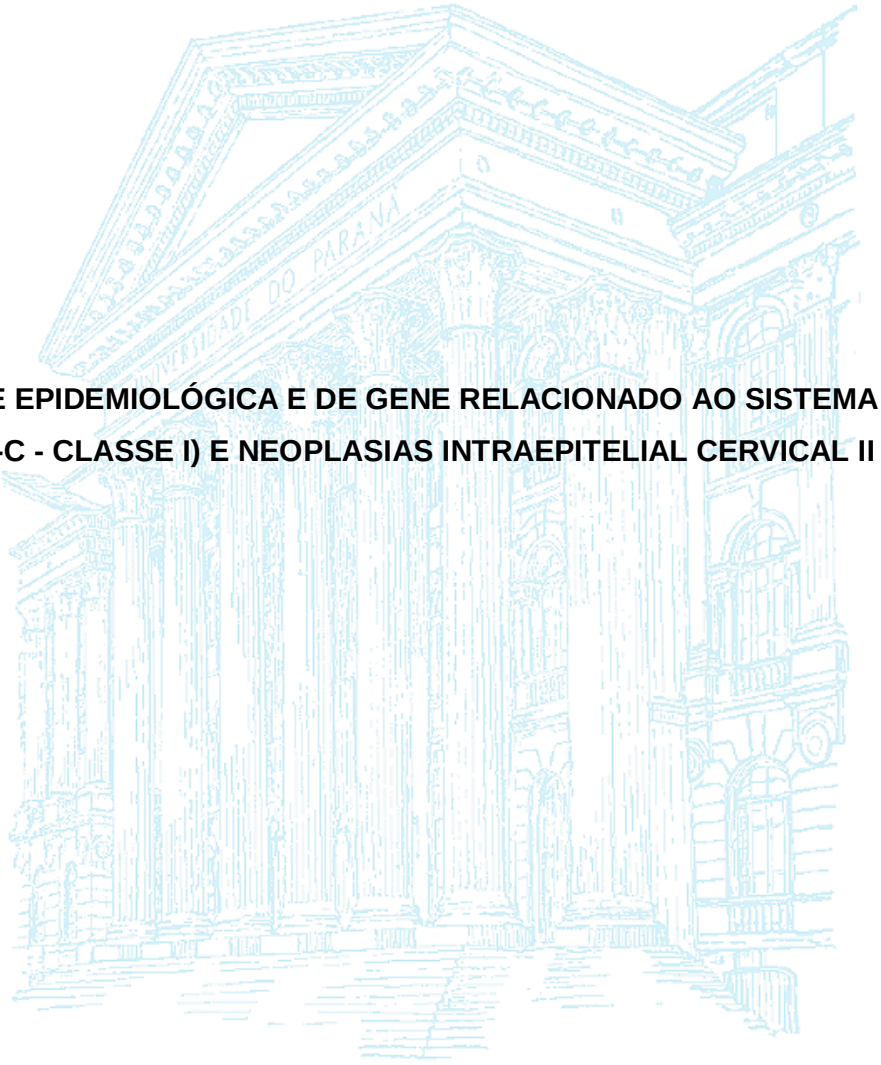
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
MARINA BÁRBARA DE SOUSA XAVIER



ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA E DE GENE RELACIONADO AO SISTEMA IMUNE (HLA-C - CLASSE I) E NEOPLASIAS INTRAEPITELIAL CERVICAL II E III

CURITIBA
2012

MARINA BÁRBARA DE SOUSA XAVIER

ANÁLISE EPIDEMIOLÓGIA E DE GENE RELACIONADO AO SISTEMA IMUNE (HLA-C - CLASSE I) E NEOPLASIAS INTRAEPITELIAL CERVICAL II E III

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina Interna, área de concentração Tocoginecologia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Newton Sérgio de Carvalho

Co-Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Maria da Graça Bicalho.

CURITIBA

2012

Xavier, Marina Bárbara de Sousa
Análise epidemiológica e de gene relacionada ao sistema imune (HLA-C – Classe I) e neoplasias intraepitelial cervical II e III / Marina Bárbara de Sousa Xavier. Curitiba, 2012.
123f. : il. color.

Orientador: Prof. Dr. Newton Sérgio de Carvalho

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde. Departamento de Clínica Médica do Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

1. Antígenos HLA-C. 2. Neoplasias do Colo do Útero. 3. Epidemiologia. I. Título. II. Carvalho, Newton Sérgio.

NLM: WP 480

Ministério da Educação
Universidade Federal do Paraná
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
= MESTRADO e DOUTORADO =

PARECER

Aos treze dias do mês de julho do ano de dois mil e doze, a banca examinadora constituída pelos Professores Doutores: **Iara Moreno Linhares, Luiz Martins Colaço e Newton Sergio de Carvalho** , exarou o presente parecer sobre a dissertação elaborada por **Marina Bárbara de Sousa Xavier**, do **Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna nível Mestrado**, da **Universidade Federal do Paraná**, intitulada: "**ANÁLISE DE GENE RELACIONADO AO SISTEMA IMUNE (HLA-C-CLASSE I) E NEOPLASIAS INTRAEPITELIAL CERVICAL II E III**". A Banca examinadora considerou que **Marina Bárbara de Sousa Xavier**, apresentou trabalho adequado para dissertação e o defendeu com segurança e propriedade nas argüições que lhe foram feitas, de modo a merecer a sua **aprovação**, sendo recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de **Mestre em Medicina Interna** e a publicação de artigo em revista técnico-científica com corpo editorial, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das argüições, cumpridas outras exigências previstas em normativas da pós-graduação.

Curitiba, 13 de julho de 2012.

Profa. Dra Iara Moreno Linhares

Prof. Dr. Luiz Martins Colaço

Prof. Dr. Newton Sérgio de Carvalho

Aos meus pais Jair e Maria Rosa (*in memoriam*)

Aos meus irmãos

Aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Às mulheres que voluntariamente aceitaram participar deste projeto e que propiciaram um crescimento profissional e humano incalculável ao longo desses anos de trabalho.

Aos professores do curso de pós graduação em Medicina Interna e Ciências da saúde.

As secretárias Valéria e Lúcia por todas as orientações e grande ajuda nos quesitos burocráticos.

À profa. Maria da Graça Bicalho por toda sua generosidade, dedicação e disponibilização de recursos à pesquisa e construção humana. Meu agradecimento e minha admiração.

Ao Prof. Newton Sérgio de Carvalho pela orientação, ajuda e confiança em mim depositadas. Não há palavras para agradecer todas as oportunidades.

A equipe de profissionais e alunos do LIGH pela compreensão e apoio, cada um contribuiu de alguma forma para a realização desse trabalho. Em especial as "meninas do HPV: Patrícia, Renata e Juliana. Muito foi feito por nós, estejam certas. (HPV eu e você!)"

A Sibelle Mattar e Fabiana Poerner pela ajuda com análise e interpretação dos resultados.

Ao José Samuel pela ajuda com as análises estatísticas.

À Gorete Rezende "(meu braço direito!)", obrigada pela amizade tão divertida, por me socorrer nas dificuldades práticas da pesquisa, por me ouvir tantas e tantas vezes e me ajudar sempre!

Aos meus irmãos, por todo incentivo, em especial ao Mauro Xavier que sempre acreditou, investiu e orientou minha formação acadêmica. Seu apoio e carinho foram essenciais!

Ao meu pai, que na sua simplicidade me deu todas as oportunidades para me tornar uma pessoa de caráter e buscar uma vida melhor. Tenho orgulho e muito amor por você.

À minha amada mãe, pedra fundamental da minha vida! Gostaria que estivesse aqui para presenciar mais uma luta e vitória da minha caminhada. Saudades e amor eternos!

Aos amigos, os melhores do mundo, que me agüentaram várias vezes de mau humor e estressada. Vocês são essenciais na minha vida. Em especial ao Rodrigo Teixeira e Raquel Novak, sempre presentes e cuidando de mim com amor e carinho. Amo vocês!

A Deus por cada momento, cada minuto.

Ao Convênio FUNPAR-LIGH e à CAPES pelo apoio financeiro.

Com o tempo, os conceitos mudam...
os sonhos mudam...
os planos mudam...
a vida muda...
Mas não se mudam princípios e valores...
Mudei e continuo igual...
Assim é o ser humano: tão coerente em suas contradições...

Jacky Correia

Agradeço a todos que me disseram não,
é por causa deles que eu fiz tudo eu mesmo.
Einstein

RESUMO

O Papilomavírus Humano (HPV) é relacionado ao desenvolvimento de lesão escamosa intra-epitelial de alto grau (NIC II / NIC III) e CC, sendo associado a outros fatores de risco. Genes que participam da resposta imune, como por exemplo, *HLA* e genes codificantes de receptores tipo imunoglobulina das células Natural Killer (*KIR*) têm sido investigados na progressão/regressão de doenças causadas por infecções virais. O objetivo do presente estudo foi analisar dados epidemiológicos e a diversidade genética do gene *HLA-C* referentes a 84 mulheresNIC II e 90 NIC III no grupo caso e comparar com um grupo controle, sendo 102 mulheres controle negativo para a presença do vírus e 76 mulheres controle positivo para a presença do HPV, com citologia cervical normal. As mulheres participantes foram obtidasda cidade e região metropolitana de Curitiba com faixa etária entre 15 e 45 anos. O grupo caso foi obtido no Hospital Erasto Gaertner, Curitiba, PR e o grupo controle foi recrutado a partir de campanhas de prevenção do câncer cervical promovidas pelo Hospital de Clínicas e Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade. O DNA foi extraído de amostras de sangue periférico e a genotipagem *HLA-C*realizada pelo método PCR-SSOP em alta definição. Para análise estatística utilizou-se o software Biostat 5.0, os testes G e qui-quadrado (X^2) em tabelas LxC.Na análise epidemiológica alguns fatores de risco foram significativos dentre todos os analisados. Os alelos *HLA-C**05:01, *HLA-C**07:01P, *HLA-C**07:02, *HLA-C**12:03, *HLA-C**15:02P e *HLA-C**16:01 foram significativamente mais freqüentes quanto aos outros alelos encontrados. No estudo de associação houve significância para portadores dos alelos *HLA-C**05:01, *HLA-C**07:01P, *HLA-C**07:02, *HLA-C**12:03 e *HLA-C**15:02P. O genótipo homozigoto *HLA-C**04:01P/*04:01P foi o mais freqüente, 3,7%. Os resultados da análise epidemiológica corroboraram com dados da literatura. Para os alelos*HLA-C**05:01, *HLA-C**07:02 e *HLA-C**12:03 há diferença significativa quando da comparação entre grupos com ausência *versus* presença de lesão. Indivíduos portadores dos alelos *HLA-C**05:01, *HLA-C**07:01P,*HLA-C**07:02 e *HLA-C**12:03 foram associados à susceptibilidade de progressão de NIC. Outros estudos complementares devem ser realizados para se avaliar o significado do risco de desenvolvimento do CC, principalmente no contexto das interações *KIR* ligante *HLA-C*.

Palavras-chave: HLA-C, HPV, Câncer cervical, epidemiologia

ABSTRACT

The Human Papillomavirus (HPV) is relatedto the development of a squamous intraepithelial lesion high grade (CIN II / CIN III) and CC, being associated with other risk factors. Genes involved in immune response, as HLA and genes encodingimmunoglobulin-like receptors of Natural Killer Cells (KIR) have been investigate on the progression/regression of diseases caused by viral infections. The aim of this study was to analyze epidemiological data and the HLA-C frequency on 84 women CIN II and 90 CIN III in the case group compared with a control group, which includes 102 women HPV negative and 76 women HPV positive, both with normal cytology. The samples were from Curitiba (25°20'S49°10'W) and surroundings. All this women have between 15 and 45 years old. The case group was treated at the Department of Cervical Pathology of the Erasto Gaertner Hospital, Curitiba and the control group was recruited from campaigns promoted by public institution healthy as Department of Gynecology and Obstetrics and Histocompatibility and Immunogenetics Laboratory, Department of Genetics, Federal University of Parana. DNA was extracted from peripheral blood samples and *HLA-C* genotyping performed by PCR-SSOP in high definition. Statistical analysis used the software Biostat 5.0, G and chi-squaretests in 2x2 tables. The epidemiological analysis of some risk factors were significant among all analyzed. The alleles *HLA-C**05:01, *HLA-C**07:01P, *HLA-C**07:02, *HLA-C**12:03, *HLA-C**15:02P e *HLA-C**16:01 were significantly more frequent as the other alleles found. In the study there was a significant association for carriers of *HLA-C**05:01, *HLA-C**07:01P, *HLA-C**07:02 and *HLA-C**12:03. The homozygous genotype *HLA-C**04:01P/*04:01P was the most frequent, 3.7%. The results of epidemiological analyzes corroborated with literature data. *HLA-C**05:01, *HLA-C**07:02 and *HLA-C**12:03showed significant difference when comparing groups with presence versus absence of injury. Individuals carrying the *HLA-C**05:01, *HLA-C**07:01P, *HLA-C**07:02 and *HLA-C**12:03 were associated with susceptibility progression of CIN. Additional studies must be conducted to evaluate the significance of the risk of development of CC, especially in the context of *HLA-C* ligand interactions KIR.

Keywords: HLA-C, HPV, Cervical cancer, epidemiology

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Incidências dos tipos de câncer mais comuns para o estado do Paraná e Curitiba.....21
Figura 2 - Representação das taxas brutas de incidência de CC estimadas para 2012. 21
Figura 3 - Contribuição estimada do HPV no câncer. 22
Figura 4 - Dez tipos de HPV mais frequentes entre mulheres com ou sem lesões cervicais no Brasil. 23
Figura 5– Estrutura externa do vírus HPV.....27
Figura 6 – Organização genômica do vírus do papiloma humano. 28
Figura 7 – Tipos mais frequentes do HPV nas regiões do brasil.....30
Figura 8 - Modelo de história natural do HPV e CC. 31
Figura 9 - Estágios de progressão do vírus HPV em mulheres.....32
Figura 10 - Localização do colo uterino e representação do câncer cervical. 35
Figura 11 – Mecanismo da carcinogênese por HPV 37
Figura 12 - Mapa do Complexo Principal de Histocompatibilidade (*MHC*) humano. .46
Figura13 -Especificidades *KIR* - ligante HLA.....49
Figura 14 – Número amostral do estudo. 54
Figura 15 - Gel de agarose 2,5% 56
Figura 17a - Amostra da tabela de alelos raros NMDP versão 3.5 (Adaptada).....57
Figura 17b - Amostra da tabela de grupos P.....58
Figura 20 - Valores para cálculo de *ODDS RATIO.* 59
Figura 21 - Representação esquemática do desenvolvimento do estudo. 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estimativas para o ano 2012 das Taxas Brutas de Incidência de Câncer, por 100 mil, segundo localização primária. 20
Tabela 02: Idade, etnia e escolaridade dos grupos de estudo. 63
Tabela 03: Idade de início da atividade sexual, número de parceiros, uso de preservativo e uso de contraceptivo, entre os grupos. 64
Tabela 04: Número de gestações e idade ao 1º parto entre os grupos. 66
Tabela 05: Número de citologias oncóticas entre os grupos. 67
Tabela 06: Hábito tagabista entre os grupos. 68
Tabela 07: Hábito tabagista entre as fumantes, considerando tempo de uso e número de cigarros por dia, entre os grupos de estudo. 68
Tabela 08: Hábito tabagista entre as ex-fumantes, considerando tempo de uso, número de cigarros por dia e tempo que parou, entre os grupos de estudo. 69
Tabela 09: Frequências das variantes alélicas do gene HLA-C e comparação das mesmas entre os grupos. 70
Tabela 10:Cálculo de *p* para grupos alélicos de HLA-C. 73
Tabela 11:Representação de 26 genótipos com frequência acima de 1% do total da variabilidade genotípica encontrada. 74
Tabela 12: Comparação estatística para presença ou ausência do vírus e para presença ou ausência de lesão, entre os grupos. 75
Tabela 13:Comparação de indivíduos portadores do alelo HLA-C*05:01nas amostras NIC II (n=84) e CP (n=76). 76
Tabela 14: Comparação de indivíduos portadores do alelo HLA-C*05:01 nas amostras CN (n=102) e CP (n=76). 76
Tabela 15: Comparação de indivíduos portadores do alelo HLA-C*07:01P nas amostras NIC II (n=84) e NIC III (n=90). 76
Tabela 16:Comparação de indivíduos portadores do alelo HLA-C*07:02 nas amostras NIC II (n=84) e CP (n=76). 77
Tabela 17:Comparação de indivíduos portadores do alelo HLA-C*07:02 nas amostras NIC III (n=90) e CP (n=76). 77
Tabela 18: Comparação de indivíduos portadores do alelo HLA-C*07:02 nas amostras CN (n=102) e CP (n=76). 77
Tabela 19: Comparação de indivíduos portadores do alelo HLA-C*12:03 nas amostras NIC II (n=84) e CP (n=76). 77

Tabela 20: Comparação de indivíduos portadores do alelo HLA-C*12:03 nas amostras CN (n=102) e CP (n=76).....78
Tabela 21: Comparação de indivíduos portadores do alelo HLA-C*12:03 nas amostras NIC III (n=90) e CP (n=76).....78
Tabela 22: Comparação de indivíduos portadores do alelo HLA-C*15:02P nas amostras CN (n=102) e CP (n=76).....78
Tabela 23: Compilação dos resultados obtidos: Análise epidemiológica (mais frequentes). 79
Tabela 24: Compilação dos resultados obtidos: Análise genética.....80

LISTA DE ABREVIATURAS

APC - Célula Apresentadora de Antígeno(*Antigen Presenting Cell*)

CC - Câncer Cervical

CL - Células de Langerhans

CT - Clamídia (*Chlamydia trachomatis)*

E - Região de proteínas precoce(*Early proteins*)

CH - Captura Híbrida

HLA - Antígenos Leucocitários Humano(*Human LeucocytesAntigens*)

HPV - Vírus do Papiloma Humano(*Human Papillomavirus*)

HSIL - Lesão Escamosa Intra-epitelial de Alto Grau(*High-Grade Squamous Intraepithelial Lesions*)

HSV-2 - Vírus do Herpes Simples do Tipo II(*Herpes Simplex Vírus* 2)

IARC - Agência Internacional para pesquisa do Câncer (*International Agency for Research on Cancer)*

IFN - Interferon

Ig - Immunoglobulina

IL2 - Interleucina 2

KIR - Receptores de Células NK semelhantes a Imunoglobulinas *(Killer Immunoglobulin-like receptors*)

L - Região de proteínas tardias *(Late proteins*)

LCR - Região controladora de lócus*(Long Control Region*)

LRC - Complexo de Receptores Leucocitários*(Leukocyte Receptor Complex*)

LSIL - Lesão Escamosa Intra-epitelial de Baixo Grau*(Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions*)

MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade*(Major Histocompatibility Complex*)

NG - *Neisseria gonorrhoeae*

NIC I - Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau I

NIC II - Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau II

NIC III - Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau III

NK - Células Exterminadoras Naturais*(Natural Killer Cells*)

NMDP -Programa Nacional de Doadores de Medula*(National Marrow Donor Program*)

OR	- Razão de Probabilidades*(Odds Ratio*)
ORFs	- Matriz Aberta de Leitura (O*pen Reading Frames*)
PCR-SSOP	- Reação em Cadeia da Polimerase com Sondas de Oligonucleotídeos Seqüência-Específicos*(Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotide Probes)*
RB1	- Gene do Retinoblastoma 1
RR	- Risco Relativo
TGFβ	- Fator de Crescimento Tumoral β
TNFα	- Fator de Necrose Tumoral α
TP53	- Tumor Protein p53 Gene

Sumário

1. INTRODUÇÃO 17

2. REVISÃO DE LITERATURA 19

2.1 CÂNCER CERVICAL: EPIDEMIOLOGIA 19
2.2 CÂNCER CERVICAL: FATORES DE RISCO 22
2.3 VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO – HPV 25
2.3.1 Infecção por HPV 29
2.3.2 Neoplasias Intraepitelial Cervical – NIC 33
2.3.3 Patogênese e Efeito Oncogênico 34
2.4 RESPOSTA IMUNE CONTRA O HPV 38
2.5 ESTRATÉGIAS DE PREVENÇÃO E RASTREAMENTO 41
2.6 GENES CANDIDATOS À SUSCEPTIBILIDADE OU PROTEÇÃO AO DESENVOLVIMENTO DE NICs 43
2.6.1 MHC e genesHLA 44
2.6.2 Interações entre receptores *KIR* e seus ligantes *HLA-Cw** 47

3 JUSTIFICATIVA 50

3.1 HIPÓTESES QUE FUNDAMENTAM A PESQUISA 51

4 OBJETIVOS 52

4.1 OBJETIVO GERAL 52
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 52

5 METODOLOGIA 53

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS 53
5.1.1 Critérios de Inclusão 54
5.1.2 Critérios de Exclusão 55
5.2 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO 55
5.2.1 Extração do DNA do sangue 55
5.2.2 Cálculo da concentração do DNA 55
5.3 GENOTIPAGEM DO GENEHLA-C 56
5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA 59

5.4.1 Freqüências alélicas e genotípicas 59
5.4.2 Equilíbrio de Hardy-Weinberg 60
5.4.3 Análise de associação entre HLA-C e NICs 60

6 RESULTADOS 61

6.1 FLUXOGRAMA DAS ATIVIDADES REALIZADAS E RESULTADOS OBTIDOS 61
6.2 CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLOGICA 61
6.3 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA HLA-C 70

7 DISCUSSÃO 81

7.1 CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS 81
7.2 HLA-C 90
7.3 PERSPECTIVAS 93

8 CONCLUSÕES 94

8.1 Epidemiológicas 94
8.2 Genéticas 95

9 REFERÊNCIAS 96

10 APÊNDICES 114

10.1 APÊNDICE 1 Metodologias aplicadas ao estudo 114
10.2 APÊNDICE 2 Hibridização SSOP 116

11 ANEXOS 119

11.1 ANEXO 1 - Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa 119
11.2 ANEXO 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 120
11.3 ANEXO 3 - Questionário Epidemiológico 122

1. INTRODUÇÃO

O câncer cervical (CC) é um problema de saúde pública em todo mundo. É o segundo câncer mais incidente e o que causa maior número de mortes na população feminina, especialmente em países em desenvolvimento, onde são precárias informações e acesso aos programas de rastreamento, que é a forma de prevenção mais importante. Em 2008, nas Américas, mais de 80 mil mulheres foram diagnosticadas com câncer cervical e cerca de 36 mil morreram. Se as tendências continuarem o número de óbitos será o dobro até 2030. (WHO, 2006; BRASIL. Ministério da Saúde, 2011, WHO, 2012).

Os principais agentes etiológicos do CC são os tipos oncogênicos do vírus do papiloma humano (*HPV*) (WALBOOMERS *et al.*, 1999), sendo a presença do vírus um pré-requisito para o surgimento da maior parte dos casos de câncer do colo do útero. O HPV é transmitido de uma pessoa para outra através do contato sexual com a pele da região afetada, não sendo necessário o contato com fluidos corporais.

A prevenção primária do câncer do colo do útero pode ser realizada através do uso de preservativos durante a relação sexual, embora não impeça totalmente a transmissão do vírus. No Brasil, o exame preventivo citopatológico (teste de Papanicolaou) é a estratégia de rastreamento recomendada pelo Ministério da Saúde prioritariamente para mulheres de 25 a 59 anos, que tem ou já tiveram relação sexual (BRASIL. Ministério da Saúde, 2011).

Apesar da infecção por HPV ser o principal fator de risco ao desenvolvimento do CC, apenas algumas mulheres infectadas desenvolvem a doença, indicando que outros fatores também são importantes para o desenvolvimento do câncer (MAGNUSSON e GYLLENSTEN, 2000).

A susceptibilidade genética à exposição e/ou infecção por HPV, parece ser importante na determinação do risco individual ao desenvolvimento deste câncer induzido pelo vírus (MAGNUSSON e GYLLENSTEN, 2000).

A interferência das oncoproteínas virais nas proteínas do sistema imune e do ciclo celular induz e mantém a transformação celular, fazendo com que células infectadas formem lesões precursoras do câncer podendo levar à progressão para um CC. Portanto, o estudo dos genes que codificam as proteínas celulares

envolvidas com a resposta das células à infecção pelo HPV tem grande importância, uma vez que determinados genótipos podem demonstrar maior susceptibilidade ou maior proteção ao desenvolvimento de lesões pré-câncer, devido à ação de proteínas virais.

A participação de produtos gênicos de Classe I do Complexo Principal de Histocompatibilidade, do inglês (*MHC*) é fundamental para gerar respostas de linfócitos T a antígenos virais. Esse fato pode ser observado nos diferentes estudos que investigam a influência dos variantes alélicos HLA na modulação da resposta do hospedeiro à infecção do HIV (GAUDIERI, *et al.*, 2005), no contexto da imunidade adaptativa. Além disso, um importante mecanismo da imunidade inata fundamenta-se na alorreatividade das células NK *(Natural Killer)*, mediada pela expressão de receptores de membrana, dentro os quais os receptores tipo imunoglobulina, do inglês *Killer immunoglobulin (Ig)-like receptors* (*KIR*), cujos ligantes são variantes alotípicos HLA-Cw codificados por alelos HLA-C. A identificação do ligante *HLA* Classe I específico para receptores KIR presentes nas células NK e as análises da sua alorreatividade abre perspectivas para se investigar a base biológica capaz de ligar a pesquisa básica e relevantes aplicações clínicas (MORETTA *et al.*, 2009).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÂNCER CERVICAL: EPIDEMIOLOGIA

O contínuo crescimento populacional, bem como seu envelhecimento, afetará de forma significativa o impacto do câncer no mundo. Esse impacto recairá principalmente sobre os países de médio e baixo desenvolvimento. A IARC/OMS (*International Agency for Research on Cancer*)estimou que, em 2008, metade dos casos novos e cerca de dois terços dos óbitos por câncer ocorrerão nessas localidades. (BRASIL. Ministério da Saúde, 2011)

As mais recentes estimativas realizadas em 2008 apontaram que o câncer do colo do útero se tornou um importante problema de saúde pública no mundo e apontam 529 mil casos novos desse câncer em mulheres para aquele ano configurando-se o terceiro tipo de câncer mais comum entre as mulheres. Sua incidência é cerca de duas vezes maior em países menos desenvolvidos quando comparada aos países mais desenvolvidos. Em geral, a razão mortalidade/incidência é de 52%, sendo responsável pelo óbito de 275 mil mulheres em 2008. Mais de 85% desses óbitos ocorrem em países em desenvolvimento. Somente a Índia, que é o segundo país mais populoso do mundo, contribui com cerca de 27% dos óbitos por esse câncer (CANCER RESEARCH UK, 2002; WHO, 2010; INCA, 2012).

O CC é o segundo tipo de câncer mais comum entre as mulheres sendo responsável pelo óbito de, aproximadamente, 230 mil mulheres por ano. Ocupa o segundo lugar dos cânceres mais incidentes na América do Sul, ocorrendo em quase 30 a cada 100 mil mulheres, sendo menos freqüente apenas que o câncer de mama (WHO/ICO, 2010; BRASIL. Ministério da Saúde, 2010).

Em países desenvolvidos, a sobrevida média estimada em cinco anos varia de 59 a 69%. Nos países em desenvolvimento, os casos são primeiramente detectados em estágios relativamente avançados e, conseqüentemente, a sobrevida média é de cerca de 49%, após cinco anos. A média de sobrevida mundial estimada é de 49%, sendo que na América do sul é de 55% (PARKIN *et al.,* 2005).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2012, apontam para a ocorrência de 518.510 casos novos de câncer em geral. São esperados aproximadamente 260.240

para sexo feminino, sendo os mais incidentes: tumores de pele não melanoma (71 mil casos), mama (53 mil casos), cólon de reto (16 mil) e pulmão (10 mil).

O número de casos novos de câncer do colo do útero esperado para o Brasil em 2012 será de 17.540, com um risco estimado de 17 casos a cada 100 mil mulheres (Tabela 1) (INCA. Ministério da Saúde, 2012). A incidência CC torna-se evidente na faixa etária de 20 a 29 anos e o risco aumenta rapidamente até atingir seu pico, geralmente na faixa etária de 45 a 49 anos (BRASIL. Ministério da Saúde, 2010).

Tabela 1: Estimativas para o ano 2012 das Taxas Brutas de Incidência de Câncer, por 100 mil, segundo localização primária.

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estados		Capitais		Estados		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	60.180	62,54	15.660	75,26	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	52.680	52,50	18.160	78,02
Colo do Útero	-	-	-	-	17.540	17,49	5.050	21,72
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	17,90	4.520	21,85	10.110	10,08	3.060	13,31
Cólon e Reto	14.180	14,75	4.860	23,24	15.960	15,94	5.850	25,27
Estômago	12.670	13,20	3.200	15,34	7.420	7,42	2.170	9,47
Cavidade Oral	9.990	10,41	2.760	13,34	4.180	4,18	1.130	4,92
Laringe	6.110	6,31	1.540	7,56	-	-	-	-
Bexiga	6.210	6,49	1.900	9,28	2.690	2,71	880	3,72
Esôfago	7.770	8,10	1.500	7,26	2.650	2,67	520	2,27
Ovário	-	-	-	-	6.190	6,17	2.220	9,53
Linfoma não Hodgkin	5.190	5,40	1.560	7,66	4.450	4,44	1.560	6,85
Glândula Tireoide	-	-	-	-	10.590	10,59	3.490	14,97
Sistema Nervoso Central	4.820	5,02	1.190	5,82	4.450	4,46	1.200	5,23
Leucemias	4.570	4,76	1.180	5,81	3.940	3,94	1.180	5,02
Corpo do Útero	-	-	-	-	4.520	4,53	1.700	7,39
Pele Melanoma	3.170	3,29	810	4,05	3.060	3,09	790	3,46
Outras Localizações	43.120	44,80	11.100	53,33	38.720	38,61	10.320	44,50
Subtotal	**195.190**	**202,85**	**51.780**	**248,60**	**189.150**	**188,58**	**59.280**	**254,86**
Pele não Melanoma	62.680	65,17	14.620	70,39	71.490	71,30	15.900	68,36
Todas as Neoplasias	**257.870**	**267,99**	**66.400**	**318,79**	**260.640**	**259,86**	**75.180**	**323,22**

Fonte: INCA – Ministério da Saúde (2012) - Adaptado

O estado do Paraná tem uma incidência prevista para 2012 de 770 casos de CC, ou seja, 13,79 para cada 100 mil mulheres, enquanto a incidência para Curitiba é de 140 casos de CC, ou seja, 15,02 a cada 100 mil (Figura 1). (INCA. Ministério da Saúde, 2012).

