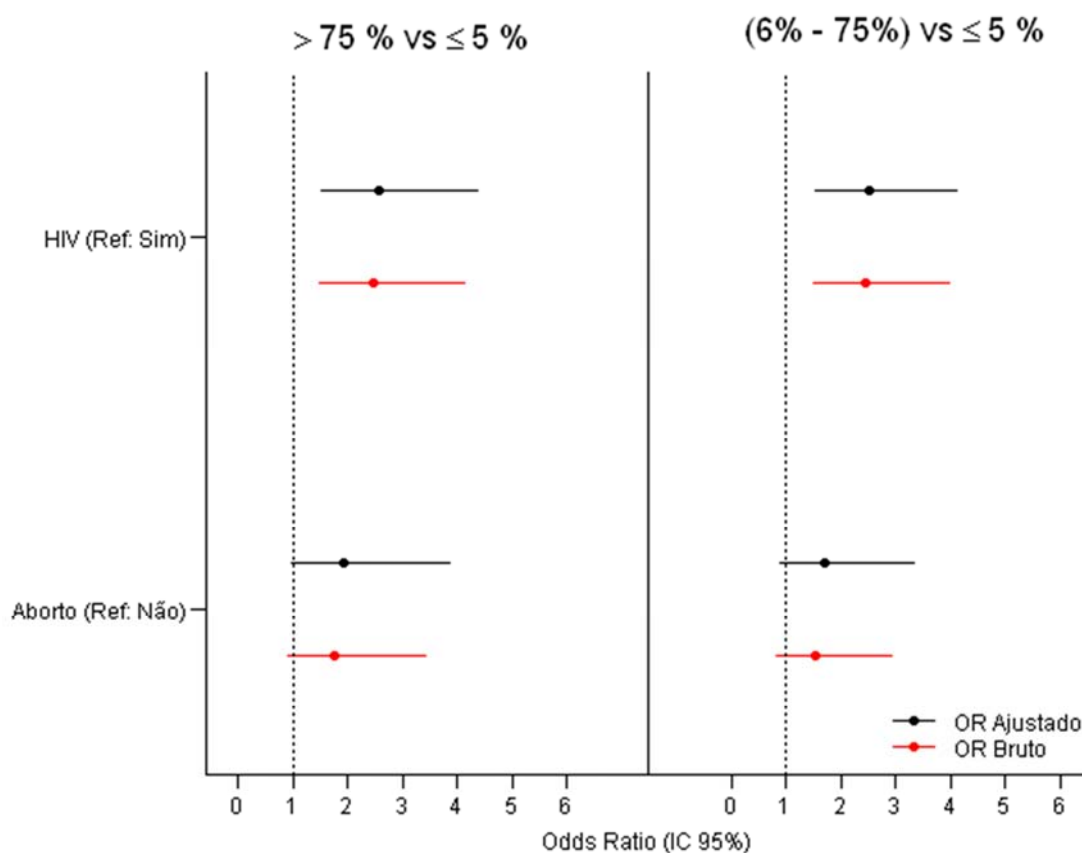


Gráfico 9 - Representação do intervalo de confiança e do valor do Odds Ratio referente à associação entre a expressão de HLA-G e as variáveis HIV-1 e aborto. Ribeirão Preto- SP - Brasil, 2013. Fonte: Pesquisa de Campo.

Explorando um pouco mais os resultados, de acordo com os dados obtidos e sua importância clínica, foi realizada nova análise estatística com diferente agrupamento dos níveis de expressão das moléculas HLA-G e as variáveis de interesse no grupo PHIV+ (carga viral, contagem de células CD4+ e TARV). Como observamos uma frequência maior nos níveis de expressão de HLA-G $\leq 25\%$, optamos por realizar um corte confrontando esse nível de expressão com os $> 25\%$ (Tabela 8). Consideramos também importante realizar outro corte comparando os extremos dos níveis de expressão ($\leq 25\%$ vs $> 75\%$) e sua associação com as mesmas variáveis analisadas no corte anterior (carga viral, contagem de células CD4+ e TARV) (Tabela 9).