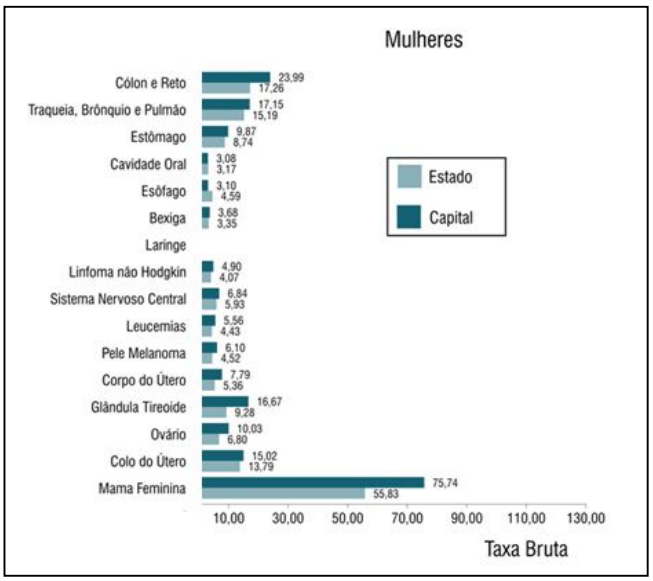


Figura 1 - Incidências dos tipos de câncer mais comuns para o estado do Paraná e Curitiba

Fonte: INCA – Ministério da Saúde (2012) - Adaptado

A maior incidência de CC é na Região Centro-Oeste, 28 casos para cada 100 mil mulheres. Nas regiões Norte e Nordeste as proporções são 24 e 18 casos, respectivamente, para cada 100 mil mulheres. Nas regiões Sudeste e Sul as proporções são 15 e 14 casos, respectivamente, para cada 100 mil mulheres. Essas taxas podem sofrer variações entre os estados de uma mesma região (figura 2) (BRASIL. Ministério da Saúde, 2012).

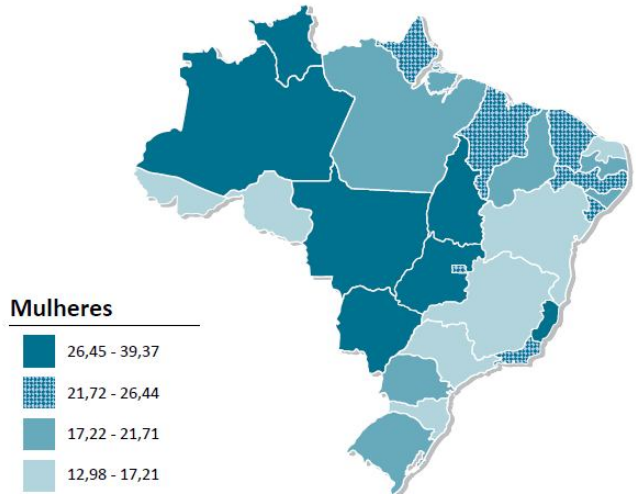


Figura 2 - Representação das taxas brutas de incidência de CC por 100 mil mulheres, estimadas para 2012.FONTE: Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde (2012)

Estima-se que cerca de 25% das mulheres da população brasileira estejam infectadas pelo vírus e, somente uma pequena fração (entre 3% a 10%) das mulheres infectadas com um tipo de HPV com alto risco de câncer desenvolverá câncer do colo do útero (BRASIL. Ministério da Saúde, 2010).

O rastreamento cervical é reconhecido como a abordagem mais eficaz para prevenção do CC, entretanto, a maioria das mulheres nos países mais pobres, não tem acesso a programas de rastreamento efetivos.

2.2 ***CÂNCER CERVICAL: FATORES DE RISCO***

No início da década de 80, Zur Hausen e colaboradores comprovaram que o vírus do papiloma humano estaria relacionado ao desenvolvimento do CC (ZUR HAUSEN, 2008). Atualmente, sabe-se que o principal agente etiológico do CC são os subtipos oncogênicos do vírus do papiloma humanoquando persistentes, o HPV. Estudos demonstraram uma prevalência de DNA do HPV em 99,7% dos carcinomas cervicais (Figura 3) (WALBOOMERS *et al.*, 1999).

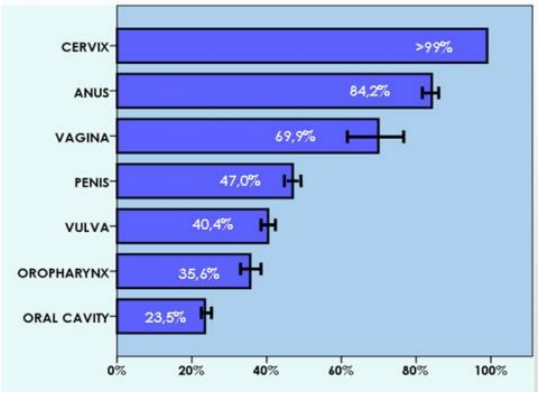


Figura 3 - Contribuição estimada do HPV no câncer.
Fonte: WHO/ICO (2010) - Adaptado

A presença de infecção pelo HPV é reconhecida como um pré-requisito para o surgimento do câncer do colo do útero, e determinados tipos de HPV são designados como uma condição necessária para o CC (PRENDIVILLE e DAVIES, 2004). As lesões epiteliais malignas e pré-malignas da cérvice e lesões neoplásicas da vulva, vagina, ânus, pênis e orofaringe são causadas por pelo menos 15 tipos

oncogênicos do HPV. Destes, os tipos mais comuns são o HPV16 e o HPV18, responsáveis por, aproximadamente, 70% de todos os cânceres cervicais de todo o mundo (Figura 4) (WHO, 2006; CASTELLSAGUÈ, 2008).

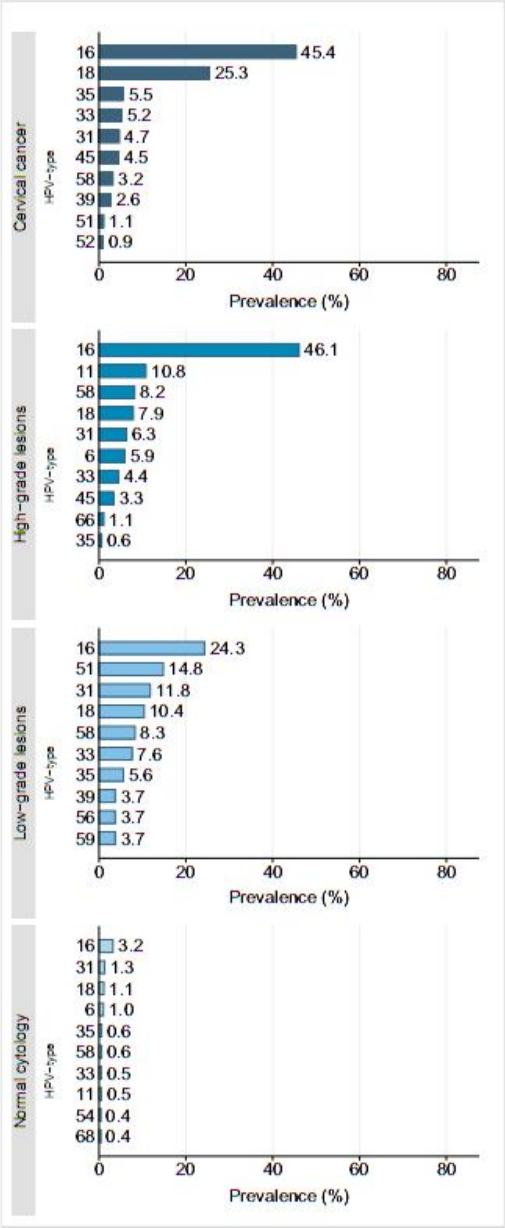


Figura 4 - Dez tipos de HPV mais frequentes entre mulheres com ou sem lesões cervicais no brasil.
Fonte: WHO/ICO (2010) - Adaptado

Apesar da infecção por HPV ser o principal fator de risco ao desenvolvimento do CC, apenas algumas mulheres infectadas desenvolvem a doença, indicando que

outros fatores também são importantes para o desenvolvimento do câncer (MAGNUSSON e GYLLENSTEN, 2000).

Outros fatores de risco associados ao desenvolvimento do CC também chamados de co-fatores podem ser exógenos, como uso de contraceptivos orais, tabagismo, gestações múltiplas, infecção concomitante por outros agentes infecciosos, início precoce da atividade sexual, múltiplos parceiros, parceiros de alto risco e a subnutrição (MUÑOZ *et al.,* 2002; CASTELLSAGUÉ e MUÑOZ, 2003).

O uso de anticoncepcionais orais, por mais de cinco anos consecutivos, pode influenciar a progressão da infecção por HPV por promover a integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro e estimular a transcrição de oncogenes virais E6 e E7 envolvidos na carcinogênese (CASTELLSAGUÉ e MUÑOZ, 2003; WHO, 2006).

O tabagismo parece aumentar o risco de CC em mulheres positivas para o HPV. Subprodutos carcinogênicos do tabaco, como a nicotina e a cotidina, podem danificar diretamente o DNA das células cervicais ou comprometer a resposta imunológica local, facilitando a persistência do HPV (CASTELLSAGUE e MUÑOZ, 2003). Além disso, o benzo[*a*]pireno (BaP), o principal carcinógeno encontrado na fumaça do cigarro, interage com o HPV, elevando o título viral dos HPVs 16,18 e 31 (HARRIS*et al.*, 2004). Em 2004, a agência internacional IARC classificou o tabagismo como causa de CC. O ICESCC (*International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer*) publicou em 2006 o resultado de uma análise de 24 estudos epidemiológicos, no qual mulheres fumantes apresentaram aumento significativo do risco relativo de CC, comparado com mulheres não fumantes (RR = 1,60). Esse risco diminui em mulheres que abandonaram o hábito e aumenta com a quantidade de cigarros por dia (mais de 15 cigarros *versus* nenhum).

Mulheres que tiveram gestações múltiplas também têm um risco maior de desenvolver a doença, conforme alguns estudos. O maior risco de CC em mulheres com elevado número de gestações poderia estar relacionado com a manutenção prolongada da zona de transformação na exo-cérvice ou a alterações hormonais, como níveis aumentados de estrogênio e progesterona (HILDESHEIN *et al.*,2001; CASTELLSAGUE e MUNOZ, 2003).

A infecção concomitante com outros agentes infecciosos como o vírus da Imunodeficiência humana (HIV), ou o vírus do herpes simples tipo II (HSV-2) e as bactérias *Chlamydia trachomatis* (CT) e *Neisseria gonorrhoeae* (NG) também foram

relacionados ao aumento do risco ao CC. O HSV-2, a CT e a NG causariam uma reação inflamatória gerando a produção de radicais livres e levando ao desenvolvimento de instabilidade genética, e o HIV estaria relacionado ao estado de imunossupressão, o que reforça a importância de co-fatores imunológicos do hospedeiro na carcinogênese pelo HPV (SMITH et. al., 2002; WHO, 2010).

O início precoce da atividade sexual, a história de múltiplos parceiros e parceiros de alto risco (homens cuja parceira anterior apresentava carcinoma de colo uterino ou homens com carcinoma de pênis) também são fatores de risco conhecidos para o CC (MUÑOZ *et al.,* 2002).

Além disso, o baixo nível sócio-econômico também tem sido relacionado como um fator de risco ao CC, uma vez que muitas mulheres não têm acesso adequado aos serviços de saúde. Tais mulheres também podem apresentar subnutrição o que poderia aumentar o risco do desenvolvimento de CC. Mulheres com dieta pobre em vitamina A e C podem ter um risco maior de desenvolver CC assim como mulheres obesas (HERRERO *et al.*, 1991). Há estudos que também demonstram um provável efeito protetor contra a neoplasia cervical do folato, retinol, vitamina E, carotenóides e vitamina B12 (IARC, 2005).

A susceptibilidade genética também teria grande impacto no CC, sendo que as mulheres com histórico familiar (mães ou irmãs que tiveram CC) são mais sujeitas ao desenvolvimento da doença, sendo essa uma condição herdada, que levaria a uma menor capacidade dessas mulheres em combater a infecção por HPV. Estudos epidemiológicos genéticos mostraram que genes contribuem significativamente ao risco da doença (MAGNUSSON e GYLLENSTEN, 2000).

2.3 VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO – HPV

Em meados do século XVI, o físico e anatomista italiano Fallopius introduziu o termo *Condylomata accuminata* (condiloma acuminado ou verrugas genitais externas) para um melhor diagnóstico diferencial em comparação com lesões planas causadas pela sífilis (STUBENRAUCH e IFTNER, 2009). Com o auxílio da microscopia eletrônica foram demonstradas partículas virais em verrugas da pele, em 1950, e em verrugas genitais, em 1968.

Os *HPV*s eram classificados como pertencentes à família *Papovaviridae* e subfamília *Papillomavirus*, mas nos últimos anos foram reconhecidos como uma família própria: *Papillomaviridae*, sendo, portanto, o HPV pertencente à família *Papillomaviridae* e ao gênero *Papillomavirus* (DE VILLIERS, 2004).

Originalmente os *HPV*s eram classificados em tipos cutâneos ou tipos mucosos, porém, essa classificação, além de simples, era incorreta em alguns casos. (PRENDIVILLE e DAVIES, 2004; LETO *et al.*, 2011)

Dos mais de 200 *HPVs* reconhecidos, classificados em tipos, subtipos e variantes com base em homologia de DNA, aproximadamente 40 tipos infectam a área genital, pertencentes ao gênero alfa, cerca de 16 tipos têm potencial oncogênico (GARLAND, 2002). Os tipos 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 50, 51, 52, 53, 56, 55, 56, 58, 59, 60, 64, 68 e 73 são oncogênicos, (MOTOYAMA, *et al.*, 2004), mas há divergências entre os trabalhos quanto a alguns tipos oncogênicos, como os tipos 50, 52, 60, 64 e 66. Os tipos oncogênicos de alto risco prevalentes mundialmente são 16, 18, 31, 45 e 56 (MUÑOZ *et al.,* 2002; STUBENRAUCH e IFTNER, 2009).

Enquanto os tipos associados com epidermodisplasia verrucosiforme cutânea, pertencentes ao gênero beta são classificados como tipos de baixo risco causadores de verrugas genitais externas (condiloma acuminado) e lesões benignas (HPVs 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81).Existem ainda tipos de risco indeterminado (DE VILLIERS *et al.,* 2004; PRENDIVILLE e DAVIES, 2004).

Os *HPVs* possuem um capsídeo icosaédrico (poliedro constituído por 20 faces de triângulos eqüiláteros), com cerca de 50 a 55nm de diâmetro, como estrutura mais externa, ou seja, não possuem envelope (SPPV, 2009) (Figura 5). O capsídeo do vírus *HPV* possui 72 capsômeros formados por duas proteínas estruturais, L1 e L2, sendo a primeira correspondente a 90% do conteúdo protéico do vírus. Os capsômeros protéicos revestem o DNA dupla fita, circular, que contém cerca de 8000 pares de bases (SPPV, 2009).

Entre 1980 e 1982, Zur Hausen e colaboradores isolaram e caracterizaram dois tipos diferentes de DNA do vírus *HPV* de verrugas genitais e posteriormente, em 1983 e 1984, o grupo de Zur Hausen iniciou a clonagem e caracterização do DNA dos vírus HPV 16 e 18 provenientes de biopsias do câncer cervical e das lesões precursoras do câncer anogenital (ZUR HAUSEN, 2008).

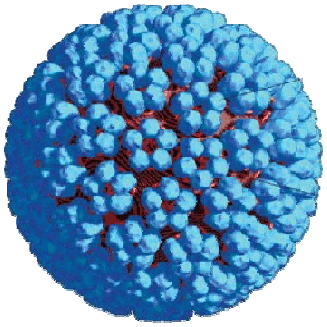


Figura 5– Estrutura externa do vírus HPV, mostrando o capsídeo icosaédrico constituído por 72 capsômeros. FONTE: SPPV, 2009.

A organização relativa de 8 a 10 ORFs (*open reading frames* ou matriz aberta de leitura) dentro do genoma de 8kpb é a mesma em todos os tipos de HPVs, e uma característica particular do vírus é que as ORFs, parcialmente sobrepostas, são dispostas em apenas uma fita do DNA (PRENDIVILLE e DAVIES, 2004). O DNA viral é ligado a histonas (derivadas do *pool* celular do hospedeiro natural) e condensado em nucleossomos (GIRI e DANOS, 1986).

O genoma do HPV divide-se em três regiões: região de proteínas precoces (E), região de proteínas tardias (L) e região de longo controle (LCR), sem potencial codificante, que incluem promotores e seqüências reguladoras (FIGURA 6) (PRENDIVILLE e DAVIES, 2004;VON LINSINGEN, 2008).

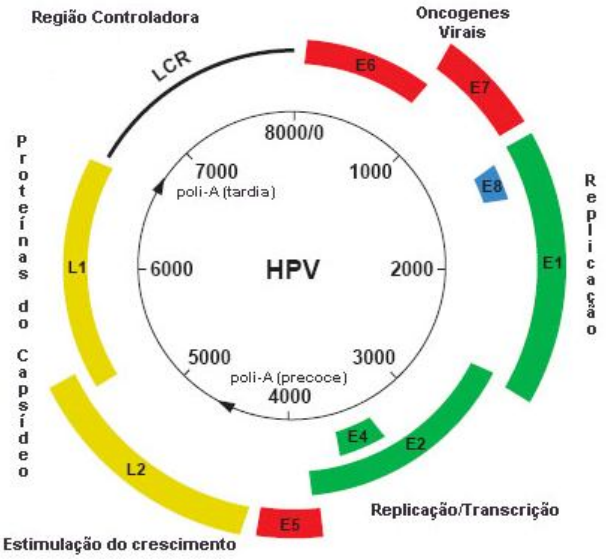


Figura 6 – Organização genômica do vírus do papiloma humano.
FONTE: PRENDIVILLE e DAVIES, 2004. Adaptado

A região E possui de sete a oito genes (*E1* – *E8*). O produto do gene *E1* é envolvido com a replicação viral, com o controle da transcrição gênica, além de ter função de helicase. Essa proteína é similar entre todos os tipos virais. O produto do gene *E2* é um fator transcricional viral, essencial para a replicação viral e controle transcricional, além de promover a segregação do genoma e o encapsulamento. A proteína codificada pelo gene *E4* faz interação com proteínas do citoesqueleto (citoqueratina), e é responsável pela montagem e liberação do vírus. Os genes *E5*, *E6* e *E7* codificam proteínas envolvidas com a estimulação da proliferação celular, imortalização e transformação da célula, através da interação com proteínas celulares. Os genes *E3* e *E8* codificam produtos sem função conhecida, estando presentes apenas em uma minoria dos HPVs. Em 2004, foi descrita uma nova proteína E2, a qual consiste na fusão do produto formado pela pequena ORF E8 com parte da proteína E2. Essa fusão protéica é capaz de reprimir a replicação e a transcrição do DNA viral e, portanto, acredita-se que ela desempenha o papel principal na manutenção da latência viral observada nas células basais do epitélio infectado. A região L contém dois genes: *L1*, o qual codifica a principal proteína do capsídeo e *L2*, que codifica a proteína secundária que compõe o capsídeo. A região LCR, formada por 500 a 1000pb, é formada pela origem de replicação e outras

regiões reguladoras, as quais contêm elementos *cis* que regulam a expressão gênica, a replicação e o empacotamento de partículas virais (PRENDIVILLE e DAVIES, 2004; VON LINSINGEN, 2008).

Os vírus *HPV*s descritos são classificados em tipos, subtipos ou variantes com base na homologia do seu DNA. Um novo genótipo é definido quando possui menos de 90% de homologia com a seqüência nucleotídica de L1, após o seqüenciamento completo do genoma. Os subtipos são definidos quando apresentam entre dois e 10% de divergência com a seqüência nucleotídica de L1, enquanto as variantes apresentam menos de 2% de divergência (BERNARD*et al.*, 1994).

2.3.1 Infecção por HPV

O *HPV* é transmitido de uma pessoa para outra através do contato sexual com a pele da região afetada, não sendo necessário o contato com fluidos corporais. A infecção por *HPV* pode envolver áreas que não são facilmente cobertas por preservativos ou que o uso não ofereça proteção contra a infecção (CANCER RESERCH UK., 2008). A maioria dos casos de infecção por HPV é assintomática, no entanto as lesões podem surgir em um período de 3 semanas a 8 meses, após a infecção, sendo a média de 3 meses após a infecção.

Os *HPVs* podem causar verrugas ou papilomas, os quais são tumores benignos, em várias partes do corpo, como mãos, pés, língua e lábio. Os que ocorrem nas regiões genitais feminina e masculina e na região anal são denominados condiloma acuminado e são causados em sua maioria pelos HPVs 6 e 11. Esses raramente estão relacionados ao CC e são classificados como de baixo risco (BRASIL. Ministério da Saúde, 2010).

Membros da família HPV podem ser detectados em toda a rede de tumores cervicais. Estudos mostraram a presença do HPV e todos os tumores cervicais testados (WALBOOMERS *et al.*, 1997, CANCER RESERCH UK., 2008). Os maiores riscos associados a infecção com os tipos 16 e 18 do HPV progredirão para a neoplasia cervical intraepitelial (CIN ou NIC). Entretanto, acredita-se que o câncer cervical não se desenvolverá sem a presença da persistência do DNA HPV e tem-se

proposto como a primeira evidência sempre identificada como “causa necessária” para o câncer. (BOSCH, *et al.*, 2002, CANCER RESERCH UK., 2008)

Analisando estudos de prevalência da infecção por HPV na população levou a conclusões que o HPV é mais comum em mulheres jovens que mulheres idosas, que o HPV é raramente detectado em mulheres que não tiveram atividade sexual anterior e que não existem aparentes diferenças geográficas quanto a prevalência do HPV. Estudos têm mostrado que um dos principais fatores de risco para NIC III em mulheres HPV positivo,são a idade precoce na primeira relação sexual, longa duração da relação sexual mais recente e tabagismo (CANCER RESERCH UK, 2008).

Segundo Brasil, Ministério da Saúde 2010 há certa variação na freqüência de determinados tipos do HPV no Brasil (Figura 7). Roteli-Martins e colaboradores em um estudo multicêntrico realizado em 2011 detectaram pelo menos um tipo de HPV de alto risco em mais de 26% das 3204 mulheres analisadas. Foram encontradas 25% de positividade para HPV de alto risco no Brasil, 16,9% no Canadá, e 19,1% nos Estados Unidos. O HPV 16 foi o mais prevalente (5.2%), seguido pelos tipos 51 (3,3%), 52 (3,3%), 31 (2,9%), 66 (2,3%), e 39 (2,0%).

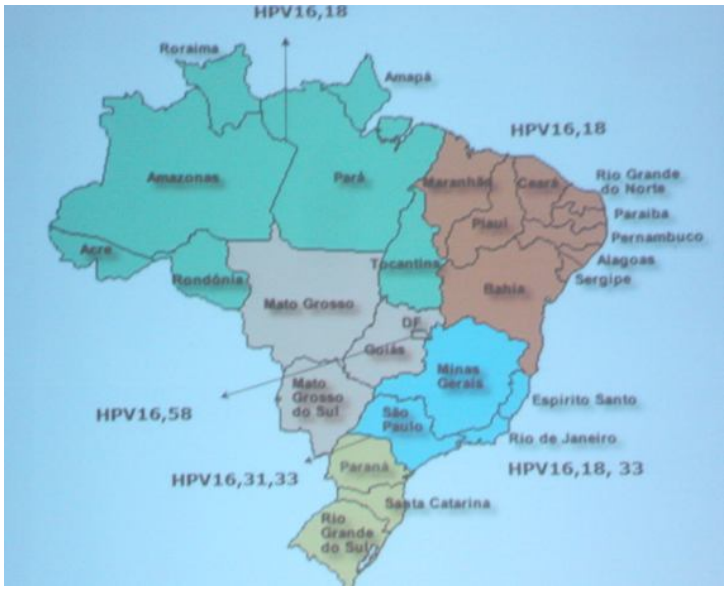


Figura 7 – Tipos mais frequentes do HPV nas regiões do brasil.

FONTE: ANA RAMALHO - INCA (ABRIL 2010). Adaptado

A infecção por *HPV* tem um padrão transitório, sendo que a maioria das mulheres infectadas pelos tipos de *HPV* causadores de CC não desenvolve a doença (70% a 90%). Geralmente, a infecção desaparece sem nenhum tratamento e o vírus é eliminado devido à ação do sistema imune, em um período de 12 a 24 meses, após o diagnóstico inicial (HO *et al.*, 1998).

Após a infecção pelo *HPV* a sucessão dos eventos moleculares biológicos pode seguir diferentes vias, podendo resultar na eliminação completa do vírus no desenvolvimento de lesões precursoras e do CC. Se o vírus não é eliminado pelo organismo, ele pode desencadear anormalidades nucleares primárias, incluindo a tetraploidização, que levam à formação de Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau I (NIC I), em um prazo médio de dois a cinco anos após a infecção por *HPV*. A NIC I pode regredir espontaneamente, ou, quando ocorre o desenvolvimento de clones celulares aneuplóides, progredir para Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau II e III (NIC II ou NIC III), em um prazo médio de quatro a cinco anos após a infecção. Na maioria dos casos, se a NIC II e/ou NIC III não forem devidamente tratadas persistirão no organismo podendo resultar em câncer invasivo, quando os clones celulares com propriedades invasivas possuírem vantagem de crescimento. A progressão de NIC I para NIC II e NIC III, a persistência de NICs e o desenvolvimento do câncer podem ser influenciados por co-fatores, ainda não claramente definidos (Figura 8) (SOUTHERN e HERRINGTON, 1998).

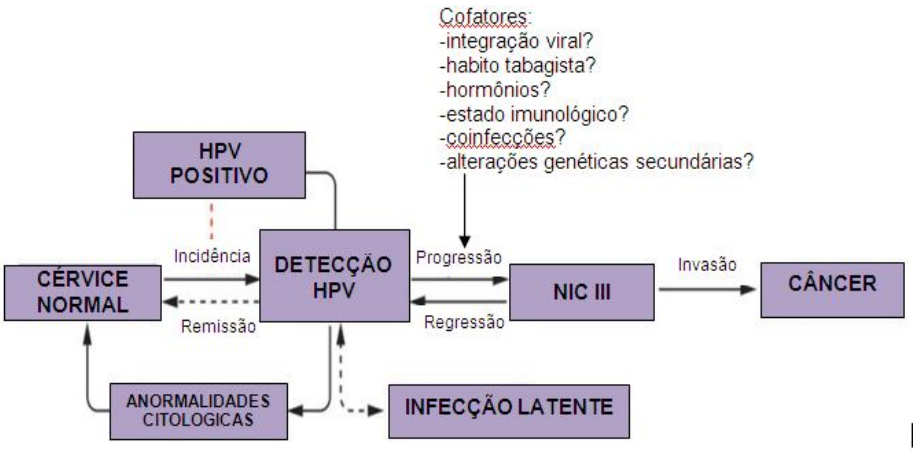


Figura 8 - Modelo de história natural do HPV e CC. Após a detecção de alterações citológicas suaves deve haver a confirmação da infecção. Apenas a minoria das infecções persiste podendo progredir para uma lesão pré-câncer (NIC III). FONTE: FRANCO *et al.*, 1999; BOSCH *et al.*, 2008; GRAVITT *et al.*, 2011 (com modificações) .

A infecção pelo *HPV* pode ser transiente ou persistente. Quando o vírus não tem a capacidade de permanecer no hospedeiro por muito tempo, como ocorre para a maioria dos *HPVs*, mesmo para os tipos considerados de alto risco, a infecção é denominada transiente. Já a infecção persistente, incidente em 10% a 30% dos casos, é definida como quando ocorre a detecção do mesmo tipo de HPV duas ou mais vezes, em avaliações periódicas em um intervalo de até dois anos. O CC pode ser detectado em uma média de nove a 15 anos após a infecção persistente (KOUTSKZ *et al.*, 1997; GRAVITT, 2011).

Gravitt, 2011, descreveu após mensurações em intervalos de quatro, seis e 12 meses feitas através de células cervicais esfoliadas (Papanicolaou), que transições múltiplas entre os estágios de ausência e progressão do CC podem facilitar o entendimento da história natural do CC (Figura 9), assumindo o HPV 16 como exemplo.

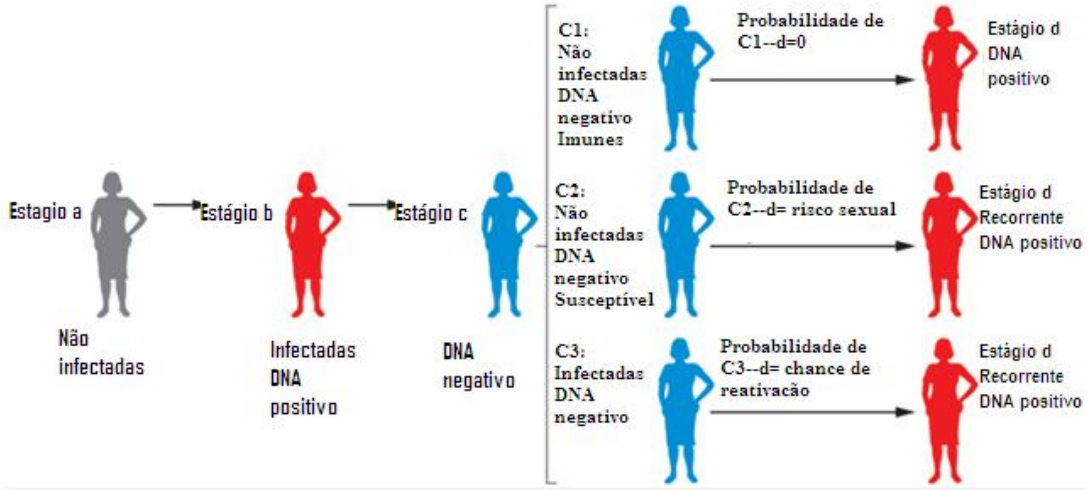


Figura 9 - Estágios de progressão do vírus HPV em mulheres.
FONTE: Trottier, 2010 e Gravitt, 2011. Adaptado

No estágio (a), as mulheres não têm atividade sexual e não infectadas por HPV. A transição (a) para (b) acontece em mulheres sexualmente ativas, cujo risco de exposição ao vírus é o mais comum (30%) após 24 meses de início sexual.

Do estágio (b) para (c), 90% das mulheres apresentam DNA negativo após dois anos da detecção inicial, é a fase de maior incidência e eliminação do HPV. No estágio (c) as mulheres são consideradas “limpas”, de acordo com a detecção primária, mas considerando alguns fatores como imunidade natural contra re-

infecção e latência podem apresentar três estados independentes: (c1) para mulheres com infecção previa e DNA HPV negativo (imunes); (c2)para mulheres DNA HPV negativo susceptíveis à re-infecção e (c3), infectadas com testes de DNA HPV negativo (sujeitas à re-infecção). A transição do estágio (c) para (d) depende individualmente de cada subgrupo: (c1) para (d): hipótese de imunidade natural; (c2) para (d): risco sexual natural; (c3) para (d): DNA positivo, gatilhos de reativação descaracterizados, memória imunológica comprometida (TROTTIER, 2010 e GRAVITT, 2011).

2.3.2 Neoplasias Intraepitelial Cervical – NIC

Uma vez estabelecida a infecção pelo *HPV*, o CC é uma doença crônica, que pode se desenvolver a partir de mudanças intraepiteliais que podem, posteriormente, transformar-se em um processo invasor. As lesões cervicais precursoras do CC apresentam-se em diferentes graus evolutivos, do ponto de vista cito-histopatológico.

Lesões pré-cancerígenas são definidas biologicamente como lesões que possuem, em princípio, uma capacidade de progredir potencialmente para um CC invasivo, se não tratadas. Essas lesões são fortemente associadas a mudanças morfológicas das células e aos tipos específicos de alto risco do *HPV*. A expressão contínua de oncoproteínas derivadas do *HPV*, como E6 e E7, resulta em uma proliferação celular não regulada. Fenotipicamente, os pré-cânceres são caracterizados pela presença de DNA de *HPV* de alto risco e por instabilidade cromossômica a qual resulta em aneuploidias. O conceito de que o carcinoma invasivo de células escamosas da cérvice aparece a partir de uma lesão intraepitelial precursora foi registrado há mais de um século, com base na identificação de lesões intraepiteliais imediatamente adjacentes e com similaridades morfológicas dos CC invasivos (IARC, 2005).

Os *HPVs* de alto risco são detectados em 50% a 80% das lesões de alto grau (NIC II e NIC III) e em 99,7% dos casos de câncer invasor do colo uterino (WALBOOMERS *et al.*, 1999; PRENDIVILLE e DAVIES, 2004).

Em 1988, o sistema de classificação citológica conhecido como classificação de Bethesda foi desenvolvido. Neste sistema a NIC de grau I é denominada lesão escamosa intra-epitelial de baixo grau (LSIL) e as NICs II e III são classificadas

como lesão escamosa intraepitelial de alto grau (HSIL). As células escamosas atípicas de significância indeterminada são classificadas como ASCUS. Durante o XVII Congresso Brasileiro de Citopatologia em 2002, a nomenclatura em citopatologia ginecológica foi atualizada (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CITOPATOLOGIA (SBC), 2009. WHO/ICO, 2010) e as alterações celulares epiteliais cervicais classificadas em: lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL) (compreendendo efeito citopático pelo HPV e neoplasia intraepitelial cervical grau I); lesão intra-epitelial de alto grau (HSIL) (compreendendo neoplasias intraepiteliais cervicais grau II e III); lesão intra-epitelial de alto grau, não podendo excluir invasão; e carcinoma epidermóide invasor. Nesse trabalho os termos NIC I, NIC II e NIC III serão utilizados para designar as lesões precursoras do CC.

O carcinoma invasor de colo uterino, em cerca de 90% dos casos, evolui a partir da NIC, mas nem toda NIC progride para um processo invasor, porém todas as NICs devem ser consideradas lesões significativas e como tal devem ser acompanhadas e, quando indicado, tratadas (BRASIL. Ministério da Saúde, 2010).

O pré-câncer é o precursor intraepitelial do câncer invasivo, sendo equivalente ao diagnóstico histológico de NIC III. NIC III e CC são caracterizados por aneuploidias e a instabilidade genética avançada, e estudos *in vitro* demonstram que essas seriam conseqüências da expressão inapropriada dos oncogenes virais E6 e E7 com ativação da telomerase e amplificação centrossomal. Embora a regressão de lesões NIC III seja teoricamente possível, esta tendência não é observada em curto prazo e estudos observacionais destas lesões não seriam éticos (MOSCICKI *et al.*, 2006). Nota-se, portanto, que nos casos de NIC II, onde o nível de anormalidade não é suficiente para prever o risco de progressão a NIC III e CC, e nos quais não é ético o seguimento em longo prazo, há a necessidade de um outro fator preditivo de risco de CC para auxiliar no delineamento de uma abordagem terapêutica mais precisa.

2.3.3 Patogênese e Efeito Oncogênico

A cérvice uterina possui forma cilíndrica e constitui o terço inferior do útero que se estende até a vagina. Ele possui uma abertura central que se abre no canal

endocervical o qual possui comunicação com a cavidade uterina (IARC, 2005) (Figura 10).

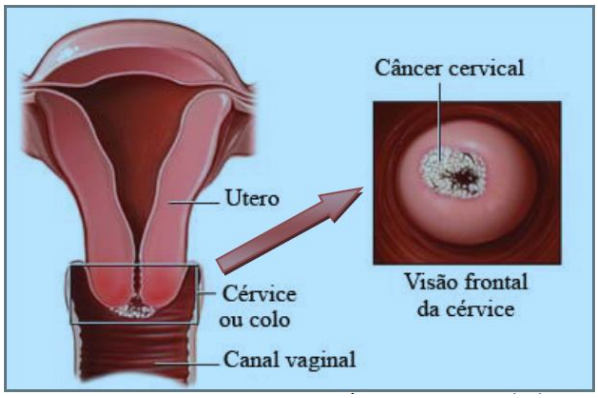


Figura 10 - Localização do colo uterino e representação do câncer cervical.

FONTE: Nucleus Medical Media.

O epitélio cervical é derivado de duas fontes embriológicas distintas. A região da cérvice que se projeta na vagina, denominada ectocérvice, é recoberta por um epitélio escamoso estratificado não queratinizado, semelhante ao encontrado na vagina, sendo esse epitélio derivado da cavidade urogenital. O canal endocervical é coberto por células colunares secretadoras de muco de origem Mülleriana. A junção entre os dois epitélios é denominada junção escamocolunar, não fixada anatomicamente, e que migra após a puberdade da periferia do ectocérvice em direção ao endocérvice, por um processo denominado metaplasia escamosa, no qual o epitélio colunar do tipo endocervical é substituído por um epitélio escamoso estratificado, sendo essa região de transformação denominada Zona de Transformação. A área metaplásica adjacente a junção escamocolunar retraída possui, por razões desconhecidas, uma susceptibilidade única a transformação neoplásica induzida por *HPV*, sendo nelas onde a maioria dos carcinomas de células escamosas da cérvice se desenvolve (IARC, 2005).

Devido à escoriação ou microlesões na superfície mucocutânea, o vírus *HPV* infecta a camada de células basais do epitélio escamoso estratificado da cérvice uterino. Essas células originam-se na camada basal desse epitélio e constituem as células germinativas responsáveis pela divisão celular e pela manutenção do mecanismo de substituição das células superficiais que descamam. As células basais expressam duas moléculas das famílias das integrinas, α6β1 e α6β4,

identificadas como os receptores do *HPV* (FRAZER e TINDLE, 1992; EVANDER *et al.*, 1997).

O *HPV* mostra um rigoroso tropismo por tecidos epiteliais. Nos tumores benignos, a propagação do vírus frequentemente causa um efeito citopatológico sobre o epitélio infectado, no entanto, a proliferação do vírus não desencadeia processos inflamatórios ou necrose celular, uma vez que a infecção, geralmente, não é detectada de forma eficiente pelo sistema imunológico (STUBENRAUCH e IFTNER, 2009).

Uma célula infectada persistentemente por HPV de alto risco sofre contínuas divisões celulares e não interrompem a proliferação celular em resposta aos danos no DNA (PRENDIVILLE e DAVIES, 2004).

Os genes virais *E1* e *E2* são os responsáveis pela replicação do DNA viral, a qual ocorre nas células das camadas basais epiteliais, onde permanecem em múltiplas cópias estáveis, garantindo a persistência nas células do epitélio proliferativo (HO *et al.*, 1998; LOWY e HOWLEY, 2001).

As proteínas E6 e E7 são as oncoproteínas virais mais importantes. A ocorrência da transcrição dos genes *E6* e *E7* é continuamente observada em carcinomas cervical, sendo esse o primeiro indício de um importante papel desses genes na tumorigênese associada ao HPV (PRENDIVILLE e DAVIES, 2004).

O efeito oncogênico do *HPV* nas células é exercido através de duas oncoproteínas virais precoces E6 e E7 e parte de E5 dos *HPVs* de alto risco. As células infectadas tornam-se geneticamente instáveis devido à interferência das oncoproteínas virais em diversos mecanismos celulares, como o reparo do DNA, o controle do ciclo celular, o fuso mitótico, a apoptose ou a estabilização dos telômeros. As oncoproteínas virais E6 e E7 são essenciais na indução e manutenção da transformação celular devido a sua interferência com o controle do ciclo celular e apoptose (INCASSATI, *et al.*, 2006). Estas oncoproteínas ligam-se a sítios específicos nas proteínas p53, produto do gene *TP53* (*tumor protein p53*) (WERNESS, *et al.*, 1990) e pRb, produto do gene *RB1* (retinoblastoma 1) (DYSON *et al.*, 1989) levando a alterações no ciclo celular, com proliferação celular anormal. Um esquema simplificado demonstrando um mecanismo de carcinogênese devido ao HPV é demonstrado na figura 11.

A passagem das diferentes fases do ciclo celular ocorre através do aumento da concentração de proteínas intracelulares, as ciclinas, as quais são ativadas

apenas quando formam um complexo com quinases celulares. Além disso, existem grandes proteínas reguladoras, que monitoram tanto a fase tardia G1 em fase de síntese de DNA (fase S), bem como o início da Mitose. Os membros da família RB controlam as principais transições G1-S no ciclo celular. Sem agrupamentos fosfato há bloqueio do ciclo celular na fase G1 por determinados fatores de transcrição, da família E2F, que é responsável pelo início da fase S (STUBENRAUCH e IFTNER, 2009).

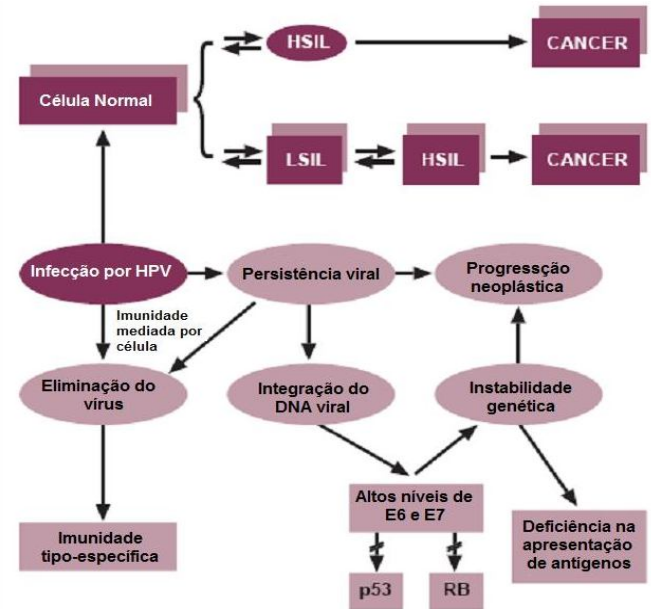


Figura 11 – Mecanismo da carcinogênese por HPV

FONTE: PRENDIVILLE e DAVIES, 2004. Adaptado
NOTA: HSIL: lesões intraepitelial escamosa de alto risco (NIC II e NIC III); LSIL: lesões intraepitelial escamosa de baixo risco (NIC I).

A ORF E6 codifica uma pequena proteína de aproximadamente 150 aminoácidos e peso molecular de 16-18kD. A proteína E6 dos tipos anogenital de alto risco apresentam apenas um fraco potencial oncogênico na maioria das linhagens celulares estabelecidas e uma cooperação com a proteína E7 é requerida para uma capacidade completa de transformação e imortalização celular (PRENDIVILLE e DAVIES, 2004).

O mecanismo de ação da proteína E6 é a inibição da função da proteína p53, uma proteína supressora de tumor, aumentando a sua degradação através da via da ubiquitina. A atividade supressora tumoral de p53, que normalmente levaria a célula

alterada à apoptose, é perdida quando há a ligação da oncoproteína E6 ao complexo protéico denominado proteína ligase associada à E6 (E6AP), um membro da família E3 de ubiquitinas ligases, que somente liga-se à p53 quando esta está associada à E6 (WERNESS,*et al.*; THOMAS e BANKS 1999; HENGSTERMANN *et al.*, 2001; MANTOVANI e BANKS, 2001). A maioria das proteínas E6 dos HPVs de baixo risco não se liga à proteína p53, e nenhuma delas induz a sua degradação (PRENDIVILLE e DAVIES, 2004).

Como conseqüência da infecção pelo *HPV* pode haver, portanto, uma permanente proliferação das células devido ao defeito na função de p53. Essa interferência em p53 faz com que essa proteína passe a não mais possuir a capacidade de responder aos danos no DNA através de uma interrupção no ciclo celular ou com o desencadeamento de morte celular programada (apoptose) (STUBENRAUCH e IFTNER, 2009).

A oncoproteína E7 é uma pequena fosfoproteína nuclear, de aproximadamente 100 aminoácidos e peso molecular de 10kD. O gene *E7* é o principal oncogene transformante dos HPVs, agindo através da ligação de seu produto protéico com proteínas da família supressora tumoral pRb, que, pela interação com a família E2F dos fatores transcricionais, controla a replicação celular (BOYER, WAZER e BAND, 1996). Essa interação induz múltiplas respostas celulares, incluindo mecanismos que estabilizam p53, a qual, portanto, não controla a proliferação celular (PRENDIVILLE e DAVIES, 2004).

O gene do retinoblastoma (*RB1*) é um importante gene supressor tumoral que está deletado ou mutado em muitas linhagens celulares tumorais. O produto do gene *RB1*, a proteína pRb e os membros de sua família, p107 e p130 são alvos da oncoproteína *HPV* E7 (KLINGELHUTZ *et al.*, 1996).

2.4 RESPOSTA IMUNE CONTRA O HPV

Os vírus são microorganismos que obrigatoriamente infectam as células através de várias moléculas da superfície celular e de outros receptores (GONÇALVES e GONADI, 2004).

O epitélio é uma interface entre o vírus e o ambiente, e o vírus e o sistema imune. Existe uma imunidade local natural na cérvice contra vírus e bactérias. Na

região cervicovaginal há bacilos de Doderlein, naturais da vagina, que secretam ácido lático, abaixando o pH da vagina, promovendo um microambiente ácido, que também dificulta infecções. Além disso, as células epiteliais secretam defensinas, que são peptídeos com atividade antibacteriana e antiviral que são drenados através do muco cervicovaginal (HO *et al.*, 1998).

Quando a imunidade local não é suficiente para impedir a infecção por *HPV*, o vírus infecta as células basais, tendo como alvo as células tronco. A expressão de altos níveis de proteínas virais ocorre apenas nas camadas superficiais do epitélio escamoso. O tempo desde a infecção até a liberação do vírus é de aproximadamente três semanas (que é o tempo que um queratinócito da camada basal completa a sua diferenciação e sofre descamação naturalmente), e esse período é denominado período de incubação (ORIEL, 1971; MIDDLETON *et al.*, 2003). Sabe-se que a vigilância imune sistêmica e local pode explicar a latência da infecção por *HPV* genital (GONÇALVES e DONADI, 2004).

Embora a resposta imune contra o *HPV* não esteja totalmente compreendida, há evidências de que a resposta imune humoral ou celular do hospedeiro é responsável pela progressão da infecção pelo HPV (SCOTT, STITES e MOSCICKI, 1999), uma vez que a vigilância imunológica afeta a susceptibilidade a lesões relacionadas ao *HPV* e a sua regressão (WU, COLEMAN e HIGGINS, 1994).

O grupo de fatores da imunidade local natural, na presença de uma infecção viral, ativa uma resposta imune específica e adaptativa (HO *et al.*, 1998), que leva à secreção de citocinas, principalmente de TNFα. A interação de citocinas/quimiocinas liberadas durante a reação imune humoral/celular é responsável pela regressão, persistência ou progressão das lesões associadas ao *HPV* (GONÇALVES e DONADI, 2004).

O trato genital feminino possui poucos folículos linfóides, os quais são as unidades ativas do lado indutor envolvido na resposta imune do tecido linfóide associado a mucosas (PARR e PARR, 1996). Sendo assim, o tecido linfóide associado à mucosa tem como principais vias indutoras no trato genital feminino as Células de Langerhans (CL), são células dendríticas presentes no epitélio e na mucosa, macrófagos e formações linfóides no córion (GRESLIN, MOUGIN e SEILLES, 1998). Essas células, que se encontram em maior concentração no epitélio da mucosa cervical que na vagina, participam ativamente na apresentação de antígenos, através da expressão de moléculas do complexo principal de

histocompatibilidade de classe II (*MHC* II), e de classe I (*MHC* I), ativando, assim, linfócitos TCD4+ e TCD8+ (GRESLIN, MOUGIN e SEILLES, 1998).

Apesar da importância das CL ser conhecida no sistema imunológico local, há controvérsias a respeito de como essas células são afetadas pelo *HPV*. Enquanto alguns estudos mostram um aumento do número de CL com a infecção por *HPV*, outros estudos mostram o contrário. Possivelmente, diferentes tipos de HPV causam diferentes efeitos citopáticos (GONÇALVES e DONADI, 2004).

Os queratinócitos do epitélio cervical tem o potencial de apresentar peptídeos virais, uma vez que o *HPV* multiplica-se dentro dessas células sem causar a sua lise. Eles também expressam moléculas *MHC*-II, entretanto, apenas sob indução principalmente do INF-γ, e não constitutivamente. Essas células apresentam antígenos também através de moléculas *HLA*-I, uma vez que o *HPV* multiplica-se dentro dessas células. Sendo assim os queratinócitos também gerariam uma fonte de citocinas, e induziriam resposta imune pelas células T (GONÇALVES e DONADI, 2004).

Existe uma polarização da resposta imune para o tipo Th2, em mulheres infectadas por *HPV* com lesões de alto risco, sendo que esse desequilíbrio pode ter origem genética (induzido por *HLA*), adquirido (devido à imunodeficiência adquirida) ou pela oncogenicidade do tipo de *HPV* encontrado (SCOTT, STITES e MOSCICKI, 1999).

Muitos estudos mostram que o HPV diminui a produção de TNFα, que é uma citocina pró-inflamatória. Como há diminuição de TNFα, a capacidade de apresentação de antígenos das APCs diminui (MAJEWSKI, MALEJCZYK e JABLONSKA, 1996).

Além das células citadas acima, populações de monócitos e macrófagos também foram encontradas na mucosa do trato uterino. Em tecidos não afetados há um maior número de macrófagos em relação ao número de CL, ao contrário do que ocorre em tecidos afetados. Os macrófagos teriam uma participação indireta no controle negativo da transcrição dos genes das oncoproteínas E6 e E7, além de funções antitumorais em células infectadas por *HPV* e transformadas (BANKS *et al.*, 1991).

As células NK também são importantes na infecção por HPV, uma vez que a quantidade dessas células aumenta em displasias mais severas. Os interferons de tipo I, interferon-α e interferon-β são sintetizados pelas células infectadas e têm

atividade antiviral, antiproliferativa, antiangiogênica e propriedades imunoestimulatórias que ativam as células dendríticas imaturas (THEOFILOPOULOS *et al.*, 2005). O TNF é sintetizado por macrófagos e linfócitos T e possui uma forte atividade antitumoral e antiviral. O TGFβ inibe a proliferação celular, principalmente daquelas infectadas pelo vírus; a IL-2, do tipo TH1 é muito importante na imunidade celular e são necessárias para respostas efetivas no caso de patógenos intracelulares, como vírus (VIEIRA *et al.*, 1996; KIM *et al.* e UM *et al.*, 2000; BOCCARDO *et al.*, 2010).

Quando a infecção é por *HPV*, mesmo que as proteínas virais E6 e E7 sejam fortemente expressas, os linfócitos T citotóxicos (CTLs) parecem não reconhecê-los. Isso deve ocorrer como um resultado da deficiência de apresentar epítopos virais durante o longo período de latência entre o início da infecção e o aparecimento do câncer. Portanto, a atividade das moléculas do MHC parece ser um fator determinante na indução de uma resposta imune adaptativa.

Os vírus, assim como as células tumorais, são capazes de desenvolverem mecanismos para escaparem do sistema imune, como exemplo, a proteína E7 do HPV16 inibe a indução de genes ativados por INFα. Na infecção por *HPV* pode haver pouca ou nenhuma liberação de citocinas pró-inflamatórias, as quais são importantes para a ativação das células dendríticas locais (CL), sendo assim os sinais essenciais para desencadearem uma resposta imune no epitélio escamoso (KUPPER e FULBRIGGE, 2004; BOCCARDO *et al.*, 2010).

2.5 ESTRATÉGIAS DE PREVENÇÃO E RASTREAMENTO

O teste Papanicolaou ou citologia cervical (também conhecido como preventivo) constituiu-se na principal estratégia utilizada em programas de rastreamento voltados para o controle do câncer do colo do útero. O nome origina-se do médico grego, naturalizado americano Georgios Papanicolaou (1883-1962), considerado o pai da citopatologia. O exame consiste na coleta de material citológico do colo do útero, sendo coletada uma amostra da parte externa (ectocérvice) e outra da parte interna (endocérvice) (BRASIL. Ministério da Saúde, 2010).

Novos métodos de rastreamento como testes de detecção do DNA do *HPV* e inspeção visual do colo do útero são apontados em vários estudos como eficazes na

redução das taxas de mortalidade por câncer do colo do útero (BRASIL. Ministério da Saúde, 2011).

No Brasil, o exame citopatológico é a estratégia de rastreamento recomendada pelo Ministério da Saúde prioritariamente para mulheres de 25 a 59 anos, que tem ou já tiveram relação sexual. É estimado que uma redução de cerca de 80% da mortalidade por este câncer pode ser alcançada através do rastreamento de mulheres na faixa etária de 25 a 65 anos com o teste de Papanicolaou e tratamento das lesões precursoras com alto potencial de malignidade ou carcinoma *in situ*. A prevenção primária do câncer do colo do útero pode ser realizada através do uso de preservativos durante a relação sexual, embora o uso da camisinha não impeça totalmente a transmissão do vírus. Já a prevenção secundária seria através da realização do exame preventivo do câncer do colo do útero (BRASIL. Ministério da Saúde, 2011).

Em adição ao teste Papanicolaou, novas tecnologias tem sido desenvolvidas para a detecção precoce de neoplasias do colo de útero. Testes que rastreiam a presença de DNA do papilomavírus humano de alto risco (HPV AR) estão sendo empregados como estratégia de detecção e prevenção do CC. O diagnóstico molecular das infecções genitais por HPV se baseia principalmente pela detecção de ácidos nucléicos virais, devido às limitações em cultivar estes vírus e o diagnóstico sorológico.

Os testes moleculares permitem fazer a triagem das mulheres quanto à ausência ou presença de HPV AR. Os testes como captura híbrida (CH), *southern blot*, hibridização in situ, hibridização em fase sólida (*microarrays*) e reação em cadeia de polimerase (PCR), podem ser empregados na detecção de HPV AR, e alguns permitem a identificação do tipo específico de HPV AR presente no material cérvico vaginal (MONSONEGO, 2010).

No início dos anos 90 (1991 – 1993), foram desenvolvidas duas vacinas contra os tipos virais mais presentes no câncer de colo do útero (HPV-16 e HPV-18) (JAVIER e BUTEL, 2008). Em 2006, o *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o Gardasil (Merck & Co.), vacina desenvolvida para prevenir o CC, lesões pré-cancerosas e verrugas genitais. Essa vacina foi aprovada para o uso em mulheres entre a idade de 9 a 26 anos. Em 2009 a vacina bivalente Cervarix® foi licenciada, ela protege contra os tipos 16 e 18 do HPV (FDA, 2006; NICCOLAI *et al.*, 2011).

Mas o real impacto da vacinação contra o câncer de colo de útero só poderá ser observado após décadas. Há duas vacinas comercializadas no Brasil. Uma delas é a quadrivalente, ou seja, previne contra os tipos 16 e 18, presentes em 70% dos casos de câncer de colo do útero e contra os tipos 6 e 11 presentes em 90% dos casos de verrugas genitais. A outra é específica para os subtipos 16 e 18 (BRASIL. Ministério da Saúde, 2010).

As vacinas são baseadas em partículas semelhantes ao vírus, inicialmente pela inserção da ORF de L1 e L2 nos sistemas vetores da vacina, que resultam na formação de estruturas capsídicas vazias, que são purificadas e adicionadas em adjuvantes específicos, assim usados para a vacinação (ZUR HAUSEN, 2008).

A formação de anticorpos ocorre em quase 100% das pessoas vacinadas (ZUR HAUSEN, 2008). A idade recomendada para se tomar a vacina varia entre os países, mas é na faixa etária dos 9 aos 25 anos.

2.6 GENES CANDIDATOS À SUSCEPTIBILIDADE OU PROTEÇÃO AO DESENVOLVIMENTO DE NICs

Cada vez mais há um aumento de evidências de que os produtos gênicos do vírus *HPV* interferem com o controle do ciclo celular, levando ao acúmulo secundário de pequenas, e em grande escala, anormalidades genéticas. Isso pode explicar a associação entre a persistência viral com a progressão da lesão causada pelo vírus, mas, em muitas pacientes, os fatores secundários como a resposta imune, são evidentemente importantes (SOUTHERN e HERRINGTON, 1998).

A resposta imune celular é um importante mecanismo para a eliminação de infecções por *HPV* já estabelecidas. As células *NK* desempenham um importante papel na imunidade celular contra o *HPV*, induzindo apoptose em células infectadas pelo vírus e em células cancerosas. A atividade específica das células requer os receptores semelhantes a imunoglobulinas de células *NK* (*KIR*), os quais permitem essas células a distinguirem células normais das células infectadas por vírus ou de tumores (IARC, 2005; MARTIN *et al.*, 2010).

2.6.1 MHC e genesHLA

Inicialmente as proteínas do *MHC* foram identificadas como os principais antígenos reconhecidos durante o processo de rejeição a transplantes, que normalmente ocorre quando enxertos são transplantados entre indivíduos da mesma espécie (alo-enxerto) ou de espécies diferentes (xeno-enxerto).O *MHC* foi, então, identificado como uma região cromossômica, cujos genes codificam os produtos responsáveis pela rejeição de transplantes entre linhagens de camundongos endogâmicos.

Na década de 50, experimentos com transplante de pele entre camundongos de linhagens genéticas diferentes foram fundamentais para esclarecer o fenômeno da rejeição a enxertos decorrente do reconhecimento imune dirigido a aloantígenos, presentes na superfície das células transplantadas (ZINKERNAGEL e DOHERTY, 1979 *apud* ALBERTS *et al.,* 2002)

Os genes responsáveis pelo reconhecimento de aloantígenos presentes no enxerto foram denominados de genes de histocompatibilidade, termo que também passou a denominar os diferentes genes como também, a região cromossômica onde os mesmos estão conhecidos pela sigla MHC (McDEVITT, 2000).

Durante quase 20 anos após a descoberta do *MHC*, a principal característica atribuída aos genes *MHC*relacionava-se ao seu papel na rejeição a tecidos transplantados. No entanto, os transplantes,, não são processos naturais dos organismos e, portanto, não havia nenhuma razão óbvia para que esse conjunto de genes fosse preservado no processo evolutivo somente para atender essa suposta função.

Nas décadas de 60 e 70 do século XX, foi descoberto que os genes do *MHC* eram fundamentais para todas as respostas imunológicas contra antígenos protéicos, uma vez que codificam proteínas referidas também pela sigla MHC, com função de ligar e apresentar peptídeos derivados de proteínas estranhas e antigênicas (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

O *MHC*humano foi identificado em uma extensa região do braço curto do cromossomo 6 (6p213), constituído por genes altamente polialélicos e polimórficos (ABBAS e LICHTMAN, 2005). O termo polimorfismo refere-se à coexistência num mesmo loco gênico, de duas ou mais variantes alélicas na mesma população, sendo

que a variante mais comum tem uma freqüência de 0,99 ou menos. Como consequência, pelo menos 2% da população será heterozigota para esse lócus. Alelos com freqüência menor que 1% são considerados variantes “raros” enquanto aqueles com freqüência maior são denominados “polimórficos” (FORD, 1940).

O *MHC* recebe nomes distintos em diferentes espécies, como *H2* em camundongos, *RT1* em ratos, *ChLA* em chimpanzés, *RhLA* no macaco Rhesus, *BoLA* no gado doméstico, *B* em aves de criação, etc. (RAMMENSEE, BACHMANN e STEVANOVIĆ, 1997; ABBAS e LICHTMAN, 2005).

Os genes do *MHC* são expressos de forma co-dominante em cada indivíduo e são funcionalmente, estruturalmente e evolutivamente relacionados uns aos outros (RAMMENSEE, BACHMANN e STEVANOVIĆ, 1997). Até pouco tempo conhecia-se apenas a região de 3800 kb no braço curto do cromossomo 6 humano (Figura 12) ocupada pelos genes do *MHC,* de (RAMMENSEE, BACHMANN e STEVANOVIĆ, 1997, ABBAS e LICHTMAN, 2005), mas Bahram (2000) descreve a dispersão de genes relacionados ao *MHC-I* em outros cromossomos além do cromossomo 6.

Duas grandes famílias gênicas codificam dois diferentes tipos de proteínas MHC que são funcionalmente especializadas em exibir peptídeos antigênicos a linfócitos T $CD8^+$ (moléculas de classe I) ou a linfócitos T $CD4^+$ (moléculas *MHC* de classe II) (RAMMENSEE, BACHMANN e STEVANOVIĆ, 1997; ABBAS e LICHTMAN, 2005).

Cada proteína *MHC* apresenta uma importante estrutura funcional, uma fenda extracelular que liga os peptídeos antigênicos, seguida de domínios semelhantes a imunoglobulinas (Igs), e está ancorada na membrana celular por meio de domínios transmembrânicos e citoplasmáticos (McDEVITT, 2000). As duas classes de proteínas MHC diferem em estrutura e função. As proteínas *MHC* de classe I são expressas na maioria das células nucleadas de mamíferos, enquanto as de classe II são encontradas apenas em alguns poucos tipos celulares, dos quais os mais importantes são as células B, macrófagos, células dendríticas e epitélio tímico. Os domínios que formam a fenda de ligação são denominados domínios G (G para *groove ou fenda*).Os aminoácidos polimórficos das moléculas *MHC* estão localizados na fenda de ligação de peptídeos e próximos a ela (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

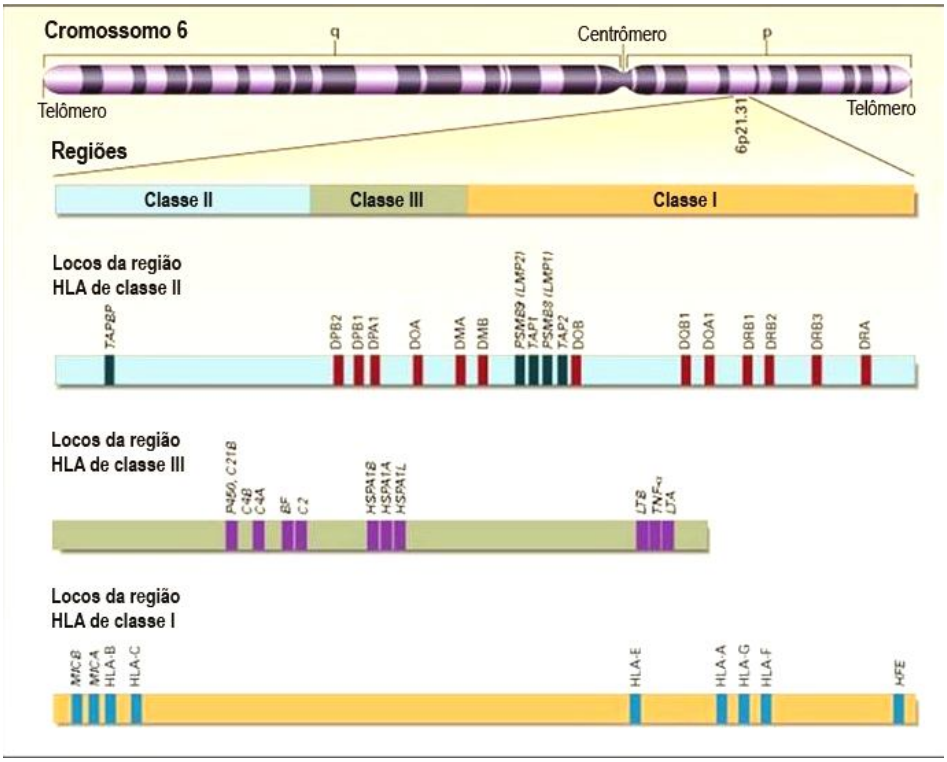


Figura 12 - Mapa do Complexo Principal de Histocompatibilidade (*MHC*) Humano. FONTE: Sociedad Latinoamericana De Gastroenterología Pediátrica, Hepatología Y Nutrición, 2006. Adaptado.