Tabela 8 - Distribuição das biópsias de acordo com a associação entre a marcação das moléculas HLA-G $\leq 25\%$ e $> 25\%$ no grupo PHIV+ e as variáveis carga viral (cópias/mL), CD4+ (células/mm³) e terapia antirretroviral (TARV) utilizada. Ribeirão Preto – SP – Brasil, 2013. Fonte Pesquisa de Campo.

| Variáveis | Marcação HLA-G | | Valor p | Odds ratio | Intervalo de confiança (IC) 95% | |
|-------------------------------|----------------|----------|---------|------------|---------------------------------|--------|
| | $\leq 25\%$ | $> 25\%$ | | | | |
| <i>Carga Viral</i> | | | | | | |
| > 50 cópias/mL | 26 | 31 | 0,3905 | 1,59 | 0,6804 | 3,7140 |
| < 50 cópias/mL | 20 | 15 | | | | |
| <i>Carga Viral</i> | | | | | | |
| > 10.000 cópias/mL | 6 | 8 | 0,5737 | 0,6938 | 0,2199 | 2,1889 |
| ≤ 10.000 cópias/mL | 40 | 37 | | | | |
| <i>CD4</i> | | | | | | |
| < 200 células/mm ³ | 0 | 7 | 0,1709 | 0,1441 | 0,0077 | 2,2858 |
| > 200 células/mm ³ | 15 | 33 | | | | |
| <i>TARV</i> | | | | | | |
| Sem IP | 3 | 4 | 1 | 0,9375 | 0,1936 | 4,5391 |
| Com IP | 28 | 35 | | | | |
| <i>TARV</i> | | | | | | |
| Sem INTR | 1 | 4 | 0,3737 | 0,2917 | 0,0309 | 2,7532 |
| Com INTR | 30 | 35 | | | | |
| <i>TARV</i> | | | | | | |
| Sem INTR + IP | 4 | 8 | 0,5286 | 0,5741 | 0,1555 | 2,1200 |
| Com INTR + IP | 27 | 31 | | | | |

INTR=Inibidores Nucleosídeos de Transcriptase Reversa

IP=Inibidores de Protease

*Teste exato de Fisher

Os resultados dessa análise demonstraram que não houve associação dos níveis de expressão de HLA-G, com as demais variáveis, independentemente do corte realizado. Para analisarmos a associação da variável carga viral com a expressão de HLA-G, pensando nas

implicações biológicas, exploramos as amostras com agrupamentos de carga viral indetectável (< 50 cópias/mL) e de 10.000 cópias/mL, e não obtivemos nenhuma associação. Em relação à contagem de células CD4+, também pensando nas implicações biológicas, fizemos cortes em contagens de 200 células/mm³ e também não foi observada nenhuma associação.

Quando analisamos o uso da TARV com a expressão de HLA-G, realizamos um corte de acordo com as principais classes de drogas utilizadas, ou seja, presença ou ausência de INTR e IP, e não foi observada nenhuma associação.

Para possibilitar uma melhor interpretação dos resultados, foi estimado o valor do *odds ratio*. Em todas as associações realizadas, o valor estimado do *odds ratio* foi menor que 1, e o valor 1 estava contido em todos os intervalos de confiança. Nesse caso verificamos que não houve associação entre as variáveis estudadas (quantificação da carga viral, contagem de células CD4+ e TARV utilizada) e os níveis de expressão das moléculas HLA-G.

Tabela 9 - Distribuição das biópsias de acordo com a associação entre a marcação das moléculas HLA-G ≤ 25% e > 75% no grupo PHIV+ e as variáveis carga viral (cópias/mL), CD4+ (células/mm³) e terapia antirretroviral (TARV) utilizada. Ribeirão Preto – SP – Brasil, 2013. Fonte Pesquisa de Campo.

| Variáveis | Marcação HLA-G | | Valor p | Odds ratio | Intervalo de confiança (IC) 95% | |
|-------------------------------|----------------|-------|---------|------------|---------------------------------|---------|
| | ≤ 25% | > 25% | | | | |
| <i>Carga Viral</i> | | | | | | |
| > 50 cópias/mL | 26 | 17 | 0,1145 | 2,615 | 0,8237 | 8,3040 |
| < 50 cópias/mL | 20 | 5 | | | | |
| <i>Carga Viral</i> | | | | | | |
| >10.000 cópias/mL | 6 | 4 | 0,7165 | 0,675 | 0,1695 | 2,6886 |
| ≤ 10.000 cópias/mL | 40 | 18 | | | | |
| <i>CD4</i> | | | | | | |
| < 200 células/mm ³ | 0 | 2 | 0,492 | 0,2258 | 0,0100 | 5,0748 |
| > 200 células/mm ³ | 15 | 17 | | | | |
| <i>TARV</i> | | | | | | |
| Sem IP | 3 | 2 | 1 | 0,9107 | 0,1379 | 6,0106 |
| Com IP | 28 | 17 | | | | |
| <i>TARV</i> | | | | | | |
| Sem INTR | 1 | 1 | 1 | 0,6 | 0,0353 | 10,1951 |
| Com INTR | 30 | 18 | | | | |
| <i>TARV</i> | | | | | | |
| Sem INTR + IP | 4 | 3 | 1 | 0,7901 | 0,1564 | 3,9911 |
| Com INTR + IP | 27 | 16 | | | | |