A resposta imune adaptativa pode ser estimulada pela interação entre peptídeos antigênicos ligados às moléculas *MHC* com o receptor de Linfócitos T (TCR) (TIENG *et al.*, 2002; ABBAS e LICHTMAN, 2005).

O conhecimento da especificidade alélica para certos peptídeos antigênicos pode ser aplicado em vários métodos de manipulação da resposta imune contra infecções, tumores malignos e transplantes, doenças auto-imunes e outros casos imunopatológicos (RAMMENSEE, BACHMANN e STEVANOVIĆ, 1997).

Variantes alélicas *HLA-I*têm sido reportadas como possível influência no CC e, a presença de alguns alelos *HLA-II* específicos podem ser decisivos na definição do risco de desenvolver o CC (SOUTHERN e HERRINGTON, 1998, MARTIN *et al.*, 2010). No caso do *HLA-A1* (MONTOYA *et al.*, 1998), *HLA-B44* (BONTKES*et al.*1998) e *HLA-B7* (DUGGAN-KEEN *et al.,* 1996), associações negativas foram descritas com os mesmos.Além disso, tem sido reportada a existência de variantes do *HPV*-16 com mutações em E6, que afetam os motivos de ligação ao peptídeo nas

moléculas *HLA-A2* e *HLA-B7*, sugerindo que a ausência de epítopos restritos a CD8, permite ao vírus escapar da resposta imune e da imunovigilância(ELLIS *et al.*, 1995).

Alterações nos domínios ou módulos funcionais das proteínas *HLA-I* podem causar uma diminuição da sua afinidade de ligar e apresentar peptídeos virais o que contribuiria para a persistência do HPV no hospedeiro. Além disso, as citocinas TNFα, LTα e IFN-γ, importantes moduladoras da resposta inflamatória, e que participam na imunidade contra o *HPV*, podem aumentar a expressão de moléculas *HLA* de classe I de superfície celular de células endoteliais (JOHNSONS e POBER; 1990), o que poderia influenciar também na eficiência da resposta imune dirigida ao vírus.

Alguns receptores de células NK especialmente da família KIR(do inglês: *Killer cell Immunoglobulin-like Receptors*: receptores tipo imunoglobulina das células natural killer) ligam-se a alótipos presentes nas moléculas HLA-Iconstituindo outra estratégia de imunovigilância mediada por células NK na resposta imune contra *HPV*. Os genes *KIR* localizam-se no braço longo do cromossomo 19 humano (19q13.4), no complexo gênico de 1Mb, conhecido como LRC.

Os receptores de membrana codificados por esses genes conferem uma especificidade na citólise de células alvo (infectadas por vírus ou células neoplásicas) mediada por células NK (HAREL-BELLAN *et al.*, 1986; MORETTA *et al.*, 1990, GAUDIERI *et al.*, 2005). Essa especificidade se dá por meio da interação de receptores inibidores *KIR* com epítopos presentes em certas moléculas *HLA* de classe I. Essa interação é conhecida por proteger células saudáveis da destruição espontânea causada pela citólise mediada por células *NK*. Entretanto, a interação de receptores *KIR* ativadores com alótipos HLA-I pode estimular essa atividade citolítica (CARRINGTON e NORMAN, 2003).

Dois tipos de haplótipos *KIR* foram descritos com base no conteúdo dos genes, e são designados A e B. O haplótipo A contém apenas um gene *KIR* ativador, enquanto o haplótipo B contém aproximadamente, seis e, além disso, apresenta uma maior variedade de subtipos (HSU*et al.*, 2002).

2.6.2 Interações entre receptores *KIR* e seus ligantes *HLA-Cw**.

Os genes *HLA* de classe I e os genes *KIR* estão mapeados em cromossomos diferentes, cromossomo 6 e cromossomo 19, respectivamente. Assim, a herança e a

expressão dos genes que codificam os receptores e seus ligantes são independentes. Como conseqüência é possível que um determinado receptor *KIR*, seu ligante, ou ambos possam estar ausentes em um indivíduo, conduzindo a uma situação funcional nula. Os receptores *KIR* igualmente exibem uma expressão diversificada nas células *NK,* isto é, um dado gene *KIR* é expresso em alguns, mas não em todos os clones de células *NK* dentro de um indivíduo, tal seleção combinatória adiciona outra dimensão à variabilidade e à complexidade do sistema. Uma vez adquirido, o padrão de expressão de herança dos genes *KIR* permanece estável nos clones de células *NK* sob várias condições de cultura de células e estímulos de ativação (VALIANTE *et al.*, 1997).

Os ligantes conhecidos para os receptores *KIRs* são epítopos presentes em algumas proteínas*MHC* de classe I. Os alótipos*HLA* podem apresentar o epítopo C1, compartilhado pelas proteínas HLA-Cw que possuem Ser77Asn80, reconhecidos pelos receptores *KIR* inibidores *KIR2DL2*/*KIR2DL3*. Alternativamente o grupo alotipico C2, possuem Asn77Lys80, são os ligantes para *KIR2DL1*(BIASSONI *et al.*, 1995, WINTER *et al.*, 1997; Ugolotti*et al.*, 2011).

Dessa forma, cada alótipo *HLA-Cw* pertence a um dos dois grupos de ligantes baseado em um dimorfismo na posição 80 da alfa hélice: grupo 1 (HLA-C1), possui a asparagina, e grupo 2 (HLA-C2), possui a lisina na posição 80 (Figura 13). Torna-se cada vez mais claro que a força de interações *HLA-KIR* possui um significado funcional e pode influenciar a susceptibilidade a doenças. Isto é exemplificado pelas interações entre *HLA-C* e o inibidor *KIR2D* onde *KIR2DL1/HLA-C2* (e, provavelmente *KIR2DL2/HLA-C1*) parece conferir respostas inibidoras mais fortes do que *KIR2DL3/HLA-C1* (WINTER, *et al.*, 1997; AHLENSTIEL, *et al.*, 2008). A variação alélica igualmente tem um papel na determinação da força de interação. (GARDINER, *et al.*, 2001; YAWATA,*et al.*, 2006). Variantes alélicas podem igualmente diferir em termos da freqüência de células *NK* que as expressam (YAWATA,*et al.*, 2006). Enquanto a contribuição de ligantes *HLA* de classe I na expressão de genes *KIR* não é perfeitamente clara, existem evidências que a expressão de ligantes *HLA* certamente module a freqüência de células *NK* que expressam receptores inibidores e seu nível da expressão (YAWATA et al, 2006)

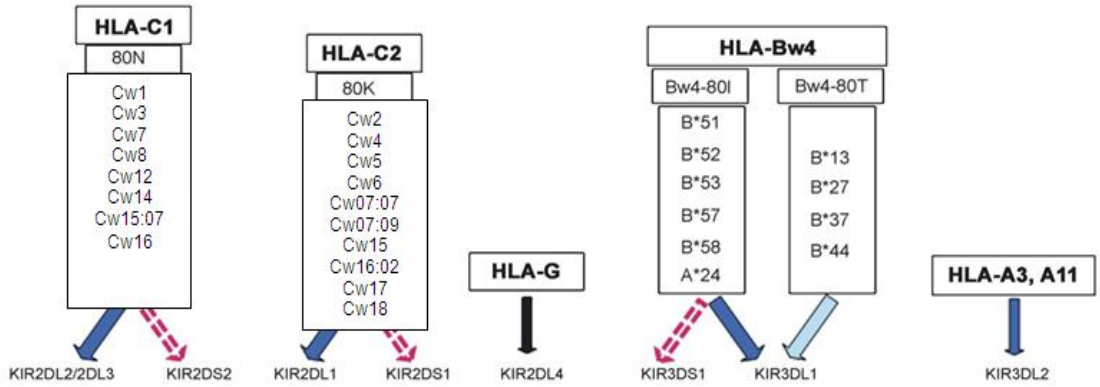


Figura13 - Especificidades *KIR* - ligante HLA. Alelos pertencentes aos grupos de ligantes *KIR* HLA-C1/C2 e BW4 80I/80T são alistados nas caixas. FONTE: KULKARNI, 2008. (Modificado)

Os autores propõem um papel para as interações *KIR-MHC* I inibidoras na regulação da potência de células *NK* (ANFOSSI *et al.*, 2006). KIM e colaboradores igualmente demonstraram que específicos *KIR* e alelos *HLA* são associados com o nível de resposta de células *NK*, sugerindo um papel de “licenciamento” de células *NK* em seres humanos (KIM et.al., 2008).

Os estudos que investigaram a relação *KIR-HLA* e a susceptibilidade à progressão de doenças virais e à auto-imunidade reconheceram que a falta do ligante *HLA* para os receptores *KIR* inibidores no paciente podem acarretar em efeitos significativos no resultado clínico da doença (KHAKOO *et al.*, 2004).

3 JUSTIFICATIVA

O câncer cervical (CC) é um importante problema de saúde pública em todo o mundo, principalmente em países em desenvolvimento.

A susceptibilidade genética à infecção por HPV parece ser importante na determinação do risco individual ao desenvolvimento deste câncer induzido pelo vírus (MAGNUSSON e GYLLENSTEN, 2000).

A interferência das oncoproteínas virais nas proteínas do sistema imune e do ciclo celular induz e mantém a transformação celular, fazendo com que células infectadas formem lesões precursoras do câncer podendo levar à progressão para um CC. Portanto, o estudo dos genes que codificam as proteínas celulares envolvidas com a resposta das células à infecção pelo HPV tem grande importância, uma vez que determinados genótipos podem demonstrar maior susceptibilidade ou maior proteção ao desenvolvimento de lesões pré-câncer, em resposta à ação de proteínas virais.

As aparências morfológicas nem sempre permitem a distinção de lesões precursoras que possuem uma capacidade substancial de progredir ou não ao câncer, gerando incertezas quanto ao diagnóstico. No estágio atual da avaliação e prognóstico do CC, a ausência de métodos diagnósticos mais sensíveis e precisos, faz com que a histopatologia permaneça como método mais utilizado para a definição de lesões pré-câncer e de CC (IARC, 2010).

O conhecimento da história natural da doença facilita as decisões a serem tomadas a partir de detecções de lesões pré-neoplásicas. Apesar do vasto conhecimento a respeito da infecção pelo HPV, há, pelo menos, uma parte faltante das informações sobre a história natural das infecções por HPV de alto risco. É importante conhecer as causas da persistência da infecção por HPV oncogênicos e o que faz com que lesões precursoras progridam e não regridam.

Um bom conhecimento da base genética no desenvolvimento de lesões de alto risco que possam resultar em câncer cervical, pode contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos biológicos subjacentes à lesões pré-cancerosas. A tipagem genética de genes candidatos, por exemplo, no presente estudo caso-controle o gene HLA-C permite investigar se o mesmo está direta ou indiretamente envolvido com a imunovigilância e a resposta imune relacionada ao HPV. Além

disso, pode contribuir para esclarecer a complexa base genética da predisposição ou proteção contra o desenvolvimento de câncer de colo cervical causado por HPV.

A combinação de tipos virais de alto risco com a predisposição genética pode gerar uma capacidade substancial de lesões precursoras progredirem para o câncer. O estabelecimento de um grupo de risco, baseado na identificação de fatores genéticos que se relacionam ao controle da carcinogênese, pode auxiliar na detecção precoce ou mesmo na prevenção primária do HPV.

Por essa razão, a pesquisa genética relacionada ao HPV, o CC e às suas lesões precursoras são de grande importância para fundamentar ações abrangentes para o controle do câncer, nos diferentes níveis de atuação, como na promoção da saúde, na detecção precoce, na assistência às pacientes, na vigilância, na formação de recursos humanos, na comunicação e mobilização social e na gestão do SUS.

3.1 HIPÓTESES QUE FUNDAMENTAM A PESQUISA

Para a hipótese nula principal (H0) testada, não existe diferença entre as freqüências das variantes alélicas do gene *HLA-C* em mulheres NIC II e III, assim como em mulheres saudáveis com a ausência ou presença de lesão por HPV.

A hipótese alternativa (H1) da pesquisa, é que existe diferença significativa nas frequências alélicas do gene HLA-C entre os grupos de estudo.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os dados epidemiológicos e estimar as freqüências alélicas do gene *HLA-C* em mulheres diagnosticadas com neoplasias intraepitelial cervical de graus II e III, e comparar estes resultados com um grupo de mulheres saudáveis com a ausência de lesão por HPV e em mulheres saudáveis com presença do vírus, mas sem lesão cervical.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer um modelo de banco de dados com a descrição de características epidemiológicas e genéticas das mulheres que participaram do projeto HPV como: Idade, Escolaridade, Etnia, Sexualidade (Idade da 1ª relação sexual, número de parceiros sexuais no último ano, uso de preservativo e contraceptivo), Gestações e idade ao 1º parto, Exames de citologia oncótica eTabagismo;
- Realizar a tipificação, em nível alélico do gene HLA-C, de mulheres com Neoplasia Intraepitelial Cervical de graus II e III;
- Estimar as freqüências alélicas HLA-C, de mulheres com Neoplasia Intraepitelial Cervical de graus II e III;
- Estimar as freqüências alélicas de mulheres controles diagnosticadas em dois subgrupos: com ausência ou presença do vírus HPV;
- Estimar as frequências genotípicas da variação genética de HLA-C na amostra caso e na amostra controle;

5 METODOLOGIA

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram selecionadas aleatoriamente todas as mulheres integrantes deste estudo. Essas mulheres foram inseridas no banco de dados do Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade da UFPR no período de Outubro de 2009 à Fevereiro de 2011. Neste estudo transversal caso-controle, a amostra caso foi composta por 200 mulheres portadoras de HPV que compareceram para o atendimento ginecológico e foram indicadas ao tratamento cirúrgico da NIC no Departamento de Patologia Cervical do Hospital Erasto Gaertner. Essas pacientes apresentaram diagnóstico citológico, colposcópico e histológico de NIC II e NIC III e não apresentaram imunossupressão ou doenças auto-imunes, além de não possuírem parentesco consangüíneo.

A amostra controle foi composta por 200 mulheres saudáveis, distribuídas em dois grupos: mulheres HPV negativo, sem histórico de NIC e que apresentaram o último exame ginecológico normal, realizado no mesmo dia que a coleta do sangue; e mulheres saudáveis com HPV positivo NIC I, sem histórico de alteração citológica ou progressão de lesão intraepitelial cervical. Em todos os controles realizou-se a detecção do vírus HPV através do exame molecular de Captura Híbrida segundo o protocolo do kit fornecido pela empresa Digene®, para o diagnóstico de ausência ou presença deHPV de alto risco ou oncogênicos.

No grupo de mulheres-casos foi possível realizar a genotipagem do gene *HLA-C* para apenas 174 amostras, visto que 26 amostras foram eliminadas devido à baixa qualidade do DNA verificada através da leitura da Densidade Óptica ou pela limitação da técnica utilizada. Portanto, a amostra analisada para o grupo caso totalizou 174 indivíduos (84 mulheres NIC II + 90 NIC III)

Do total de 200 amostras controle, 22 foram eliminadas pelos mesmos motivos. Assim, o grupo controle, ficou constituído por 178 indivíduos (102 Controles Negativos para infecção pelo HPV mais 76 Controles positivos para a infecção pelo HPV). Constituindo um *N* amostral de 352 mulheres (Figura 14).

As informações epidemiológicas foram obtidas através de um questionário multicêntrico elaborado por um grupo multiprofissional, considerando-se fatores de risco para o contágio do vírus HPV e possibilidade de desenvolvimento do CC.

O estudo está aprovado pelo comitê de Ética e Pesquisa em seres Humanos do Hospital Erasto Gaertner sob o número 1943/2009. Os integrantes do estudo receberam treinamentos em Boas Práticas Clínicas de acordo com a resolução 196/96,os responsáveis pela aplicação do questionário epidemiológico receberam treinamento especifico prévio para a sua execução e todas as participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido previamente a qualquer procedimento do estudo (Anexo).

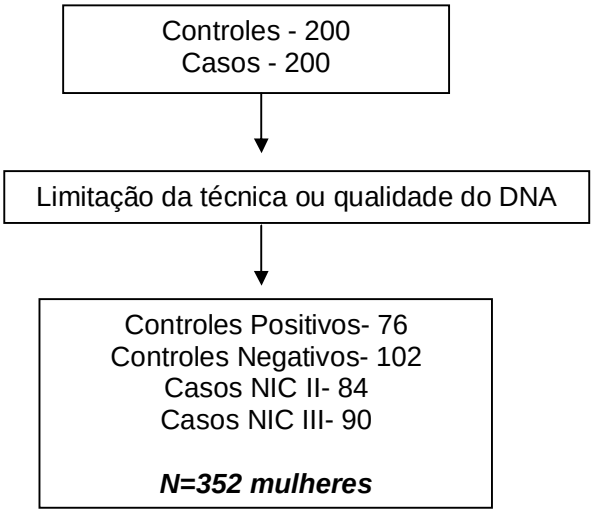


Figura 14 – Número amostral do estudo.

5.1.1 Critérios de Inclusão

Os critérios de inclusão utilizados foram: no grupo-caso, ter entre 15 e 45 anos de idade, sem imunossupressão, possuir diagnóstico histológico de NIC II ou III após procedimento cirúrgico (Cirurgia de alta freqüência – CAF ou Conização).

Para o grupo controle: ter entre 15 e 45 anos de idade, sem imunossupressão, ter realizado exame citológico no dia da entrevista, ausência de lesão cervical.

5.1.2 Critérios de Exclusão

Os critérios de exclusão compreenderam: relação sexual a menos de 24 horas, idade abaixo de 15 ou acima de 45 anos, presença de lesão anterior (se realizou CAF ou Conização), estar grávida ou menstruada, ausência de útero e serem imunossuprimidas.

Estes critérios não impediram as mulheres de serem atendidas pelos profissionais da saúde para consulta ou para realizarem o exame Papanicolau ou "preventivo".

5.2 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

5.2.1 Extração do DNA do sangue

Dez mililitros (10 mL) de sangue periférico foram coletados de cada indivíduo, através de punção venosa, em tubos estéreis tipo *vacutainer* com EDTA para coleta sangüínea. Essas amostras foram centrifugadas para obtenção da camada de leucócitos para a extração de DNA pela técnica de *salting-out* (JOHN *et al.*, 1990, modificado por LAHIRI e NURNBERGER, 1991). Em seguida fez-se purificação do DNA obtido (Anexo).

5.2.2 Cálculo da concentração do DNA

A concentração de DNA das amostras foi determinada através da leitura de densidade ótica (DO), utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop® , e o valor obtido utilizou-se para padronizar a concentração para 50ng/μl adequando para tipagem do gene pela técnica SSO, descrita em seguida.

*5.3 GENOTIPAGEM DO GENE*HLA-C

Após coleta e triagem, as amostras biológicas ficaram a -20ºC por mais de 1 ano, foram congeladas e descongeladas várias vezes para a realização das pesquisas. Isso pode explicar o porquê de muitas amostras terem apresentado problemas na amplificação da técnica de PCR. Ao constatar tais problemas, as amostras foram submetidas à purificação por acetato de amônio, deixando a pureza (razão 280/260 e 260/230) e a concentração de DNA a níveis aceitáveis de qualidade para uso. Durante a amplificação foram usados controles negativos e positivos, além da repetição de algumas amostras (cerca de 5% do total) para a confirmação dos resultados.

Para a caracterização dos alelos do gene *HLA-C* o método de tipagem empregado foi o da reação em cadeia da polimerase utilizando-se sondas de oligonucleotídeos sequência-específicos, do inglês: *Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotide Probes* (PCR-SSOP), em alta definição (HD-*High definition*).Para confirmar a amplificação do gene de interesse fez-se a eletroforese do produto amplificado, em gel de agarose 2,5% (condições em anexo).

A interpretação do gel baseou-se na presença ou ausência de um fragmento de DNA amplificado específico, cujo sucesso da amplificação foi verificado com a visualização da presença das bandas (éxons 2 e 3) formadas pelo gene de interesse (Figura 15), possibilitando progredir para a próxima etapa da técnica,chamada hibridização. As concentrações dos reagentes não são fornecidas e os volumes foram utilizados conforme metade do recomendado pela empresa, sendo o padrão utilizado na rotina laboratorial colaborando assim para uma substancial redução dos custos de tipagem por amostra.

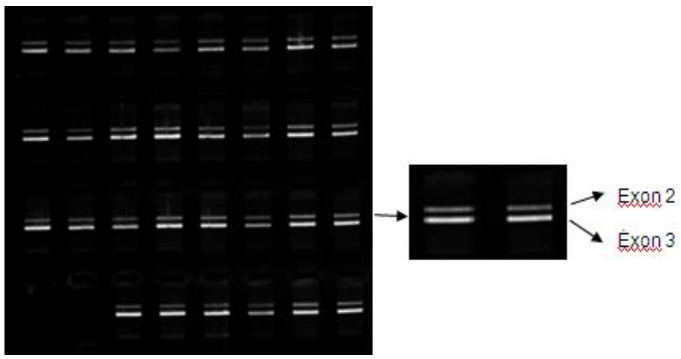


Figura 15 - Gel de agarose 2,5%, demonstrando as 2 bandas relativas aos éxons 2 e 3 que definem a tipagem dos alelos do gene *HLA-C*. FONTE: A autora (2012)

A interpretação dos resultados é feita através do software HLA FUSION Versão 2.0 (cedido pela empresa) que analisa as combinações de sondas nas micro-esferas detectadas pelo aparelho e sugerem quais são os alelos presentes.

O nível de resolução da tipagem *HLA-C* foi o de “alta definição” HD *(high definition)*, que na prática, define ou caracteriza um grupo de variantes alélicos que codificam a mesma sequência de aminoácidos para a região da molécula HLA que liga o peptídeo. Assim, o resultado obtido pelo uso do kit comercial não permitiu definir diretamente o nível alélico dos genes *HLA-C*, dando várias possibilidades de resultados. Por essa razão, usou-se o critério de exclusão de alelos raros segundo a tabela do *National Marrow Donnor Program* (NMDP) dos Estados Unidos, que é baseada na freqüência mundial de alelos HLA já descritos, por etnias, cuja atualização é realizada duas vezes por ano. A versão 3.5 de Agosto de 2011 foi utilizada neste trabalho (Figura 17a e 17b).

NATIONAL MARROW DONOR PROGRAM®

BE THE MATCH®

HLA-C Locus Rare Allele List

Total Count = number of times an allele was reported to the NMDP.
Since 1987, 750,560 HLA-C locus allele level results have been reported to the NMDP.
The number of times any listed allele was specifically tested for is unknown.

Allele	AFA	API	CAU	HIS	NAM	OTH	Total Count	Rare (< 1:50,000)	Zero	Publish Date
C*01:04	0	2	0	0	0	0	2	X		1999-06-08
C*01:05	0	0	1	0	0	0	1	X		2001-02-28
C*01:09	0	0	1	0	0	0	1	X		2002-09-30
C*01:11	0	0	0	0	0	0	0		X	2005-02-18
C*01:12	0	0	1	0	0	0	1	X		2006-02-27
C*01:13	0	0	2	0	0	1	3	X		2006-02-27
C*01:14	0	0	0	0	0	0	0		X	2007-01-28
C*01:15	0	0	1	0	0	0	1	X		2007-02-28
C*01:16	1	1	0	0	0	0	2	X		2007-02-28
C*01:18	0	1	0	0	0	0	1	X		2007-02-28
C*01:19	0	0	0	0	0	0	0		X	2007-05-31
C*01:20	0	1	0	0	0	0	1	X		2008-02-27
C*01:21	0	0	0	0	0	0	0		X	2008-04-29
C*01:22	0	0	0	2	0	0	2	X		2008-05-31

AFA = Americano africano,
API= Asiático ou ilhas do Pacífico,
CAU= Caucasianos,
HIS = Hispânicos ou miscigenados,
NAM = Americanos nativos,
OTH = Múltiplos, desconhecidos

Allele Publish Dates
IMGT HLADB vs 3.5.0
Page 1 of 17

Figura 17a -Amostra da tabela de alelos raros NMDP versão 3.5 (Adaptada).

FONTE: **http://bioinformatics.nmdp.org**, 2011.

C*01:02P	C*01:02:01/C*01:02:02/C*01:02:03/C*01:02:04/C*01:02:05/C*01:02:06/C*01:02:07/C*01:02:08/C*01:02:09/C*01:02:10/C*01:02:11/C*01:02:12/C*01:02:13/C*01:02:14/C*01:11/C*01:25/C*01:40/C*01:44
C*01:03P	C*01:03/C*01:24
C*02:02P	C*02:02:01/C*02:02:02/C*02:02:03/C*02:02:05/C*02:02:06/C*02:02:07/C*02:02:08/C*02:02:09/C*02:02:10/C*02:02:11/C*02:02:12/C*02:02:13/C*02:02:14/C*02:02:15/C*02:02:16/C*02:02:17/C*02:02:18/C*02:02:19/C*02:02:20/C*02:02:21/C*02:02:22/C*02:10/C*02:29
C*02:16P	C*02:16:01/C*02:16:02
C*02:26P	C*02:26:01/C*02:26:02/C*02:26:03

Figura 17b - Amostra da tabela de grupos p usados para a definição de alelos HLA-C.
FONTE: **\\hla.alleles.org**, 2011.

Mesmo com exclusão de alelos raros, em várias amostras não foi possível chegar ao nível alélico. A solução encontrada foi agrupá-los de acordo com as semelhanças em seus domínios de ligação ao antígeno. Através da nomenclatura para fatores do sistema HLA, os resultados secundários foram agrupados em P, um dos dois códigos de nomenclatura: grupos P e G. Para os alelos HLA de classe I, o grupo P se refere nas sequências protéicas idênticas codificadas pelos éxons 2 e 3. No caso do HLA classe II, são as codificadas pelo éxon 2. Por exemplo: o grupo C*01:03P contém as variantes C*01:03 / C*01:24.

Alelos HLA que possuem número idêntico de sequências nucleotídicas através dos éxons, codificando domínios de ligação do peptídeo são conhecidos como grupo G, isto é, este grupo contém um mínimo de seis dígitos. Por exemplo: o grupo C*01:02:01G contém as variantes *01:02:01 / 01:02:02 / 01:02:11 / 01:02:12 / 01:02:14 / 01:02:15 / 01:25 / 01:44*(ALLELES, 2012).

Através da análise de exclusão de alelos raros pela Tabela NMDP e agrupamento por código P, o estabelecimento de grupos alélicos para a análise foi possível.

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

5.4.1 Freqüências alélicas e genotípicas

As freqüências alélicas dentro do grupo de pacientes e da amostra controle foram obtidas por contagem direta. Para calcular as freqüências genotípicas, primeiramente assumiu-se que as freqüências observadas seguem as proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p^2+2pq+q^2=1$).

Para a comparação de freqüências alélicas e genotípicas foi utilizado o teste G ou Qui-quadrado$\mathbf{X^2}$ (a soma do *n* das modalidades deve ser: 20<n<40), para dados categóricos. Tais comparações entre os grupos amostrais Caso e Controle foram feitas utilizando-se Tabelas de contingência L x C, do programa BioEstat 5.0 – Aplicações Estatísticas nas áreas das Ciências Biomédicas (AYRES *et al.,* 2007).

Foi realizado o teste de contingência, em uma Tabela 4x2, com grau de liberdade igual a 3, para verificar se existe diferença entre cada grupo (Controle positivo x Controle Negativo x NIC II x NIC III) para cada alelo. Os alelos cujos resultados foram significativos, foram examinados em tabelas LxC, 2x2, comparando-se os grupos separadamente, dois a dois. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas (indicando associação) nos casos em que p ≤0,05. Aplicou-se a correção de Yates quando necessário, de acordo com as freqüências observadas dentro de cada classe utilizada no teste de contingência.

Nos casos em que a diferença entre as freqüências alélicas ou gênicas de pacientes e controles apresentarem significância estatística, calculou-se a "*Odds Ratio*" ("OR" ou razão de probabilidades segundo WOLF,1955), através da fórmula: **OR= (AxD) / (BxC)**. Onde: A, B, C e D são os valores correspondentes às letras da figura 20:

	Casos	Controles
Positivo para o fator pesquisado	A	B
Negativo para o fator pesquisado	C	D

Figura 20 - Valores para cálculo de *ODDS RATIO.* FONTE: WOLF, 1955

O valor da OR, em análises de associação, é considerado como sinônimo do valor de risco relativo (RR), que exprime quantas vezes a característica é mais

freqüente entre os portadores de um determinado fator comparando-se com indivíduos sem o fator (SVEJGAARD *et al.*, 1974).

Valores de OR acima de 1 indicam que o fator está associado a uma maior probabilidade de susceptibilidade ao desenvolvimento de NICs e valores abaixo de 1, a uma menor probabilidade.

5.4.2 Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Para o locus HLA-C foi realizado o teste de equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (HW), considerando-se os 49 alelos encontrados. Seguindo o teorema de HW onde, **p= 1-q**, tem-se o resultado da freqüência de heterozigotos esperada (p). Para esse locus, ambas as amostras, caso e controle, estão em equilíbrio (p= 0,9347 e p= 0,0653, respectivamente), onde o limite da margem de confiança adotado ($p < 0,05$ é significativo).

Primeiro calculou-se a frequência observada de cada alelo usando a fórmula *FRalelo = nº indivíduos/N total*. O resultado da *FRalelo* foi elevada ao quadrado, cujo resultado é a freqüência esperada de homozigotos (q) $(Freq.\ obs.alelo)^2$. Para a confirmação do equilíbrio, calculou-se o qui-quadrado (X^2) para cada grupo amostral. O número de homozigotos observados nas amostras CN e CP (6,0 % e 9,0%) é próximo ao esperado (6,0%), a heterozigosidade observada para CN e CP (99,08% e 98,77%) não é significativamente diferente da esperada (93,47%). A heterozigosidade observada na amostra caso, NIC II e NIC III (98,84% e 99,08%) foram muito próximas à esperada (93,47%), e dentre os homozigotos, 8,0% e 7,0%, para NIC II E NIC III respectivamente, sendo a percentagem esperada de homozigotos de 6,0%.

5.4.3 Análise de associação entre HLA-C e NICs

Para a análise de associação foi relacionado o número de mulheres do grupo-caso e mulheres do grupo-controle em tabelas de contingência 2x2 (CN x CP / CN x NIC II / CN x NIC III / CP x NIC II / CP x NIC III / NIC II x NIC III). Essas comparações permitiram testar a hipótese nula (H0) do alelo em questão apresentar freqüência similar nas amostras dos grupos caso e controle.