INTR=Inibidores Nucleosídeos de Transcriptase Reversa

IP=Inibidores de Protease

*Teste exato de Fisher

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

De acordo com as características sócio-demográficas em nossa casuística, detectamos que em mulheres portadoras da infecção pelo HIV-1, a faixa etária predominante foi de 20 a 29 anos (48%), a cor de pele branca foi a mais frequente (71%) e a escolaridade predominante foi o ensino fundamental (61%). Observamos, também, a pauperização desse grupo de mulheres, pois nossa amostra apresentou grande número de mulheres com baixa escolaridade e sem vínculo empregatício – fatores associados à vulnerabilidade, e que podem interferir na aquisição da infecção pelo HIV-1 e na adesão ao tratamento, devido à dificuldade de interpretação das informações fornecidas pela equipe de saúde. Esses resultados estão de acordo com os estudos prévios realizados em diversas regiões de nosso país (BRASIL, 2010, 2012; SÃO PAULO, 2012; FELIX E CEOLIM, 2012).

A realização de sorologia para o HIV-1 foi incorporada ao acompanhamento pré-natal com o intuito de evitar a TMI, tornando possível o diagnóstico da infecção pelo HIV-1 durante a gestação e a implementação de medidas profiláticas contra a ocorrência da TMI do HIV-1 (BRASIL, 2010). Certamente as medidas profiláticas ensejaram uma diminuição importante dos casos de TMI pelo HIV-1 na última década. Entretanto, é inegável a importância da realização de pesquisas que possibilitem o melhor entendimento dos marcadores imunogenéticos, com o objetivo de favorecer o desenvolvimento de conhecimento específico e possibilitar a produção de mais estratégias preventivas.

Tem sido descrito que a expressão das moléculas HLA-G pode ser observada em condições fisiológicas e patológicas em diversas células e tecidos. Por desempenhar importante papel na indução de tolerância, a HLA-G tem sido estudada em diversas condições patológicas como tumores, doenças autoimunes, transplante de órgãos e em infecções virais, sendo essa última a condição de interesse no presente estudo (COROSELLA, 1999; REBMANN, 2007).

Para quantificar a expressão das moléculas HLA-G, elegemos a imunoistoquímica, por ser uma técnica que não permite somente a detecção de antígenos, como também a determinação de sua localização e as relações espaciais (HONIG et al., 2005).

Ao analisarmos nossos resultados, associando a expressão da molécula HLA-G e a presença da infecção pelo HIV-1, observamos que a presença do vírus está significativamente associada à menor expressão de HLA-G ($p < 0,01$). De forma semelhante, Derrien e colaboradores (2004) também mostraram a diminuição da isoforma HLA-G1 em portadores do HIV e sugeriram que essa redução possa ser um mecanismo de escape viral, que acarreta a

redução da apresentação de peptídeos virais para os linfócitos T CD8+. Por outro lado, Lozano e colaboradores (2002) mostraram aumento da expressão de HLA-G em monócitos circulantes de portadores do HIV, e sugeriram que esta expressão aumentada poderia estar associada à patogênese da infecção, favorecendo a infecção viral nessas células.

Poucos estudos sobre a expressão de HLA-G foram conduzidos na placenta. Apenas um estudo de Moodley e Bobat (2011) investigou os níveis de HLA-G1 (por meio de PCR em tempo real) em placentas de mulheres infectadas pelo HIV-1 e a ocorrência de TMI, sendo observado que os níveis de HLA-G1 estavam reduzidos em mulheres cujos filhos não foram infectados pelo HIV-1, quando comparado com placentas de mulheres cujos filhos foram infectados. Esses resultados podem ser comparados aos nossos, visto que nenhuma criança foi diagnosticada com a infecção pelo HIV-1 até o momento.

Com o objetivo de analisar o uso de TARV e o comportamento da molécula HLA-G, nossos resultados não mostraram nenhum tipo de associação. Por outro lado, Cabello e colaboradores (2003) realizaram estudo para avaliar a expressão de HLA-G em monócitos de sangue periférico em 12 indivíduos com infecção confirmada para o HIV-1, e foi observado que a expressão de HLA-G estava aumentada em monócitos circulantes de indivíduos que faziam uso de TARV em relação aos que não faziam uso de nenhuma terapia. Eles observaram também que a expressão diminuía em indivíduos que abandonavam o tratamento. Considerando esses resultados, Rivero e colaboradores (2007) avaliaram a participação dos IPs, contidos na TARV, e a expressão de HLA-G em monócitos de sangue periférico. Esse estudo demonstrou que os IPs utilizados na TARV não foram capazes de induzir o aumento da expressão de HLA-G1 em monócitos, apenas os INTRs. Nossos resultados não apresentaram diferenças na expressão das moléculas HLA-G, independentemente do tipo de classe de droga utilizada na TARV.