6 RESULTADOS

6.1 FLUXOGRAMA DAS ATIVIDADES REALIZADAS E RESULTADOS OBTIDOS

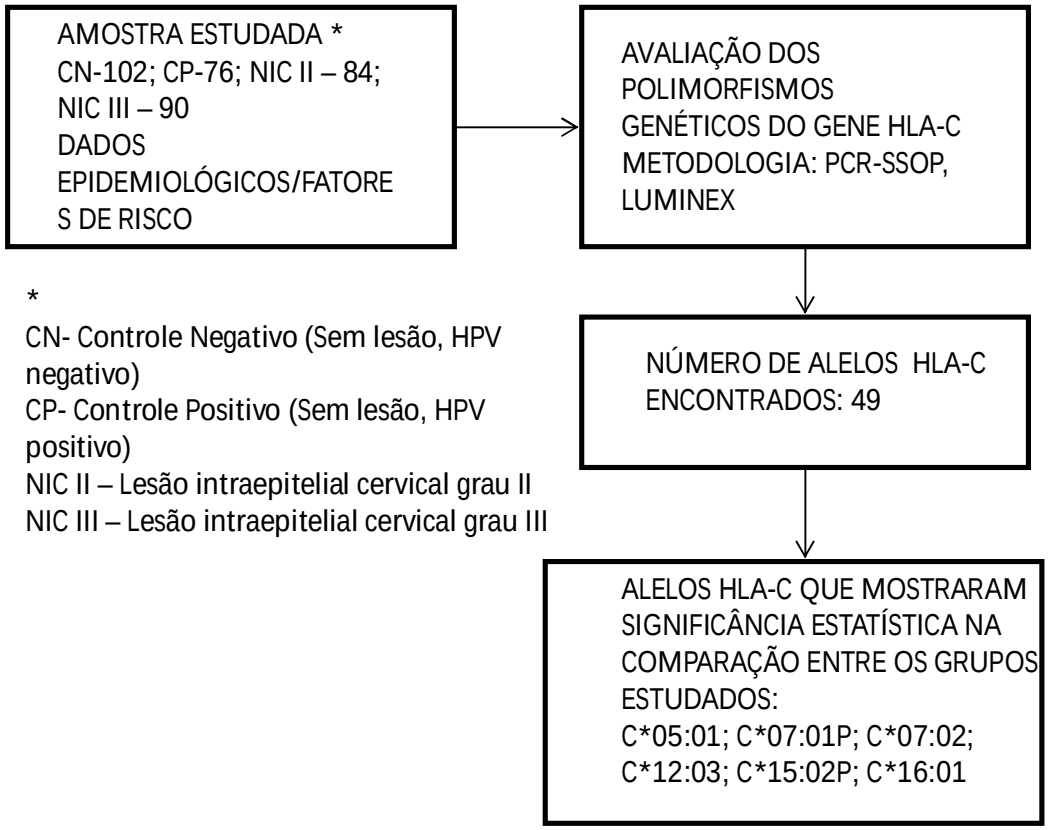


Figura 21 - Representação esquemática do desenvolvimento do estudo.

6.2 CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLOGICA

A idade média das 352 mulheres recrutadas para o presente foi de 31,5 ±7,13 anos. A idade média para os diferentes grupos: controle negativo (CN), controle positivo (CP), casos NIC II e NIC III, também ficaram próximas aos 30 anos. Quanto à etnia, 92,11% das mulheres CN foram classificadas como Brancas. No entanto, para os grupos CP, NIC II E NIC III, a etnia parda constituiu respectivamente, 50%, 59,21% e 64,47% da amostra.

A escolaridade variou entre ensino fundamental incompleto e ensino superior completo. O ensino fundamental incompleto compreendeu o maior número de mulheres dos grupos: controles positivos 28,95%, controles negativos 36,27% e NIC III 34,44%. Já no grupo NIC II, 34,52% possuem o ensino médio completo (tabela 2).

Para todos os grupos do estudo, as maiores porcentagens para início da atividade sexual ficaram na faixa etária entre 15 e 25 anos. O número de parceiros sexuais nos últimos 12 meses manteve-se entre um e cinco para todos os grupos.A ausência do uso de preservativo nos últimos 12 meses (NUNCA) apresentou maior frequência para todos os grupos do estudo, destacando o controle negativo com 53,92%. Quanto ao uso de contraceptivo, o grupo controle positivo 57,89% (44) afirmaram não usar, enquanto nos grupos casos NIC II e NIC III, 67,86% (57) e 70% (63) respectivamente, afirmaram usar regularmente. Para o controle negativo 50% (51) para ambas as respostas sobre o uso de contraceptivo. Nesse contexto, o maior tempo de uso, está representado nos grupos controle negativo e NIC III (>10 anos), seguidos por NIC II (seis a 10 anos) e controle positivo (um a cinco anos) (Tabela 3).

Tabela 02: Idade, etnia e escolaridade dos grupos de estudo.

Idade (15 – 45 anos)	**CP (*N*=76)**		**CN (*N*=102)**		**NIC II (*N*=84)**		**NIC III (*N*=90)**		**p**
31,5±7,13	27,3		34,5		30,5		32,8		0,984
Etnia	*n*	%	*n*	%	*n*	%	*n*	%	
Branco	24	31,58[a]	**70**	92,11[b]	32	41,11[a]	34	44,74[a]	**<0,0001**
Negro	6	7,89	2	2,63	4	5,26	2	2,63	0,2175
Pardo	37	48,68[a]	**30**	40,79[b]	46	59,21[a]	49	64,47[a]	**0,0007**
Asiático	1	1,32	0	0	0		0		0,6439
NI	8	10,53	0	0	2	2,63	5	6,58	**0,0023**
Escolaridade									
F. I.	22	28,95	37	36,27	26	30,95	31	34,44	0,7295
F. C.	15	19,74	19	18,63	14	16,67	10	11,11	0,4025
M. I.	10	13,16	8	7,84	11	13,10	18	20,00	0,1105
M. C.	16	21,05	35	34,31	29	34,52	24	26,67	0,1588
S. I.	4	5,26	0	0	1	2,38	3	3,33	0,0683
S. C.	0	0	3	2,94	2	2,38	0	0	0,1351
NI	**9**	11,84 [b]	**0**	0 [b]	1	1,19 [a]	4	4,44 [a]	**0,0005**

Tabela LxC 4x2, Teste G. p≤0,05 significativo. Teste X^2em tabela 2x2 para comparações significativas entre os grupos.
NOTA 1: FI - Fundamental Incompleto, FC - Fundamental Completo, MI - Médio Incompleto, MC - Médio Completo, SI - Superior Incompleto, SC - Superior Completo, NI – Não informado. n= número de indivíduos por grupo.
NOTA 2: a – resultados sem diferença significativa
b – resultados significativamente diferentes
FONTE: A autora (2012)

Tabela 03: Idade de início da atividade sexual, número de parceiros, uso de preservativo e uso de contraceptivo, entre os grupos.

Idade de início da atividade sexual	CP(*N*=76)		CN (*N*=102)		NIC II (*N*=84)		NIC III (*N*=90)		p
	n	%	*n*	%	*n*	%	*n*	%	
<15	28	36,84 [a]	**13**	12,75 [b]	24	28,57 [a]	23	2 5,56 [a]	**0,0018**
15 - 25	48	63,16 [b]	**85**	83,33 [b]	61	72,62 [a]	67	74,44 [a]	**0,0247**
26 - 35	0	0	4	3,92	0	0	2	2,22	0,0764
36 - 45	0	0	0	0	0	0	0	0	1,000
>45	0	0	0	0	0	0	0	0	1,000
Número de parceiros	**(12 meses)**								
0	**15**	14,71 [b]	5	4,90 [a]	6	5,88 [a]	6	5,88 [a]	**0,0096**
1	**43**	42,16 [b]	89	87,25 [a]	71	69,61 [a]	76	74,51 [a]	**< 0,0001**
2 a 5	**17**	16,67 [b]	7	6,86 [a]	7	6,86 [a]	8	7,84 [a]	**0,0123**
6 a 10	1	0,98	1	0,98	0	0	0	0	0,5814
>10	1	0,98	0	0	0	0	0	0	0,6439
Uso de preservativo (12 meses)									
S/Relação	**16**	21,05 [b]	5	4,90 [a]	4	4,76 [a]	5	5,56 [a]	**0,0013**
Regula	6	7,89	9	8,82	8	9,52	7	7,78	0,9751
Ocasional	21	27,63	33	32,35	32	38,09	35	38,89	0,0717
Nunca	33	43,42	55	53,92	40	47,62	43	47,78	0,5688

(continuação)

Uso de Contraceptivo									
Sim	32	43,42 [a]	**51**	50 [b]	**57**	67,86 [b]	**63**	70 [b]	**0,0002**
Não	**44**	57,89 [b]	**51**	50 [b]	25	29,76 [a]	26	28,89 [a]	**< 0,0001**
NI	0		0		2	2,38	1	1,11	0,3021
Tempo de uso de contraceptivo	**CP(*N*=76)**		**CN (*N*=102)**		**NIC II (*N*=84)**		**NIC III (*N*=90)**		**p**
	n	%	n	%	n	%	n	%	
0	13	17,11	11	10,78	7	8,33	11	12,22	0,3983
<1	8	10,53	7	6,86	5	5,95	3	3,33	0,3271
1 a 5	**30**	39,47 [b]	23	22,56 [a]	20	23,81 [a]	20	22,22 [a]	**0,0459**
6 a 10	12	15,79	25	24,51	27	32,14	20	22,22	0,1069
>10	**11**	14,47 [b]	36	35,29 [b]	24	28,57 [a]	34	37,78 [b]	**0,0032**
NI	2	2,63	0	0	1	1,19	2	2,22	0,3377

Tabela LxC 4x2, Teste G. p≤0,05 significativo. Teste X^2em tabela 2x2 para comparações significativas entre os grupos. n= número de indivíduos por grupo.
NOTA: a – resultados sem diferença significativa
b – resultados significativamente diferentes
FONTE: A autora (2012)

O número de gestações mais representativo para os grupos manteve-se entre um e três, considerando gestações mal sucedidas e gemelares, o número eleva-se, exceto no grupo de controle negativo. O número absoluto entre mulheres que não tiveram gestação variou entre 11 e 15 mulheres. A maioria das mulheres 33 CP e 32 NIC II (cerca de 36%) teve o primeiro parto entre 15 e 18 anos, entretanto as 35 mulheres CN e 31 NIC III (cerca de 41%), entre 19 e 22 anos(Tabela 4). O exame de citologia oncótica deve ser realizado em mulheres sexualmente ativas, no caso de todos os grupos em estudo, a maioria realizou entre no máximo cinco, durante toda a vida sexual. A comparação entre número de citologias versus a idade na 1ª relação sexual está representada na tabela 5.

Tabela 04: Número de gestações e idade ao 1º parto entre os grupos.

Nº Gestações	CP (*N*=76)		CN (*N*=102)		NIC II (*N*=84)		NIC III (*N*=90)		p
	n	%	*n*	%	*n*	%	n	%	
1 a 3	44	57,89	66	64,71	58	69,05	64	71,11	0,3046
4 a 6	16	21,05	15	14,71	12	14,29	10	11,11	0,3724
>6	1	1,32	0	0	1	1,19	4	4,44	0,1256
0	14	18,42	14	13,73	13	14,29	11	12,22	0,7185
NI	1	1,32	7	6,86 [b]	0	0	1	1,11	**0,0173**
Idade ao 1º parto									
<15	4	5,26	2	1,96	0	0	2	2,22	0,1348
15 a 18	33	43,42	29	28,43	37	44,05	32	35,55	0,0924
19 a 22	16	21,05	35	34,31	21	25	31	34,44	0,1272
>22	7	9,21	22	21,57	11	13,09	12	13,33	0,2063
NI	2	2,63	2	1,96	2	2,38	2	2,22	0,9936

Tabela LxC 4x2, Teste G. p≤0,05 significativo. Teste X^2 em tabela 2x2 para comparações significativas entre os grupos. n= número de indivíduos por grupo.
NOTA: a – resultados sem diferença significativa
b – resultados significativamente diferentes
FONTE: A autora (2012)

Tabela 05: Número de citologias oncóticas entre os grupos.

Número de Citologias oncóticas	CP (*N*=76)		CN (*N*=102)		NIC II (*N*=84)		NIC III (*N*=90)	
	n	*%*	*n*	*%*	*n*	*%*	*n*	*%*
0	7	9,21	3	2,94	0	0	0	0
1 a 5	37	48,68	38	37,25	42	50	41	45,56
6 a 10	20	26,32	25	24,51	24	28,57	26	28,89
11 a 15	7	9,21	21	20,59	8	9,52	14	15,56
>15	4	5,26	10	9,81	10	11,90	8	8,89
NI	1	1,32	5	4,90	0	0	1	1,11

	Nº Citologias/ Idade		
	Controles (n=178)	**Casos (n=174)**	
<20 anos			
0 a 5	77	82	0,5339
6 a 10	43	45	0.8055
>10	35	36	0.9147
21 a 30 anos			
0-5	9	1	**0,0203**
6 a 10	2	4	0,6594
>10	7	3	0,3505
>30 anos			
0-5	0	0	
6 a 10	0	0	
>10	1	0	0,9887

Tabela LxC 4x2, Teste G. p≤0,05 significativo. Teste X^2 em tabela 2x2 para comparações significativas entre os grupos. n= número de indivíduos por grupo.

Mulheres com hábito tabagista representam menor porcentagem nos grupos. Apenas o grupo CP demonstrou maior número de ex-fumantes 34 (44,74%), enquanto para os outros grupos, a maioria das mulheres afirmou que nunca tiveram esse hábito; 61,76%, 48,81% e 43,33% para CN, NIC II e NIC III, respectivamente (Tabela 6). Dentre as mulheres fumantes, as CP (5) tem esse hábito entre 11 e 15 anos. Já as mulheres CN (8) e NIC II (13), fumam a mais de 15 anos. Para o grupo NIC III 28,57% (8 mulheres), afirmaram fumar entre seis e 10 anos e outras 28,57% (8 mulheres), mais de 15 anos (Tabela 7).

Tabela 06: Hábito tagabista entre os grupos.

Tabagismo	CP(*N*=76)		CN (*N*=102)		NIC II (*N*=84)		NIC III (*N*=90)		p
	n	*%*	*n*	*%*	*n*	*%*	*n*	*%*	
Fumantes	15	19,74[a]	18	17,65[b]	30	35,71[b]	28	31,11[b]	**0,0143**
Ex- fumantes	33	43,42[b]	20	19,61[a]	12	14,29[a]	23	25,56[a]	**< 0,0001**
Nunca fumaram	28	36,84[b]	63	61,76[b]	41	48,81[a]	39	43,33[b]	**0,0064**
NI	0	0	1	0,98	1	1,19	0	0	

Tabela LxC 4x2, Teste G. p≤0,05 significativo. Teste X^2em tabela 2x2 para comparações significativas entre os grupos. n= número de indivíduos por grupo.
NOTA: a – resultados sem diferença significativa
b – resultados significativamente diferentes. FONTE: A autora (2012)

Tabela 07: Hábito tabagista entre as fumantes, considerando tempo de uso e número de cigarros por dia, entre os grupos de estudo.

FUMANTES	CP(*n*=76)		CN (*n*=102)		NIC II (*n*=84)		NIC III (*n*=90)		p
Tempo (anos)	*n*	*%*	*n*	*%*	*n*	*%*	*n*	*%*	
<1	1	6,67	0	0	0	0	0	0	0,6439
1 a 5	4	26,67	3	16,67	6	20,0	3	10,71	0,5485
6 a 10	2	13,33	1	5,56[b]	4	13,33	8	28,57[b]	**0,0528**
11 a 15	5	33,33	5	27,78	7	23,33	7	25,00	0,7940
>15	2	13,33[b]	8	44,44	13	43,33	8	28,57[b]	**0,0347**
NI	1	6,67	1	5,56	0		2	7,14	0,5257
Cigarros/Dia									
1 a 5	**5**	**33,33**	5	27,78	6	20	4	14,29	0.8532
6 a 10	3	20,0	**7**	**38,89**	7	23,33	**8**	**28,57**	0.5965
11 a 15	1	6,67	1	5,56	4	13,33	6	21,43	0,1065
16 - 20	3	20,0	4	22,22	**10**	**33,33**	**8**	**28,57**	0,1176
>20	2	13,33	0	0	3	10,0	1	3,57	0,1931
NI	1	6,67	1	5,56	0	0	1	3,57	0,7250

Tabela LxC 4x2, Teste G. p≤0,05 significativo. Teste X^2em tabela 2x2 para comparações significativas entre os grupos. n= número de indivíduos por grupo.

No contexto das ex-fumantes, CN, NIC II e NIC III, 40%, 41,67% e 30,43%, respectivamente, fumaram entre um e cinco anos. As mulheres CP, 41,18%, entre seis e 10 anos. O consumo de cigarros por dia variou entre um e cinco para CN e NIC II, maior que 20 para CP e entre seis e 10 para NIC II E NIC III. Para CN, CP e NIC III, o hábito tabagista foi encerrado entre um e cinco anos, já para NIC II, 39,13%, a menos de um ano (Tabela8).

Tabela 08: Hábito tabagista entre as ex-fumantes, considerando tempo de uso, número de cigarros por dia e tempo que parou, entre os grupos de estudo.

Ex-Fumantes	CP(*n*=76)		CN (*n*=102)		NIC II (*n*=84)		NIC III (*n*=90)		p
Tempo (anos)	*n*	*%*	*n*	*%*	*n*	*%*	*n*	*%*	
<1	1	2,94	1	5,00	0	0	0	0	0,5814
1 a 5	10	29,41	8	40,00	5	41,67	7	30,43	0,4466
6 a 10	14	41,18 [b]	7	35,00 [b]	3	25,00	6	26,09 [b]	**0,0088**
11 a 15	4	11,76	1	5,00	3	25,00	5	21,74	0,2683
>15	5	14,71	3	15,00	1	8,33	5	21,74	0,2548
NI	0	0	0	0	0	0	0	0	
Cigarros/Dia									
1 a 5	6	17,65	9	45,00	4	33,33	1	8,33	0,0647
6 a 10	3	8,82	1	5,00	4	33,33	8	66,67	0,0679
11 a 15	0	0	1	5,00	0	0	2	16,67	0,3570
16 - 20	12	35,29 [b]	4	20,00	2	16,67 [b]	1	8,33 [b]	**0,0006**
>20	13	38,24 [b]	5	25,00	2	16,67 [b]	0	0 [b]	**< 0,0001**
NI	0	0	0		0	0	0	0	
TEMPO QUE PAROU (anos)									
<1	5	14,71	1	5,00 [b]	9	39,13 [b]	5	21,74	**0,0264**
1 a 5	25	73,53 [b]	7	35,00 [b]	6	26,09 [b]	11	47,83 [b]	**< 0,0001**
6 a 10	3	8,82	6	30,00	2	8,70	4	17,39	0,6903
11 a 15	1	2,94	5	25,00	4	17,39	3	13,04	0,5481
>15	0	0	1	5,00	2	8,70	0	0	0,3271
NI	0	0	0		0	0	0	0	

Tabela LxC 4x2, Teste G. p≤0,05 significativo. Teste X^2 em tabela 2x2 para comparações significativas entre os grupos. n= número de indivíduos por grupo.

6.3 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA HLA-C

A freqüência alélica absoluta foi obtida por contagem direta, e foram encontradas 49 variantes, como demonstrado na Tabela9.

Tabela 09: Frequências das variantes alélicas do gene HLA-C e comparação das mesmas entre os grupos.

Alelos (2*n*= 704)	**Contagem Direta (F_{rel})**	**NIC II** (2n=168)	**NIC III** (2n=180)	**CP** (2n=152)	**CN** (2n=204)	***p value***
C*01:02	13 (0,0185)	3 (0,0179)	3 (0,0167)	2 (0,0132)	5 (0,0245)	0,7977
C*01:02P	3 (0,0043)	0 (-)	1 (0,0056)	1 (0,0066)	1 (0,0049)	0,7656
C02:02	32 (0,0455)	9 (0,0535)	9 (0,050)	5 (0,0329)	9 (0,0442)	0,3428
C*02:02P	3 (0,0043)	1 (0,0059)	0 (-)	2 (0,0132)	0 (-)	0,1357
C*02:10	9 (0,0128)	4 (0,0238)	2 (0,011)	1 (0,0066)	2 (0,0098)	0,2585
C*03:02	2 (0,0028)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	2 (0,0098)	0,2025
C*03:03	34 (0,0483)	8 (0,0476)	8 (0,044)	10 (0,0658)	8 (0,0392)	0,4864
C*03:04	41 (0,0582)	7 (0,0417)	18 (0,10)	8 (0,0526)	8 (0,0392)	0,1062
C*03:04P	1 (0,0014)	0 (-)	0 (-)	1 (0,0066)	0 (-)	0,4085
C*03:18	1 (0,0014)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	1 (0,0049)	0,5120
C*04:01	3 (0,0043)	1 (0,0059)	0 (-)	1 (0,0066)	1 (0,0049)	0,5373
C*04:01P	125 (0,1776)	26 (0,1548)	30 (0,1667)	29 (0,1908)	40 (0,1961)	0,5056
C*04:07	1 (0,0014)	0 (-)	0 (-)	1 (0,0066)	0 (-)	0,4085

C*04:13	1 (0,0014)	1 (0,0059)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0,3107
C*05:01*	15 (0,0213)	6 (0,0357)	3 (0,0167)	0 (-)	6 (0,0294)	**0.0096**
C*05:01P	25 (0,0355)	7 (0,0417)	4 (0,0222)	7 (0,0460)	7 (0,0343)	0,3183
C*05:44	1 (0,0014)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	1 (0,0049)	0,5120
C*06:02	35 (0,0497)	10 (0,0595)	6 (0,0333)	6 (0,0394)	13 (0,0637)	0,1448
C*06:02P	8 (0,0114)	0 (-)	3 (0,0167)	2 (0,0131)	3 (0,0147)	0,3874
C*06:03	1 (0,0014)	0 (-)	1 (0,0056)	0 (-)	0 (-)	0,4657
C*07:01	3 (0,0043)	0 (-)	1 (0,0056)	0 (-)	2 (0,0098)	0,3421
C*07:01P*	54 (0,0767)	18 (0,1071)	9 (0,050)	13 (0,0855)	14 (0,0686)	**0,0096**
C*07:02*	38 (0,0540)	8 (0,0476)	15 (0,0833)	1 (0,0066)	14 (0,0686)	**0,0024**
C*07:02P	28 (0,0398)	4 (0,0238)	6 (0,0333)	9 (0,0592)	9 (0,0441)	0,7022
C*07:04	8 (0,0114)	1 (0,0059)	2 (0,0111)	0 (-)	5 (0,0245)	0,1209
C*07:04P	2 (0,0028)	0 (-)	1 (0,0056)	0 (-)	1 (0,0049)	0,5559
C*07:16	1 (0,0014)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	1 (0,0049)	0,5120
C*07:27	1 (0,0014)	0 (-)	0 (-)	1 (0,0066)	0 (-)	0,4085
C*07:51	3 (0,0043)	1 (0,0059)	0 (-)	1 (0,0066)	1 (0,0049)	0,5373
C*08:01	1 (0,0014)	0 (-)	1 (0,0056)	0 (-)	0 (-)	0,4657
C*08:02	34 (0,0483)	5 (0,0298)	8 (0,0444)	13 (0,0855)	8 (0,0392)	0,3213
C*08:03	2 (0,0028)	0 (-)	1 (0,0056)	0 (-)	1 (0,0049)	0,5559
C*08:03P	1 (0,0014)	0 (-)	0 (-)	1 (0,0066)	0 (-)	0,4085
C*08:04	5 (0,0071)	1 (0,0059)	3 (0,0167)	1 (0,0066)	0 (-)	0,2008
C*08:37	1 (0,0014)	1 (0,0059)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0,3107
C*12:02	8 (0,0114)	1 (0,0059)	1 (0,0056)	2 (0,0131)	4 (0,0196)	0,6359

C*12:03*	22 (0,0313)	9 (0,0536)	6 (0,0333)	0 (-)	7 (0,0343)	**0,0010**
C*12:03P	11 (0,0156)	1 (0,0059)	3 (0,0167)	3 (0,0197)	4 (0,0196)	0,8945
C*12:04	1 (0,0014)	0 (-)	1 (0,0056)	0 (-)	0 (-)	0,4657
C*14:02	15 (0,0213)	4 (0,0238)	7 (0,0389)	2 (0,0131)	2 (0,0098)	0,1536
C*14:03	1 (0,0014)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	1 (0,0049)	0,5120
C*15:02	5 (0,0071)	1 (0,0059)	1 (0,0056)	3 (0,0197)	0 (-)	0,1500
C*15:02P*	30 (0,0426)	12 (0,0714)	6 (0,0333)	4 (0,0263)	8 (0,0392)	**0,0176**
C*15:05	3 (0,0043)	0 (-)	1 (0,0056)	1 (0,0066)	1 (0,0049)	0,7656
C*16:01*	41 (0,0582)	13 (0,0774)	11 (0,0611)	10 (0,0658)	7 (0,0343)	**0,0415**
C*16:02	5 (0,0071)	2 (0,0119)	1 (0,0056)	1 (0,0066)	1 (0,0049)	0,6657
C*17:01	22 (0,0313)	2 (0,0119)	7 (0,0389)	8 (0,0526)	5 (0,0245)	0,3816
C*17:01P	1 (0,0014)	1 (0,0059)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0,3107
C*18:02P	3 (0,0043)	0 (-)	0 (-)	2 (0,0131)	1 (0,0049)	0,2335

NOTA: Teste G.Tabela de contingência LxC 4x2. Frel= freqüência relativa para cada alelo. Significativo p≤0,05. FONTE: A autora (2012)

Os mesmos cálculos de freqüência foram repetidos para os grupos alélicos de HLA-C, como demonstrado na Tabela 10, somente o HLA-C*03 obteve um valor de significância, porém próximo a 0,05.

Tabela 10: Cálculo de *p* para grupos alélicos de HLA-C.

GRUPO ALÉLICO (n=704)	$F_{(rel)}$	*p value*
C*01	0,022	0.8882
C*02	0,062	0.6428
C*03	**0,112**	**0.0411****
C*04	0,185	0.7857
C*05	0,058	0.4024
C*06	0,062	0.7370
C*07	0,196	0.4643
C*08	0,062	0.1166
C*12	0,059	0.4031
C*14	0,022	0.3661
C*15	0,054	0.5016
C*16	0,065	0.2419
C*17	0,033	0.2966
C*18	0,004	0.1835

NOTA: Teste X^2. Tabela LxC 2x2. GL=1. $p \leq 0,05$ significativo.

FONTE: A autora (2012)

Na caracterização do gene HLA-C, foram encontrados 163 combinações genotípicas. A Tabela 11 representa somente os genótipos mais freqüentes na população de estudo, para tal, foi usado um valor de corte de 0,99%. Assim, somente genótipos com freqüência a partir de 1,0% foram descritos.

Tabela 11: Representação de 26 genótipos com frequência acima de 1% do total da variabilidade genotípica encontrada.

GENÓTIPOS	CP	CN	NIC II	NIC III	TOTAL	%
C*02:02/C*04:01P	0	2	0	2	4	1,1
C*02:02/C*17:01	1	1	1	1	4	1,1
C*03:03/C*04:01P	1	3	1	1	6	1,7
C*03:03/C*06:02	2	0	2	1	5	1,4
C*03:03/C*07:01P	1	1	2	1	5	1,4
C*03:04/C*07:02	0	0	1	3	4	1,1
C*03:04/C*12:03	0	0	0	4	4	1,1
C*03:04/C*15:02P	0	1	1	3	5	1,4
C*03:04/C*16:01	1	1	1	2	5	1,4
C*04:01P/C*04:01P	**3**	**4**	**5**	**1**	**13**	**3,7**
C*04:01P/C*05:01	0	2	1	1	4	1,1
C*04:01P/C*05:01P	1	1	0	2	4	1,1
C*04:01P/C*06:02	1	4	2	0	7	2,0
C*04:01P/C*07:01P	**4**	**2**	**2**	**1**	**9**	**2,6**
C*04:01P/C*07:02	**0**	**3**	**1**	**5**	**9**	**2,6**
C*04:01P/C*07:02P	2	1	0	1	4	1,1
C*04:01P/C*08:02	4	1	0	1	6	1,7
C*04:01P/C*12:03	0	3	2	1	6	1,7
C*04:01P/C*12:03P	1	1	0	3	5	1,4
C*04:01P/C*14:02	0	0	1	3	4	1,1
C*04:01P/C*16:01	2	2	1	2	7	2,0
C*04:01P/C*17:01	3	1	0	3	7	2,0
C*05:01/C*07:01P	0	3	2	0	5	1,4
C*06:02/C*07:02	1	5	1	0	7	2,0
C*06:02P/C*07:01P	0	2	0	2	4	1,1
C*07:01P/C*15:02P	0	1	3	0	4	1,1
C*07:02/C*16:01	0	2	2	2	6	1,7
C*08:02/C*16:01	1	0	0	3	4	1,1

NOTA: Cálculos realizados nos programas Excel e Access. As percentagens encontradas para os 163 genótipos variaram de 0,3 a 3,7%. Em destaque os genótipos com maior freqüência e o número absoluto de indivíduos, por grupo.FONTE: A autora (2012)

Com finalidade de se observar diferenças entre a presença ou ausência do HPV e se na presença deste vírus, há diferença entre a presença ou ausência de

lesão em relação aos alelos encontrados, agrupou-se os indivíduos HPV positivos(CP + NIC II + NIC III) comparando-os aos HPV negativos (CN). Para os indivíduos HPV positivos, comparou-se a presença ou ausência de lesão (CP *versus* NIC II + NIC III). Foi observado que para os alelos HLA-C*05:01,HLA-C*07:02 eHLA-C*12:03 houve diferenças significativas para a existência ou não de lesões, analisando apenas os indivíduos HPV positivo (Tabela 12).

Tabela 12: Comparação estatística para presença ou ausência do vírus e para presença ou ausência de lesão, entre os grupos.

HLA-C*05:01	**Indivíduos (n=352)**	***p value***
Ausência ou Presença do HPV	CN x CP + NICII + NICIII	0,3504
Ausência ou Presença de lesão	**CP x NICII + NICIII**	**0,0098**
HLA-C*07:01P		
Ausência ou Presença do HPV	CN X CP+NICII+NICIII	0,5878
Ausência ou Presença de lesão	CP X NICII+NICIII	0,7539
HLA-C*07:02		
Ausência ou Presença do HPV	CN X CP+NICII+NICIII	0,2675
Ausência ou Presença de lesão	**CP X NICII+NICIII**	**0,0017**
HLA-C*12:03		
Ausência ou Presença do HPV	CN X CP+NICII+NICIII	0,7636
Ausência ou Presença de lesão	**CP X NICII+NICIII**	**0,0008**
HLA-C*15:02P		
Ausência ou Presença do HPV	CN X CP+NICII+NICIII	0,7689
Ausência ou Presença de lesão	CP X NICII+NICIII	0,1727
HLA-C*16:01		
Ausência ou Presença do HPV	CN X CP+NICII+NICIII	0,0614
Ausência ou Presença de lesão	CP X NICII+NICIII	0,8925

NOTA: Teste $\mathbf{X^2}$Tabela LxC 2x2. GL=1. $p \leq 0,05$ significativo.FONTE: A autora (2012)

A fim de se verificar possível associação entre os alelos significativos ou “alelos candidatos” e progressão/estádio da infecção por HPV foram realizadas todas as possíveis comparações combinadas nas diferentes amostras de indivíduos portadores desses alelos. No entanto, somente as diferenças estatísticas foram demonstradas nas tabelas 13 a 22.

Tabela 13: Comparação de indivíduos portadores do alelo HLA-C*05:01nas amostras NIC II (n=84) e CP (n=76).

HLA-C*05:01	**+**	**-**	**Total**
NIC II	6	78	84
Controle HPV +	0	76	76
***p* value**	**0,0048**		

NOTA: Teste **G.** Tabela LxC 2x2. GL=1. p ≤ 0,05 significativo. FONTE: A autora (2012)

Tabela 14: Comparação de indivíduos portadores do alelo HLA-C*05:01 nas amostras CN (n=102) e CP (n=76).

HLA-C*05:01	**+**	**-**	**Total**
Controle HPV-	8	94	102
Controle HPV +	0	76	76
***p* value**	**0,0024**		

NOTA: Teste G. Tabela LxC 2x2. GL=1. p ≤ 0,05 significativo. FONTE: A autora (2012)

Tabela 15: Comparação de indivíduos portadores do alelo HLA-C*07:01P nas amostras NIC II (n=84) e NIC III (n=90).