Ampliando o entendimento acerca da expressão de HLA-G e a TARV, Murdaca e colaboradores (2009, 2011) investigaram os níveis séricos do HLA-G solúvel em 91 pacientes infectados pelo HIV-1 durante a TARV, e observaram um aumento nos níveis séricos do HLA-G solúvel nos pacientes infectados pelo HIV-1 em todos os estágios da infecção. Antes do início do tratamento, contudo, foi observada uma diminuição gradativa dos níveis séricos após a introdução da TARV. Foi sugerido pelos autores que o aumento dos níveis das moléculas HLA-G solúveis contribuem para determinar um estado de imunossupressão, colaborando para a progressão para a aids. Portanto, a diminuição dos níveis séricos de HLA-G solúvel causado pela TARV, favorece a reconstituição da atividade citotóxica das células T CD8+ contra os patógenos.

Das mulheres que participaram do nosso estudo, 75% faziam uso de TARV e os 25% restantes não possuíam qualquer informação acerca dessa terapêutica em seus prontuários, impossibilitando-nos de categorizá-las. Dentre as que faziam uso de TARV, 84% se enquadravam no esquema de uso de INTR + IP, conforme as recomendações nacionais (BRASIL, 2010). Assim, as análises de associação entre as diferentes classes de drogas ficaram prejudicadas, podendo ser um fator limitante nesse estudo.

De acordo com a imunotolerância ao feto, a relação entre a reduzida expressão de HLA-G e a ocorrência de abortos recorrentes tem sido descrita (Havemann *et al.*, 2013). Entretanto, Bhalla e colaboradores (2006) demonstraram que a molécula HLA-G ligada à membrana celular estava expressa somente no TEV, mas a densidade de sua expressão não estava associada a abortos recorrentes. Nossos resultados se assemelham aos de Bhalla pois, ao analisarmos a ocorrência de abortamentos prévios com a expressão de HLA-G, não obtivemos uma associação entre os dois grupos estudados.

Poucos estudos têm avaliado a possível associação entre a TMI do HIV-1 e o polimorfismo do gene codificador da molécula HLA-G. Além disso, esses estudos, realizados com a população materno-infantil, demonstraram resultados contraditórios. Assim, (AIKHIONBARE *et al.* 2001, 2006) avaliando duplas de mães e filhos, sugerem que a discordância genotípica para o HLA-G pode estar associada ao risco reduzido para TMI do HIV-1. Um estudo realizado com a população brasileira, especificamente em filhos de mães portadoras da infecção pelo HIV, verificou a associação entre o polimorfismo da inserção/deleção de 14pb do HLA-G na TMI do HIV-1 e constatou que a deleção de 14pb do HLA-G foi mais frequente em crianças expostas ao vírus porém não infectadas, em relação aos controles saudáveis e às crianças infectadas (FABRIS *et al.*, 2009).

Outro estudo pelo mesmo grupo de pesquisadores, também realizado apenas com filhos de mães portadoras da infecção pelo HIV, demonstrou que o alelo 3777C isoladamente não apresenta efeito na TMI do HIV-1, porém, quando ligado ao alelo D (deleção de 14 pb), exerce papel de proteção (SEGAT *et al.*, 2009). Por outro lado, (MATTE *et al.*, 2002) avaliando duplas de mães e filhos, mostraram que a concordância ou discordância materno-infantil no genótipo do HLA-G não estão associadas com a TMI do HIV-1, seja intrauterina ou periparto. Adicionalmente, o estudo mais recente, conduzido por (LUO *et al.*, 2013) também relata que a concordância entre mãe e filho para os genes do *HLA-G* não está associada com a TMI do HIV.

Pelo exposto, nossos resultados mostraram a associação da infecção pelo HIV com a reduzida expressão de HLA-G em tecido placentário de terceiro trimestre. Entretanto, outros estudos devem ser realizados para o melhor entendimento do papel da molécula HLA-G em tecidos placentários de mulheres infectadas pelo HIV-1.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

1- Ao realizar a análise dos dados sociodemográficos e obstétricos, pudemos observar que o perfil das mulheres atendidas num hospital de referência no município de Ribeirão Preto assemelha-se ao encontrado nacionalmente, consolidando o que já foi observado por inúmeros estudos nessa temática.

2- Em relação ao padrão de expressão da molécula HLA-G, observamos que placentas de mulheres portadoras da infecção pelo HIV-1 apresentaram expressão significativamente menor da molécula HLA-G em comparação com placentas de mulheres saudáveis ($p < 0,01$).

3- Não encontramos associação entre os diversos biomarcadores da infecção pelo HIV-1, como carga viral, número de células CD4+ e uso de TARV, com a expressão das moléculas HLA-G placentárias.

4- Outros estudos utilizando metodologias distintas devem ser realizados para melhor esclarecer o papel da molécula HLA-G em tecidos placentários de mulheres portadoras da infecção pelo HIV-1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**. 5ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ACKERMAN, W. T.; J, J. K. Role of the placenta in adverse perinatal outcomes among HIV-1 seropositive women. **J Nippon Med Sch**, v. 80, n. 2, p. 90-4, 2013.

AGHAFAR, M. Z. et al. Genetic variations in loci relevant to natural killer cell function are affected by ethnicity but are generally not correlated with susceptibility to HIV-1. **Tissue Antigens**, v. 79, n. 5, p. 367-71, 2012.

AGRESTI, A. **Categorical data analysis**. 2ª edition. New York: John Wiley & Sons, 2002.

AIKHIONBARE, F. O. et al. Mother-to-child discordance in HLA-G exon 2 is associated with a reduced risk of perinatal HIV-1 transmission. **Aids**, v. 15, n. 16, p. 2196-8, 2001.

_____. HLA-G DNA sequence variants and risk of perinatal HIV-1 transmission. **AIDS Res Ther**, v. 3, p. 28, 2006.

AMIOT, L. et al. Expression of HLA-G by mast cells is associated with hepatitis C virus-induced liver fibrosis. **J Hepatol**, 2013.

APLIN, J. D. Developmental cell biology of human villous trophoblast: current research problems. **Int J Dev Biol**, v. 54, n. 2-3, p. 323-9, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Recomendações para profilaxia da transmissão vertical do HIV e terapia antirretroviral em gestantes**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 176p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico – AIDS e DST**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 159p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico HIV/AIDS**. Brasília: Ministério da Saúde, 2012. 64p.

BELLO, G. et al. Demographic history of HIV-1 subtypes B and F in Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 7, p. 263-270, 2007.

BHALLA, A. et al. Comparison of the expression of human leukocyte antigen (HLA)-G and HLA-E in women with normal pregnancy and those with recurrent miscarriage. **Reproduction**, v. 131, n. 3, p. 583-9, 2006.

BRENOL, C. V. et al. O papel do gene e da molécula HLA-G na expressão clínica das doenças reumatológicas. **Rev Bras Reumatol**, v. 52, n. 1, p. 75-91, 2012.

CABELLO, A. et al. HAART induces the expression of HLA-G on peripheral monocytes in HIV-1 infected individuals. **Hum Immunol**, v. 64, n. 11, p. 1045-9, 2003.

CALLEN, P.W. **Ultrasonography in Obstetrics and Gynecology**. 4ª edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000.

CAROSELLA, E. D. et al. HLA-G: a tolerance molecule from the major histocompatibility complex. **Immunol Today**, v. 20, n. 2, p. 60-2, 1999.

CARVALHO, F. T. D.; PICCININI, C. A. Aspectos históricos de feminino e do maternal e a infecção pelo HIV em mulheres. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, n. 6, p. 1889-98, 2008.

CELSI, F. et al. HLA-G/C, miRNAs, and their role in HIV infection and replication. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 1-13, 2013.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwrhtml/rr5710a1.htm#tab>>. Acesso em 02 out 2013.

COPEMAN, J. et al. Posttranscriptional regulation of human leukocyte antigen G during human extravillous cytotrophoblast differentiation. **Biol Reprod**, v. 62, n. 6, p. 1543-50, 2000.

CUNNINGHAM, F. G. et al. **Obstetrícia de Williams**. 23ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2012.

DAHER, S.; MATTAR, R. Gestação: um fenômeno imunológico? **Rev Bras Alerg Immunopatol**, v. 32, n. 2, p. 63-67, 2009.

DERRIEN, M. et al. Human immunodeficiency virus 1 downregulates cell surface expression of the non-classical major histocompatibility class I molecule HLA-G1. **J Gen Virol**, v. 85, n. 7, p. 1945-54, 2004.

DESCHASEAUX, F. et al. HLA-G in organ transplantation: towards clinical applications. **Cell Mol Life Sci**, v. 68, n. 3, p. 397-404, 2011.

DONADI, E. A. Como entender a nomenclatura e os mecanismos de associação entre os antígenos e os alelos de histocompatibilidade com as doenças. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 33, p. 7-18, 2000.

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.

DONAGHY, L. et al. Elevated levels of soluble non-classical major histocompatibility class I molecule human leucocyte antigen (HLA)-G in the blood of HIV-infected patients with or without visceral leishmaniasis. **Clin Exp Immunol**, v. 147, n. 2, p. 236-40, 2007.