HLA-C*07:01P	**+**	**-**	**Total**
NIC III	8	82	90
NIC II	18	66	84
***p* value**	**0,0193**		

NOTA: Teste **G.** Tabela LxC 2x2. GL=1. p ≤ 0,05 significativo. FONTE: A autora (2012)

Tabela 16: Comparação de indivíduos portadores do alelo HLA-C*07:02 nas amostras NIC II (n=84) e CP (n=76).

HLA-C*07:02	**+**	**-**	**Total**
NIC II	8	76	84
Controle HPV+	1	75	76
***p* value**	**0,0160**		

NOTA: Teste **G.** Tabela LxC 2x2. GL=1. p ≤ 0,05 significativo. FONTE: A autora (2012)

Tabela 17:Comparação de indivíduos portadores do alelo HLA-C*07:02 nas amostras NIC III (n=90) e CP (n=76).

HLA-C*07:02	**+**	**-**	**Total**
NIC III	15	75	90
Controle HPV+	1	75	76
***p* value**	**0,0002**		

NOTA: Teste **G.** Tabela LxC 2x2. GL=1. p ≤ 0,05 significativo. FONTE: A autora (2012)

Tabela 18: Comparação de indivíduos portadores do alelo HLA-C*07:02 nas amostras CN (n=102) e CP (n=76).

HLA-C*07:02	**+**	**-**	**Total**
Controle HPV-	14	88	102
Controle HPV+	1	75	76
***p* value**	**0,0011**		

NOTA: Teste **G.** Tabela LxC 2x2. GL=1. p ≤ 0,05 significativo. FONTE: A autora (2012)

Tabela 19: Comparação de indivíduos portadores do alelo HLA-C*12:03 nas amostras NIC II (n=84) e CP (n=76).

HLA-C*12:03	**+**	**-**	**Total**
NIC II	9	75	84
Controle HPV+	0	76	76
***p* value**	**0,0005**		

NOTA: Teste **G.** Tabela LxC 2x2. GL=1. p ≤ 0,05 significativo. FONTE: A autora (2012)

Tabela 20: Comparação de indivíduos portadores do alelo HLA-C*12:03 nas amostras CN (n=102) e CP (n=76).

HLA-C*12:03	**+**	**-**	**Total**
Controle HPV-	7	95	102
Controle HPV+	0	76	76
***p* value**	**0,0047**		

NOTA: Teste **G.** Tabela LxC 2x2. GL=1. p ≤ 0,05 significativo. FONTE: A autora (2012)

Tabela 21: Comparação de indivíduos portadores do alelo HLA-C*12:03 nas amostras NIC III (n=90) e CP (n=76).

HLA-C*12:03	**+**	**-**	**Total**
NIC III	6	84	90
Controle HPV+	0	76	76
***p* value**	**0,0060**		

NOTA: Teste **G.** Tabela LxC 2x2. GL=1. p ≤ 0,05 significativo. FONTE: A autora (2012)

Tabela 22: Comparação de indivíduos portadores do alelo HLA-C*15:02P nas amostras CN (n=102) e CP (n=76).

HLA-C*15:02P	**+**	**-**	**Total**
Controle HPV-	8	94	102
Controle HPV+	4	72	76
***p* value**	**0,0229**		

NOTA: Teste **G.** Tabela LxC 2x2. GL=1. p ≤ 0,05 significativo. FONTE: A autora (2012)

Para facilitar a visualização dos resultados, na tabela23há uma compilação de todos os resultados epidemiológicos mais freqüentes e na tabela 24, os genéticos, a fim de resumidamente colaborar com o que foi anteriormente descrito nos resultados.

Tabela 23: Compilação dos resultados obtidos: Análise epidemiológica (mais frequentes).

	ID	ETNIA	ESC	IASEX	Nº PR	PRE	COC	TCO	GEST	1º PAR	C.O.	TABG
CN	34,5	BRN	F.I.	15-25	1	NUN	SIM	>10	1-3	15-18	1-5	NÃO F
	±7,26	70	37	85	89	55	51	36	66	29	38	63
		92,11	36,27	83,33	87,25	53,92	50	35,29	64,71	28,43	37,25	61,76
CP	27,3	PRD	F.I.	15-25	1	NUN	NÃO	1-5	1-3	15-18	1-5	EX F
	±7,23	38	22	48	43	34	44	30	44	33	38	34
		50,0	28,95	63,33	42,16	44,74	57,89	39,47	57,89	43,42	50,0	44,74
NIC II	30,5	PRD	M.C.	15-25	1	NUN	SIM	6-10	1-3	15-18	1-5	NÃO F
	±7,03	46	29	61	71	40	57	27	58	37	42	41
		59,21	34,52	72,62	69,61	47,62	67,86	32,14	69,05	44,05	50,0	48,81
NIC III	32,8	PRD	F.I.	15-25	1	NUN	SIM	>10	1-3	15-18	1-5	NÃO F
	±7,00	49	31	67	76	43	63	34	64	32	41	39
		64,47	34,44%	74,44	74,51	47,78	70,0	37,78	71,11	35,55	45,56	43,33

NOTA: ID- idade; ESC- escolaridade; IASEX- início da atividade sexual; NºPR- número de parceiros nos últimos 12 meses; PRE– uso de preservativo; COC– uso de contraceptivo oral; TCO – tempo de us de contraceptivo oral; GEST- gestações; 1ºPAR- idade ao 1º parto; C.O- citologias oncóticas; TABG- hábito tabagista; BRN- branco; PRD- pardo; FI- ensino fundamental incompleto; MC- ensino médio completo; NUN- nunca; NÃO F- não fumantes; EXF- ex fumantes.

FONTE: A autora (2012)

Tabela 24: Compilação dos resultados obtidos: Análise genética.

	HLA-C							
	ALELO *05:01 0,0096	ALELO *07:01P 0,0096	ALELO *07:02 0,0024	ALELO *12:03 0,0010	ALELO *15:02P 0,0176	ALELO *16:01 0,0415	GENOTIPO 04:01P/04:01P 3,7%	G. A. HLA-C*03
Estudo de associação com alelos "candidatos"	**NICII x CP** p=0,0048 **CN x CP** p=0,0024	**NICIII x NICII** p=0,0193	**NIC II x CP** p=0,0160 **NICIII x CP** p=0,0002 **CN x CP** p=0,0011	**NIC II x CP** p=0,0005 **NICIII x CP** p=0,0060 **CN x CP** p=0,0047	**CN x CP** p=0,0229	Não significante		*p*=0.0411
ALOTIPO HLA-C	C2 (Lys ^{80})	C1 (Asp ^{80})	C1(Asp ^{80})	C1(Asp ^{80})	C2(Lys ^{80})	C1(Asp ^{80})	C2(Lys ^{80})	C1(Asp ^{80})

NOTA: G.A – Grupo alélico. Lys ^{80}– lisina na posição 80; Asp ^{80} – asparagina na posição 80.

7 DISCUSSÃO

7.1 CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS

Um modelo de banco de dados com a descrição de características gerais das mulheres do projeto HPV, epidemiológicas e genéticas, servirá como base de caracterização para estudos futuros. O estabelecimento de um banco de dados sólido pelo grupo de pesquisa LIGH-UFPR, Hospitais Erasto Gaertner e Departamento de Tocoginecologia (DTG) do Hospital de Clínicas da UFPR, possibilitará a comparação das informações observadas por outras Instituições de Saúde e Serviços de Rastreamento e Combate ao Câncer de Colo Uterino no Brasil e em outros países. Um sistema de banco de dados estruturado fornece informações sobre a magnitude e o impacto do câncer, detecção precoce, tratamento e cuidados paliativos. Para o estabelecimento de medidas efetivas de controle para Instituições de Saúde, fazem-se necessárias informações de qualidade sobre a distribuição de incidência, caracterização genotípica e epidemiológica, o que possibilita uma melhor compreensão sobre a doença e seus determinantes; a formulação de hipóteses causais; a avaliação dos avanços tecnológicos aplicados à prevenção e ao tratamento, bem como a efetividade da atenção à saúde.

O presente trabalho teve como objetivo verificar a existência de diferenças significativas entre as freqüências alélicas do gene HLA-C em quatro grupos específicos de mulheres: CN-controle negativo, mulheres saudáveis com citologia oncótica normal e Captura Híbrida negativa; CP-controle positivo, mulheres saudáveis com citologia normal e Captura Híbrida positiva para HPV; NIC II e III – mulheres com lesão intraepitelial cervical graus II e III, diagnosticadas por exame anatomopatológico e ainda confirmadas pelo teste de Captura Híbrida para a positividade do HPV de alto risco ou oncogênicos. Também foi avaliada a caracterização epidemiológica de cada grupo específico para análise conjunta aos dados moleculares.

O HPV é considerado um pré-requisito para o CC. No entanto, além da presença desse vírus outros fatores de risco devem ser considerados. Esses co-fatores podem agir influenciando a contaminação, persistência e o desenvolvimento da NIC. Um

grupo de co-fatores são os fatores ambientais e exógenos, incluindo deficiência alimentar, contraceptivos, hábito tabagista, alta paridade e co-infecção com outras DSTs, por exemplo, *Chlamydia trachomatis*, Herpes simples tipo 2 e imunossupressores (ANJUERE, 2007). Outro grupo engloba co-fatores virais, como infecções com outros tipos ou variantes do HPV. Co-fatores do hospedeiro, incluindo hormônios, fatores genéticos e outros fatores relacionados a resposta imune também podem estar associados ao risco de infecção (KOTLOFF, 1998; SIMONETTI, 2009).

A respeito da infecção do vírus HPV de alto risco, existem alguns fatores epidemiológicos que podem influenciar no desenvolvimento do CC, bem como os genéticos e virais que podem estar envolvidos na expressão da carcinogênese (SCHLECHT et al, 2001, FERNANDES et al, 2009; ALAEZ-VERSON et al, 2011).

Fernandes *et al.*, em 2009, realizaram um trabalho com 250 mulheres entre 15 e 65 anos. Observaram que em mais de 81,5% das mulheres que tiveram resultados de citologia oncótica normal e incidência de infecção por HPV foram até 34 anos, mas com menor prevalência do que em mulheres com maior idade. Entre as mulheres diagnosticadas NIC II, a prevalência da infecção aumentou a medida que a idade se aproximava dos 34 anos e depois reduzia a partir dos 35 aos 44 anos. Cerca de 78% das mulheres NIC III tinham entre 25 e 54 anos de idade.

Um trabalho realizado na Tailândia recrutou 1256 mulheres, cuja media de idade foi de 29.6 anos (MARKS, 2011). Em outros trabalhos, a média de idade também é próxima aos 30 anos de idade (GUPTA,*et al.*, 2009; GRAVITT,*et al.*, 2011).

Segundo INCA, 2012, a incidência do câncer do colo do útero manifesta-se a partir da faixa etária de 20 a 29 anos, aumentando seu risco rapidamente até atingir o pico etário entre 50 e 60 anos.

O presente estudo teve como amostra mulheres saudáveis e mulheres portadoras NIC II e NIC III, cuja média de idade total n=532, é de 31,5±7,13 anos. Ao calcular a média de idade para cada grupo encontrou-se: CN 34,5±7,26 anos, CP 27,3±7,23 anos, NIC II 30,5±7,03 anos e NIC III 32,8±7,00 anos. Ao calcular o valor de p (p=0,984), observou-se que a diferença de idade entre os grupos não é significativa, isto é, há semelhança entre as variações das idades entre os grupos de estudo para os valores encontrados e estão próximos aos descritos na literatura.

Segundo dados do IBGE 2011, dos entrevistados, 96% afirmam que saberiam fazer sua auto classificação no que diz respeito a cor ou raça, 65% dos entrevistados utilizaram uma das cinco categorias de classificação: branca (49,0%), preta (1,4%), parda (13,6%), amarela (1,5%) e indígena (0,4%), além dos termos “morena” (21,7%, incluindo variantes “morena clara” e “morena escura”) e “negra” (7,8%).

Quanto à etnia, cerca de 60% das mulheres CP, NIC II e NIC III foram declaradas pardas e 92,11% brancas para CN. Essa classificação foi realizada por uma equipe preparada para a entrevista do questionário epidemiológico, na tentativa de reduzir distorções da autoclassificação. O valor significativo de p para a etnia branca (*p*=<0,0001), assim como para pardo (*p*=<0,0007), explica que a variação étnica do grupo CN para os demais se deve ao fato de que a coleta da maioria das mulheres deste grupo, ocorreu em uma única cidade metropolitana de Curitiba enquanto, principalmente, os grupos NIC abrangem mulheres de várias cidades da região de Curitiba e do Estado. Em 2008, Downs *et al*, verificou nos Estados Unidos, que a percentagem de mulheres com CC nos diferentes grupos raciais analisada por idade, o maior índice de prevalência, entre 40 e 49 anos, foi encontrado para mulheres brancas, enquanto hispânicas tem picos mais amplos (variando de 30 a 60 anos). Mulheres afro-americanas tiveram pico de prevalência entre 35 e 45 e novamente aos 60.

Alguns estudos mostraram que a baixa educação está altamente relacionada a uma pior saúde e baixo ou limitado conhecimento em saúde, sendo um fator de risco para piores resultados (KAKU *et al.*, 2008; KELLER *et al.*, 2008; MA *et al.*, 2012).

Ao se observar a variação dos níveis de escolaridade entre os grupos analisados, a maioria das mulheres permaneceu no ensino fundamental incompleto CP 22 (28,95%), CN 37 (36,27%) e NIC III 31 (34,44%). O grupo NIC II, entretanto, 29 mulheres (34,52%) possuem ensino médio completo. A dificuldade de acesso à informação, através de qualquer instrumento da mídia, é importante para esclarecimento e conscientização. Durante o processo de entrevista, tanto no grupo controle quanto no grupo caso, a maioria das entrevistadas não possuía informações básicas suficientes sobre a infecção por HPV e suas possíveis consequências, bem como sobre o CC.

Os resultados encontrados contradizem a maioria dos trabalhos, sendo que mulheres com mais anos de escolaridade estão positivamente associadas à infecção

do HPV (NIC II) quando comparadas às de menor estudo. Segundo Nonnenmacher *et al.*, 2002, uma explicação pode ser o resultado de um efeito amostral, pois a diferença entre o número de mulheres NIC II para o ensino médio completo e ensino fundamental incompleto é de apenas três mulheres.

Para o enfrentamento do câncer, são necessárias ações que incluam: educação em saúde em todos os níveis da sociedade; promoção e prevenção orientadas a indivíduos e grupos (não se esquecendo da ênfase em ambientes de trabalho e nas escolas); geração de opinião pública; apoio e estímulo à formulação de leis que permitam monitorar a ocorrência de casos (INCA, 2012).

Mulheres com mais de 34 anos, apresentam maior risco para NIC II e, acima de 45 anos, para NIC III. As mulheres que tiveram sua primeira relação sexual entre as idades de 14 e 17 anos, apresentam maior risco apenas para NIC III. Múltiplos parceiros sexuais (FERNANDES ET AL, 2009) e hábito tabagista (GRAVITT, 2003; COLLINS, 2005; MCINTYRE-SELTMAN, 2005) também elevam o risco de NIC III. Além do uso de contraceptivo oral por longo período e múltiplas gestações (MORENO, 2002; GRAVITT, 2003; APPLEBY, 2007).

Alguns autores afirmam que o início precoce da atividade sexual é um fator de risco para o surgimento de lesões intraepiteliais. Todos os grupos em estudo, a maioria das mulheres afirmou ter tido sua primeira relação sexual entre 15 e 25 anos. Os grupos controle positivo e negativo, respectivamente com 63,16% e 83,33%, NIC II 72,62% e NIC III 74,44%. É interessante observar que no grupo com idade de início sexual menor de 15 anos, há um número reduzido de mulheres CN (13), comparado as CP e NICs II e III (29, 24 e 23, respectivamente) p=0,0018. Já no grupo ente 15 e 25 anos, ocorre o contrário, há um número de mulheres CN (85) maior que os outros grupos (48 CP,61 NIC II e 67 NIC III). Ao se calcular p (*p*=0,0247) foi observado que há uma proteção duas vezes maior do que em mulheres que iniciam a atividade sexual após os 15 anos de idade.

O número de parceiros nos últimos 12 meses também entre a maioria das mulheres ficou em 89 (87,25%) CN, 43 (42,16%) CP, 71 (69,61%) NIC II e 76 (74,51%) NIC III, que relataram terem tido um parceiro sexual. A diferença entre CN e NICs é numericamente pequena, entretanto, CP tem a metade de indivíduos de CN para um parceiro. Entre as mulheres que não tiveram parceiro, CP destacou-se em relação aos outros grupos de estudo com 15 mulheres, enquanto CN e NICs, cinco e seis respectivamente. Para análise de dois a cinco parceiros, CP também

obteve maior índice com 17 mulheres (16,67%) enquanto CN, NIC II e NIC III, 7(6,86%), 7(6,86) e 8(7,84). Para *p*=0,0010, *OR*=5,2540 e IC95%=2,5122-10,9885; pode-se afirmar que a probabilidade de infecção é cerca de cinco vezes maior em mulheres que tiveram mais parceiros no mesmo período.

Novos parceiros sexuais e reativação latente têm sido usados para explicar um segundo pico de prevalência de HPV observados em mulheres mais velhas, particularmente na América latina (GRAVITT, 2003; DE SANJOSE, 2007). Alguns estudos epidemiológicos relatam uma forte associação entre novos parceiros sexuais e incidência de HPV, impulsionando novos casos de infecções (GRAVITT, 2003; MUNOZ, 2004; TROTTIER, 2010).

A maioria dos adultos sexualmente ativos terá HPV genital em algum momento de suas vidas, isso se explica pelo fato de o HPV geralmente ser transitório e assintomático. A maioria não vai saber que foi infectado (CDC, 2010).

Mais de 100 tipos de HPV que foram identificados e que podem infectar a pele ou mucosas, aproximadamente 40 infectam a mucosa do trato genital e que são transmitidos pelo contato direto, causam complexas infecções associadas à doenças graves, como displasia cervical a cânceres de pênis e anal (GIULIANO E SALMON., 2008; REPP *et al.*, 2012). O epitélio dos tecidos da pele e mucosa atua como mecanismo de barreira contra a invasão de patógenos. Estas células epiteliais possuem enzimas hidrolíticas que desempenham um papel importante na defesa hospedeiro, principalmente contra bactérias e vírus (SIMONETTI,*et al.*,2009).

Embora mais de 40 tipos do vírus infecte a área genital, quatro tipos (seis, 11,16 e 18) são comumente associados à implicações mais graves nas mulheres. Os HPVs 6 e 11 são mais comumente associados a verrugas genitais, enquanto os tipos 16 e 18, ao potencial desenvolvimento do CC. Por não existir cura para a infecção do HPV, o desenvolvimento de medidas preventivas como o uso de preservativo e vacinas são essenciais para reduzir a carga do HPV (GIULIANO *et al.* 2011; REPP *et al.*, 2012).

Ao questionar as mulheres sobre o uso de preservativo, os índices de respostas NUNCA das mulheres dos grupos CN e CP ficaram em 53,92%(55) e 44,74%(34), já para NIC II 47,62%(40) e NIC III 47,78%(43). Ao observar os dados, pode-se notar que as mulheres CN e NIC III englobam a maior parte do desuso, a justificativa para esses índices de não uso de preservativo se deve ao fato de a maioria dessas mulheres teve um parceiro fixo, demonstrado na Tabela 5. Para

mulheres que não mantiveram relação sexual, os valores calculados foram: p=0,0436, OR=4,5333, IC95%=1,5750-13,0481, indicando quatro vezes maior proteção do que aquelas que não usaram preservativo com atividade sexual regular e os 30% de mulheres que responderam usar preservativos OCASIONAL nos últimos 12 meses, o risco é cerca de 1,5 maior do que as que usam REGULAR (OR=1,4456, IC95%=0,7960-2,6253).

Relacionado o uso de contraceptivo oral (CO) neste trabalho, obteve-se para CN 51 mulheres (50%) que usaram e outras 51 (50%) que não usaram. Para CP, NIC II e NIC III, a maioria das mulheres declarou não usar CO, sendo 44 (57,89%), 57 (67,86%) e 63 (70%), respectivamente. O equilíbrio no grupo CN se reflete no número de parceiros, no qual cerca de 87% das mulheres afirmou ter um apenas e 4,9% não tiveram relações sexuais em 12 meses, portanto não usaram contraceptivo.

Foram encontrados nos grupos NICs os maiores índices de uso de contraceptivo, seguidos por CN. As mulheres que não usam contraceptivo tem duas vezes mais proteção à infecção por HPV (*p*=<0,0001 e *OR*=2,3600, IC 95%=1,2851-4,3339). Alguns autores afirmam que o uso de contraceptivo a partir de cinco anos é um fator risco relevante à infecção do HPV. Verificou-se que 37,78% das mulheres NIC III usam CO há mais de 10 anos, seguidas por 35,29% de CN, provavelmente explicado pelas gestações, sendo que mais de 79% das mulheres CN já tiveram entre uma aseis gestações. Entre 6 e 10 anos, 32,14% de mulheres NIC II e entre um e cinco anos, 39,47% de CP usam CO, indicando que os índices encontrados neste trabalho são concordantes com a literatura quanto ao tempo de uso de contraceptivo de infecção do HPV.

Uma observação importante quanto ao uso de CO é o fato de que algumas mulheres já fizeram uso por determinados períodos e na data da entrevista não usavam mais. De qualquer forma, cerca de apenas 12% do total de mulheres com vida sexualmente ativa não usaram CO em nenhum momento da vida.

Marks, 2011, constatou em seu estudo que, das 379 mulheres que faziam uso de contraceptivo oral de um total de 544, 273 (50,2%) eram NIC III e 174 (63,7%) NIC II. O risco do HPV associado ao câncer cervical tem-se mostrado significativamente alto entre mulheres que usam contraceptivos orais combinados (COC), por cinco anos ou mais (MORENO*et al.*, 2002; APPLEBY*et al.*, 2007; MARKS *et al.*, 2011).

Várias teorias tentam explicar a associação por tempo prolongado de contraceptivo oral e risco de câncer cervical, incluindo aumento no risco de infecção de HPV de alto risco entre as usuárias, sendo um efeito cancerígeno direto do estrogênio e progesterona regulando a expressão do oncogene viral (MITRANI-ROSENBAUM*et al.*, 1989; MITTAL*et al.*, 1993; PATER*et al.*, 1994; CHEN *et al.*,1996; KIM*et al.*, 2000; RUUTU*et al.*, 2006; MARKS, 2011), e a habilidade para promover o crescimento e persistência do tumor (BRAKE, 2005; LAMBERT*et al.*, 2005; SHAI*et al.*, 2007; CHUNG*et al.*, 2008; MARKS, 2011).

Segundo IARC, 2005 e Bosch e colaboradores, 2008, mulheres que reportaram sete ou mais gestações a termo e eram HIV positivo, tinham quatro vezes mais risco de CC quando comparadas a mulheres nulíparas HPV positivas com características similares. Existia ainda duas vezes mais risco em mulheres que reportaram sete ou mais gestações quando comparadas às HPV positivo com uma ou duas gestações a termo. Estudos similares foram realizados na Costa Rica, Tailândia e Portland. Ainda especula-se que a redução na taxa de paridade em países em desenvolvimento nas últimas décadas tem contribuído para a redução na incidência do CC.

Entre as mulheres do estudo a maioria manteve-se, entre umae três gestações sendo, 57,89% para CP, 64,71% CN, 69,05% NIC II e 71% NIC III, representando 65,9% do total de mulheres do estudo (n=352). Entre quatro e seis gestações, 21,05% de mulheres CP e 14,29% NIC II (p não significativo, OR=1,3793, IC95%= 0,5861-3,2460). Mulheres que não tiveram gestação representaram 14,77% do total. Acima de seis gestações, sete mulheres CP (9,21%), uma NIC II (1,19%) e quatro NIC III (4,44), destacando-se uma mulher NIC III com dezoito gestações. É importante ressaltar que dentro dos grupos gestacionais estão gestações únicas, gemelares e abortos. Gestações mal sucedidas foram observadas para os grupos CN 11 (10,78%), CP 20 (26,32%), NIC II 6 (7,14%) e NIC III 13 (14,44%). Talvez o alto índice de abortos no grupo CP se explique pelo fato de que o início da atividade sexual (38,16%) e a idade do primeiro parto sejam precoces, 5,26% (4) pariram até 15 anos de idade e 43,42% (33) entre 15 e 18 anos. Enquanto para os outros grupos CN, NIC II e NIC III as percentagens de partos antes dos 15 anos permanecem entre zero e 2%.

A detecção primária do HPV é realizada por um exame citológico simples, rápido e eficiente, o Papanicolaou ou preventivo (INCA, 2012). Dados do Ministério da Saúderevelam que, somente no primeiro semestre de 2011, o Paraná realizou 302,7 mil exames de citologia, entre mulheres de 25 a 64 anos. O dado corresponde a 87% da meta em 2011. Este é o público prioritário para a realização do exame porque concentra o maior risco e a maior incidência da doença. Para o Brasil, os dados semestrais mostram que foram realizados mais de 5,6 milhões de exames de citologia. Para o público prioritário, mulheres entre 25 e 64 anos, foram realizadas 4,3 milhões de exames, o que corresponde a 71% da meta do Paraná, sendo que o Brasil atingiu apenas 47%de sua meta no mesmo período (BRASIL, 2011).

A rotina recomendada para o rastreamento no Brasil é a repetição do exame Papanicolaou a cada três anos, após dois exames normais consecutivos realizados com um intervalo de um ano (INCA, 2012). A repetição em um ano após o primeiro teste tem como objetivo reduzir a possibilidade de um resultado falso-negativo na primeira rodada do rastreamento (BRASIL, 2010). A periodicidade de três anos tem como base a recomendação da OMS e as diretrizes da maioria dos países com programa de rastreamento organizado. Tais diretrizes justificam-se pela ausência de evidências de que o rastreamento anual seja significativamente mais efetivo do que se realizado em intervalo de três anos (WHO, 2007).

Neste estudo, constatou-se que o acompanhamento das citologias oncóticas pelas NIC II e NIC III foi feito a cada seis meses pelo hospital, pelo menos dois exames, sendo que a confirmação do grau da lesão pelo último exame foi 2-3 meses antes do procedimento cirúrgico. Destacam-se 2,94% de mulheres CN e 9,21% de CP, que ainda não haviam realizado o exame. A variação de períodos sem realização de exame preventivo entre os grupos foi observada, sendo que CP e CN, 50% e 37,25% respectivamente fizeram no máximo cinco preventivos durante toda a vida sexualmente ativa, bem como 50% NIC II e 45,56% NIC III, antes de detectar alteração celular. O maior número de mulheres que realizaram entre seis e 10 exames de citologia foram 26 mulheres NIC III (28,89%) contra 20 CP (26,32%). Entre 11 e 15 citologias, 20,59% CN, seguidas pelos NICs, sugerindo possível confirmação de diagnóstico. Acima de 15 citologias, 11,90% NIC II sugerem acompanhamento de possível desenvolvimento ou regressão de lesão. Ao calcular os valores entre os grupos (p=0,0174, OR=1,9565, IC95%=0,5894-6,4950), resultou

que maior número de citologias, indica maior prevenção ou maior acompanhamento entre mulheres com diagnóstico de HPV ou NIC.

Ao correlacionar a idade da primeira relação sexual e o número de citologias realizadas, primeiramente os grupos controle e caso foram subdivididos por idade (<20; 21 a 30; >30 anos), em seguida ao aplicar o teste de X^2 observou-se que houve diferença significativa para o grupo entre 21 e 30 anos, para mulheres que fizeram no máximo 5 citologias (p=0,0203). Já para mulheres com início da atividade sexual com menos de 20 e acima de 30 anos, não foi detectada nenhuma significância.

Vários estudos têm demonstrado que dentre os fatores de risco o hábito tabagista é de fundamental importância para o entendimento da infecção e progressão do HPV principalmente em países em desenvolvimento (BOTTINI *et al.*, 1999; MORENO *et al.*, 2002; GUETTA *et al.*, 2007; FARID *et al.*, 2011; GRAVITT, 2011).

Neste estudo 91 mulheres se declararam fumantes, 89 ex-fumantes e 171 não fumantes. A maioria de fumantes são NIC (35,71% e 31,11%), os controles foram menos de 20% de fumantes. O grupo de ex-fumantes como menor percentagem foi NIC II (14,29%), CP foi o mais representativo com 44,74%. Já entre mulheres que nunca fumaram, 61,76% são CN.

Resumidamente, mais mulheres NICs fumavam e menos nunca fumaram. Menos mulheres CN fumavam e mais nunca fumaram. O grupo CP representa ex-fumantes. Fumantes estão duas vezes mais relacionadas a chance de desenvolvimento de lesão cervical. Ex-fumantes tem quatro vezes mais risco quando comparadas ao grupo de não fumantes, pois além do risco acumulado pelo uso do cigarro, tem-se o risco natural da infecção pelo HPV.

Foi encontrado no grupo NIC II o maior número de fumantes com 30 mulheres (35,71%). Desse total, 13 (43,33%) mulheres fumam entre 16 e 20 cigarros ao dia e 10 (33,33%) há mais de 15 anos. Em NIC III, das 28 fumantes (31,11%), 13 (43,33%) fumam há mais de 15 anos e 10 (33,33%) fumam entre 16 e 20 cigarros ao dia. Entre os grupos controle, CN oito mulheres (44,44%) fumam ha mais de 15 anos e 7 (38,89%) entre seis e 10 cigarros ao dia. Para CP cinco mulheres (33,33%) fumam entre 11 e 15 anos e duas (13,33%) mais de 15 anos e ambos fumam entre

um e cinco cigarros ao dia. Através dos dados observou-se que o numero de mulheres NIC fumantes é duas vezes maior que ao de controles para o tempo de 15 anos e que também mais mulheres do grupo caso consomem maior número de cigarro ao dia.

Harris *et al.*, em 2004 observou que o hábito tabagista está associado ao NIC analisando o tipo de hábito, quantidade de maços de cigarro ao ano e o número de cigarros ao dia e encontrou que o consumo acima de dez cigarros ao dia está fortemente associado ao desenvolvimento de lesão intraepitelial.

Os cálculos gerais para o grupo de ex-fumantes demonstraram que o tempo, em anos, de consumo de cigarros foi significativo para o período entre seis e 10 anos(p=0,0088).Ao analisar o número de cigarros por dia, valores significativos foram encontrados para consumo entre 16 e 20 cigarros ao dia e acima de 20 cigarros ao dia (p=0,0006 e p=<0,0001, respectivamente). Comparações feitas entre os grupos de estudo nas diferentes classes de cigarros ao dia apresentaram que para o consumo de um a cinco cigarros existe uma chance de 8 vezes para associação à infecção do HPV. O consumo a partir de seis cigarros ao dia aumenta esta chance cerca de 10 vezes (OR=9,8537, IC95%=1,2076-80,4031).

Já o tempo, em anos, para mulheres que pararam de fumar foi significativo para menos de um ano (p=0,0264) e de um a cinco anos (p=<0,0001), entretanto demonstra que o período é insuficiente para que reduza a associação entre cigarro e a infecção por HPV. A partir de seis anos os cálculos indicam redução na chance dessa associação, significando que o abando do hábito tabagista por um período prolongado pode representar menor chance de progressão de lesão por HPV.