DUARTE, G.; QUINTANA, S. M.; EL BEITUNE, P. Fatores que influenciam a transmissão vertical do vírus da imunodeficiência humana tipo 1. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 27, n. 11, p. 698-705, 2005.

FABRIS, A. et al. Association between HLA-G 3'UTR 14-bp polymorphism and HIV vertical transmission in Brazilian children. **AIDS**, v. 23, n. 2, p. 177-82, 2009.

FELIX, G.; CEOLIM, M. F. O perfil da mulher portadora de HIV/AIDS e sua adesão a terapia antirretroviral. **Rev Esc Enferm USP**, v. 46, n. 4, p. 884-91, 2012.

FERNANDES, A. P. et al. HLA markers associated with progression to AIDS are also associated with susceptibility to cytomegalovirus retinitis. **Aids**, v. 17, n. 14, p. 2133-6, 2003.

FERNANDES, A. P. M. et al. Maior sobrevida em pacientes com marcadores imunogenéticos de rápida progressão para a AIDS: subsídios para a assistência de enfermagem. **Rev Latino-am Enfermagem**, v. 13, n. 2, p. 229-34, 2005.

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 U S A**, v. 84, n. 24, p. 9145-9, 1987.

GIACOMOZZI, A. I.; CAMARGO, B. Y. Eu confio no meu marido: estudo da representação social de mulheres com parceiro fixo sobre prevenção da AIDS. **Psicologia: Teoria e Prática**, v. 6, n. 1, p. 31-44, 2004.

GONZÁLEZ, 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.

GROTTO, R. M. T.; PARDINI, M. L. M. C. Biologia molecular do HIV-1 e genética da resistência humana à AIDS. **Arq Ciênc Saúde**, v. 13, n. 3, p. 61-4, 2006.

HAN, Q. et al. Association of serum soluble human leukocyte antigen-G levels with chronic hepatitis B virus infection. **Clin Exp Med**, 2012.

HAVEMANN, D. et al. Intermedin/adrenomedullin 2 is associated with implantation and placentation via trophoblast invasion in human pregnancy. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 98, n. 2, p. 695-703, 2013.

HOGLUND, S. et al. Spatial visualization of the maturing HIV-1 core and its linkage to the envelope. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 8, n. 1, p. 1-7, 1992.

HONIG, A. et al. Immunohistochemistry in human placental tissue--pitfalls of antigen detection. **J Histochem Cytochem**, v. 53, n. 11, p. 1413-20, 2005..

HUNT, J. S.; LANGAT, D. L. HLA-G: a human pregnancy-related immunomodulator. **Curr Opin Pharmacol**, v. 9, n. 4, p. 462-9, 2009.

HUNT, J. S. et al. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. **Faseb j**, v. 19, n. 7, p. 681-93, 2005.

IMAM, T. et al. Leukocyte telomere length in HIV-infected pregnant women treated with antiretroviral drugs during pregnancy and their uninfected infants. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 60, n. 5, p. 495-502, 2012.

INC., SAS INSTITUTE. **SAS/STAT User's guide. Version 9.0**. Cary, NC:SAS Institute Inc., 1999.

JIN, H. L. et al. Clinical relevance of sHLA-G-mediated with better graft acceptance in early posttransplantation. **Transplant Proc**, v. 44, n. 5, p. 1259-61, 2012.

JURISICOVA, A. et al. HLA-G expression during preimplantation human embryo development. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 1, p. 161-5, 1996.

KIERSZENBAUM, A. L. **Histologia e Biologia Celular: uma introdução à Patologia**. 2ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

KUMAR, S. B. et al. Different regions of HIV-1 subtype C env are associated with placental localization and in utero mother-to-child transmission. **J Virol**, v. 85, n. 14, p. 7142-52, 2011.

LAFON, M. et al. Modulation of HLA-G expression in human neural cells after neurotropic viral infections. **J Virol**, v. 79, n. 24, p. 15226-37, 2005.

LAJOIE, J. et al. Persistence of high levels of blood soluble human leukocyte antigen-G is associated with rapid progression of HIV infection. **AIDS**, v. 23, n. 11, p. 1437-40, 2009.

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.

LEVINSON, W. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 10ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2010.

LI, X. J. et al. Human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression in cervical cancer lesions is associated with disease progression. **Hum Immunol**, v. 73, n. 9, p. 946-9, 2012.

LILA, N. et al. Implication of HLA-G molecule in heart-graft acceptance. In: (Ed.). **Lancet**. England, v.355, p. 2138, 2000.

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.

LUO, M. et al. HLA-G and mother-child perinatal HIV transmission. **Hum Immunol**, v. 74, n. 4, p. 459-63, 2013.

MACDONALD, K. S. et al. Mother-child class I HLA concordance increases perinatal human immunodeficiency virus type 1 transmission. **J Infect Dis**, v. 177, n. 3, p. 551-6, 1998.

MACKELPRANG, R. D. et al. Maternal HLA homozygosity and mother-child HLA concordance increase the risk of vertical transmission of HIV-1. **J Infect Dis**, v. 197, n. 8, p. 1156-61, 2008.

MATTE, C. et al. Mother-to-child human leukocyte antigen G concordance: no impact on the risk of vertical transmission of HIV-1. **Aids**, v. 16, n. 18, p. 2491-4, 2002.

MEDAWAR, P. B. Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. **Symp. Soc. Exp. Biol.**, v. 44, p. 320-38, 1953.

MENU, E. et al. Selection of maternal human immunodeficiency virus type 1 variants in human placenta. European Network for In Utero Transmission of HIV-1. **J Infect Dis**, v. 179, n. 1, p. 44-51, 1999.

MOODLEY, S.; BOBAT, R. Expression of HLA-G1 at the placental interface of HIV-1 infected pregnant women and vertical transmission of HIV. **Placenta**, v. 32, n. 10, p. 778-82, 2011.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia Clínica**. 8ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

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.

_____. Soluble human leukocyte antigen-G serum levels in patients with acquired immune deficiency syndrome affected by different disease-defining conditions before and after antiretroviral treatment. **Hum Immunol**, v. 72, n. 9, p. 712-6, 2011.

NAJI, A. et al. CD3+CD4low and CD3+CD8low are induced by HLA-G: novel human peripheral blood suppressor T-cell subsets involved in transplant acceptance. **Blood**, v. 110, n. 12, p. 3936-48, 2007.

NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES. Disponível em <<http://www.niaid.nih.gov/topics/hivaids/understanding/biology/Pages/hivReplicationCycle.aspx>>. Acessado em 05 out 2013.

PINTO, M. E.; STRUCHINER, C. J. A diversidade do HIV-1: uma ferramenta para o estudo da pandemia. **Cad Saúde Pública**, v. 22, p. 473-484, 2006.

POLYCARPOU, A. et al. Association between maternal and infant class I and II HLA alleles and of their concordance with the risk of perinatal HIV type 1 transmission. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 18, n. 11, p. 741-6, 2002.

QIU, J. et al. Soluble HLA-G expression and renal graft acceptance. **Am J Transplant**, v. 6, n. 9, p. 2152-6, 2006.

REBMANN, V. et al. Quantification and identification of soluble HLA-G isoforms. **Tissue Antigens**, v. 69, p. 143-9, 2007. Supplement 1.

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.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. **Histologia Texto e Atlas**. 5ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

SANTOS, N. J. S. et al. Contextos de vulnerabilidade para o HIV entre mulheres brasileiras. **Cad Saúde Pública**, v. 25, p. S321-S333, 2009. Suplemento 2.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Coordenadoria de Controle de Doenças. Centro de Referência e Treinamento em DST/Aids - C.R.T – DST/AIDS – SP Programa Estadual de DST/Aids de São Paulo. CRT **Boletim Epidemiológico**., 2012.

SEGAT, L. et al. HLA-G 3' UTR haplotypes and HIV vertical transmission. **AIDS**, v. 23, n. 14, p. 1916-8, 2009.

SOUSA, M. D. C. P. D.; ESPIRITO SANTO, A. C. G.; MOTTA, S. K. A. Gênero, vulnerabilidade das mulheres ao HIV/Aids e Ações de prevenção em Bairro de Periferia de Teresina, Piauí, Brasil. **Saúde Soc. São Paulo**, v. 17, n. 2, p. 58-68, 2008.

SVENDSEN, S. G. et al. The expression and functional activity of membrane-bound human leukocyte antigen-G1 are influenced by the 3'-untranslated region. **Hum Immunol**, v. 74, n. 7, p. 818-27, 2013.

TELUGU, B. P. et al. Comparison of extravillous trophoblast cells derived from human embryonic stem cells and from first trimester human placentas. **Placenta**, v. 34, n. 7, p. 536-43, 2013.

UNAIDS. **Global Report**: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2012. Geneva, 2012.

VERMAAK et al. Morphologic changes in the placenta of HIV-positive women and their association with degree of immune suppression. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 119, n. 3, p. 239-43, 2012.

VERONESI, R. **Tratado de Infectologia**. 3ª edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

YAN, W. H. HLA-G expression in cancers: potential role in diagnosis, prognosis and therapy. **Endocr Metab Immune Disord Drug Targets**, v. 11, n. 1, p. 76-89, Mar 2011.

ZHU, X. et al. Expression of human leukocyte antigen-G during normal placentation and in preeclamptic pregnancies. **Hypertens Pregnancy**, v. 31, n. 2, p. 252-60, 2012.

APÊNDICES

APÊNDICES

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PHIV -

Sabemos que a transmissão do HIV-1, mais conhecido como vírus da AIDS, pode ocorrer durante a gravidez ou parto, só que nem todos os bebês se infectam, mas não sabemos totalmente como isso ocorre. Por esse motivo, estamos fazendo um estudo chamado **“Expressão das moléculas HLA-G e HLA-E em tecidos placentários de mulheres portadoras ou não do HIV-1.**

Nesse estudo, estamos tentando identificar alguns fatores relacionados à imunidade que possam estar associados com a transmissão do vírus da AIDS de mãe para filho. Assim, gostaríamos de convidá-la a participar desse estudo, mesmo não sendo portadora do vírus da AIDS, para que possamos comparar se os fatores relacionados a imunidade estudados encontrados nas mulheres com AIDS é o mesmo nas mulheres saudáveis. Se você aceitar, serão colhidos 10 mL de sangue da veia do seu braço para que o estudo seja feito. A coleta será realizada por mim, aluna de mestrado da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto - USP, em uma sala reservada, enquanto você espera pelo atendimento médico, o que levará no máximo 10 minutos ou, se você achar melhor, a coleta do sangue poderá ser feita quando você for colher sangue para outros exames, aproveitando a mesma coleta. Essa coleta pode causar algum tipo de desconforto, como por exemplo dor no início da coleta. Você responderá também um questionário com 15 questões sobre seus antecedentes obstétricos e alguns dados sociodemográficos. O sangue colhido será desprezado após uso nesta pesquisa, não sendo utilizado em nenhuma outra. Também será coletada, após o parto, uma amostra da sua placenta para identificar os mesmos genes que serão estudados na amostra de sangue.

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 nenhum dinheiro para participar deste estudo e será garantidos o sigilo e anonimato do seu nome e do seu filho.

Assim, Eu, _____, RG _____, abaixo assinado, após ter recebido as informações da aluna de mestrado, concordo em participar dessa pesquisa, tendo garantido os meus direitos abaixo relacionados:

- Direito de receber resposta a qualquer pergunta ou dúvida sobre o tema;
- Direito de deixar de participar da pesquisa a qualquer momento, sem prejuízo atual e futuro a minha assistência;
- Direito de não ser identificado e ter minha privacidade preservada.

Esclareço que em caso de dúvida, fui orientado a procurar a professora Ana Paula M Fernandes na Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto –USP, onde a mesma trabalha no horário das 8: 00h às 17:00h, de segunda a sexta-feira e/ou pelos telefones (16) 3602-3459 (laboratório) ou (16) 3602-3462 (secretária).

Declaro de que tenho conhecimento dos direitos acima descritos, e consinto em participar deste estudo, realizada pela pesquisadora que subscreve este termo de consentimento.

De acordo,

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 2012.

Assinatura do participante do estudo

APÊNDICE B - QUESTIONÁRIO PHIV-**IDENTIFICAÇÃO**

1- Iniciais:

2- Estado civil:..... Há quanto tempo: anos..... meses.....

(1) Casado (2) Amasiado (3) Viúvo (4) Desquitado (5)Solteiro (6)Outro.....

3- Naturalidade: (1) Ribeirão (2) Região (3) Fora Região (4)Outro
Estado/Especifique.....4- Procedência: (1) Ribeirão (2) Região (3) Fora Região (4)Outro
Estado/Especifique.....

5- Data de nascimento: / /

6- Idade (anos):

(1) 18 I- 22 (3) 28 I- 32 (5) 38 I- 42

(2) 23 I- 27 (4) 33 I- 37

7- Sexo: Feminino

8- Raça/cor: (1) Branca (2) Negra (3) Amarela

9- Escolaridade: (1) Superior (2) Ensino médio completo (3) Ensino médio incompleto

(4) Ensino fundamental completo (5) Ensino fundamental incompleto (6) Analfabeto

TRABALHO

10-Profissão/Emprego:.....

MORADIA

11- Co-habitação:

(1) Esposa/marido/filho (2) Mãe/pai (3) Familiares (4) Sozinho (5) Outro.....

ANTECEDENTES OBSTÈTRICOS

12- N° de Gestações: G ()

N° de Partos: N () C () F ()

N° de abortos: A () Motivo:.....

13- Você fez o exame pré-natal?

(1) Sim (2) Não

14- Apresentou problemas durante a gravidez?

(1) Sim (2) Não

Qual:.....