7.2 HLA-C

A resposta imune está intimamente ligada ao MHC, cujas moléculas são necessárias para apresentar os antígenos protéicos aos linfócitos T e são expressas constitutivamente em quase todas as células nucleadas (classe I). As moléculas classe II são encontradas geralmente nas células dendríticas, linfócitos B e em macrófagos (ABBAS E LICHTMAN, 2005). Os genes HLA de classe I e classe II são

polialélicos e polimórficos e seus produtos protéicos possuem um papel essencial na respostas das células T dirigida a antígenos estranhos, inclusive os virais. Alguns alelos e seus correspondentes produtos moleculares podem apresentar mais eficientemente peptídeos virais e, dessa forma determinar com mais eficiência a remoção de certas infecções virais (CUZICK *et al.*, 2000; CHATURVEDI *et al.*, 2009). Vários estudos avaliaram a associação de genes HLA classe I (HLA-A, HLA-B e HLA -C) e classe II com a susceptibilidade ao CC (NEUMAN *et al.* 2000; WANG *et al.*, 2002a, b)

Carrington *et al.*, 2005 e Martin e colaboradores em 2010, em seus trabalhos observaram uma associação entre alótipos HLA-C do grupo 1 (C1;com asparagina na posição 80) e o aumento do risco de CC enquanto os alótipos HLA-C do grupo 2(C2; lisina na posição 80) foi associado à redução do risco de desenvolvimento de NIC III e CC (2005). Wang *et al.*, 2002a mostrou uma associação entre HLA-C*02:02 (grupo 2) com indivíduos NIC II e NIC III tendo um efeito protetor.

Em 2008, Madeleine et. al., encontrou três classes de alelos significantemente relacionados ao aumento do câncer cervical em mais de 20% dos casos: A*03:01 (OR, 1.4; 95% CI, 1.1–1.9), B*44:02 (OR,1.9; 95% CI, 1.4–2.7), e C*05:01 (OR, 1.6; 95% CI, 1.2–2.3). A redução do risco foi relacionada ao alelo B*15:01(OR, 0.6; 95% CI,0.4–0.9).

Dos alelos pesquisados se observou que em seis deles houve diferença estatística, i.e., dentre os 49 alelos encontrados entre os grupos, em seis deles se detectou significância estatística sendo: HLA-C*05:01(*p*=0,0096), HLA-C*07:01P (*p*=0,0096), HLA-C*07:02 (*p*=0,0024), HLA-C*12:03 (*p*=0,0010), HLA-C*15:02P(*p*=0,0176) e HLA-C*16:01(*p*=0,0415).

Análises com grupo alélico também foram realizadas, apenas HLA-C*03 ficou abaixo de 5,0%, onde *p*=0,0411, próximo ao limite de significância. Uma possível explicação seja a alta freqüência encontrada na amostra estudada (79 mulheres), já que na população brasileira a freqüência é de 0,079 (ALLELE FREQUENCY, 2012).

A freqüência genotípica HLA-C também foi obtida e foram observados 163 genótipos para a amostra em estudo, isso reflete a grande variabilidade genética do gene HLA-C. A variação da freqüência foi de 0,3% a 3,7%, sendo que os três genótipos mais freqüentes pertencem ao grupo alélico HLA-C*04. A maior freqüência encontrada, 3,7% foi para o genótipo homozigoto HLA-C*04:01P, sugerindo um reflexo da alta freqüência desse alelo encontrada na população do estudo.

Não houve diferença significativa para os quatro alelos testados na correlação feita entre mulheres HPV negativo x HPV positivo. Entretanto, para mulheres HPV positivo sem lesão x HPV positivo com lesão, houve significância estatística para os alelos HLA-C*05:01 (*p*=0,0098), HLA-C*12:03 (*p*=0,0008) e HLA-C*07:02 (*p*=0,0017, OR=0,0875 e IC 95%=0,0116-0,6607), podendo estar diretamente relacionada à progressão da lesão, uma vez que há significância entre os grupos (CP x NICII+NICIII).

Para verificar a existência de associação entre os alelos HLA-C*05:01, HLA-C*07:01P, HLA-C*07:02, HLA-C*12:03, HLA-C*15:02P e HLA-C*16:01, e progressão ou estádio da infecção por HPV, análises entre as combinações de indivíduos dos grupos de estudo foram realizadas.

Para o alelo HLA-C*05:01 a significância se deu entre os grupos CP x NIC II (*p*=0,0048) e CP x CN (*p*=0,0024), indicando que presença desse alelo nas mulheres NIC II poderia ser encarado como indício de susceptibilidade a progressão da lesão, assim como a ausência desse alelo em CP.

No alelo HLA-C*07:01P, a significância foi entre NIC II x NIC III (*p*=0,0193), sugerindo também, possível susceptibilidade ao desenvolvimento de lesão cervical na presença desse alelo.

O HLA-C*07:02 apresentou três resultados estatisticamente significativos entre: NIC II x CP (*p*=0,0160), NIC III x CP (*p*=0,0002)e CN x CP (*p*=0,0011). Esses dados sugerem que pode haver uma correlação entre a presença do vírus e o desenvolvimento da lesão, sendo um sinalizador de possível NIC.

Assim como dito anteriormente para o HLA-C*07:02, o HLA-C*12:03, também apresentou três resultados estatisticamente significativos entre: NIC II x CP (*p*=0,0005), NIC III x CP (*p*=0,0060)e CN x CP (*p*=0,0047). O alelo HLA-C*15:02P apresentou significância entre os grupos CN x CP (*p*=0,0229).

O alelo HLA-C*16:01 não apresentou diferenças entre os grupos, possivelmente pelo número amostral, necessitando de um *n* maior e devido à frequência do alelo na população ser menor do que os demais alelos de significância estatística encontrados o que corrobora com a descrição de freqüências pelo site *Allele frequency* (2012) para os alelos HLA-C*05:01 (0,0610); HLA-C*07:01P (0,1560); HLA-C*07:02 (0,0800) e HLA-C*16:01 (0,0240) para a população brasileira descrita.

7.3 PERSPECTIVAS

As células *Natural Killer* (NK) desempenham um importante papel na imunovigilância e na eliminação de células neoplásicas e infectadas por vírus. Sua ação citotóxica depende de interações entre uma diversidade de receptores presentes em sua membrana celular, como por exemplo, os receptores semelhantes a imunoglobulinas de células *NK* (*KIR*) com ligantes presentes na célula alvo. (IARC, 2005).

Os estudos que investigaram a relação *KIR-HLA* e a susceptibilidade à progressão de doenças virais e à auto-imunidade reconheceram que a falta do ligante *HLA* para os receptores *KIR* inibidores no paciente podem acarretar em efeitos significativos no resultado clínico da doença (LIAO *et al.*, 1991; KHAKOO *et al.*, 2004).

Torna-se cada vez mais claro que a força de interações *HLA-KIR* possui um significado funcional e podem influenciar a susceptibilidade a doenças. Isto é exemplificado pelas interações entre *HLA-Cw* e o inibidor *KIR2D* onde *KIR2DL1/HLA-C2* (e, provavelmente *KIR2DL2/HLA-C1*) parece conferir respostas inibidoras mais fortes do que *KIR2DL3/HLA-C1* (WINTER, *et al.*, 1998; AHLENSTIEL, *et al.*, 2008).

Neste estudo foram encontrados quatro alótipos significativos do grupo HLA-C1, codificados pelos alelos HLA-C*07:01P, HLA-C*07:02, HLA-C*12:03 e HLA-C*16:01 e dois alótipos HLA-C2, HLA-C*05:01 e HLA-C*15:02P. Abre-se, portanto, a perspectiva de se investigar o genótipo KIR das pacientes para estabelecer as interações KIR-HLA e possíveis associações à susceptibilidade ou proteção perante infecções virais.

8 CONCLUSÕES

8.1 Epidemiológicas

1- A média geral de idade encontrada entre os grupos foi de 31,5±7,13;

2- A maioria das mulheres do grupo CN pertence à etnia Branca enquanto mulheres dos outros grupos pertencem a Pardo, devido a variação dos locais de coleta, mesmo pertencendo à região metropolitana de Curitiba;

3- O ensino fundamental incompleto foi o nível de escolaridade mais freqüente entre mulheres CP, CN e NIC III, sendo que para NIC II, a maioria das mulheres tinha ensino médio completo;

4- Principalmente em CN o início da atividade sexual se deu entre 15 e 25 anos. Já mulheres menores de 15 anos que iniciaram a vida sexual, a maioria pertence ao grupo CP;

5- Nos últimos 12 meses, mulheres que tiveram maior número de parceiros têm cerca de cinco vezes mais chance de infecção por HPV;

6- O uso de preservativo foi praticamente ignorado pelas mulheres analisadas, isso se deve ao fato de a grande maioria ter apenas um parceiro. Mulheres que usam camisinha ocasionalmente tem mais risco de infecção do que aquelas que usam regularmente;

7- No grupo caso (NIC II + NIC III) encontra-se o maior número de mulheres que fazem uso de contraceptivo por longo período de tempo, acima de seis anos. Foi constatado que mulheres que não usam contraceptivo tem três vezes menos chance de desenvolvimento de lesão cervical;

8- Cerca de 66,0% das mulheres teve entre uma e três gestações e 14,77% são nulíparas. Mulheres do grupo CP que tiveram mais de seis gestações tem oito vezes mais chance de progressão de lesão. Portanto, maior número de gestações, maior a probabilidade de lesão;

9- Abortos foram detectados em todos os grupos de estudo, principalmente em CP, justificado pelo início precoce da atividade sexual e por partos abaixo de 15 anos em 5,26% das mulheres e entre 15 e 18 anos, 43,42%;

10- Longos períodos sem realização de citologia oncótica foram detectados, sendo que a maior parte das mulheres fez no máximo cinco exames durante toda a vida sexual ativa. NIC II apresentou maior número, acima de 15 exames, sugerindo acompanhamento médico periódico da regressão/progressão da lesão cervical;

11- Foi constatado numericamente que mais mulheres NIC são fumantes e menos nunca fumaram, ao contrário de CN, no qual menos mulheres fumam e mais nunca fumaram. Fumantes têm duas vezes mais chance de progressão, enquanto as mulheres ex-fumantes, quatro vezes, pois se associa a probabilidade acumulada pelo uso do cigarro a probabilidade natural da infecção;

12- Dentre as fumantes, NIC II tem maior representatividade, pois as mulheres desse grupo consomem maior número de cigarros ao dia por mais anos;

13- Na comparação entre ex-fumantes e não fumantes, a partir de seis cigarros ao dia, a chance de associação é dez vezes superior. Maior tempo sem consumo de cigarro, a partir de seis anos, representa redução na chance de desenvolvimento de lesão por HPV;

8.2 Genéticas

14- Seis alelos HLA-C apresentaram distribuições alélicas diferentes quando das comparações entre amostras caso-controle totais e estratificadas (*HLA-C*05:01, HLA-C*07:01P, HLA-C07:02, HLA-C*12:03, HLA-C*15:02P e HLA-C*16:01);*

15- O grupo alélico *HLA-C*03* foi um dos grupos mais freqüentes atingindo o nível de significância na amostra, porém sua significância foi próxima a p=0,05;

16- Cento e sessenta e três genótipos *HLA-C* foram descritos, sendo que o genótipo homozigoto *HLA-C**04:01P/*04:01P foi o mais frequente (3,7%), seguidos por *HLA-C**04:01P/C*07:01P e *HLA-C**04:01P/C*07:02, ambos com 2,6%, reflexo da freqüência encontrada na população estudada;

17- Os variantes alélicos *HLA-C**05:01, *HLA-C**07:02 e *HLA-C**12:03 foram observados como possíveis sinalizadores de susceptibilidade a NIC, sendo que o *HLA-C**07:02 e *HLA-C**12:03 apresentaram alta significância entre os grupos avaliados.

9 REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. Imunologia Celular e Molecular. REALI, C. [Trad] 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

AHLENSTIEL, G.; MARTIN, M.P.; GAO, X.; CARRINGTON, M.; REHERMANN, B. Distinct KIR/HLA compound genotypes affect the kinetics of human antiviral natural killer cell responses. Jounal of Clinical Investigation 3:1017-26, 2008.

ALAEZ-VERSON C, BERUMEN-CAMPOS J, MUNGUÍA-SALDAÑA A., *et al.*HPV-16 and HLA-DRB1 Alleles Are Associated with Cervical Carcinoma in Mexican Mestizo Women. BRIEF REPORT. Archives of Medical Research. 42:421e 425.2011

ALBERTS, B.; JOHNOSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Molecular Biology of The Cell. 5.ed. USA: Garland Science, 2008.

ALLELES, 2012. Disponível em: <http://hla.alleles.org/>. Acesso em: 02/05/2012.

ALLELE FREQUENCIES, 2012. Disponível em: <http://www.allelefrequencies.net/>. Acesso em: 10/06/2012

ANFOSSI, N.; ANDRE, P.; GUIA, S.; FALK, C.S.; ROETYNCK, S.; STEWART, C.A.; et. al. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. Immunity 25(2):331–42; 2006.

ANJUERE F., CZERKINSKY C. Mucosal immunity and vaccine development, Medicine. Science. 4, 371e 378. 2007

ANTHONY NOLAN RESEARCH INSTITUTE. The Anthony Nolan Trust. Disponível em: <http://www.anthonynolan.org.uk/HIG/lists/otherlist.html> Acesso em: 26/04/2012

APPLEBY P., BERAL V., PLUMMER M., SWEETLAND S. Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16,573 women with cervical cancer and 35,509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. Lancet; 370:1609–21. Oxford, 2007

AYRES, M.; AYRES, M. JR; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A.S. Bioestat 5.0– Aplicações Estatísticas nas áreas das Ciências da Saúde. Belém, 2007.

BANKS, L. MOREAU, F.; VOUSDEN, K.; PIM, D.; MATLASHEWSKI, G. Expression of the human papillomavirus E7 oncogene during cell transformation is sufficient to induce susceptibility to lysis by activated macrophages. The Journal of Immunology, Baltimore, v. 146, p.2037-2042, 1991.

BERNARD, H.U.,Chan, S. Y., Manos, M. M., Ong, C. K., Villa, L. L.,Delius, H., Peyton, C. L., Bauer, H. M. & Wheeler, C. Ml. Assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction, restricion digest, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. The Journal of Infectious Disease, Chicago, v.170, p.1077-1085, 1994.

BIASSONI, R., FALCO M, CAMBIAGGI A. Amino acid substitutions can influence the natural killer (NK) – mediated recognition of HLA-C molecules. Role of Serine-77 and Lysine-80 in the target cell protection from lysis mediated by ‘group2’ or ‘group 1’ NK clones. Journal of Experimental Medicine, 182, p. 605-609. 1995

BOCCARDO E., LEPIQUE AP., VILLA LL. The role of inflammation in HPV carcinogenesis. Carcinogenesis. V.31, no.11, p.1905–1912, 2010

BONTKES, H.J. M. VAN DUIN, T.D. DE GRUIJL, M.F. DUGGAN.HPV 16 infection and progression of cervical intra-epithelial neoplasia: analysis of HLA polymorphism and HPV 16 E6 sequence variants. International Journal of Cancer, Genève, v.78, p.166-171, 1998.

BOSCH FX,QIAO YL, CASTELLSAGUÉ X., *et al*. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. Vaccine. 26(suppl 10):K1–K16. 2008

BOTTINI N, A GIMELFARB, F GLORIA-BOTTINI, M LA TORRE.Haptoglobin genotype and natural fertility in humans. Fertility and Sterility, 72:293-296. 1999

BOYER, S.N.; WAZER, D.E.; BAND, V. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitinproteasome pathway. Cancer Research, Chicago, v. 56, p. 4620-4624, 1996.

BRAKE T, LAMBERT PF. Estrogen contributes to the onset, persistence, and malignant progression of cervical cancer in a human papillomavirus-transgenic mouse model. Proceedings of the National Academy of Science, USA; 102:2490–5. 2005

BRASIL. Ministério da Saúde. Disponível em: http://portalsaude.saude.gov.br/ . Acesso em: 03/05/2012

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativas 2011: Incidência de Câncer no Brasil. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Série A: Normas e Manuais Técnicos. Cadernos de Atenção Primária nº29. Departamento de Atenção Básica. Rastreamento. Brasília, 2010.

CANCER RESEARCH UK. Disponível em: <http://info.cancerresearchuk.org/cancerstats/geographic/world/?a=5441>. Acesso em: 02/05/2012.

CARRINGTON M., WANG S., MARTIN MP., GAO X., SCHIFFMAN M.Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci. Journal of Experimental Medicine 201:1069–1075. 2005

CASTELLSAGUÉ, X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. Gynecologic Oncology, New York, v. 110, n. 3, suppl. 2, p. S4-7, 2008.

CASTELLSAGUÉ, X.; MUÑOZ, N. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis – role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. Journal of the National Cancer Institute. Monographs, Washington, n. 31, p. 20-28, 2003.

CDC- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Disponível em: <http://www.cdc.gov/cancer/cervical/>. Acesso em: 16/05/2012

CHATURVEDI AK, MADELEINE MM, BIGGAR RJ, ENGELS EA. Risk of human papillomavirus-associated cancers among persons with AIDS. Journal of the National Cancer Institute 101:1120–1130. 2009

CHEN YH, HUANG LH, CHEN TM. Differential effects of progestins and estrogens on long control regions of human papillomavirus types 16 and 18. Biochem Biophys Res Commun; 224:651–9. 1996

CHUNG SH, WIEDMEYER K, SHAI A, KORACH KS, LAMBERT PF. Requirement for estrogen receptor alpha in a mouse model for human papillomavirus-associated cervical cancer. Cancer Res; 68:9928–34. 2008

COLLINS AS., NAKAHARA T, DO A, LAMBERT PF. Interactions with Pocket Proteins Contribute to the Role of Human Papillomavirus Type 16 E7 in the Papillomavirus Life Cycle. Journal of Virology. 79.23.14769–14780.2005

COLLINS S, ROLLASON TP, YOUNG LS, WOODMAN CBJ. Cigarette smoking is an independent risk factor for cervical intraepithelial neoplasia in young women: a longitudinal study. European Journal of Cancer. 46(2):405–411.2010

CUZICK J, G TERRY, L HO, J MONAGHAN. Association between high-risk HPV types, HLA DRB1*and DQB1* alleles and cervical cancer in British women. British Journal of Cancer. 82(7), 1348–1352. 2000

DE VILLIERS, E.M.; FAUGUET, C.; BROKER, T.R.; BERNARD, H.U. ZUR HAUSEN, H. Classification of papillomaviruses. Virology, New York, v. 324, n. 1, p. 17-27, 2004.

DE SANJOSE S, DIAZ M, CASTELLSAGUÉ X, *et al*. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women withnormal cytology: a meta-analysis. Lancet Infect Disease. 7(7):453–459. 2007

DOWNS LS., SMITH LS.,SCARINCI I., FLOWERS L., PARHAM G. The disparity of cervical cancer in diverse populations. Gynecologic Oncology 109 S22–S30. 2008

DUGGAN-KEEN, M.F. KEATINGP. J.,STEVENS FR A.Immunogenetic factors in HPV-associated cervical cancer: influence on disease progression. European Journal of Immunogenetics, Oxford, v. 23, p. 275–284, 1996.

DYSON, N.; HOWLEY, P.M.; MUNGER, K.; HARLOW, E. The human papillomavirus 16 – E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. Science, Washington, v. 243, p. 934-937, 1989.

ELLIS, J.R.M.; KEATING, P.J.; BAIRD, J.; HOUNSELL, E.F.; RENOUF, D.V.; ROWE, M.; HOPKINKS, D.; DUGGAN-KEEN, M.F.; BARTHOLOMEW, J.S.; YOUNG, L.S.; STERN, P.L. The association of an HPV16 oncogene variant with HLA-B7 has implications for vaccine design in cervical cancer. Nature Medicine, New York, v.1, p.464-470, 1995.

EVANDER, M.; FRAZER, I.H; PAYNE, E.; QI, Y.M.; HENGST, K.; MCMILLAN, N.A. Identification of the α6 integrine as a candidate receptor for papillomavirus. Journal of Virology, Baltimore, v. 71, p. 5449-5459, 1997.

FARIDI R, ZAHRA A, KHAN K, IDREES M. Oncogenic potential of Human Papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. Review. Virology Journal, 8:269. 2011

FERNANDES JV, Meissner RV., de Carvalho M.G.F., Fernandes T.A.A.M., Azevedo P.R.M. VILLA L.L. Prevalence of HPV infection by cervical cytologic status in Brazil. International Journal of Gynecology and Obstetrics. 105, 21–24. 2009

FOOD AND DRUG ADMINISTRATIO (FDA). FDA licenses new vaccine for prevention of cervical cancer and other diseases in females caused by human papillomavirus. (2006). Disponível em: <http://www.fda.gov/default.htm>. Acesso em: 18/03/2012

FORD E.B., Polymorphism and Taxonomy, in the New Systematics (ed.)Huxley J. Clarendon Press, Oxford, 1940, p. 493-513.

FRAZER, I.; TINDLER, R.; Cell-mediated immunitY to papillomaviruses. Papillomavirus report, Leeds, v. 3, p.53, 1992.

FUTUYMA, D. J. Biologia Evolutiva. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética /CNPq, 1992.

GARDINER, C. M.; GUETHLEIN, L. A.; SHILLING, H. G.; PANDO, M.; CARR, W. H.; RAJALINGAM, R.; VILCHES, C.; PARHAM, P. Different NK cell surface phenotypes defined by the DX9 antibody are due to KIR3DL1 gene polimorphism. Journal Immunology. 166:2992; 2001.

GARLAND, S.M. Human papillomavirus update with a particular focus on cervical disease. Pathology, Surry Hills, v. 34, p. 213-224, 2002.

GAUDIERI, S. NOLAN, D. McKINNON, E. WITT, C. S. MALLAL, S. CHRISTIANSEN, F. T. Associations between *KIR* epitope combinations expressed by HLA-B/-C haplotypes found in an HIV-1 infected study population may influence NK mediated immune responses. Molecular Immunology, Austrália, v. 42, p. 557-560. 2005. Review

GIRI, I., DANOS, O. Papillomavirus genomes. From sequence data to biological properties. Trends in Genetics, Amsterdam, v. 2, p. 227-232, 1986.

GIULIANO A.R., PALEFSKY J.M., GOLDSTONE S., MOREIRA, JR E D., PENNY M E., ARANDA C., VARDAS E., MOI H., JESSEN H., HILLMAN R., CHANG Y-H., FERRIS D., ROULEAU D., BRYAN J.J., MARSHALL B., VUOCOLO S., BARR E., RADLEY D., HAUPT R M., AND GURIS D.,Efficacy of quadrivalent HPV vaccine against HPV infection and disease in males. New England Journal Medicine; 364:401–11. 2011

GIULIANO A.R, SALMON D. The case for a gender-neutral (universal) human papillomavirus vaccination policy in the United States. Cancer Epidemiology Biomarkers Prevent. 17:805–8. 2008

GONÇALVES, M.A.G.; DONADI, E.A. Immune cellular response to HPV: Current concepts. The Brazilian Journal of Infectious Diseases, Salvador, v.8, n.1, p.1-9, 2004.

GRAVITT PE. The known unknowns of HPV natural history. Journal Clinical Investigation. 121(12):4593–4599. 2011

GRESLIN, I.; MOUGIN, C.; SEILLES, E. Biologie des infections à papillomavirus. II. Résponse immunitaire. Annales de Biologie Clinique, Paris, v. 56, p.267-276, 1998.

GUETTA J, STRAUSS M, LEVY NS, FAHOUM L, LEVY AP: Haptoglobim genotype modulates the balance of Th1/Th2 cytokines produced by macrophages exposed to free haemoglobin. Artherosclerosis, 191:48-53. 2007

GUO, S.; THOMPSON, E. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. Biometrics, Washington, v. 48, n. 2, p. 361-372, 1992.

GUPTA S, SODHANI P., SHARMA A., SHARMA J. K., HALDER K., CHARCHRA K. L., SARDANA S., SINGH V., SEHGAL A., DAS B.C. Prevalence of high-risk human papillomavirus type 16/18 infection among women with normal cytology: risk factor analysis and implications for screening and prophylaxis. Cytopathology, 20, 249–255. 2009

HAREL-BELLAN,A.; QUILLET, A.; MARCHIOL, C.; DeMARS, R.; TURSZ, T.; FRADELIZI, D. Natural Killer susceptibility of human cells may be regulated by genes in the HLA region on chromosome 6. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v.83, p.5688, 1986.

HARRIS TG. KULASINGAM SL. KIVIAT NB. Cigarette Smoking, Oncogenic Human Papillomavirus, Ki-67 Antigen, and Cervical Intraepithelial Neoplasia. American Journal Epidemiology. 159:834–842, 2004

HENGSTERMANN, A.; LINARES, L.K.; CIECHANOVER, A.; WHITAKERK, N.J.; SCHEFFNER, M. Complete switch from mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, Washington, v. 98, p. 1218-1223, 2001.

HERRERO, R.; POTISCHMAN, N.; BRINTON, L.A.; REEVES, W.C.; BRENES, M.M.; TENORIO, F.; BRITTON, R.C.; GAITAN, E. A case-control study of nutrient status and invasive cervical cancer. I. Dietary Indicators. American Jounal of Epidemiology, Baltimore, v. 134, n. 11, p. 1335-1346, 1991.

HILDESHEIN, A. *et al.*HPV co-factors related to the development of cervical cancer: results from a population-based study in Costa Rica. British Journal of Cancer, London, v. 84, n. 9, p. 1219-1226, 2001.

HO, G.Y.; BIERMAN, R.; BEARDSLEY, L.; CHANG, C.J.; BURK, R.D. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. The New England Journal of Medicine, Boston, v. 338, n.7, p. 423 – 428, 1998.

HSU, K. C.; LIU, X. R.; SELVAKUMAR, A.; MICKELSON, E.; O'RELLY, R. J.; DUPONT, B. Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. Journal of Immunology, Baltimore, v.69, p. 5118, 2002.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Hand-books of Cancer Prevention. Cervix Cancer Screening. Lyon: IARC Press, 2005.

IBGE – Insituto Brasileiro de Geografia e Estatística. DisponÍvel em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias>. Acesso em: 01/05/2012

INCA. MINISTERIO DA SAUDE – BRASIL . Estimativa 2012. Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012.pdf> .Acesso em: 02/05/2012.

INCA. MINISTERIO DA SAUDE – BRASIL . Tipos de câncer, detecção precoce. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/>. Acesso em: 04/05/2012

INCASSATI, A.; PATEL, D.; McCANCE, D.J. Induction of tetraploidz through loss of p53 and upregulation of Plk1 by human papillomavirus type-16, E6. Oncogene, Basingstoke, v. 25, p. 2444-2451, 2006.

INTERNATIONAL COLLABORATION OF EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF CERVICAL CANCER; APPLEBY, P.; BERAL, V.; BERRINGTON DE GONZÁLES, A.; COLIN, D.; FRANCESCHI, S.; GOOGILL, A.; GREEN, J.; PETO, J. PLUMMER, M.; SWEETLAND, S. Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies.

International Journal of Cancer. Journal International du Cancer. Genève, v. 118, n. 6, p. 1481-1495, 2006.

JAVIER, R.T.; BUTEL, J.S. The history of tumor virology. Cancer Research, Chicago, v.68, n.19, p.7693-7706, 2008.

JOHNSONS, D.R.; POBER, J.S. Tumor necrosis factor and immune interferon synergistically increase transcription of HLA clas I heavy and light chain genes in vascular endothelium. Immunology, Oxford, v. 87, p.5183-5187, 1990.

KAKU M, MATHEW A, RAJAN B. Impact of socio-economic factors in delayed reporting and late-stage presentation among patients with cervix cancer in a major cancer hospital in South India. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 9(4):589–94. 2008

KELLER DL, WRIGHT J, PACE HA. Impact of health literacy on health outcomes in ambulatory care patients: a systematic review. Ann Pharmacother, 42:1272–81. 2008

KHAKOO, S.I.; THIO, C.L.; MARTIN, M.P.; BROOKS, C.R.; GAO, X.; ASTEMBORSKI, J. et. al. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. Science. 305:872-4; 2004.

KIM C.J, UM S.J, KIM T.Y, *et al.* Regulation of cell growth and HPV genes by exogenous estrogen in cervical cancer cells. International Journalof Gynecological Cancer; 10:157–64. 2000

KIM,S.; POURSINE-LAURENT, J.; TRUSCOTT, S.M.; LYBARGER, L.; SONG, Y.J.; YANG, L.; et. al. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. Nature 436(7051):709–13; 2008.

KLINGELHUTZ, A.J.; FOSTER, S.A.; McDOUGALL, J.K. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. Nature, London, v.380, p.79-82, 1996.

KOTLOFF K.L., WASSERMAN, S.S.; RUSS, K B.S.N., SHAPIRO, S. B.S.N., DANIEL, R.B.S., BROWN, W., FROST, A., TABARA, S.O., SHAH, K.,*et al.*Detection

of genital human papillomavirus and associated cytological abnormalities among college women. Sexually Transmitted Disease. 25, 243 e 250. 1998

KOUTSKZ; L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. The American Jjournal of Medicine, New York, v.102, n. 5A, p. 3 – 8, 1997.

KULKARNI, S.; MARTIN, M. P.; CARRINGTON, M. The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease. Seminars in Immunology. V.20. 6. p.343-52

KUPPER, T.S.; FUHLBRIGGE, R.C. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. Nature reviews. Immunology, London, v.4, p.211-222, 2004.

KYO,S.
INOUEM, HAYASAKAN, INOUET, YUTSUDOM, TANIZAWAO, HAKURAA.Regulation of early gene expression of human papillomavirus type 16 by inflammatory cytokines. Virology. 200, 130–139. 1994

LAHIRI, D.K.; NUMBERGER, J.I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. Nucleic Acids Research, London, v. 19, p. 5444, 1991.

LAMBERT KC, CURRAN EM, JUDY BM, MILLIGAN GN, LUBAHN DB, ESTES DM. Estrogen receptor alpha (ERalpha) deficiency in macrophages results in increased stimulation of CD41 T cells while 17beta-estradiol acts through ERalpha to increase IL-4 and GATA-3 expression in CD41 T cells independent of antigen presentation. J Immunol;175:5716–23. 2005

LETO MGP, SANTOS JR GF, PORRO AM. Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. Anais Brasileiros de Dermatologia. 86(2):306-17. 2011

LIAO, N.S.; BIX, M.; ZIJLSTRA, M.; JAENISCH, R.; RAULET, D. MHC class I deficiency: susceptibility to natural killer (NK) cells and impaired NK activity. Science 253(5016):199–202; 1991.

LOWY, D.R.; HOWLEY, P.M. Papillomaviruses. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. Fields Virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. p.2231-2264. 2001

MA J, ZHU Q, HAN S, ZHANG Y, OU W, WANG H, ZHAO J, LIU Z**.** Effect of socio-economic factors on delayed access to health care among Chinese cervical cancer patients with late rectal complications after radiotherapy. Gynecologic Oncology 124, 395–398. 2012

MADELEINE M.M.,Johnson LG., SMITH AG. *et al.* Comprehensive Analysis of HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, and HLA-DQB1 Loci and Squamous Cell Cervical Cancer Risk. Cancer Res; 68:3532-3539. 2008

MAGNUSSON, P.K.; GYLLENSTEN, U.B. Cervical cancer risk: is there a genetic component? Molecular medicine today, Cambridge, v. 6, n.4, p.145-148, 2000.

MAJEWSKI, S.; MALEJCZYK, J.; JABLONSKA, S. The role of cytokines and other factors in HPV infection and HPV-associated tumors. Papillomavirus Report, Leeds, v.7, p. 143-154, 1996.)

MANTOVANI, F.; BANKS, L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. Oncogene, Basingstoke, v.20, p. 7874-7887, 2001.

MARKS M, GRAVITT P.E.,SWATI GUPTA B.,*et al.* Combined Oral Contraceptive Use Increases HPV Persistence but Not New HPV Detection in a Cohort of Women From Thailand. The Journal of Infectious Diseases. 204:1505–13. 2011

MARTIN M.P, BORECKI I.B., ZHANG Z., NGUYEN L., MA D., GAO X., QIY., CARRINGTON M.,RADER J.S. *et al.*Hla-cw group 1 ligands for kir increase susceptibility to invasive cervicalcancer. Immunogenetics. 62:761–765. 2010

McDEVITT, H.O. Discovering the role of the major histocompatibility complex in the immune response. Annual Review of Immunology, Palo Alto, v. 18, p. 1-17, 2000.

MCINTYRE-SELTMAN K, CASTLE PE, GUIDO R, SCHIFFMANM,HEELER CM. Smoking is a risk factor for cervical intraepithelialneoplasia grade 3 among oncogenic human papillomavirus DNA-positive women withequivocal or mildly

abnormal cytology. Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention. 14(5):1165–1170. 2005

MIDDLETON, K.; PEH, W.; SOUTHERN, S.; GRIFFIN, H.; SOTLAR, K.; NAKAHARA, T. Organiyation of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. Journal of Virology, Baltimore, v.77, p. 10186-10201, 2003.

MITRANI-ROSENBAUM S, TSVIELI R, TUR-KASPA R. Oestrogen stimulates differential transcription of human papillomavirus type 16 in SiHa cervical carcinoma cells. Journal of General Virology; 70:2227–32. 1989

MITTAL R, TSUTSUMI K, PATER A, PATER MM. Human papillomavirus type 16 expression in cervical keratinocytes: role of progesterone and glucocorticoid hormones. Obstetrics and Gynecology; 81:5–12. 1993

MONSONEGO J., CORTES J, GREPPEC C., HAMPLD M., JOURAE E., SINGERF A. Benefits of vaccinating young adult women with a prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16 and 18) vaccine. Vaccine. 28, 8065–8072.2010

MORENO V, MORENO V, BOSCH FX, MUNOZ N, MEIJER CJ, SHAH KV, WALBOOMERS JM, *et al.* Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. Lancet; 359:1085–92. 2002

MORETTA, A., PENDE, D., LOCATELLI, F. activating and inhitory killer immunoglobulin-like receptors (KIR) in haploidentical haemopoietic stem cell transplantation to cure high-risk leukaemias. Clinical & Experimental Immunology, Genova, v.157, p. 325-331, 2009. REVIEW

MORETTA, A.; TAMBUSSI, G.; BOTTINO, C. C.; TRIPODI, G.; MERLI, A.; CICCONE, E.; PANTALEO, G.; MORETTA, L. A novel surface antigen expressed by a subset of human CD3- CD16+ natural killer cells. Role in cell activation and regulation of cytolytic. The Journal of Experimental Medicine, New York, v.171, p. 695, 1990.

MOSCICKI, A.B.; SCHIFFMAN, M.; KJAER, S.; VILLA, L.L. Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. Vaccine, Guildford, v.24, suppl.3:S3, p.42-51, 2006.

MOTOYAMA, S..; LADINES-LLAVE, C.A.; VILLANUEVA, S.L.; MARUO, T. The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. The Kobe Journal of Medical Sciences, Kobe, v. 50, n. 1, p. 9-419, 2004.

MUNGER, K.; HOWLEY, P.M. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. Virus Research, Amsterdam, v. 89, p. 213-228, 2002.

MUÑOZ N, FRANCESCHI S, BOSETTI C. *et al.*; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. MULTICENTRIC CERVICAL CANCER STUDY GROUP. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. Lancet, London, v. 359, n. 9312, p. 1093-10101, 2002.

NEUMAN RJ, HUETTNER PC, LI L, MARDIS ER, DUFFY BF, WILSON RK,RADER JS.Association between DQB1 and cervical cancer in patients with human papillomavirus and family controls. Obstetrics and Gynecology. 95:134–140. 2000

NICCOLAI, L.M., MEHTA, N.R., HADLER, J.L. Racial/Ethnic and Poverty Disparities in Human Papillomavirus Vaccination Completion. American Journal of Preventive Medicine. 41(4):428–433. 2011

NMDP. NATIONAL MARROW PROGRAM DONNOR. Disponível em: <http://bioinformatics.nmdp.org/HLA/Rare_Allele_Lists/Version_3_5_0/Rare_Allele_List_File_Version_3_5_0_aspx>. Acesso em: 15/08/2011

NONNENMACHER B., BREITENBACH V., VILLA LL.,Genital human papillomavirus infection identification by molecular biology among asymptomatic women. Revista de Saúde Pública; 36(1):95-100. 2002

NUCLEUS MEDICAL MEDIA. Disponível em: <http://catalog.nucleusmedicalmedia.com/>. Acesso em: 08/05/2012

ONE LAMBDA, INC. Micro SSO^{TM} HLA DNA typing trays. Ago. 2004. Folheto Informativo do Produto.

ORIEL, J.D. Natural history of genital warts. The British Journal of Venereal Diseases, London, v.47, p. 1-13, 1971.

PARHAM, P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. Nature Reviews Immunology. 3:201–14; 2005.

PARKIN, M.; BRAY, F.; FERLAY, J.; PISANI, P. Global Cancer Statistics, 2002. A Cancer Journal for Clinicians. New York, v. 55, n. 2, p. 73-108, 2005 (current as of 2008).

PARR, M.B., PARR, E.L. Mucosal immunity in the female and male reproductive tract. In: OGRA, P.L.*et al.* Handbook of Mucosal Immunology. San Diego: Academy Press, 1996. p.677-689.

PATER MM, MITTAL R, PATER A. Role of steroid hormones in potentiating transformation of cervical cells by human papillomaviruses. Trends Microbiology; 2:229–34. 1994

PRENDIVILLE, W.; DAVIES, P. HPV handbook – 1: Human papillomavirus and cervical cancer. Abingdon: Taylor & Francis, 2004.

RAMMENSEE, H.G.; BACHMANN, J.; STEVANOVIĆ, S. *MHC* ligands and peptide motifs. Austin: Landes Bioscience, 1997.

REPP K.K, NIELSON C.M, FU R, SCHAFER S., LAZCANO-PONCE E., SALMERO J, QUITERIO M, VILLA L.L., GIULIANO A.R.Male Human Papillomavirus Prevalence and Association With Condom Use in Brazil, Mexico,and the United States. The Journal of Infectious Diseases; 205:1287–93. 2012

ROTELI-MARTINS CM**,** DE CARVALHO NS, NAUD P**,** TEIXEIRA J,.Prevalence of human papillomavirus infection and associated risk factors in young women in Brazil, Canada, and the United States: a multicenter cross-sectional study.International Journal of Gynecological Pathology. 2011 Mar; 30(2):173-84**.**

RUUTU M, WAHLROOS N, SYRJANEN K, JOHANSSON B, SYRJANEN S. Effects of 17beta-estradiol and progesterone on transcription of human papillomavirus 16

E6/E7 oncogenes in CaSki and SiHa cell lines. International Journal of Gynecological Cancer; 16:1261–8. 2006

SCHLECHT NF J, *et al.* Persistent human papilloma-virus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. JAMA; 286:3106 e 3114. 2001

SCOTT, M.; STITES, D.P.; MOSCICKI, A.B. Th1 cytokine patterns in cervical human papillomavirus infection. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, Washington, v.6, p.751-755, 1999.

SHAI A, BRAKE T, SOMOZA C, LAMBERT PF. The human papillomavirus E6 oncogene dysregulates the cell cycle and contributes to cervical carcinogenesis through two independent activities. Cancer Research; 67:1626–35. 2007

SIMONETTI AC, *et al.* Immunological's host profile for HPV and Chlamydia trachomatis. A cervical cancer cofactor. Microbes and Infection. 11, 435 e 442. 2009

SISCOLO – INCA – MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL. Disponível em : <http://www.inca.gov.br/painel>. Acesso em: 03/05/2012

SMITH, J.S.; HERRERO, R.; BOSETTI, C. *et al.*Herpes Simplex Virus-2 as a Human Papillomavirus ofactor in the Etiology of Invasive Cervical Cancer. Journal of the National Cancer Institute, Washington, v. 94, n. 21, p. 1604-1613, 2002.

SOCIEDAD LATINOAMERICANA DE GASTROENTEROLOGÍA PEDIÁTRICA, HEPATOLOGÍA Y NUTRICIÓN, 2006. Disponível em: <http://e-gastroped.com.br/jun05/cel02.jpg>. Acesso em: 24/04/2012

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CITOPATOLOGIA (SBC). Disponível em: <www.citopatologia.org>. Acesso em: 10/05/2012.

SOUTHERN, S.A.;HERRINGTON, C.S. 1998. Molecular events in uterine cervical cancer. Sexually transmitted infections,London, v.74, p.101-109, 1998.

SPPV – SOCIEDADE PORTUGUESA DO PAPILLOMAVIRUS HUMANO. Disponível em <http://www.sppv.org/info_ciencia.html>. Acesso em: 20/04/2012.

STUBENRAUCH F.; IFTNER, T. Krebserkrankungen durch Papillomviren. Disponível em:<http://www.medizin.unituebingen.de/virologie/exp_viro/Exp_Viro_de/Forschung/Projekte/target.html> Acesso em: 12/04/2012.

SVEJGAARD, A.; JERSILD, C.; NIELSEN, L. S.; BODMER, W. F.HL-A antigens and disease. Statistical and genetical considerations. Tissue Antigens, Copenhagen, v.4, n. 2, p. 95-105, Review, 1974.

THEOFILOPOULOS, A.N.; BACCALA, R.; BEUTLER, B.; KONO, D.H. Type I interferons (α/β) in immunity and autoimmunity. Annual Review of Immunology, Palo Alto, v.23, p.307-336, 2005.

THOMAS, M; BANKS, L. Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. TheJournal of General Virology, London, v.80, p.1513-1517, 1999.

TIENG, V.; LE BOUGUÉNEC, C.; DU MERLE, L.; BERTHEAU, P.; DESREUMAUX, P.; JANIN, A.; CHARRON, D.; TOUBERT, A. Binding of *Escherichia coli* adhesin AfaE to CD55 triggers cell-surface expression of the *MHC* class I-related molecule *MICA*.Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, Washington, v. 99, n.5, p. 2977-2982, 2002.

TOWNSEND, A.; BODMER, H. Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes. Annual Review of Immunology, Palo Alto, v. 7, p. 601-624, 1989.

TROTTIER H, FERREIRA S, THOMANNP, COSTAMC., SOBRINHO JS., PRADOJCM., ROHANTE.,VILLAL.L., FRANCOE.L.. Human papillomavirus infection and reinfection in adult women: the role of sexual activity and natural immunity. Cancer Research. 70(21):8569–8577. 2010

UGOLOTTI E**,** VANNI I**,** RASO A**,** BENZI F**,** MALNATI M**,** BIASSONI R**.** Human leukocyte antigen-B (-Bw6/-Bw4 I80, T80) and human leukocyte antigen-C (-C1/-C2) subgrouping using pyrosequence analysis. Human Immunology.72(10):859-68. 2011

UM, S.J. KIM E-J., HWANG E-S., KIM S-J., NAMKOONG S-E., PARK J-S. Antiproliferative effects of retinoic acid/interferon in cervical carcinoma cell lines: cooperative growth suppression of IRF-1 and p53. Int. J. Cancer,85, 416–423. 2000

VALIANTE, N. M.; UHRBERG, M.; LIENERT-WEIDENBACH, K.; ARNETT, K. L.; D'ANDREA, A.; PHILLIPS, J. H.; LANIER, L. L.; PARHAM, P. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertories in the peripheral blood of two human donors. Immunity 7:739; 1997.

VIEIRA K.B.L.,GOLDSTEIND.J., VILLA L.L. Tumor necrosis factor alpha interferes with the cell cycle of normal and papillomavirus-immortalized human keratinocytes. Cancer Research. 56, 2452 2457. 1996

VON LINSINGEN, R.Polimorfismos de genes de citocinas e do gene mica em pacientes com neoplasia intra-epitelial cervical. 124f, 2008. Dissertação (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas (Microbiologia, Parasitologia e Patologia Básica). Programa de Pós-Graduação em Genética.

WALBOOMERS, J.M.; JACOBS, M.V.; MANOS, M.M.; *et al.*Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. The Journal of pathology, London, v. 189, n. 1, p. 1-3, 1999.

WANG S.S.,HILDESHEIM A, GAO X.,*et al.* Comprehensive analysis of leukocyte antigen class I alleles and cervical neoplasia in 3 epidemiologic studies. Journal of Infectious Disease. 186:598–605. 2002a

WANG S.S,WHEELER C.M, HILDESHEIM A*et al.* Human leukocyte antigen class I alleles and cervical neoplasia: no heterozygote advantage. Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention 11:419–420. 2002b

WERNESS, B.A.; LEVINE, A.L.; HOWLEY, P.M. Association of human papillomaviruses type 16 and 18 E6 proteins with p53. Science, Washington, v.248, p. 76-79, 1990.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cancer Control. Knowledge into ation. WHO guide for efective pogrammes. Switzerland. Disponível em: <www.who.int/cancer/modules/Prevention%20Module.pdf>. Acesso em: 03/05/2012

WHO – World Health Organization. Comprehensive cervical cancer control : a guide to essential practice. Geneva: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2006.

WHO – World Health Organization. Global cancer rates could increase by 50% to 15 million by 2020. Geneva: WHO Media Centre, New realeses, 2003.

WHO/ICO – World Health Organization. Human Papillomavirus And Related Cancers Summary Report Update. Américas. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. March 10, 2010.

WHO/ICO – World Health Organization/Institut Català d'Oncologia. Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Cervical Cancer Summary Report – AMERICAS. Barcelona: WHO/ICO, 2007.

WINTER, C.C.; LONG, E.O. A single amino acid in the p58 killer cell inhitory receptor controls the ability of natural killer cells to discriminate between the two groups of HLA-C allotypes. Journal of Immunology, v. 158, p.4026-4028. 1997

WU, R.; COLENAN, N.; HIGGINS, G. Lymphocyte-mediated cytotoxicity to HPV 16 infected cervical keratonocytes. In: STANLEY, M.A. Immunology of Human Papillomaviruses. New York: Plenum Press. p.255-259.1994

YAWATA, M.; YAWATA, N.; DRAGHI, M.; LITTLE, A.M.; PARTHENIOU, F.; PARHAM, P. Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. Journal of Experimental Medicine 203(3):633–45, 2006.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses - to Vaccination and Beyond. Biochemistry (Moscow), New York, v. 73, n. 5, p. 498-503, 2008.

10 APÊNDICES

10.1 APÊNDICE 1 Metodologias aplicadas ao estudo

EXTRAÇÃO DE DNA PELA TÉCNICA DE *SALTING-OUT* (JOHN *et al.*, 1990, modificado por LAHIRI e NURNBERGER, 1991)

PROTOCOLO

1. Identificar tubos de 1,5mL tipo Eppendorf
2. Transferir 500µL de buffy-coat para cada tubo
3. Acrescentar 800µL de tampão de lise de células vermelhas (**RCLB 1X**)
4. Passar rapidamente no Vórtex
5. Centrifugar a 13000 rpm por 2 minutos
6. Desprezar o sobrenadante e ressuspender o botão de células em 1mL de **RCLB 1X**, passar no Vórtex, centrifugar 13000 rpm por 2 minutos e desprezar o sobrenadante
7. **Repetir o passo 6** até que se obtenha um precipitado claro
8. Desprezar o último sobrenadante e adicionar: 80µL de **tampão da Proteinase K**, 40µL da **Proteinase K**, 20µL de **SDS a 20%** e 240µL de **água Milli-Q**. Homogeneizar em Vórtex
9. Incubar em banho-maria a 55 °C por 40 minutos. Agitar aos 20 minutos
10. Deixar atingir temperatura ambiente antes de prosseguir
11. Adicionar 100µL de solução saturada de **NaCl (6M)**. Agitar no vórtex
12. Centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos
13. Transferir o sobrenadante para um novo tubo de 1,5mL com 100µL de **NaCl (6M)** e centrifugar novamente a 13000 rpm por 5 minutos
14. Transferir o sobrenadante para novo tubo de 1,5mL e acrescentar 800µL de **ETOH absoluto gelado** e inverter gentilmente várias vezes para precipitar o DNA
15. Centrifugar a 13000 rpm por 2 minutos
16. Desprezar o sobrenadante e adicionar 1mL de **etanol 70%**
17. Centrifugar a 13000 rpm por 2 minutos
18. Desprezar o sobrenadante e deixar secar a temperatura ambiente
19. Ressuspender o DNA em 50µL de **água Milli-Q**

20. Deixar em geladeira por pelo menos um dia para reidratar o DNA
21. Deixar em banho-maria por 30 minutos para dissolver bem
22. Homogeneizar 23. Proceder a leitura da Densidade Ótica ou armazenar a -20°C

Obs.: Antes dos procedimentos, deve-se efetuar a limpeza das bancadas com Álcool 70%. Após o término, nova limpeza com Hipoclorito 1% e Álcool 70%.

Purificação de Dna por Acetato de Amônio

As amostras de DNA após a leitura da DO, foram aliquotadas para um volume final de 100µl. Desse total, 50 µl foram usados para a técnica de purificação com acetato de amônio a 7,5M. A técnica é composta de 3 etapas:

- Adição de etanol absoluto ao DNA;
- Adição de etanol 70%;
- Ressuspensão em água deionizada.

Condições de amplificação para a realização da PCR SSOP para tipagem de HLA-C.

TEMPERATURA	TEMPO	Nº DE CICLOS
96ºC	3 minutos	1 ciclo
96ºC	20 segundos	5 ciclos
60ºC	20 segundos	
72ºC	20 segundos	
96ºC	10 segundos	30 ciclos
60ºC	15 segundos	
72ºC	20 segundos	
72ºC	10 minutos	1 ciclo
4ºC	∞	1 ciclo

A PCR foi realizada no Termociclador GeneAmp PCR System 9700, da empresa Applied Biosystems

Condições para eletroforese

Gel de agarose 2,5%,misturando 3 ul do produto amplificado a 1 ul de gel de *red*. A corrida do gel ocorreu a 150V, 300A, por 13 minutos, usando como tampão TBE 1X.

10.2 APÊNDICE 2 Hibridização SSOP

PROTOCOLO

1. Identificar uma placa de PCR nova para o primer (HLA-C HD);
2. Pegar recipientes para Tampão de Lavagem, Tampão de Neutralização e Tampão de Desnaturação;
4. Ligar termociclador no programa SSO 60ºC;
5. Transferir 2,5µL de cada Dna amplificado para a nova placa de PCR (usando a pipeta multicanal da Eppendorf (possui ponteiras específicas);
6. Fechar placa com a borracha;
7. Pôr o Tampão de Desnaturação no seu recipiente;
8. 1,25µL de Tampão de desnaturação em cada poço da placa (colocar gota na parede do poço – usar uma ponteira para todas as amostras);
9. Bater fraco na bancada para descer o reagente;
10. Tampar;
11. Agitar no vortex, dar um spin na centrífuga até 2000rpm (a coloração ficará mais rosa);
12. Incubar na bancada à temperatura ambiente por 10 min;
13. Devolver Tampão;
14. * Durante esse tempo de espera prepara-se as Beads;
15. Separar e identificar tubos eppendorf, um para cada grupo de Beads;
16. Pegar papel alumínio para cubrir os eppendorfs com as Beads;
17. 544µL do Tampão de Hibridização em cada um dos 3 eppendofs (volume para 32 amostras);
18. Homogeneizar bem as Beads (aproximadamente 1 min cada, devido sua tendência de aglomerar);
19. Dar uma flicada de leve para descer;
20. 64µL de cada Bead (cuidar a identificação das Beads (usar ponteiras com filtro));
21. Homogeneizar com a ponteira;
22. Deixar o mix de Beads em local escuro;
23. Guardar Tampão e Beads;
24. ** Dado o tempo de incubação, colocar o Tampão de Neutralização no recipiente; 25. Pegar isopor com gelo na terceira porta do freezer -80°;
26. 2,5µL de Tampão de Neutralização em cada poço (pôr gota na parede);

27. Bater de leve na bancada;
28. Fechar placa com a borracha e agitar no vortex com cuidado para não formar bolhas (verificar se todos os poços mudam de cor (para amarelo), não ficando, adicionar um pouco mais de volume de tampão diretamente no poço);
29. Deixar no gelo;
30. Guardar o Tampão de Neutralização;
31. 17,8µL do Mix de Beads em cada poço;
32. Verificar se não faltou em nenhum poço e passar para a próxima Bead;
33. Tampar;
34. Agitar demoradamente no vortex (misturar bem);
35. Pôr no termociclador a 60°C por 15min;
36. * Preparar o Tampão da SAPE;
37. Retirar da geladeira o tampão;
38. O volume para uma placa é de 2376µL, isso é dividido em dois eppendorfs com 1188µL cada (para isso usa-se 2 vezes o volume de 594µL na pipeta, devido sua limitação de volume);
39. Fechar e armazenar no escuro e à temperatura ambiente (na gaveta);
40. * Recongelar a placa com o produto amplificado;
41. * Colocar o Tampão de Lavagem no recipiente;
42. Passados os 15 minutos, retirar a placa do termociclador;
43. Rapidamente acrescentar 50 uL de Tampão de Lavagem em cada poço;
44. Centrifugar por 5 minutos;
45. Após o tempo, flicar de uma só vez na pia e deixar a placa virada sobre papel toalha; 46. Repetir os passos 43 ao 45 por mais duas vezes;
47. *Durante a última centrifugada:
48. Pegar o tampão da SAPE na gaveta;
49. Passar a SAPE no vortex (devagar), deixar o ambiente o mais escuro o possível;
50. Para 96 poços, passar um volume de 24uL de SAPE (divididos em dois tubos de Tampão de SAPE = 12 uL para cada)
51. Misturar com a própria pipeta;
52. Fechar os tubos e retorná-los para a gaveta;
53. Flicar a placa que estava centrifugando;
54. Homogeneizar a SAPE em vortex;
55. Transferir o volume de 23,7uL de Tampão + SAPE para cada poço da placa;

56. Verificar se todos os poços têm;
57. Fechar placa e passar no vortex por aproximadamente 20 segundos;
58. Pôr no termociclador à 60ºC por 5 minutos;
59. Ao sair do termociclador, acrescentar 50uL de Tampão de Lavagem;
60. Centrifugar por 5 minutos;
61. * Desligar o termociclador;
62. Flicar a placa;
63. Colocar 50uL de Tampão de Lavagem;
64. Transferir para a placa do Luminex (de fundo em V);
65. Durante a transferência homogeneizar com a ponteira por pelo menos 20 vezes cada poço;
66. Pôr no aparelho para leitura;

11 ANEXOS

11.1 ANEXO 1 - Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa

ERASTO GAERTNER
CENTRO DE PROJETOS DE ENSINO E PESQUISA

PARECER CONSUBSTANCIADO

No dia, 27 de outubro de 2009, o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Erasto Gaertner, avaliou o projeto intitulado como: **"Polimorfismos genéticos e expressão de genes relacionados ao sistema imune e ao ciclo celular no carcinoma uterino associado à infecção pelo papilomavirus humano",** cujo número é P.P. nº 1943, cuja pesquisadora principal é Patrícia Pinho de França, tendo o seguinte parecer:

OBJETIVOS: Verificar a existência de associação entre variantes alélicas dos genes HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-G, KIR, MICA, IL-2, RB1, NKG2D e CDKN2A e o desenvolvimento de neoplasias intra-epitelial cervical de grau II e III (NIC II e NIC III) e do câncer cervical uterino; Verificar a existência de expressão gênica diferencial em tecido do colo uterino de mulheres com NIC II, NIC III e câncer cervical uterino em relação a mulheres saudáveis.

SUMÁRIO DO PROJETO: Este trabalho terá uma fase de coleta de amostras de sangue periférico (para a tipificação dos genes) e do epitélio colo uterino (para verificação da expressão gênica) de mulheres pacientes e controles.A amostra paciente será composta por pacientes do hospital Erasto Gaertner, nas quais o resultado do exame preventivo ginecológico realizado no máximo há um ano antes do contato dos pesquisadores, não apresente alterações.

CONSIDERAÇÕES:

a) Projeto analisado e sem restrições.

PARECER: APROVADO Dr. Jordan Zanetti Silva
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
HEG - L.P.C.M. - CRM-PR 14.457

Membros do CEP:

Ana Paula Hey – Enfermeira
Timóteo Borges de Campos – Membro da comunidade
Andrei Leite de Morais - Médico
Ariovaldo Donizetti de Abreu - Fisioterapeuta
Clarice Nana Yamanouchi - Médica
Edenice de Oliveira Santana - Enfermeira
Fabrício Martinelli de Oliveira - Médico
Flávia Martignago - Nutricionista
Geovana Cristina S.Sylvestre - Enfermeira
Iolanda de Assis Galvão
Ivy Gamen Longhi – Farmacêutica
Jordan Zanetti Silva - Médico
José Carlos Wiederkehr – Administrador de Empresas
Luiz Antonio Negrão Dias - Médico
Márcia Bobak - Enfermeira
Marina Lopes Carlos - Nutricionista
Ricardo Isaias Testoni - Enfermeiro
Rodrigo Leite de Morais - Médico
Timóteo Borges de Campos – Membro da Comunidade

Dr. Ovande do Amaral, 201 – Jardim das América. Curitiba-PR Brasil. CEP 81520-060
Fone: 55 - 41- 3361-5000. http://www.erastogaertner.com.br

11.2 ANEXO 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

a) Você está sendo convidado para participar na pesquisa entitulada "A investigação do polimorfismo e o estado de metilação da região reguladora e promotora do HLA-G em tecido normal e tecido cervical neoplásico como marcadores do desenvolvimento e progressão do câncer do colo do útero". É através da pesquisa científica que avanços médicos são possíveis e portanto a sua participação é de importância fundamental.

(b) O objetivo principal trabalho presente é a investigação de certas características do sistema imune que são capazes de eliminar o vírus do papiloma humano (o HPV) na grande maioria das mulheres. O HPV é transmitido durante a relação sexual sem proteção e, na maioria das mulheres, o mesmo é eliminado pelo sistema imune. Entretanto, em algumas mulheres a infecção pelo HPV pode perdurar levando a alterações detectáveis pelo Exame de Papanicolau, ou até mesmo ao câncer do colo do útero. A participação de mulheres livres de doença e infectadas pelo HPV é de grande importância para atingir um entendimento fundamental e possivelmente o desenvolvimento de métodos de diagnósticos novos, vacinas e novas drogas.

c) Se você decidir participar desta pesquisa, além do Exame de Papanicolau para o qual você foi referida a este Hospital, as suas células cervicais serão testadas para o presença do HPV. Ainda, você será convidada a doar 10mL de sangue a ser coletado com material estéril e a preencher um questionário breve.

d) Você pode ser positiva para a infecção pelo HPV e ter o resultado do Exame de Papanicolau normal. Se o seu resultado for positivo para o HPV, será oferecido a você o gerenciamento de rotina e exames repetidos.

e) Não há riscos para você além daqueles pertinentes a coleta rotineira de sangue.

f) É seu direito ter toda informação referente à sua participação e os resultados de todos os exames realizados com as suas amostras a qualquer hora.

g) A sua participação neste estudo é voluntária.

h) O material relacionado a pesquisa será acessível somente aos pesquisadores diretamente envolvidos na pesquisa e pelas autoridades legais. Se qualquer

informação vier a ser publicada ela será codificada e portanto a sua confidencialidade será mantida. Acesso aos resultados a terceiros não será permitido, incluindo empregador, supervisores, companhias de seguro, etc. Uma alíquota do seu DNA extraído das suas células cervicais será enviado ao Laboratório de Epidemiologia Molecular da "*Università degli Studi di Torino*" (Itália) para a análise da infecção pelo HPV e o status de metilação do HLA-G

i) Não caberá qualquer custo a você quanto aos procedimentos e exames realizados nesta pesquisa.

l) Pela sua participação neste estudo você não receberá qualquer pagamento.

m) Os pesquisadores responsáveis por este projeto são Profs.ª Drs.ª Maria da Graça Bicalho - Tel: (41) 3361-1729 (Laboratório, celular.: 9973-5855, Prof. Dr. Newton Sérgio de Carvalho (41) 3335-7474 e Dr. Carlos Alfonso Maestri (41) 33615000 e na Itália o Prof. Franco Merletti (Tel: +39 011 6334306), Chefe da Unidade de Epidemiologia do Câncer, "*Università degli Studi di Torino"*.

Eu, _____li o texto acima e compreendi a natureza e o objetivo da pesquisa para a qual eu fui convidada a participar. A explicação recebida enfatizou o fato de eu precisar doar uma amostra de sangue e material do colo de útero e de que eu sou livre de interromper a minha participação a qualquer momento que eu decida fazê-lo sem que isto prejudique qualquer acompanhamento médico na Instituição aonde estou consultando.

Eu voluntariamente concordo em participar desta pesquisa.

_____ ___/ ___ /___ _____

Paciente/Controle Assinatura Data Pesquisador

11.3 ANEXO 3 - Questionário Epidemiológico

HPV, Câncer Cervical, Estudo do HLA-G

******Teve relação sexual nas últimas 24 h? Se positivo excluir do estudo**

Questionário para avaliação dos fatores de risco.

ID: Nome: _____

Data de nascimento: _____

RG/CPF: _____

1. Idade em que ocorreu a primeira relação sexual (anos) |__|__|

2. Número de parceiros sexuais desde o início da atividade sexual |__|__|

3. Uso de hormônios contraceptivos:

a. Faz uso de hormônios contraceptivos (presente) Sim |__| Não |__| Fez uso? _____

Qual (is):_____

b. Idade em que iniciou o uso |__|__|

c. Tempo de uso do anticoncepcional durante a vida |__|__|

4. Número de gestações |__|__|

a. Idade ao primeiro parto |__|__|

5. Escolaridade:

(__) Ens. Fundam. Incomp. (__) Ens. Médio Incomp.(__) Ens. Superior Incomp

(__) Ens. Fund. Comp. (__) Ens. Médio Comp. (__) Ens. Superior Comp.

6. Etnia: (__) Branco (__) Preto (__) Pardo (__) Asiático

7. Fumante

a. **Sim** |__| b. **Ex-fumante** |__| c. **Nunca** |__|

a.1) Fuma há quanto tempo? (anos) |__|__|b.1)Parou a quanto tempo? (anos) |__|__|

a.2) Cigarros/dia |__|__| b.2)Fumou por quanto tempo (anos) |__|__|

b.3)Cigarros/dia |__|__|

8. Quando foi o último preventivo? |__||__|

Mês/ ano

9. Apresentou alguma citologia oncótica (PREVENTIVO) alterada? Sim |__| Não |__|

10. Número de parceiros sexuais nos últimos 12 meses |__|__|

11. Uso de preservativo nos últimos 12 meses:

i. Regular |__| ii. Ocasional |__| iii. Nunca |__|

12. Usuária de DIU |__| sim |__| não

Se retirou o DIU, a quanto não faz mais uso |__|__| anos

13. Antecedentes de DST

a. Tem ou teve alguma DST*****? Sim |__| Não |__|

*****Não considerar se a paciente estiver no momento em tratamento para lesão de alto grau.

14. Cauterização:

a. Já teve alguma cauterização? Não |__|

Sim |__| Colo |__| Vagina| |__|

Vulva |__| Ânus |__|

15. Quantas citologias oncóticas (preventivo) foram feitos durante a vida? |__|

_____

Entrevistador:

Data: Unidade de coleta: