

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
JULIANA COCHENSKI CORDEIRO



***SNPS DA REGIÃO CONTROLADORA DE LOCUS (LCR) NA REGIÃO REGULADORA 5'
DO GENE HLA-G EM MULHERES COM NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL.***

CURITIBA

2013

JULIANA COCHENSKI CORDEIRO

***SNPS DA REGIÃO CONTROLADORA DE LOCUS (LCR) NA REGIÃO REGULADORA 5'
DO GENE HLA-G EM MULHERES COM NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL.***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria da Graça Bicalho.

CURITIBA

2013



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **JULIANA COCHENSKI CORDEIRO**, para obtenção do título de Mestre em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira à candidata o conceito "C".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 30 de setembro de 2013

Doutora Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro
Dep. Genética/UFPR – Membro Titular

Doutora Eni Picchioni Bompeixe
Dep. Patologia Básica/UFPR – Membro Titular

Doutora Maria da Graça Bicalho
Dep. Genética/UFPR – Orientadora e Presidente da Banca

Visto

Professor Doutor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a minha mãe **Regina** a minha irmã **Franciele**, ao meu noivo **Leandro**, à minha **família** e a todos que de alguma forma colaboraram com essa conquista, não só estando sempre ao meu lado, mas, nos bastidores, vivenciando toda a trajetória, incentivando, consolando, aplaudindo. Vocês são meu leme, minha bússola e meu porto seguro. **Amo muito vocês.***

Aos meus pais M^a Regina e Jorge

À minha irmã

Ao meu noivo

Aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente a minha orientadora, Profa. Dra. Maria da Graça Bicalho, por ter aceitado me orientar e desenvolver comigo este trabalho, por toda sua generosidade e dedicação.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Genética.

Aos Membros da Banca de acompanhamento Professoras: Enilze Ribeiro e Lupe Ale, pelas suas críticas e sugestões enriquecendo este trabalho.

À equipe de funcionários e alunos do Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade, pela compreensão e apoio, cada um contribuiu de alguma forma para a realização desse trabalho. Em especial as meninas do HPV: Patrícia, Renata, Marina e Gorete. (HPV eu e você!). A Sibelle B. Mattar, Priscilla F. Wowk, Fabiana Poerner pela ajuda, e principalmente pelos ensinamentos e apoio. Suelen C. Zeck, por ser essa amiga tão divertida e me dar tanto apoio.

Ao José Samuel pela ajuda com as análises estatísticas.

Agradeço a Cynthia H. Costa pelo apoio, incentivo, ensinamentos, amizade, pela companhia durante as práticas (sem você tudo seria mais triste e mais difícil), por acreditar em mim desde antes de entrar na pós, pelos momentos de extrema alegria e de dificuldades, enfim por ser amiga-irmã!

Aos meus colegas de turma, em especial, Janaina de Sena, Luana Barbosa, Carlos Eduardo Ibaldo, Samuel Neto pela amizade. *“A amizade é um amor que nunca morre.” Mário Quintana.*

À Karen Bora, obrigada pela amizade tão divertida desde os tempos da faculdade, por me ouvir tantas e tantas vezes e me ajudar sempre!

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 Alexandre M. C. Filho e Nathalia Scremin, sempre presentes e cuidando de mim com amor e carinho. Amo vocês! *"E eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos!" Vinícius de Moraes.*

À Coordenação da catequese em especial a Maria Angelica e Grasiella, pelo apoio e carinho. *"A verdadeira riqueza não está nas coisas, mas no coração" Papa Francisco.*

Ao Chefe escoteiro Osires Pissaia, pelos conselhos, pelos exemplos. *"Palavras comovem, exemplos arrastam!" Baden Powell.*

Às minha avós Irene e Izaurinha, pelo incentivo e estímulo à via acadêmica, seu carinho foi fundamental.

À minha irmã, por todo incentivo, por acreditar em mim sempre, seu apoio e carinho foram essenciais!

Ao meu pai, que na sua simplicidade sempre me ajudou dando apoio, carinho e bons conselhos. Tenho muito amor por você.

À minha amada mãe, pedra fundamental da minha vida! Que na sua humildade me deu todas as oportunidades para me tornar uma pessoa de caráter e buscar uma vida melhor. Investiu na minha formação acadêmica. É o meu porto seguro e o meu leme, Te amo demais.

Ao meu noivo, Leandro Baran, por estar sempre ao meu lado mostrando-se muito paciente e tolerante e me suportando em todos os momentos nesses dois anos, por do seu jeito me ajudar, por me ouvir, me aconselhar, pela compreensão e por não desistir de mim. Obrigada pelo seu amor e carinho.

À Deus por cada momento, por cada minuto, por colocar todas essas pessoas na minha vida, que muitas vezes elas me deram força, animo e coragem para seguir em frente, não me deixando desanimar com as dificuldades.

Aos pacientes, controles que colaboraram para que este estudo pudesse acontecer.

Aos Médicos, enfermeiros e colétadores que colaboram nas campanhas.

À CAPES e ao convenio LIGH/Fumpar pelo apoio financeiro possibilitando o desenvolvimento desta dissertação.

Ninguém se engane a si mesmo. Se alguém dentre vós se julga sábio à maneira deste mundo, faça-se louco para tornar-se sábio, porque a sabedoria é louca diante de Deus, pois diz a Escritura, ele apanhará os sábios na sua própria astúcia.

1Cor: 3,18-23 – Bíblia Sagrada.

Só sei que nada sei.

Sócrates.

Resumo

A infecção pelo Papilomavírus humano (HPV), que tem tropismo por mucosas e que se aloja no epitélio escamoso pluriestratificado que reveste o colo do útero, pode induzir o desenvolvimento de lesões intra-epiteliais de alto grau (NIC II e NIC III). Quando não tratadas, essas lesões podem progredir ao Câncer Cervical (CC). O câncer do colo do útero é o segundo tipo de câncer mais comum, e a maior causa de mortalidade em mulheres no mundo. Genes HLA não clássicos, em especial o gene *HLA-G*, por seu papel na imunotolerância, tem sido investigados quanto à proteção e/ou susceptibilidade a uma série de doenças causadas por vírus, câncer, entre outras. De acordo com evidências recentes, a expressão de *HLA-G*, na superfície da célula tumoral, teria efeito imunomodulador sobre as células *Natural Killer*, linfócitos T, além de inibir a resposta imune. O objetivo desse estudo de associação caso-controle, foi investigar a influência dos SNPs localizados na região promotora do gene *HLA-G* em mulheres com lesões intraepiteliais cervicais de Grau II e Grau III e mulheres controle. As configurações haplotípicas para os 8 SNPs (-1306, -1179, -1155, -1140, -1138, -1121, -990, -964) investigados na região promotora de *HLA-G* foram comparadas entre os grupos “pacientes” e “controles”. O estudo foi conduzido numa amostra constituída por 194 mulheres, sendo que 70 apresentavam NIC II e 51 apresentavam NIC III ambas HPV positivas. O grupo controle foi constituído por 73 mulheres sem lesão epitelial cervical e sem a presença do vírus HPV. O DNA foi extraído de amostras do sangue periférico pela técnica de *Salting out*, e a genotipagem foi realizada por seqüenciamento com *ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.1 (Applied Biosystems, CA, USA)*. Para as análises estatísticas utilizou-se o software *BioEstat v.5.0*. Aplicou-se o teste exato de Fisher em tabelas 2x2, considerando-se significância estatística quando $p \leq 0,05$. A estimativa das frequências haplotípicas foi executada com o software Phase 2.1. Notou-se uma maior frequência, do Haplótipo LCR *H1.1 (GAGAACGG)* em mulheres controles (CLS) tanto na comparação estratificada *NIC III x CLS* ($p=0,0130$; OR=1,87; IC=1,10-3,17) quanto na comparação entre grupos CLS x PAC (NIC II + NIC III; $p=0,0471$; OR=1,5; IC=0,98-2,27). Agrupando-se as principais configurações haplotípicas dos grupos H1 e H2, observou-se um aumento significativo na frequência dos haplótipos agrupados em H2, nas comparações *NIC III x CLS* ($p=0,0281$; OR=1,7; IC=1,01-2,84) e CLS x PAC (NIC II + NIC III; $p=0,0192$; OR=1,5; IC=1,04-2,42). Esses resultados são sugestivos de uma provável participação da Região Controladora de Locus (LCR) com o desenvolvimento do CC, tornando o *HLA-G* um gene candidato a ser melhor investigado como biomarcador de resistência (Haplótipo H1.1) e susceptibilidade (Haplótipo H2) na progressão das lesões intraepiteliais cervicais e o desenvolvimento do CC.

Palavras-chave: *HLA-G*, HPV, Câncer Cervical, tolerância imunológica.

Abstract

Infection with human papillomavirus (HPV), which has tropism for mucous and lodges itself in squamous epithelium that lines the cervix, can induce intraepithelial high- grade lesions (NIC II and NIC III). Untreated, these lesions may progress to cervical cancer (CC). Cancer of the cervix is the second most common cancer and the leading cause of mortality in women worldwide. Nonclassical HLA genes, especially *HLA-G* for its immunotolerant role in immune response, have been investigated as candidate gene for the protection or susceptibility to diseases caused by viruses, cancer among other causes. According to recent evidence the expression of HLA-G on the surface of the tumor cells have immunomodulatory effect on Natural Killer cells, T lymphocytes through the inhibition of the immune response. The aim of this study was to investigate the influence of SNPs in the promoter region of the *HLA-G* gene in women with cervical intraepithelial lesions Grade II and Grade III and control women. Haplotypes configuration for 8 SNPs (-1306, -1179, -1155, -1140, -1138, -1121, -990, -964) in the promoter region of *HLA-G* were investigated and compared between Patients and Controls groups. The study was conducted with a sample of 194 women as followed: 70 had CIN II, 51 had CIN III and 73 control women without the presence of the HPV virus and cervical epithelial lesions. DNA was extracted from peripheral blood samples using the technique of salting out and genotyping was performed by sequence base typing with an ABI Prism Big Dye Terminator V.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA, USA) and ABI 3130 Sequence Analyzer. The estimated haplotype frequencies were performed with the Phase 2.1 software. For the statistical analysis the Fisher exact test for 2x2 tables was used, considering statistically significant at $p \leq 0.05$, through the BioEstat v.5.0 software. It was observed a higher frequency of haplotype LCR H1.1 (GAGAACGG) in female controls (CLS) in the comparison stratified CIN III x CLS ($p = 0.0130$, OR = 1.87 , CI = 1.10 to 3.17) and in the comparison groups CLS x NIC II + NIC III ($p = 0.0471$, OR = 1.5 , CI = 0.98 to 2.27). Grouping the main haplotype referred as H1 and H2 groups, a higher frequency of haplotypes H2 in patients was observed (NIC II + NIC III) when compared with controls: NIC III x CLS ($p = 0.0281$, OR = 1.7 CI = 1.01 to 2.84) and CLS x NIC II + NIC III ($p = 0.0192$, OR = 1.5, CI = 1.04 to 2.42). These results were very suggestive of a possible role of the *Locus Control Region* (LCR) with the development of CC, making the HLA-G gene a good candidate for further investigation as a biomarker of protection (Haplotype H1.1) and/or susceptibility (Haplotype H2) of the progression of cervical intraepithelial lesions and development of CC.

Keywords: HLA-G, HPV, Cervical cancer, immunological tolerance.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	13
LISTA DE TABELAS.....	14
LISTA DE ABREVIATURAS.....	15
1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Justificativa.....	21
1.2 OBJETIVO.....	22
1.2.1 Objetivo Geral.....	22
1.2.2 Objetivos Específicos.....	22
2 REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 A INFECÇÃO PELO HPV E AS LESÕES NEOPLÁSICAS INTRAEPITELIAIS CERVICAIS E O CÂNCER CERVICAL (CC).....	23
2.1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER CERVICAL.....	25
2.1.2 RESPOSTA IMUNE CONTRA O HPV	28
2.1.3 GENES CANDIDATOS À SUSCEPTIBILIDADE OU À PROTEÇÃO AO DESENVOLVIMENTO DE NICs	34
2.2 O COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE HUMANO.....	38
2.2.1 O GENE HLA-G: UM COMPONENTE NÃO CLÁSSICO DO COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE HUMANO	41
2.2.2 MOLÉCULA HLA-G E A EVASÃO DA RESPOSTA IMUNE TUMORAL	45
2.2.3 POLIMORFISMOS DO GENE HLA-G.....	48
2.2.3.1 Polimorfismos da região codificadora.....	48
2.2.3.2 POLIMORFISMOS EM SÍTIOS REGULADORES E EXPRESSÃO DOS GENES MHC IA.....	49
2.2.3.3 ELEMENTOS REGULATÓRIOS DA EXPRESSÃO DE HLA-G.....	51

2.2.3.4	Região 3'UTR – Polimorfismo.....	55
Capítulo I	57
Introdução.....		59
Material e Métodos.....		59
Amostra.....		59
Genotipagem		60
Estatística		61
Resultados.....		61
Discussão.....		63
Referências.....		67
3. DISCUSSÃO		70
4. CONCLUSÕES.....		74
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		75
APÊNDICES.....		91
APÊNDICE I.....		92
MATERIAI E MÉTODOS		93
CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....		93
APÊNDICE II.....		102
ANEXO 1 - APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA E PESQUISA.....		103
ANEXO 2 - PARECER CONSUBSTANCIADO.....		104
ANEXO 3 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....		105
ANEXO 4 - QUESTIONÁRIO EPDEMIOLÓGICO.....		107

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Modelo de história natural do HPV e CC.....	23
Figura 2 – Estágios de progressão do vírus HPV em mulheres	24
Figura 3 - Representação das taxas brutas de incidência de CC por 100 mil mulheres, estimadas para 2013	27
Figura 4 - Incidências dos tipos de câncer mais comuns para o Estado do Paraná e Curitiba	28
Figura 5 – Organização genômica do vírus do papiloma humano	35
Figura 6 – Mecanismo da carcinogênese por HPV	36
Figura 7 - Mapa do Complexo Principal de Histocompatibilidade (<i>MHC</i>) humano.....	39
Figura 8 - Estrutura e composição das isoformas <i>HLA-G</i>	44
Figura 9 - Representação esquemática da atuação de <i>HLA-G</i> por meio de sua ligação aos receptores inibitórios	46
Figura 10 – Estrutura do promotor do gene <i>MHC Ia</i>	50
Figura 11 – Região promotora do gene <i>HLA-G</i>	53
Figura 12 - Polimorfismos da região 5'URR do gene <i>HLA-G</i> e os sítios de ligação dos fatores transcricionais reguladores da expressão do gene	55

MATERIAL E MÉTODO

Figura1: Gel de agarose 1% para verificação da PCR.....	98
Figura 2: Parte de um eletroferograma, mostrando um indivíduo heterozigoto.....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estimativas para o ano 2013 das Taxas Brutas de Incidência de Câncer, por 100 mil, segundo localização primária 27

Tabela 2. Polimorfismos de DNA definindo os alelos de HLA-G. 49

ARTIGO

Tabela I – SNPs Estudados e Haplótipos da Região LCR. 62

Tabela II - Frequências Haplotípicas da Região LCR de pacientes e controles 62

MATERIAL E MÉTODO

Tabela 1: Polimorfismos estudados no presente trabalho 96

Tabela 2: Condições para a amplificação 97

Tabela 3: Condições de temperatura para a amplificação 97

Tabela 4: Condições de purificação enzimática. 99

Tabela 5: Condições de temperatura para a purificação. 99

Tabela 6: Condições para a reação de seqüenciamento 99

Tabela 7: Condições de temperatura para a seqüenciamento.....100

LISTA DE ABREVIATURAS

3'UTR	- Região 3' não traduzida (<i>Untranslated Region</i>)
5'URR	- Região 5' reguladora não traduzida (<i>Upstream Regulatory Region</i>)
$\beta 2$ m	- Beta-2 microglobulina
A	- Adenina
APC	- Células apresentadoras de antígenos (<i>Antigen Presenting Cell</i>)
ATF	- Ativador de Fator de Transcrição
CC	- Câncer Cervical
CL	- Células de Langerhans
CT	- <i>Chlamydia trachomatis</i>
CH	- Captura Híbrida
C	- Citosina
cAMP	- Adenina mono fosfato cíclico
CIITA	- Transativador de classe II
CREB	- Proteína ligante ao elemento de resposta ao cAMP
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
E	- Genes de expressão precoce (<i>Early proteins</i>)
<i>EnhA</i>	- Intensificador A
<i>EnhB</i>	- Intensificador B
EXO I	- Exonuclease I
G	- Guanina
HLA	- Antígenos Leucocitários Humano (<i>Human Leucocytes Antigens</i>)
HPV	- Vírus do Papiloma Humano (<i>Human Papillomavirus</i>)
HSIL	- Lesão Escamosa Intra-epitelial de Alto Grau (<i>High-Grade Squamous Intraepithelial Lesions</i>)
HSV-2	- Vírus do Herpes Simples do Tipo II (<i>Herpes Simplex Vírus 2</i>)
HSE	- Elemento de choque térmico (<i>Heat shock element</i>)

HSF1	- Fator 1 de choque térmico (<i>Heat shock factor 1</i>)
IARC	- <i>International Agency for Research on Cancer</i>
Ig	- Imunoglobulina
IL2	- Interleucina 2
IFN	- Interferon
IL	- Interleucina
IRF	- Fator regulatório de interferon
ISRE	- <i>Interferon specific regulation element</i> (Elemento de resposta de interferon)
IFN- γ	- Interferon Gama
KIR	- <i>Killer Immunoglobulin-like receptors</i> (Receptores de Células NK Semelhantes a Imunoglobulinas)
LCR	- Região controladora de locus (<i>Long Control Region</i>)
LIGH	- Laboratório de Imunogenética Histocompatibilidade
LIR	- Receptores inibidores leucocitários semelhantes às imunoglobulinas
LTA	- Linfotoxina α
LTB	- Linfotoxina β
L	- Região de proteínas tardias (<i>Late proteins</i>)
LRC	- Complexo de Receptores Leucocitários (<i>Leukocyte Receptor Complex</i>)
LSIL	- Lesão Escamosa Intra-epitelial de Baixo Grau (<i>Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions</i>)
MHC	- Complexo Principal de Histocompatibilidade (<i>Major histocompatibility Complex</i>)
mRNA	- RNA mensageiro
NG	- <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
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 (<i>Natural Killer Cells</i>)

NMDP	- Programa Nacional de Doadores de Medula (<i>National Marrow Donor Program</i>)
NF- κ B	- Fator Nuclear κ B
OR	- Razão de Probabilidades (<i>Odds Ratio</i>)
ORFs	- <i>Open Reading Frame</i> (Matriz Aberta de Leitura)
PCR	- Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
<i>RB1</i>	- Gene do Retinoblastoma 1
RR	- Risco Relativo
RNA	- Ácido ribonucléico
RE	- Retículo Endoplasmático
SAP	- Fosfatase alcalina de camarão (<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>)
sHLA-G	- HLA-G solúvel
SNP	- Polimorfismo de nucleotídeo único (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
T	- Timina
TNF	- Fator de necrose tumoral
TAP	- Transportador Associado a Processamento
TGF β	- Fator de Crescimento Tumoral β
TNF α	- Fator de Necrose Tumoral α
<i>TP53</i>	-Tumor Protein p53 Gene

1. INTRODUÇÃO

Lesões pré-cancerígenas do colo do útero, denominadas neoplasias cervicais intraepiteliais (NIC), são lesões que possuem, inicialmente, a capacidade de progredir para um câncer cervical invasivo, se não tratadas. Essas lesões são fortemente associadas a mudanças morfológicas das células quando da infecção com tipos específicos de HPV de alto risco. A expressão contínua de oncoproteínas virais resulta em uma proliferação celular não regulada. Fenotipicamente, os pré-cânceres são caracterizados pela presença de DNA do HPV de alto risco e por instabilidade cromossômica, a qual poderá resultar em aneuploidias (IARC, 2005).

O sistema de classificação citológica conhecido como classificação de Bethesda foi desenvolvido em 1988 com o objetivo de caracterizar as lesões intraepiteliais cervicais. Neste sistema, a NIC de grau I é denominada Lesão Escamosa Intraepitelial de Baixo Grau (em inglês *LSIL- Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion*), enquanto as NICs de Grau II e Grau III são classificadas como Lesão Escamosa Intraepitelial de Alto Grau (*HSIL-High-grade Squamous Intraepithelial Lesion*) (IARC, 2005).

Nesse trabalho os termos NIC I, NIC II e NIC III são utilizados para designar as lesões precursoras do câncer cervical. 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. Dessa forma, todas as NICs devem ser consideradas lesões significativas e como tal devem ser acompanhadas e tratadas (BRASIL. Ministério da Saúde, 2013).

Outros fatores de risco têm sido associados ao desenvolvimento do câncer cervical, tais como o uso de contraceptivos orais, tabagismo, gestações múltiplas, início precoce da atividade sexual, múltiplos parceiros, parceiros de alto risco, subnutrição, nível sócio econômico e infecção concomitante por 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) (MUÑOZ *et al.*, 2002; CASTELLSAGUÉ e MUÑOZ, 2003).

A exposição e susceptibilidade ao *HPV* parecem ser importantes na determinação do risco individual ao desenvolvimento do câncer de colo do útero ou

cancêr cervical (CC). Entretanto, apenas algumas mulheres infectadas desenvolvem a doença, corroborando as evidências de que outros fatores de risco também são importantes para o desenvolvimento do câncêr (MAGNUSSON e GYLLENSTEN, 2000).

A interferência das oncoproteínas virais nas proteínas do sistema imune e naquelas que participam do ciclo celular induz e mantém a transformação neoplásica, fazendo com que células infectadas formem lesões precursoras do câncêr e evoluam posteriormente para CC. Nesse cenário, o estudo dos genes que codificam proteínas envolvidas com a resposta imune dirigida às células infectadas pelo *HPV* tem grande importância, uma vez que determinados genótipos que participam da resposta imune podem conferir maior susceptibilidade ou maior proteção ao desenvolvimento de lesões precursoras do câncêr em resposta à ação de proteínas virais (ROUAS- FREISS et al., 2005).

Os antígenos leucocitários humanos, referidos pela sigla HLA (do inglês, *Human Leucocyte Antigens*) constituem o Complexo Principal de Histocompatibilidade (do inglês *MHC, Major Histocompatibility Complex*) da espécie humana. Eles desempenham importante papel na resposta imune adaptativa e inata. Na resposta imune adaptativa atuam como moléculas apresentadoras de peptídeos para linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺ e, são fundamentais para definir o repertório dos linfócitos T circulantes. Epítopos Bw4 presentes nas moléculas HLA-B e HLA-Cw atuam como ligantes para receptores presentes nas células Natural Killer (NK), mediando a atividade citotóxica desse importante componente celular da imunidade inata (ROUAS- FREISS et al., 2005).

Atualmente, enfatiza-se a importância do estudo do gene *HLA-G* no escape tumoral. Um provável mecanismo envolveria a inibição da atividade citotóxica das células NK, que resultaria de interações da proteína HLA-G com receptores expressos na membrana da células NK e de linfócitos T citotóxicos (ROUAS- FREISS et al., 2005).

O gene *HLA-G* apresenta uma diversidade de Polimorfismos de Único Nucleotídeo (SNPs) em sua região promotora. que definem importantes sítios reguladores da expressão gênica. Dessa forma, a alteração da configuração de SNPs que definem esses elementos de ação *cis na* região promotora, poderia

influenciar na ligação de fatores transcricionais, na transcrição e/ou níveis transcricionais da proteína HLA-G, e conseqüentemente em sua expressão e função (revisado por HVIID, 2006).

O objetivo do presente estudo foi investigar a influência da configuração haplotípica de SNPs localizados em diferentes módulos funcionais da região promotora do gene *HLA-G* em mulheres com NIC II e NIC III e em mulheres controle, sem lesão epitelial cervical e sem a presença do vírus HPV. As configurações haplotípicas para os 8 SNPs (posições -1306, -1179, -1155, -1140, -1138, -1121, -990, -964) investigados no promotor de *HLA-G* foram comparadas entre os grupos paciente e controle, constituído respectivamente por 121 mulheres pacientes com a lesão epitelial cervical e com a presença do vírus HPV e 73 mulheres controles sem lesão epitelial cervical e sem a presença do vírus HPV. No grupo paciente 70 mulheres foram diagnosticadas com NIC II e 51 mulheres diagnosticadas com NIC III, respectivamente.

1.1 JUSTIFICATIVA

As lesões intraepiteliais cervicais e sua provável evolução para o câncer cervical (CC) constituem um importante problema de saúde pública. Estudar a variação de genes de resposta imune e sua influência na evolução do CC bem como a resistência e/ou susceptibilidade à infecção pelo HPV, podem contribuir para o entendimento da patogênese revelando marcadores genéticos que auxiliem no prognóstico, acompanhamento e tratamento das lesões a ser indicado para essas pacientes. Nesse contexto, a expressão diferencial do gene *HLA-G*, decorrente de variações genéticas em sua região reguladora, poderia favorecer/inibir o *clearance* viral e/ou a evolução/regressão da lesão intraepitelial em mulheres infectadas pelo HPV.

1.2 OBJETIVO

1.2.1 Objetivo Geral

- Investigar em mulheres com lesões intraepiteliais cervicais e seus controles as configurações haplotípicas de 8 *SNPs* que fazem parte da região controladora de *locus* (LCR) situado na região promotora de *HLA-G* e sua relação com a presença/ ausência e estágios das lesões intraepiteliais cervicais.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Estimar e comparar as frequências alélicas e haplotípicas de *SNPs* situados na região controladora de *locus* (LCR) na posições -1306, -1179, -1155, -1140, -1138, -1121, -990, -964, entre mulheres pacientes e controles.
- Investigar associação entre os principais haplótipos LCRs observados entre mulheres pacientes/controles e os diferentes estágios das lesões intraepiteliais cervicais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A INFEÇÃO PELO HPV E AS LESÕES NEOPLÁSICAS INTRAEPITELIAIS CERVICAIS E O CÂNCER CERVICAL (CC)

Após a infecção pelo HPV a sucessão dos eventos moleculares biológicos pode seguir diferentes vias. Uma delas pode resultar na eliminação completa do vírus. A outra progride para lesões precursoras que podem culminar no desenvolvimento do Cancer Cervical (CC). Se o vírus não é eliminado pelo organismo, ele pode desencadear alterações no DNA nuclear da célula infectada, incluindo a tetraploidização, que levam à formação de Neoplasia Intraepitelial Cervical de Grau I (NIC I), em um prazo médio de 2 a 5 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 ou III (NIC II ou NIC III), em um prazo médio de 4 a 5 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 (STANLEY 2010).

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 1) (SOUTHERN e HERRINGTON, 1998).

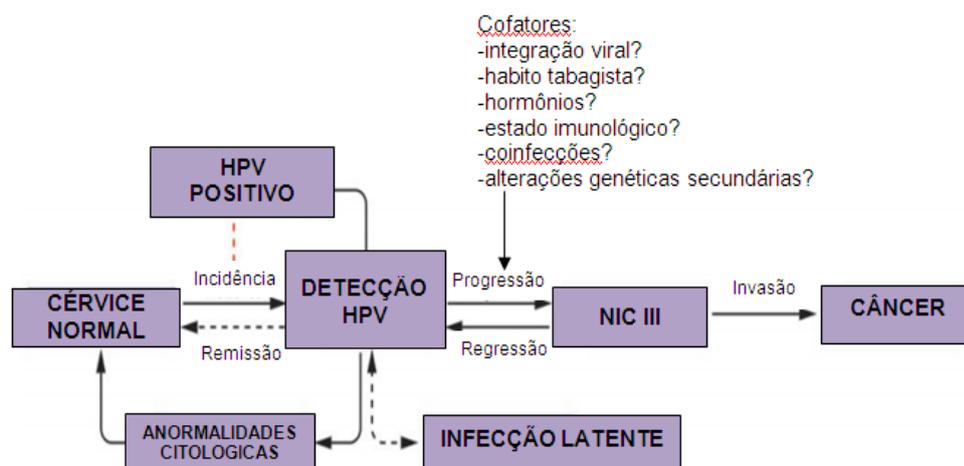


Figura 1 – Modelo de história natural do HPV e CC. após a detecção de alterações citológicas suaves, deve haver a confirmação da infecção. Apenas a minoria das infecções persiste podendo progredir para uma lesão pré câncer (NIC III). FONTE: FRANCO *et al.*, 1999; BOSCH *et al.*, 2008; GRAVITT *et al.*, 2011 (adaptado).

A infecção pelo HPV pode ser transitória quando o vírus não tem a capacidade de permanecer no hospedeiro por muito tempo, sendo que a infecção desaparece sem nenhum tratamento e o vírus é eliminado pela ação do sistema imune. Isso ocorre para a maioria dos HPVs, mesmo para os tipos considerados de alto risco. De 70% a 90% das mulheres eliminam o vírus de 12 a 24 meses após a detecção da infecção (HO *et al.*, 1998). Já a infecção persistente, a qual incide em uma faixa de 10% a 30% dos casos, é definida 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 entre 9 e 15 anos após a infecção persistente (KOUTSKZ *et al.*, 1997; GRAVITT, 2011).

Gravitt, 2011, descreveu, após mensurações realizadas em intervalos de 4, 6 e 12 meses, em células cervicais esfoliadas (Papanicolaou), que transições múltiplas entre os estágios de ausência e progressão do CC podem facilitar o entendimento do histórico do mesmo (Figura 2), assumindo o HPV 16 como exemplo.

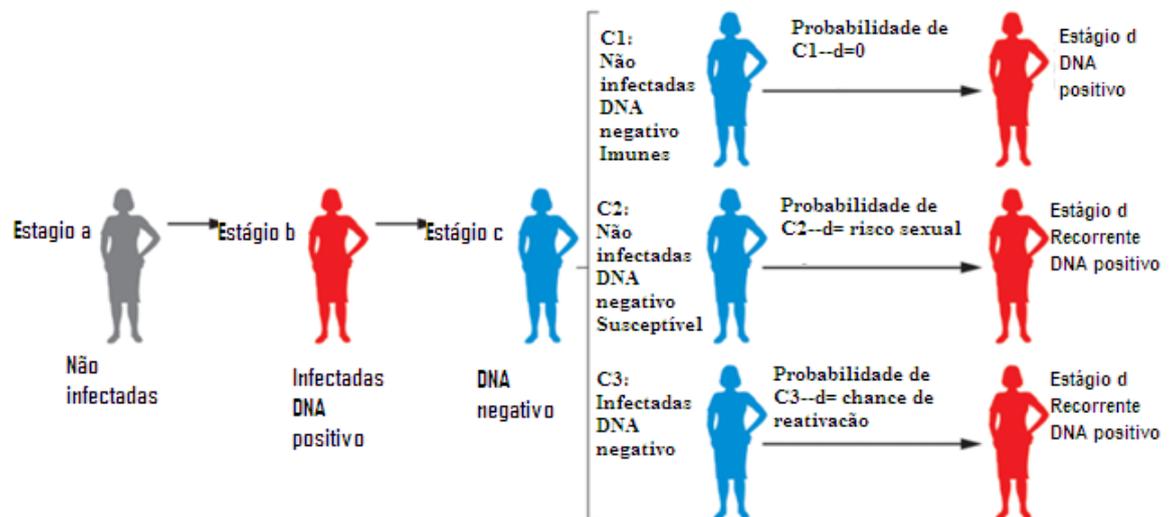


Figura 2 - Estágios de progressão do vírus HPV em mulheres.

FONTE: Trottier, 2010 e Gravitt, 2011. Adaptado

No estágio (a), as mulheres não têm atividade sexual e não são 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 do HPV após 2 anos da detecção inicial, sendo a fase de maior incidência e eliminação do vírus. No estágio (c) as mulheres são consideradas "limpas", de acordo com a detecção primária, mas considerando alguns fatores como imunidade natural contra reinfecção e latência, podem apresentar três estados independentes: (c1) para mulheres com infecção prévia e DNA HPV negativo (imunes); (c2) para mulheres DNA HPV negativo susceptíveis à reinfecção e (c3), infectadas com testes de DNA HPV negativo (sujeitas à reinfecção). 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).

A análise de estudos sobre a prevalência da infecção por HPV na população permitiu concluir que não existem aparentes diferenças geográficas quanto à prevalência do HPV. A infecção é mais comum em mulheres jovens do que em mulheres idosas e, raramente detectada em mulheres que não tiveram atividade sexual anterior. Os principais fatores de risco para NIC III em mulheres HPV positivo são a idade precoce na primeira relação sexual, múltiplos parceiros, o momento do relacionamento (monogamia serial ou concorrente) e tabagismo (CANCER RESEARCH UK, 2008). Pode-se traçar um perfil de mulheres com maior risco de desenvolver o CC se, adicionalmente a esses fatores principais, somarem-se: o baixo nível sócio-econômico associado à subnutrição, pouco acesso à informação e medidas preventivas de saúde pública. 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).

Fatores genéticos contribuem significativamente ao risco da doença. Mulheres com histórico familiar de mães ou irmãs que tiveram CC, estão mais propensas a desenvolver o CC (MAGNUSSON e GYLLENSTEN, 2000).

2.1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER CERVICAL

O CC, com aproximadamente 518 mil novos casos por ano, é um dos tipos mais incidentes em todo o mundo, sendo mais freqüente nos países em desenvolvimento (CANCER RESEARCH UK, 2002; WHO, 2011). Atualmente, mais de 85% de todas as mortes por CC ocorre nesses países (WHO/ICO, 2004, PARKIN *et al.*, 2005). Este câncer ocupa o segundo lugar dentre os mais incidentes na América do Sul, ocorrendo quase 30 a cada 100 mil mulheres, sendo menos freqüente apenas que o câncer de mama (INCA. Ministério da Saúde, 2013). No Brasil o CC é o segundo tipo de câncer mais comum entre as mulheres, sendo responsável pelo óbito de aproximadamente 230 mil mulheres por ano (WHO/ICO, 2010; BRASIL. Ministério da Saúde, 2013).

As lesões epiteliais malignas e pré-malignas do cérvix 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 (WHO,

2006; CASTELLSAGUÈ, 2008), 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).

As estimativas anuais para 2012/2013 no Brasil, segundo o Ministério da Saúde, apontam para a ocorrência de cerca de 518 mil novos casos de câncer em geral. São esperados em torno de 260 mil para o sexo feminino, destes, os mais incidentes são (desconsiderando-se o câncer de pele do tipo não melanoma) o câncer de mama (53 mil), do colo do útero (18 mil), cólon e reto (16 mil) e pulmão (10 mil) (BRASIL. Ministério da Saúde, 2013).

O número de casos novos de câncer do colo do útero esperado para o Brasil em 2013, foi de 17.540, com um risco estimado de 17 casos a cada 100 mil mulheres (Tabela 1) (INCA. Ministério da Saúde, 2013). A incidência do 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, 2013).

Em países desenvolvidos, a sobrevida média estimada para um período de cinco anos varia de 59 a 69%. Nos países em desenvolvimento, os casos são encontrados em estágios relativamente avançados e, conseqüentemente, a sobrevida média atinge 49% para o mesmo período (PARKIN *et al.*, 2005).

Segundo o Ministério da Saúde (2013), no Brasil, a maior incidência de câncer cervical ocorre na região Centro-Oeste 28/100 mil casos. Na região Norte, 24/100 mil, e Nordeste com 18/100 mil casos. Na região Sudeste tem-se 15/100 mil casos, e na região Sul 14/100 mil. Essas taxas podem sofrer variações entre os Estados de uma mesma região (figura 3).

Para o Estado do Paraná e sua capital Curitiba, a incidência prevista para o ano de 2013 seria 770 e 140 casos de CC com incidências de 13,79 e 15,02 , respectivamente a cada 100 mil mulheres (Figura 4) (INCA. Ministério da Saúde, 2013).

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

Tabela 1: Estimativas para o ano 2013 das Taxas Brutas de Incidência de Câncer, por 100 mil, segundo localização primária. FONTE: INCA – Ministério da Saúde (2013)

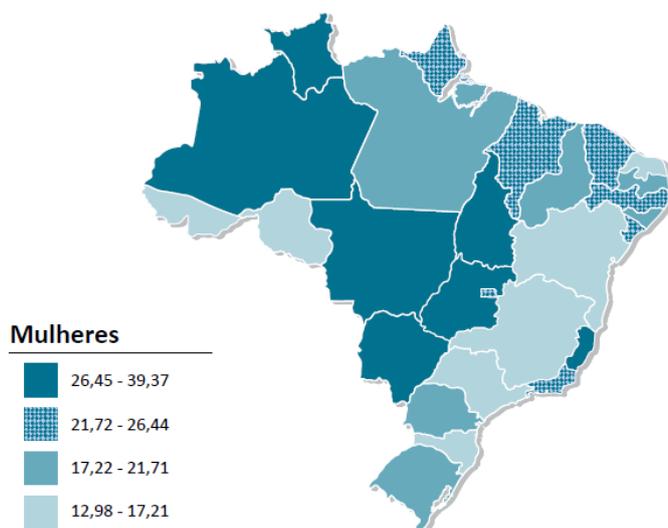


Figura 3 - Representação das taxas brutas de incidência de CC por 100 mil mulheres, estimadas para 2013. FONTE: Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde (2013).



Figura 4 - Incidências dos tipos de câncer mais comuns para o estado do Paraná e Curitiba

Fonte: INCA – Ministério da Saúde (2013) - Adaptado

Estima-se que cerca de 25% das mulheres da população brasileira estejam infectadas pelo vírus, e somente uma pequena fração (entre 3% e 10%) das mulheres infectadas com algum tipo de HPV de alto risco, desenvolverá câncer do colo do útero (BRASIL. Ministério da Saúde, 2013).

2.1.2 RESPOSTA IMUNE CONTRA O HPV

No epitélio cervical uterino existe uma imunidade local natural contra vírus e bactérias. Os bacilos de Doderlein, são naturais da vagina, e secretam ácido lático o que contribui para diminuir o pH, dificultando 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, ou período de incubação, é de aproximadamente 3 semanas, tempo suficiente para que um queratinócito da camada basal complete sua diferenciação e sofra descamação natural (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).

O grupo de fatores da imunidade local, 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 Fator de Necrose Tumoral (TNF). 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).

Os interferons de tipo 1, interferon- α (IFN- α) e interferon- β (IFN- 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 Fator de Necrose Tumoral (TNF) é sintetizado por macrófagos e linfócitos T e possui uma forte atividade antitumoral e antiviral. O Fator de Crescimento Tumoral β (TGF β) inibe a proliferação celular, principalmente daquelas células infectadas pelo vírus. A Interleucina 2 (IL-2), do tipo TH1 é muito importante na imunidade celular, sendo necessária para respostas efetivas no caso de patógenos intracelulares, como os vírus (VIEIRA *et al.*, 1996; KIM *et al.*, 2000; BOCCARDO *et al.*, 2010).

As células NK desempenham um importante papel na imunidade contra o HPV, induzindo apoptose em células infectadas pelo vírus e em células cancerosas. A atividade específica das células requer a participação dos receptores Tipo Imunoglobulina das Células Natural Killer (KIR), os quais permitem que essas células distingam células normais das infectadas por vírus ou de tumores (IARC, 2005; MARTIN *et al.*, 2010).

Os receptores KIR presentes nas células NK tem como ligantes moléculas HLA de Classe I, por meio dos quais monitoram nas células alvo estados de normalidade ou transformação neoplásica, tendo também grande importância na resposta imune contra HPV (IARC, 2005; MARTIN *et al.*, 2010).

O trato genital feminino possui poucos folículos linfóides, os quais são as unidades ativas do lado indutor da 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), que 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 do 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+ ,respectivamente.

Os queratinócitos do epitélio cervical expressam moléculas MHC- I e têm o potencial de apresentar peptídeos virais, uma vez que o HPV multiplica-se dentro dessas células sem causar a sua lise. Essas células também expressam MHC-II induzidas por Interferon- γ (INF- γ). Os queratinócitos também gerariam uma fonte de citocinas, e induziriam resposta imune pelas células T (GONÇALVES e DONADI, 2004).

Os linfócitos T CD4+ ativados secretam citocinas que promovem o crescimento, diferenciação e funções de linfócitos B, macrófagos e outras células. Dois subgrupos desses linfócitos podem ser definidos pelo tipo de citocinas que secretam: Th1 (*Helper 1*) e Th2 (*T helper 2*) (VAZ, A. J.; TAKEI, K.; BUENO, E. C., 2007).

Mas antes de se tornarem Th1 ou Th2, esses linfócitos estão em estado de quiescência, sendo denominados Th *naive*. Até esse momento o único papel deles é produzir citocinas IL-2 e expressar receptores para a mesma. O principal efeito da IL-2 é autócrino, ou seja, age na própria célula que a está secretando. Depois de um estímulo mínimo as Th *naive* passam para a circulação, passando a designar-se Th0. Quando ocorre um estímulo mais acentuado acontece a diferenciação em Th1 ou Th2. A citocina que induz as células Th0 a diferenciarem-se em Th1 é a IL-12, e a citocina que induz as células Th0 a diferenciarem-se em Th2 é a IL-4 (VAZ, A. J.; TAKEI, K.; BUENO, E. C., 2007).

Outra maneira de diferenciar essas células é pelo padrão de resposta, depois de ativadas. As Th1 produzem citocinas relacionadas principalmente com a defesa

mediada por fagocitose contra agentes infecciosos intracelulares, como Interferon-gama (INF- γ), IL-2 e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α). As Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, relacionadas com a produção de anticorpos IgE e reações imunes mediadas por eosinófilos e mastócitos contra alérgenos e helmintos (VAZ, A. J.; TAKEI, K.; BUENO, E. C., 2007).

Após a ativação destas duas subpopulações, Th1 e Th2 influenciam-se mutuamente e de forma antagônica. O INF- γ e TNF produzido pelas Th1 inibe as Th2, e a IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 que são importante na formação de anticorpos, produzida pelas Th2 inibe as Th1 (VAZ, A. J.; TAKEI, K.; BUENO, E. C., 2007).

Acredita-se, atualmente, que uma gestação bem sucedida é decorrente de uma predominância da atividade Th2, sendo que a Th1 poderia ser deletéria para o desenvolvimento da gestação. Estudos em humanos já demonstraram uma maior produção de citocinas Th1 (IL-2 e IFN-gama) e menor produção de IL-10 em casos de abortamentos de repetição. Sabe-se que a imunidade celular desempenha um papel crucial na rejeição a transplantes, enquanto que a geração de citocinas do tipo Th2 é favorável à aceitação dos mesmos. Apesar da presença de antígenos do MHC paternos, o embrião, em gestações normais, não é rejeitado pelo sistema imune materno. Acredita-se que, entre outros mecanismos, a resposta Th2 poderia proteger o embrião contra esta possível rejeição. Contrariamente, citocinas Th1, como o TNF- α , estimulam a apoptose de células trofoblásticas das vilosidades primárias. O aumento da relação Th1/Th2 já foi observado não apenas em casos de abortamentos de repetição, mas também de múltiplas falhas de implantação em ciclos de fertilização in vitro (VAZ, A. J.; TAKEI, K.; BUENO, E. C., 2007).

Citocinas produzidas por células Th1 ativadas, particularmente IL-2 e IFN- γ , também ativam células NK para se tornarem células assassinas ativadas por linfocina (células LAK). Células LAK são capazes de matar células infectadas por vírus ou células tumorais de maneira não restrita ao MHC. De fato, a susceptibilidade de células-alvos à morte por células NK e LAK é inversamente proporcional à expressão de moléculas de MHC de classe I (ver aula sobre imunidade inata). Os mecanismos efetores usados pelas células NK e LAK para matar células-alvos é similar ao usado pelas LTCs (ex., perforina e granzimas).

Células NK e LAK são também capazes de matar células cobertas por anticorpos (VAZ, A. J.; TAKEI, K.; BUENO, E. C., 2007).

Células B não são as melhores células apresentadoras de antígenos em uma resposta humoral primária; células dendríticas ou macrófagos são mais eficientes. Entretanto, com algumas poucas modificações o modelo carreador-hapteno de interações célula-célula descrito acima também se aplica para interações em uma resposta humoral primária. Em uma resposta primária a célula Th2 encontra primeiro o antígeno apresentado pelas células dendríticas ou macrófagos. A célula Th2 “iniciada” pode então interagir com células B que encontraram antígeno e estão apresentando peptídios em associação com moléculas de MHC classe II. As células B ainda requerem dois sinais para a ativação – um sinal é a ligação do antígeno à Ig de superfície e o segundo sinal vem do acoplamento CD40/ligante CD40 durante a interação célula-célula de Th2/B. Além disso, citocinas produzidas pelas células Th2 ajudam as células B a proliferarem e se diferenciarem em plasmócitos secretores de anticorpos (VAZ, A. J.; TAKEI, K.; BUENO, E. C., 2007).

Células Th1 e Th2 afetam células diferentes e influenciam o tipo da resposta imune. Citocinas produzidas pelas células Th1 ativam macrófagos e participam na geração de células Tc, resultando em uma resposta imune mediada por células. Contrariamente, citocinas produzidas pelas células Th2 ajudam a ativar células B, resultando na produção de anticorpos. Além disso, citocinas Th2 também ativam granulócitos. Igualmente importante, cada subpopulação pode exercer influências inibitórias uma em relação à outra. IFN- γ produzido pelas células Th1 inibem a proliferação de células Th2 e IL-10 produzida pelas células Th2 inibe a produção de IFN- γ pelas células Th1. Além disso, embora não mostrado, IL-4 inibe a produção de células Th1. Assim, a resposta imune é dirigida ao tipo de resposta que é requerida para lidar com o patógeno encontrado – respostas mediadas por células para patógenos intracelulares ou respostas humorais contra patógenos extracelulares (VAZ, A. J.; TAKEI, K.; BUENO, E. C., 2007).

As células *Natural Killer* (NK) também são importantes na infecção por HPV, uma vez que há uma maior concentração destas em displasias mais severas. O interferon de tipo 1, interferon- α (IFN- α) e interferon- β (IFN- 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 Fator de Crescimento Tumoral β (TGF β) inibe a proliferação celular, principalmente daquelas células infectadas pelo vírus. A Interleucina 2 (IL-2), do tipo TH1 é muito importante na imunidade celular, sendo necessária para respostas efetivas no caso de patógenos intracelulares, como os vírus (VIEIRA *et al.*, 1996; KIM *et al.*, 2000; BOCCARDO *et al.*, 2010).

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*), adquirida (devido à imunodeficiência adquirida) ou pela oncogenicidade do tipo de *HPV* encontrado (SCOTT, STITES e MOSCICKI, 1999).

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

Além das células citadas acima, monócitos e macrófagos também foram encontrados na mucosa do trato uterino. Em tecidos não infectados há um maior número de macrófagos em relação ao número de Linfócitos T Citotóxicos (CTLs), ao contrário do que ocorre em tecidos infectados. 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).

Alguns vírus, assim como as células tumorais, são capazes de desenvolver mecanismos de escape da vigilância imunológica. A proteína E7 do HPV16, p.ex., inibe a indução de genes ativados por INF α . 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. Esses são os sinais essenciais para desencadeamento da resposta imune no epitélio escamoso (KUPPER e FULBRIGGE, 2004; BOCCARDO *et al.*, 2010).

2.1.3 GENES CANDIDATOS À SUSCEPTIBILIDADE OU À PROTEÇÃO AO DESENVOLVIMENTO DE NICs

Há evidências de que os produtos gênicos do vírus *HPV* interfiram no controle do ciclo celular, levando ao acúmulo secundário de 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).

Na Figura 5 está representada a organização genômica do HPV que possui uma região controladora de locus(LCR) e genes de expressão precoce (E) referidos como E1, E2, E4, E5, E6, E7 e E8- e aqueles de expressão tardia (L), L1 e L2.

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 das mesmas nas células do epitélio proliferativo (HO *et al.*, 1998; LOWY e HOWLEY, 2001).

Dentre os HPV de alto risco oncogênico, os tipos 16 e 18 estão presentes em 70% dos casos de câncer do colo do útero. Já os HPV 6 e 11, encontrados em 90% dos condilomas genitais e papilomas laríngeos, são considerados não oncogênicos.

Como até então, não havia sido encontradas alterações de sequência que distinguissem com convicção HPVs de alto e baixo risco, foi sugerido que as características que levam a esta diferenciação e conseqüentemente levam a proteína a realizar funções específicas de E6 de alto risco como a degradação de p53, são de ordem estrutural e/ou conformacional. Dessa forma, a integridade da porção N-terminal e dos domínios de ligação ao zinco, bem como a região central seriam necessárias para manter tal estrutura/conformação (Ilgengenfritz, C. M; 2009).

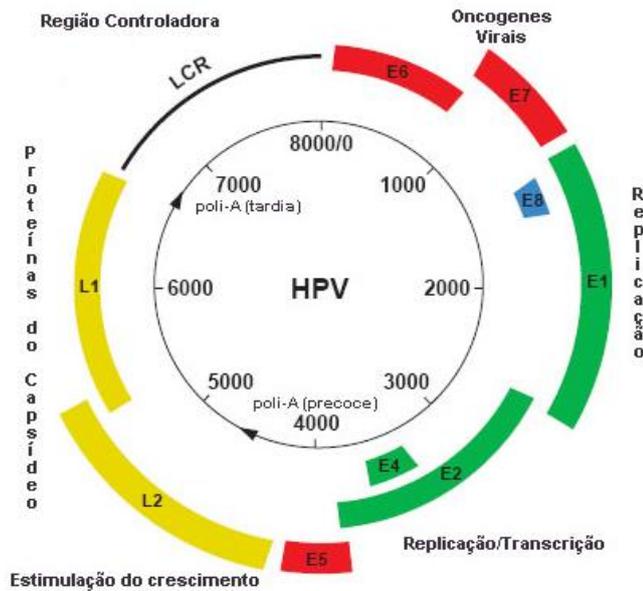


Figura 5 – Organização genômica do vírus do papiloma humano

FONTE: PRENDIVILLE e DAVIES, 2004. Adaptado

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 e a estabilização dos telômeros. As oncoproteínas virais E6 e E7 são essenciais na indução e manutenção da transformação celular devido à sua interferência com o controle do ciclo celular e apoptose (INCASSATI, *et al.*, 2006). A ocorrência da transcrição dos genes *E6* e *E7* é continuamente observada em carcinomas cervicais, sendo essa o primeiro indício de um importante papel desses genes na tumorigênese associada ao HPV (PRENDIVILLE e DAVIES, 2004). 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 6.

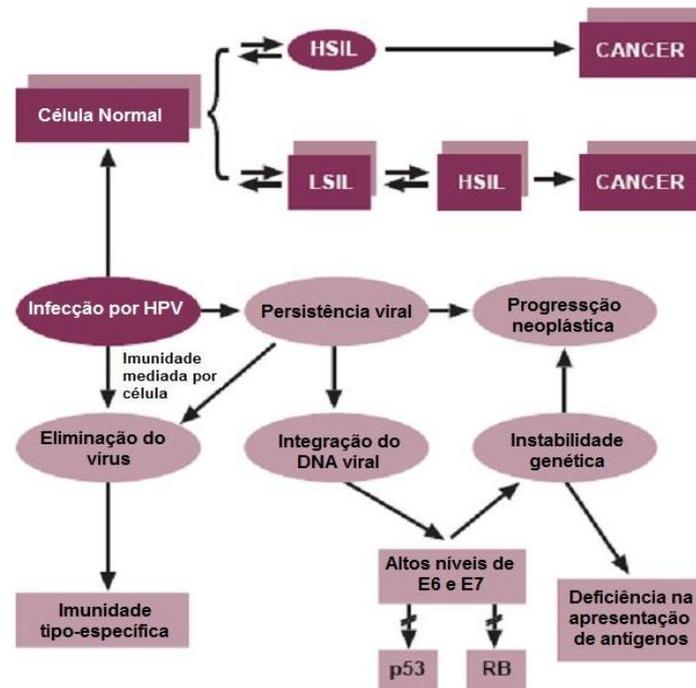


Figura 6 – Mecanismo da carcinogênese por HPV

FONTE: PRENDIVILLE e DAVIES, 2004. Adaptado

NOTA: HSIL: lesões intraepiteliais escamosas de alto risco (NIC II e NIC III); LSIL: lesões intraepiteliais escamosas de baixo risco (NIC I).

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 através da inibição 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 (WERNESSE, *et al.* 1990; 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 consequência 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, 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, 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).

Variantes alélicas *HLA-I* têm sido reportadas como possível influência no CC e, a presença de alguns alelos *HLA-II* específicos pode ser muito importante 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 HPV16 com mutações em E6, que afetam os motivos de ligação ao peptídeo nas moléculas *HLA-A2* e *HLA-B7*, sugerindo que a ausência de epítomos 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 de Classe 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 TNF, LT α 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.

Além disso, no que se refere à imunovigilância mediada por células NK, a cadeia pesada das proteínas *HLA-C*, *HLA-G*, *HLA-B* (alótipos *Bw4*) e algumas *HLA-A* expressam epítomos específicos, formando ligantes que interagem com receptores KIR. Essa interação é conhecida por proteger células saudáveis da destruição espontânea causada pela citólise mediada por células NK. A interação de receptores KIR ativadores com alótipos *HLA de Classe I* pode estimular essa atividade citolítica (CARRINGTON e NORMAN, 2005), que resulta na citólise de células alvo infectadas por vírus ou células neoplásicas. (HAREL-BELLAN *et al.*, 1986; MORETTA *et al.*, 1990, GAUDIERI *et al.*, 2005).

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 epítomos 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, 2005).

2.2 O COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE HUMANO

A região genômica referida como Complexo Principal de Histocompatibilidade, (do inglês, *MHC para Major Histocompatibility Complex*) foi pela primeira vez identificada em linhagens endogâmicas de camundongos. Aos genes aí presentes foi atribuída a codificação de produtos moleculares associados à aceitação/rejeição de tecidos transplantados entre essas linhagens (ZINKERNAGEL e DOHERTY, 1979 *apud* ALBERTS *et al.*, 2002). Por essa razão, a região e os genes correlatos foram nominados genes de histocompatibilidade (McDEVITT, 2000).

Na espécie humana, o *MHC* é referido pela sigla HLA (do inglês, *Human Leucocyte Antigen*) ou Antígeno Leucocitário Humano e ocupa uma região de aproximadamente 3 500 kb situada no braço curto do cromossomo 6 (6p21.3) (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

Os *loci* gênicos que compõem o MHC humano, cuja logo é HLA, são bem caracterizados. O Sistema gênico HLA, evoluiu nas populações humanas com uma imensa diversidade de variantes alélicas. Codificam isoformas protéicas, codominantemente expressas, que ajudam a lidar com a diversidade estrutural de patógenos e antígenos e apresentam propriedades estruturais, funcionais e imunológicas similares. São referidas como aloantígenos em função de seu potencial imunogênico (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

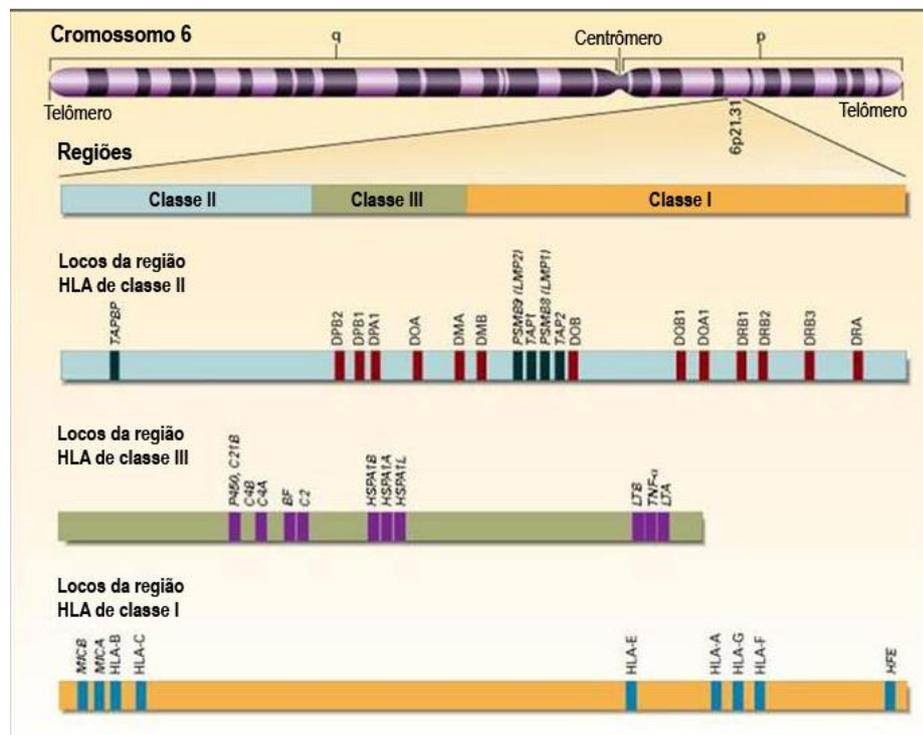


Figura 7 - Mapa do Complexo Principal de Histocompatibilidade (*MHC*) humano. FONTE: Sociedad Latinoamericana De Gastroenterología Pediátrica, Hepatología Y Nutrición, 2006. Adaptado.

Os genes situados nessa região do genoma são classificados em:

Genes da região HLA de Classe I clássicos (Ia)) *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C*, são polimórficos e apresentam um número extenso de variantes alélicas, 2 365, 3015 e 1849, respectivamente (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html>), em 13

/09/2013). Codificam proteínas nominadas também como HLA-A, HLA-B e HLA-Cw, presentes em todas as células nucleadas. Os **genes HLA de Classe I não clássicos (Ib)**, **HLA-E, HLA-F e HLA-G** possuem poucas variantes alélicas em comparação com os genes HLA-Ia, 13, 22 e 50, respectivamente, (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html> , em 13 /09/2013) e são de expressão restrita a certos tipos celulares, tais como trofoblasto e algumas células epiteliais tímicas.

As proteínas de Classe I são constituídas por um polipeptídeo α , que contém três domínios (α_1 , α_2 e α_3) e, compõem a estrutura tridimensional da molécula HLA associando-se com um outro polipeptídeo, β_2m , codificado por gene de mesmo nome situado no cromossomo 15 (TROWSDALE, 1987) .

Peptídeos antigênicos (8 a 11 aminoácidos) são acomodados na fenda extracelular, formada pelos domínios α_1 e α_2 da cadeia pesada α das proteínas HLA-Ia e apresentadas a linfócitos T CD8⁺. A cadeia se estende formando o domínio α_3 , que interage com a β_2m , seguindo-se os domínios transmembrânicos e citoplasmáticos. A ligação do co-receptor CD8 dos linfócitos T ocorre no domínio α_3 das moléculas HLA de Classe I (McDEVITT, 2000 , RAMMENSEE, BACHMANN e STEVANOVIĆ, 1997, LEE *et al.*, 1995; DIEHL *et al.*, 1996).

Genes da região HLA de Classe II: *HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DZ/DO e HLA-DP* codificam proteínas de classe II de mesmo nome, presentes na superfície de linfócitos T, linfócitos B e APCs, tais como macrófagos e células dendríticas. Esses produtos protéicos são heterodímeros constituídos por um polipeptídeo α , com dois domínios (α_1 e α_2), e um peptídeo β , também com dois domínios (β_1 e β_2) (TROWSDALE, 1987). As proteínas HLA de Classe II apresentam peptídeos exógenos (12 a 18 aminoácidos) para linfócitos T CD4⁺. A ligação do co-receptor CD4 dos linfócitos T CD4⁺ ocorre no domínio β_2 das moléculas *MHC de Classe II* (CRESSWELL, 1994; ABBAS e LICHTMAN, 2005).

Genes da região de Classe III, embora conhecidos como HLA de Classe III, não codificam proteínas HLA, cuja atribuição é específica do sistema gênico HLA de

Classe I e II, dentre os quais se encontram situados. Os genes de Classe III compõem uma variedade de genes, em sua maioria relacionados à funções imunes, tais como, *LTA*, *TNF* e *LTB*, que codificam citocinas e *C2*, *BF* e *C4B* que codificam proteínas das vias clássica e alternativa do sistema complemento, entre outros (CARROLL *et al.*, 1985).

2.2.1 O GENE HLA-G: UM COMPONENTE NÃO CLÁSSICO DO COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE HUMANO

Na década de 80 três novos genes HLA de Classe I foram descobertos e designados como genes HLA de Classe I não clássicos (Ib), compreendendo os seguintes genes: *HLA-E* (KOLLER *et al.*, 1988), *HLA-F* (GERAGHTY *et al.*, 1990) e *HLA-G* (GERAGHTY *et al.*, 1987). Muitas características distinguem os genes clássicos daqueles referidos como não clássicos, ou seja, *HLA-G*, *-E* e *-F*. Esses últimos possuem características que favorecem a tolerância imunológica (SULLIVAN *et al.*, 2006; CAROSELLA *et al.*, 2008a.). Com exceção de *HLA-E*, *HLA-G* e *HLA-F* possuem diferentes mecanismos regulatórios, o que determina uma distribuição restrita em determinados tecidos (KOLLER, 1988; GERAGHTY, 1993; MÉGRET *et al.*, 2007). Além disso, exibem um número reduzido de variantes alélicas quando comparados com os genes de Classe I clássicos.

Em 1987, Daniel Geraghty e colaboradores clonaram uma seqüência genômica não MHC de Classe Ia (*HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*) localizada num fragmento de restrição de 6.0 Kb, razão pela qual foi referida inicialmente como *HLA-6.0*. Mais tarde foi designada *HLA-G* por apresentar organização gênica semelhante aos genes *HLA* classe I clássicos: oito exons, sete introns e uma região 3'UTR. Todavia, observou-se no sexto exon de *HLA-G* um códon de término de tradução, que resulta numa proteína com um segmento citoplasmático com apenas seis aminoácidos, contrastando com as outras proteínas HLA de Classe I clássicas, que apresentam aproximadamente 30 (trinta) aminoácidos nessa região altamente conservada da proteína. O polimorfismo do gene *HLA-G* é reduzido, apresentando 50 variantes alélicas. Sete SNPs principais situados na seqüência codificadora dos genes *HLA-G* definem as principais famílias alélicas, que codificam (HVIID *et al.*, 2006).

Charlie Loke, juntamente com Shirley Ellis e Susan Kovats, e seus respectivos colaboradores foram os primeiros a identificar a molécula de *HLA-G* em citotrofblastos extravilosos, classificaram o *HLA-G* como um gene que codifica moléculas de classe I não clássicas. (ELLIS et al., 1990; KOVATS et al., 1990).

Anos mais tarde, Phillippe Le Bouteiller confirma que *HLA-G* é expresso em toda a interface materno fetal como: células trofoblásticas invasivas, células do endotélio vascular fetal, células do âmnion e do líquido amniótico (LE BOUTEILLER et al., 1999), sendo que sua ausência está relacionada a abortos espontâneos (XEU et al., 2007). Seu importante papel na interação materno-fetal, através da ligação aos receptores inibidores das células NK, especificamente ao receptor KIR2DL4, LIR-1 e LIR-2, ou interagindo com a molécula *HLA-E*, que se liga ao receptor CD94/NKG2, foi descrito posteriormente por Navarro *et al.*, 1999. A molécula de *HLA-G* é também observada em indivíduos saudáveis com expressão basal da proteína em sítios imunoprivilegiados, como por exemplo, o timo (CRISA et al., 1997), a córnea (LE DISCORDE et al., 2003), o pâncreas (CIRULLI et al., 2006) e precursores eritróides e endoteliais (MENIER et al., 2004).

A porção externa da proteína HLA-G é composta pelos domínios $\alpha 1$, $\alpha 2$, e $\alpha 3$, codificados pelos éxons 2, 3 e 4, respectivamente, sendo que os domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$ contribuem para estruturar a fenda de ligação ao peptídeo. Está ancorada na membrana celular pela região transmembrana, a qual é codificada pelo éxon 5.

À semelhança dos antígenos MHC de Classe I clássicos onde certos resíduos de aminoácidos estão em posições conservadas e situam-se em posições estratégicas para interação com linfócitos T CD8+, essas regiões conservadas também são observadas na proteína *HLA-G* e *HLA-E* (GAO *et al.*, 1997).

Dentre as proteínas HLA de Classe I, HLA-G é especial, pois é expressa em sete diferentes isoformas presentes na interface materno-fetal-trofoblasto, bem como em alguns tipos celulares. Das sete isoformas de HLA-G, 4 são ligadas à membrana (HLA-G1,-G2,-G3,-G4) e 3 são isoformas solúveis (sHLA-G5,G6,G7), geradas por processamento (*splicing*) alternativo do mRNA, que retém o íntron 4. O transcrito maduro resultante possui um códon de término de tradução prematuro (UGA), que codifica uma proteína sem a região responsável pela ligação da molécula à membrana (BLASCHITZ *et al.*, 2005) onde ficam retidos os introns 4 ou o íntron 2

(isoforma G7), que resulta na perda do domínio transmembrana (HVIID, 2006; CAROSELLA *et al.*, 2008b).

HLA-G1 é a isoforma protéica completa, cuja estrutura mais se assemelha a das moléculas HLA classe I clássicas (LE MAOULT *et al.*, 2003). Apresenta uma porção extracelular estruturada pelos domínios $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$, que se estende na região transmembrana codificada pelo éxon 5. Apresenta uma cauda citoplasmática curta com 6 aminoácidos, que resulta de um códon prematuro de término de leitura, presente no éxon 6 que codifica essa região (GERAGHTY *et al.*, 1987).

Os transcritos HLA-G2, -G3, e -G4 excluem o éxon 3, os éxons 3 e 4 e o éxon 4 respectivamente, gerando isoformas truncadas que retêm somente o domínio $\alpha 1$ para isoforma -G3, o domínio $\alpha 1$ e $\alpha 3$ para -G2 e o domínio $\alpha 1$ e $\alpha 2$ para -G4, todos ancorados às células pela região transmembrana (PAUL *et al.*, 2000; CAROSELLA, *et al.*, 2003). A isoforma -G5 retém os domínios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$. A inclusão de um códon de término de leitura presente no íntron 4, determina a versão solúvel, assim como aquela da isoforma -G6, que não expressa o domínio $\alpha 2$ (FUJII, *et al.*, 1994; PAUL *et al.*, 2000). O mesmo ocorre com -G7, que possui um códon de término de leitura presente no íntron 2 (PAUL *et al.*, 2000). Figura 8.

A clivagem proteolítica da isoforma HLA-G1 gera moléculas solúveis HLA-G1, denominadas *shed* HLA-G1 (HLA-G1s) (ROUAS-FREISS *et al.*, 2007; CAROSELLA *et al.*, 2008a). É importante notar que todas as isoformas da molécula HLA-G possuem o domínio $\alpha 1$ e que no domínio $\alpha 3$ situam-se os epítomos ligantes para receptores LIR-1 e LIR-2, funcionalmente relacionados aos receptores inibidores KIR de células NK (HVIID *et al.*, 2006).

A ligação de LIRs ou KIRs nas moléculas de classe I resulta em sinais inibidores da ativação de células NK. Esta possível função é distinta daquela exercida pela região $\alpha 3$ nas moléculas de classe I clássicas, que é interagir com a $\beta 2m$ e também servir de ancoragem para o co-receptor CD8+ de linfócitos T (LEE *et al.*, 1995; DIEHL *et al.*, 1996).

Bjorkman *et al.*, em 1987, definiram 15 aminoácidos na molécula HLA-G que possivelmente interagiam diretamente com o receptor de célula T CD8+, e expostos no domínio de interação como TCR, dos quais, dois são muito polimórficos, seis

moderadamente polimórficos e sete conservados. Dentre esses últimos, seis são idênticos entre *HLA-A2* e *HLA-G*. Entre tanto, a ausência da molécula *HLA-A* para interagir com os receptores de células T no trofoblasto, e a presença de moléculas *HLA-G*, são sugestivos de que a proteína traduzida de *HLA-G* participe de uma via de lise de células. Essa via é mediada por células NK, através da interação com receptores KIR (KIR4DL4) expressos na membrana das células NK (KOVATS *et al.*, 1990), o que poderia resultar na tolerância fetal pelo organismo materno.

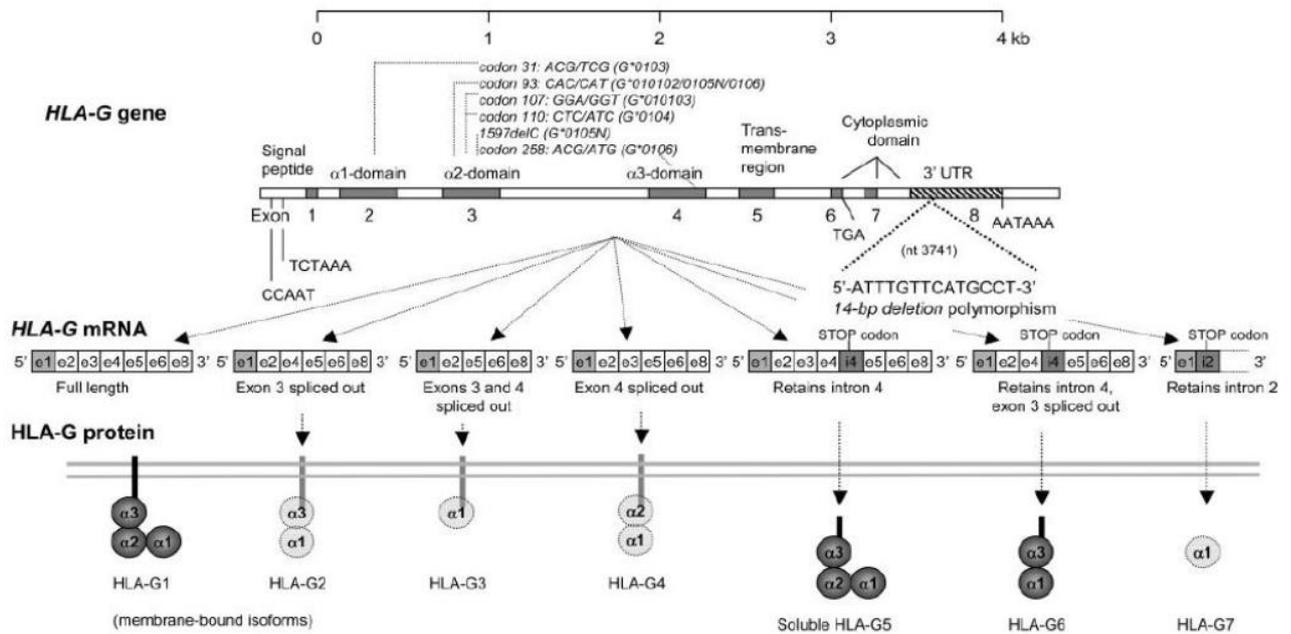


Figura 8: Estrutura e composição das isoformas do *HLA-G*.

Representação esquemática do transcrito primário de *HLA-G* e das múltiplas isoformas. (A) O transcrito primário de *HLA-G* é homólogo ao da molécula *HLA* de classe I, porém contém um códon prematuro de término de leitura presente no éxon 6, logo após a seqüência codificadora do domínio transmembrana. (B) O *splicing* alternativo do transcrito primário leva a sete isoformas da proteína: as isoformas truncadas são geradas pela exclusão de um ou dois éxons codificadores de domínios globulares, enquanto a tradução do íntron 4 ou do íntron 2 leva à isoforma solúvel, que perde o domínio transmembrana. FONTE: CAROSELLA *et al.*, 2008b; HVIID *et al.*, 2006.

2.2.2 MOLÉCULA HLA-G E A EVASÃO DA RESPOSTA IMUNE TUMORAL

Moléculas solúveis HLA-G (sHLA-G) são encontradas no sangue periférico de homens e mulheres saudáveis, no sangue do cordão umbilical e no fluido amniótico; sendo consideradas como mediadoras da tolerância imunológica e principalmente da tolerância materno-fetal (REBMANN *et al.*, 2001). Sua expressão ou o grau com que se expressa em alguns tecidos ou exossomas derivados do tumor, talvez esteja relacionada à subverter a resposta imune, favorecendo o escape tumoral e inibindo o ataque das células tumorais medido pelas células NK e linfócitos T citotóxicos e células apresentadoras de antígenos (APCs) (ROUAS-FREISS *et al.*, 2005).

Existem tecidos tumorais onde sua expressão está ausente, tecidos em que a expressão da molécula é mediana e tecidos em que a expressão é relativamente alta, podendo até ser expresso nas células infiltrantes do tumor (CAROSELLA *et al.*, 2008a), tanto na forma solúvel como ligado à membrana (RITEAU *et al.*, 2003; ROUAS-FREISS *et al.*, 2005).

Na estratégia de inibição estão envolvidos os receptores inibitórios ILT (*Immunoglobulin-Like Transcritp*), ILT-2 (LILRB1/CD85j), ILT-4 (LILRB2/CD85d) e também ao KIR2DL4 (CD158d) (*killer-cell immunoglobulin-like receptor, 2 domains, long cytoplasmic tail, 4*) (Figura 9) que é um receptor específico para HLA-G (CAROSELLA *et al.*, 2003; SHIROISHI *et al.*, 2003; LE MAOULT *et al.*, 2005).

A presença das isoformas HLA-G1 e de HLA-G5 são capazes de induzir o aumento da expressão de seus próprios receptores, ILT2 e ILT4 na APC, ILT2 e KIR2DL4 em células NK, e ILT2 e KIR2DL4 em linfócitos T CD4+, mas não em linfócitos T CD8+ (LE MAOULT *et al.*, 2005). Estes dados mostram que a molécula *HLA-G* é capaz de alterar o equilíbrio do balanço de sinais de inibição/ estímulo, favorecendo assim a inibição de sinais, e aumentando os limiares de ativação para estas células (ROUAS-FREISS *et al.*, 2007).

De forma semelhante aos tumores, os vírus desenvolvem estratégias para escapar do sistema imune. Induzindo a expressão da molécula de *HLA-G* por células infectadas, esse pode ser um mecanismo adicional que o ajude a subverter as

defesas do hospedeiro, como demonstrou Donaghy e colaboradores que verificaram que os níveis de *HLA-G* solúvel são maiores em indivíduos portadores do HIV (DONAGHY et al., 2007).

Em algumas doenças auto-imunes e inflamatórias foi observada a presença de *HLA-G*, mostrando que a molécula pode contribuir para a redução da antigenicidade das células envolvidas nestas patologias (WIENDL et al., 2005; DIEPSTRA et al., 2008).

Estudos indicam que a expressão de *HLA-G* por tecidos transplantados pode favorecer a sobrevivência do enxerto e ainda pode indicar que a molécula pode ser usada para monitorar pacientes transplantados que aceitam os enxertos, podendo beneficiar-se com a redução do tratamento imunossupressor, devido às características imunológicas apresentadas pela molécula *HLA-G* (LEMAOULT et al., 2003; QIU et al., 2006).

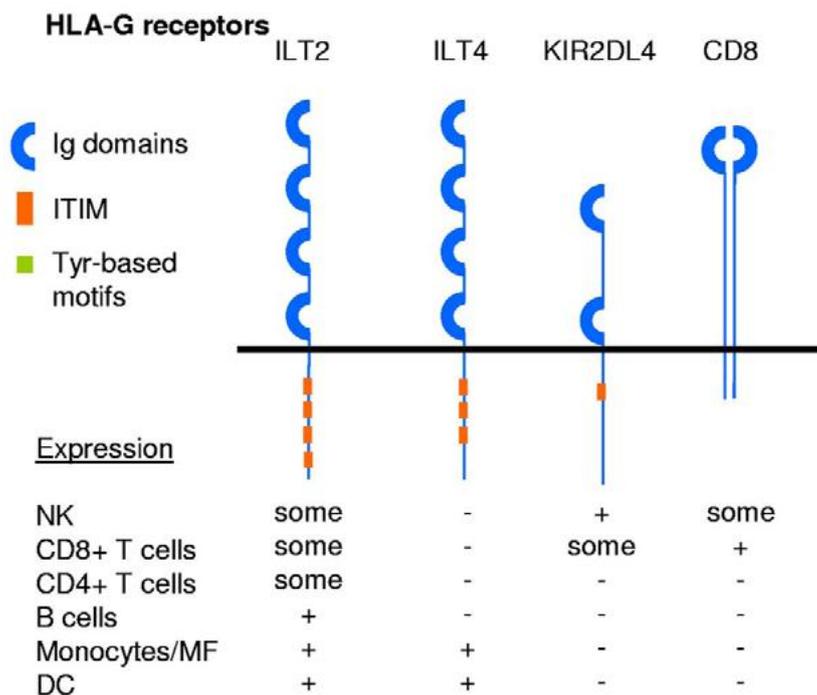


Figura 9. Representação esquemática da atuação de *HLA-G* através de sua ligação aos receptores inibitórios. Receptores *ILT* (*Immunoglobulin-Like Transcrip*), *ILT-2* (*LILRB1/CD85j*), *ILT-4* (*LILRB2/CD85d*) e também ao *KIR2DL4* (*CD158d*) (*killer cell immunoglobulin-like receptor, 2 domains, long cytoplasmic tail, 4*) que são expressos diferencialmente por células do sistema imune. (CAROSELLA, 2008b).

A isoformas HLA-G5 exibem propriedades inibitórias de células mediadoras de lise celular tais como células NK e LT CD8+, por sua ligação com receptores inibitórios presentes nessas células, como o HLA-G1 (CAROSELLA et al., 2003).

Por outro lado, existem relatos de que a molécula HLA-G5 pode induzir a apoptose de LT CD8+ ativados através da ligação de receptores Fas/ Fas ligante de LT CD8+ e CD8. Além disso, HLA-G5 naturalmente produzida por LT CD4+ aloreativos, inibe a resposta proliferativa destas células, também exercendo o seu efeito inibitório através de um mecanismo de retroalimentação (CAROSELLA et al., 2003).

A isoforma HLA-G5 influencia a liberação de citocinas de células mononucleares de sangue periférico, estimulando a liberação de IL- 10, TNF- α , e IFN- γ . As isoformas solúveis podem ter uma relevância particular, *in vivo*, uma vez que exercem as suas funções no ambiente próximo ao local de origem e/ ou em sítios distantes, devido à distribuição através do sistema circulatório (CAROSELLA et al., 2003). Neste sentido, *HLA-G* tem sido responsável por modular a liberação de citocinas a partir de sangue periférico e de células mononucleares em direção ao perfil Th2 (ROUAS-FREISS et al., 2005).

Várias citocinas podem induzir a expressão de *HLA-G*, tais como GM-CSF (Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos-Macrófagos), interleucina (IL)- 10, IFNs (*Interferons*), e LIF (fator inibitório de leucócitos) (CAROSELLA et al., 2003; ROUAS-FREISS et al., 2007). A presença de IL-10, que é secretada por células de linfoma cutâneo, é responsável por induzir a expressão *HLA-G in vitro* e *in vivo* (UROSEVIC et al, 2002), e no caso do câncer de pulmão, a IL-10 aparece fortemente associada à expressão de *HLA-G*. Devido a estas propriedades imunossupressoras, *HLA-G* juntamente com a IL-10 podem contribuir para a evasão de células malignas da imunovigilância (UROSEVIC et al., 2002).

Tanto IFN- β como IFN- γ , parecem reforçar a expressão de *HLA-G* na superfície celular *in vitro* e *in vivo* (CAROSELLA et al., 2003; MITSDOERFFER et al. 2005). Esta mudança fenotípica pode conferir imunoproteção às células tumorais, facilitando a propagação tumoral no hospedeiro. Sendo assim, a administração de IFNs para imunoterapia de doenças malignas apresenta um potencial efeito colateral

para o aumento da regulação positiva da expressão de *HLA-G* no local do tumor (ROUAS-FREISS et al., 2007; CAROSELLA et al., 2008a).

A interação da molécula *HLA-G* com vários receptores presentes em células do sistema imune, não se mostrava suficiente para explicar o mecanismo de escape tumoral dependente de *HLA-G*. Assim, demonstrou-se que células NK ativadas obtêm a molécula *HLA-G* presente na membrana de células tumorais por meio de um mecanismo denominado trogocitose. Quando isso ocorre, as células NK mudam o seu comportamento funcional de células de lise para células reguladoras de células tumorais (células alvo), protegendo-as. A trogocitose de *HLA-G* também representa um novo mecanismo de geração da regulação celular: uma delas não envolve a maturação de células regulatórias de vida longa, e outra que envolve a conversão direta e imediata de células efetoras em células que adquirem, temporariamente, efetiva função regulatória *in situ* e proporcionando assim uma supressão imunológica local de emergência (CAROSELLA et al., 2008b).

2.2.3 POLIMORFISMOS DO GENE HLA-G

2.2.3.1 Polimorfismos da região codificadora.

Até a presente data, estão registrados no IMGT/HLA, 50 alelos, 16 proteínas e 2 alelos nulos de *HLA-G* (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html>, em 13 /09/2013).

A tabela 2 mostra a relação de alguns alelos já descritos de *HLA-G*, entre eles o alelo *HLA-G*01:05N* que apresenta uma deleção de citosina no exon 3, resultando em alteração na matriz de leitura (VAN DER VEN *et al*, 1994), e na produção de uma molécula *HLA-G*1 truncada. No códon 110 do exon 3, ocorre também uma substituição não sinônima (alteração de aminoácido) que resulta no alelo *G*01:04* (revisado por HVIID, 2006), enquanto no exon 2 o alelo *G*01:03* apresenta uma substituição silenciosa de base, quando comparado a *G*01:01* e *G*01:02*, porém não se descarta um possível códon de parada *upstream* a esta variação nucleotídica (REBMANN *et al.*, 2001). Outra substituição de aminoácido resulta na alteração no códon 258 do exon 4, formando o alelo *G*01:06* (revisado por HVIID, 2006).

HLA-G alleles	5'URR/ promotor*		Exon 2					Exon 3					Exon 4				3'UTR* (nt 3741)
	-725	-201	31	35	54	57	69	93	100	107	110	130	188	236	241	258	
<i>G*010101</i>	C or G	G	ACG	CGG	CAG	CCG	GCC	CAC	GGC	GGA	CTC	CTG	CAC	GCA	TTC	ACG	-
<i>G*010102</i>	C	A	---	---	---	--A	---	--T	---	---	---	---	---	---	---	---	+14 bp
<i>G*010103</i>	C	A	---	---	---	--A	---	---	---	--T	---	---	---	---	-C-	---	+14 bp
<i>G*010104</i>	C	G	---	---	---	---	--T	---	---	---	---	---	nd	nd	nd	nd	nd
<i>G*010105</i>	nd	nd	---	---	---	---	---	---	---	--T	---	---	---	---	---	---	-
<i>G*010106</i>	nd	nd	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--T	---	---	---	nd
<i>G*010107</i>	nd	nd	---	---	---	--A	---	--T	---	--T	---	---	---	---	---	---	nd
<i>G*010108</i>	C	G	---	---	---	--A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-
<i>G*0102</i>	nd	nd	---	---	-G-	---	---	---	---	---	---	---	---	--C	---	---	nd
<i>G*0103</i>	C (or T)	G	T--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--T	nd	nd	---	+14 bp
<i>G*010401</i>	C	A	---	---	---	--A	---	---	---	---	A-	---	---	---	---	---	-
<i>G*010402</i>	nd	nd	---	---	---	--C	---	---	---	---	A-	---	--T	---	---	---	nd
<i>G*010403</i>	nd	nd	---	---	---	---	---	---	---	---	A-	---	---	---	---	---	-
<i>G*0105N</i>	C	A	---	---	---	--A	---	--T	---	---	---	•TG	---	nd	nd	---	+14 bp
<i>G*0106</i>	C	A	---	---	---	--A	---	--T	---	---	---	---	---	---	---	-T-	+14 bp
<i>G*0101g†</i>	nd	nd	---	--A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	nd	nd	---	+14 bp
<i>G*G3d5†</i>	nd	nd	---	---	---	--A	---	--T	--T	---	---	---	---	nd	nd	---	+14 bp

Tabela 2. Polimorfismos de DNA definindo os alelos de HLA-G. Fonte: HVIID *et al.*, 2006.

2.2.3.2 POLIMORFISMOS EM SÍTIOS REGULADORES E EXPRESSÃO DOS GENES MHC IA

Os genes MHC de classe I e II apresentam similaridades em suas regiões promotoras. Linhagens celulares de pacientes deficientes em moléculas MHC de classe II demonstraram também reduzida expressão das moléculas de classe I, sugerindo que a regulação da expressão dos genes de Classe I estaria sob ação dos mesmos fatores transcricionais que controlam a expressão gênica de MHC classe II (SABATIER *et al.*, 1996).

Na região promotora dos genes MHC de Classe I (Figura 10) situam-se os seguintes elementos reguladores em *cis*, os quais estão menos representados na região promotora dos genes MHC Ib ou não clássicos:

- ▶ Sequências CCAAT e TATA box que compõem o Complexo Basal de Transcrição ;
- ▶ Elemento intensificador B
- ▶ Sítio α

- ▶ Elemento de resposta ao interferon (ISRE)
- ▶ Elemento intensificador A (κB2 e κB1) B

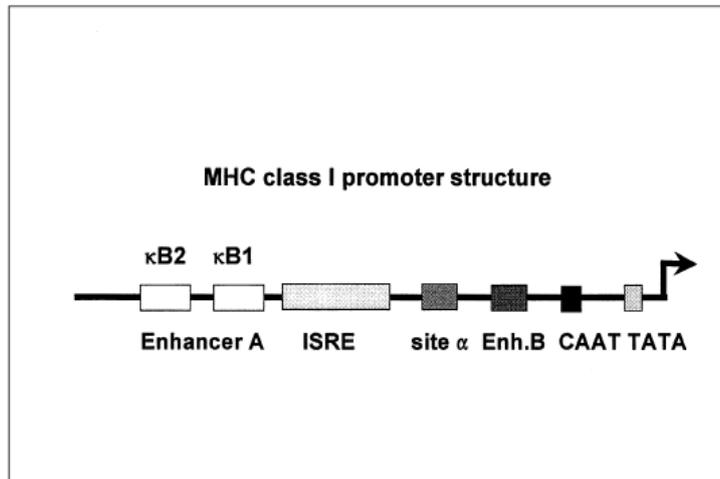


Figura 10. Estrutura do promotor do genes MHC Ia .Fonte: GOBIN et al. (1998).

O ativador de transcrição de classe II (CIITA) apresentou atividade nos promotores de classe I através de sua ligação às seqüências do *Sítio α*, que também pode ligar proteínas da família dos fatores transcrpcionais ATF/CREB (GOBIN *et al.*, 1997a).

Há, adjacente e a jusante (*upstream*) ao *sítio α* no promotor de MHC classe I, uma seqüência homóloga ao *box X2*, além das seqüências homólogas ao *box W/S*, presente no promotor de MHC classe II. O *Box CCAAT* invertido presente no *enhancer B* (*enhB*) no promotor MHC classe I é idêntico ao *box Y* do promotor de classe II (VAN DEN ELSEN *et al.*, 1998a).

O complexo ATF/CREB-*sítio-α* e a seqüência 3' flanqueadora da seqüência de resposta ao interferon (ISRE, do inglês *Interferon Specific Regulation Element*) são cruciais para os elementos regulatórios *upstream* no promotor do MHC classe I. Além das seqüências ou elementos controles já citados, também existe a seqüência TATA, alvo da ligação e posicionamento do complexo basal de iniciação da transcrição (VAN DEN ELSEN *et al.*, 1998a).

2.2.3.3 ELEMENTOS REGULATÓRIOS DA EXPRESSÃO DE *HLA-G*

Os elementos regulatórios presentes e conservados no promotor do MHC classe I clássico, *enhancer A (enhA)*, ISRE, o *sítio α* e *enhB* (BLANCHET *et al.*, 1992), não se apresentam conservados nas regiões reguladoras dos genes MHC classe I não-clássicos, o que poderia modificar a afinidade pelos fatores transcricionais e suas subunidades (VAN DEN ELSEN *et al.*, 1998b). No promotor de *HLA-G*, o *enhA* está rompido e o ISRE deletado (GERAGHTY *et al.*, 1987), o *sítio α* e o *box Y* também divergem da seqüência apresentada nos promotores dos genes clássicos (BOSS, 1997; GOBIN *et al.*, 1998) e há uma região *upstream* ao exon 1 que direciona a transcrição específica de *HLA-G*, região 1.1kb muito investigada como candidata à regulação tecido específica da expressão de *HLA-G* (SCHMIDT *et al.*, 1993).

Devido a variações nos sítios $\kappa B1$ e $\kappa B2$ dos diferentes *loci* do MHC I, estes fatores interagem como homodímeros ou heterodímeros, resultando em diferentes efeitos sobre a regulação da transcrição destes genes. Sendo que, os sítios κB presentes no gene *HLA-G* ligam-se apenas ao homodímero p50. Como conseqüência da seqüência rompida no *enhA*, a expressão de *HLA-G*, pode apresentar propriedades de ligação alteradas ao se ligar apenas à subunidade p50 (GOBIN *et al.*, 1997b), um dos 5 membros da família NF- κB juntamente com p65, p52, c-Rel e RelB, que interage em dois sítios de ligação na seqüência completa do *enhA* (THANOS E MANIATIX, 1995).

Os elementos κB presentes no intensificador A dos genes MHC classe I parecem ser também seqüências alvo potenciais para proteínas dedo de zinco, tais como MZF1, ZFX, e ativadoras coletivamente referidas como as MBP-1 e MBP-2, porém o papel destas proteínas permanece obscuro (TIENG *et al.*, 2002). Sendo assim, o intensificador A parece desempenhar um importante papel na expressão constitutiva e induzida por citocinas de genes MHC classe I (TIENG *et al.*, 2002).

A seqüência ISRE possibilita a regulação da expressão basal ou induzida de genes MHC de Classe I e II pela interação com o interferon- γ (IFN- γ) (GOES *et al.*,

1995). Isso não acontece no promotor de *HLA-G* que, por apresentar o módulo S-X-Y alterado, não responde a esta citocina e nem ao CIITA (TIENG *et al.*, 2002).

Conforme o intensificador A, um número de ativadores ligantes ao ISRE pode ser observado. O fator regulador de interferon-1 (IRF-1) atua como um ativador de transcrição de *HLA-G* (HOBART *et al.*, 1997) e tem função antagônica a IRF-2 e ICSPB (NELSON *et al.*, 1993). Por apresentar afinidade também pelo ISRE sugere-se uma possível regulação da expressão gênica de *HLA-G* através de outros elementos regulatórios, tais como sítios adicionais de resposta a IRF-1 e 2, ICSPB e ISGF3 e possíveis sítios de ligação para proteínas com módulos transativadores tipo “dedo de zinco”. No entanto *HLA-G* não é regulado por ZFX (GOBIN *et al.*, 1998).

O IFN- γ ativa a transcrição dos genes MHC classe I de forma indireta. O mesmo induz por meio da via JAK/STAT de transdução de sinal a expressão do gene IRF-1. O produto do gene IRF-1 subsequentemente se liga ao elemento ISRE no promotor dos genes MHC classe I, mediando assim a indução da expressão de genes MHC I por IFN- γ (ELSEN *et al.*, 1998).

O módulo SXY possui as sequências S, X (que são os meio - sítios X1 e X2) e Y, as quais são ligadas de forma cooperativa por complexos protéicos (RFX, CREB/ATF e NFY). Em especial o *HLA-G* possui S e X1 homólogas aos genes clássicos MHC de classe I, porém Y e X2 são divergentes, por este motivo *HLA-G* não é induzido por CIITA nem por RFX5 (SOLIER *et al.*, 2001).

Sucessivamente mais três potenciais sítios CRE/TRE regulatórios foram revelados para o gene *HLA-G*, (CRE-1380, CRE-930, CRE-770), os quais estão localizados na sua região promotora (HVIID, 2006).

A ativação da expressão induzida pelo INF- β pode estar associada a um elemento funcional localizado a -746 pares de bases do ATG inicial, no promotor do gene *HLA-G* (LEFEBVRE *et al.*, 1999).

O perfil de metilação pode funcionar como uma forma de silenciamento dos genes MHC classe I clássicos no trofoblasto, mas não há evidências de dinucleotídeos das ilhas de CpG metilados no promotor destes genes no trofoblasto *in vivo* (LE BOUTEILLER *et al.*, 1996)

Na região promotora do *HLA-G* (Figura 11), localizada entre as posições -486 e -477, seqüências reguladoras em *cis* (HSE) que atuam como sítio de ligação para o fator transcricional HSF1, (IMBRAIM *et al.*, 2000). A seqüência HSE constitui-se de repetições pentanucleotídicas (nGAAn), arranjadas em orientação alternativa, e estão presentes na região promotora de genes que codificam para proteínas de choque térmico. (YAMAMOTO *et al.*, 2005). Estes elementos não estão presentes nas regiões promotoras de *HLA-A*, *-B*, *-E* e *-F* (IMBRAIM *et al.*, 2000; RIZZO *et al.*, 2009a).

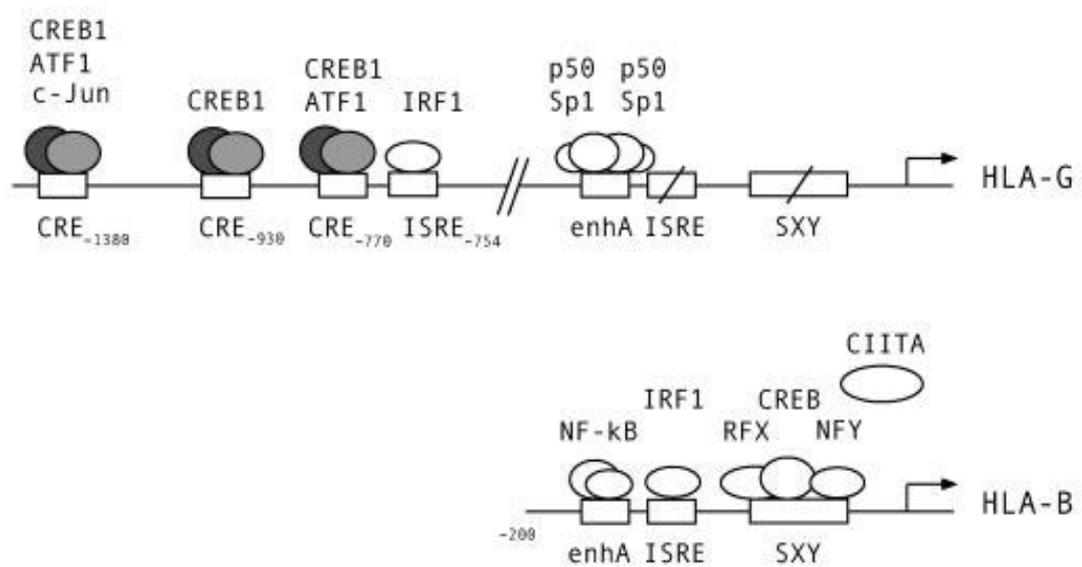


Figura 11. Região promotora do gene *HLA-G*. Fonte GOBIN, 2009

Importantes polimorfismos estão presentes nas regiões reguladora 5' e na região 3' não traduzida (5'URR e 3'UTR, respectivamente) sendo associados com a regulação gênica e níveis de expressão de *HLA-G* (HVIID *et al.*, 2006).

Observações dos SNPs em regiões promotoras de vários genes humanos descrevem que estes SNPs ocorrem com maior freqüência em regiões próximas ao sítio de início da transcrição. Nestas regiões estão localizadas as seqüências alvo de ligação de fatores transcricionais e, sua alteração pode impactar na expressão gênica, influenciando o nível de transcrição dos seus respectivos genes (OBER *et al.*, 2003).

A região promotora 5'URR de gene *HLA-G* apresenta 31 SNPs (HVIID *et al.*, 1999; OBER *et al.* 2003). Estes são encontrados na região reguladora de *locus* e tecido específica (LCR/TSRE), como numa região HSE, e em sítios de ligação com fatores transcrpcionais (OBER *et al.*, 2003).

Na posição -725 observa-se a troca de bases Citosina por Guanina ou por Timina (OBER *et al.*, 2003). A troca por Guanina foi relacionada à regulação da expressão de *HLA-G*, uma vez que existe na posição -726 uma Citosina. Quando da ocorrência do citado polimorfismo (-725G) observa-se uma alteração no perfil de metilação dos dinucleotídeos CpG. Relatou-se que a maioria das células que portam o alelo -725G apresentavam -726C metilado, o que poderia influenciar a ligação de IRF-1 no elemento regulatório específico de interferon, localizado a aproximadamente 10 pares de bases 3' dessa posição polimórfica (LEFEBVRE *et al.*, 1999; OBER *et al.*, 2003).

Na posição -201, observa-se a troca de Guanina por Adenina nos alelos *HLA-G*01:01:02*, *G*01:01:03*, *G*01:04* e *G*01:05N*. Nessa região localiza-se o *enh A*, onde se liga o fator transcricional NF- κ B2, especificamente no sítio κ B2. O polimorfismo é localizado em sequências reguladoras *cis* descritas como Intensificador A. No entanto, estudos adicionais são necessários para elucidar esse polimorfismo na região promotora, teria qualquer efeito sobre a expressão dos alelos de *HLA-G*, influenciando a ligação de fatores NF- κ B2 ao elemento Intensificador A (HVIID *et al.*, 1999). Na figura 12 observa-se a posição destes e de outros SNPs da região 5"URR e os sítios de regulação da expressão do *HLA-G*.

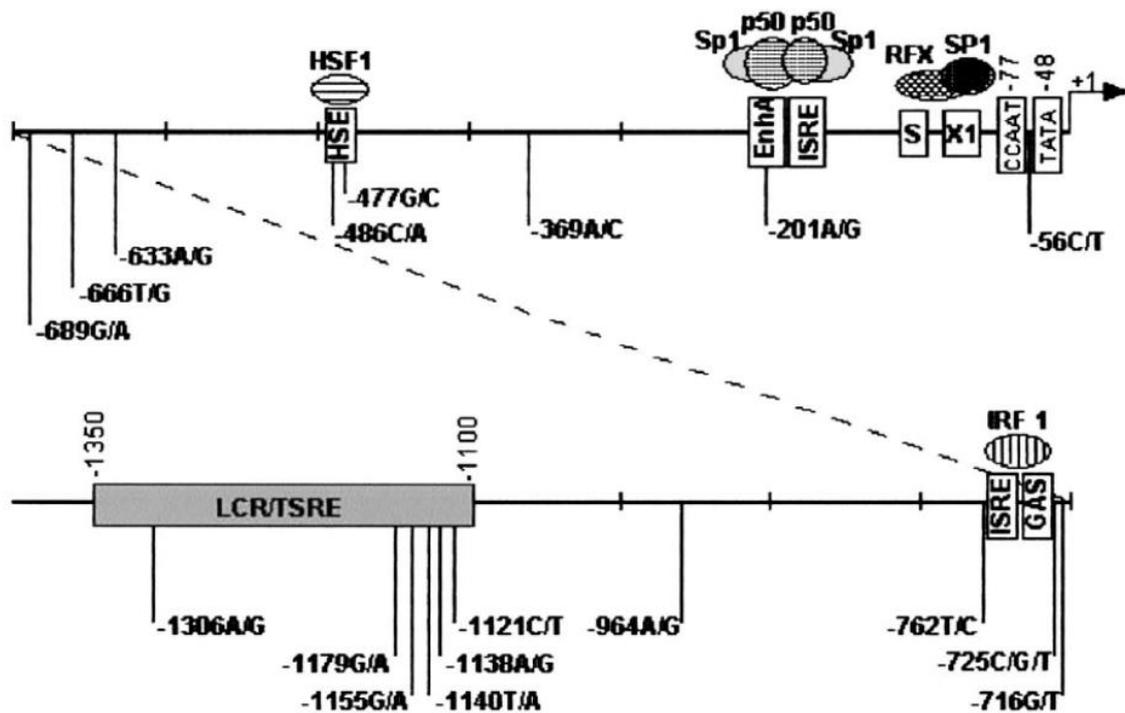


Figura 12: Polimorfismos da região 5' URR do gene *HLA-G* e os sítios de ligação dos fatores transcricionais reguladores da expressão do gene. Fonte: Ober *et al.*, 2003.

O número 1 corresponde ao início do sítio transcripcional. Elementos de cis-regulação são representados: TATA para TATA Box; CCAAT para CAAT Box; S/X1 para elementos reguladores HLA; ISRE para elemento regulatório interferon específico; EnhA para Intensificador A; HSE para elementos de proteínas de choque térmico; GAS para local gama (interferon) ativado; LCR para região de controle de locus ou (TSRE – Elemento regulador tecido específico).

2.2.3.4 Região 3'UTR – Polimorfismo

Polimorfismos de *HLA-G* têm sido descritos na região 5' (URR) a montante do promotor, e na região 3' (UTR) não transcrita do gene (HVIID *et al.*, 2003), bem como em íntrons (HARRISON *et al.*, 1993; OBER *et al.*, 2003). O *World Health Organization* (WHO), se baseia principalmente nos polimorfismos presentes nos éxons 2, 3, e 4 do gene para reportar os alelos de *HLA-G*.

Porém recentemente, o foco tem se voltado para variações nucleotídicas presentes nas regiões 5' URR e 3'UTR, sendo que na região 3'UTR, o foco tem sido o polimorfismo *Ins/Del14pb* presente no exon 8 de *HLA-G*, uma vez que esses polimorfismos podem influenciar a regulação da expressão de *HLA-G* (HARRISON *et al.*, 1993; OBER *et al.*, 2003).

Na região que compreende 1.1 e 1.4 kb a partir do sítio de início da transcrição do gene *HLA-G*, situam-se sequências reguladoras ou elementos de ação *cis*, sugeridos como importantes sítios reguladores adicionais, ou seja os loci *LCR* (região controladora de *locus*) e *TSRE* (elemento de resposta tecido específico) (SCHIMIDT *et al.*, 1993) . Polimorfismos nestas sequências também foram relatadas (HVIID, 2006), contudo ainda se desconhece as relações funcionais e a importância desse polimorfismo no controle da expressão de *HLA-G*.

Nesta região ocorre um polimorfismo de inserção/deleção de 14 pares de bases, no exon 8 (HARRISON *et al.*, 1993), que pode influenciar na estabilidade do RNA mensageiro (BOHJANEN *et al.*, 1991). Hviid *et al.*, 2003, observaram que existe uma relação entre a deleção dessas bases e diferenças no processamento alternativo das isoformas de *HLA-G* e nos seus níveis de expressão.

As posições +3003 T/C, +3010 C/G, +3027 C/A, +3035 C/T (CASTELLI *et al.*, 2009), +3142 C/G (TAN *et al.*, 2007), +3187 A/G (YIE *et al.*, 2008) e +3196 C/G (CASTELLI *et al.*, 2009) estão relacionadas com atividade de regulação de expressão de *HLA-G* pela interação com microRNAs, que são pequenos RNAs envolvidos na regulação da expressão gênica pós-transcricional (CHUA *et al.*, 2009). O alelo +3142G aumenta a afinidade com os microRNA *hsa-miR-148a*, *hsa-miR-148b* e *hsa-miR-152* fazendo uma regulação inibitória da expressão de *HLA-G* (TAN *et al.*, 2009), além de apresentar afinidade pelos microRNA *hsa-miR-19** e *hsa-miR-218-2* (CASTELLI, 2009) estando em desequilíbrio de ligação com o alelo -964G, do polimorfismo -964G/A; (TAN *et al.*, 2009); a adenina na posição +3187 *in vitro* foi associada a diminuição da estabilidade do mRNA, diminuindo a expressão de *HLA-G* (YIE *et al.*, 2008).

Capítulo I

Os resultados e discussão serão apresentados, a seguir, na forma de artigo científico a ser submetido ao periódico *Tissue Antigens*.

LCR haplotypes in the promoter region of HLA-G gene associated with protector and susceptibility effect in women with cervical intraepithelial neoplasias (NIC).

Juliana Cochesnki Cordeiro, Jose Samuel da Silva, Cynthia Hernandez Costa, Maria da Graça Bicalho.

Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade. Departamento de Genética.

Universidade Federal do Paraná.

Abstract

Infection with human papillomavirus (HPV), which has tropism for mucous and lodges itself in squamous epithelium that lines the cervix, can induce intraepithelial high- grade lesions (NIC II and NIC III). Untreated, these lesions may progress to cervical cancer (CC). Cancer of the cervix is the second most common cancer and the leading cause of mortality in women worldwide. Nonclassical HLA genes, especially *HLA-G* for its immunotolerant role in immune response, have been investigated as candidate gene for the protection or susceptibility to diseases caused by viruses, cancer among other causes. According to recent evidence the expression of HLA-G on the surface of the tumor cells have immunomodulatory effect on Natural Killer cells, T lymphocytes through the inhibition of the immune response. The aim of this study was to investigate the influence of SNPs in the promoter region of the *HLA-G* gene in women with cervical intraepithelial lesions Grade II and Grade III and control women. Haplotypes configuration for 8 SNPs (-1306, -1179, -1155, -1140, -1138, -1121, -990, -964) in the promoter region of *HLA-G* were investigated and compared between Patients and Controls groups. The study was conducted with a sample of 194 women as followed: 70 had CIN II, 51 had CIN III and 73 control women without the presence of the HPV virus and cervical epithelial lesions. DNA was extracted from peripheral blood samples using the technique of salting out and genotyping was performed by sequence base typing with an ABI Prism Big Dye Terminator V.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA, USA) and ABI 3130 Sequence Analyzer. The estimated haplotype frequencies were performed with the Phase 2.1 software. For the statistical analysis the Fisher exact test for 2x2 tables was used, considering statistically significant at $p \leq 0.05$, through the BioEstat v.5.0 software. It was observed a higher frequency of haplotype LCR H1.1 (GAGAACGG) in female controls (CLS) in the comparison stratified CIN III x CLS ($p = 0.0130$, OR = 1.87 , CI = 1.10 to 3.17) and in the comparison groups CLS x NIC

II + NIC III ($p = 0.0471$, OR = 1.5 , CI = 0.98 to 2.27). Grouping the main haplotype referred as H1 and H2 groups, a higher frequency of haplotypes H2 in patients was observed (NIC II + NIC III) when compared with controls: NIC III x CLS ($p = 0.0281$, OR = 1.7 CI = 1.01 to 2.84) and CLS x NIC II + NIC III ($p = 0.0192$, OR = 1.5, CI = 1.04 to 2.42). These results were very suggestive of a possible role of the Locus Control Region (LCR) with the development of CC, making the HLA-G gene a good candidate for further investigation as a biomarker of protection (Haplotype H1.1) and/or susceptibility (Haplotype H2) of the progression of cervical intraepithelial lesions and development of CC.

Keywords: HLA-G, HPV, Cervical cancer, immunological tolerance.

Introdução

O Papilomavírus Humano (HPV) é uma família de pequenos vírus de DNA dupla fita que ao infectar epitélio escamoso, induzem lesões proliferativas, quando não tratadas pode progredir ao câncer cervical (CC). A infecção por HPV é considerada uma doença sexualmente transmissível, e representa uma causa bem estabelecida de CC. O câncer do colo do útero é o segundo tipo de câncer mais comum, e a causa de mortalidade por câncer cervical em mulheres no mundo.

O desenvolvimento do tumor depende de diferentes estratégias para escape do reconhecimento por células imunes. Além disso, estudos têm demonstrado que a aberrante expressão de moléculas não-clássicas, incluindo HLA-G na superfície da célula tumoral, têm efeitos imunomoduladores em células *natural killer*, linfócitos T e pode ainda inibir a resposta imune (Seliger e Schlaf; 2007). A expressão restrita de HLA-G ocorre em condições normais em células epiteliais tímicas e alguns sítios imunoprivilegiados. Sua expressão no trofoblasto está associada à proteção do feto contra o ataque do sistema imune materno (Rouas-Freiss et al.; 2005). Seu papel imunomodulador e antiinflamatório tem conduzido a investigar seu papel em várias patologias inflamatórias. Sua influência, benéfica ou deletéria, depende da condição envolvida (Rizzo et al.; 2012).

No transplante e doenças auto-imunes, a expressão de HLA-G tem sido associada a um melhor prognóstico, porque a molécula pode controlar a resposta imune contra aloantígenos ou auto-antígenos. Em contraste, a expressão dos alelos

HLA-G em células infectadas por vírus ou malignas tem sido associada com a progressão de tumores e metástases (Carosella *et al.* 2003; Rouas-Freiss *et al.* 2005).

Neste estudo objetivou-se investigar a influência dos SNPs localizados num importante módulo funcional e regulador da expressão gênica, situado na região promotora do gene *HLA-G* em mulheres com lesões intraepiteliais cervicais de Grau II e Grau III e mulheres controle sem lesão epitelial cervical e sem a presença do vírus HPV. As configurações haplotípicas para os 8 SNPs investigados no promotor de *HLA-G* foram comparadas entre os grupos “pacientes” e “controles”.

Material e Métodos

Amostra

Cento e noventa e quatro mulheres (n=194) foram recrutadas em Curitiba, com idade entre 15 e 45 anos. Um estudo caso-controle transversal foi conduzido por meio de comparações entre mulheres nos estádios NIC II (n=70) e 51 NIC III (n=51) ambos com HPV positivo, e 73 mulheres controle sem lesão epitelial cervical e sem a presença do vírus HPV. Essas mulheres estiveram em tratamento no Departamento de Patologia Cervical do Hospital Erasto Gaertner, e apresentaram diagnóstico citológico, colposcópico e histológico de NIC II e NIC III. Para as amostras-controle, composto por 73 mulheres HPV negativo para o exame da captura híbrida, não consanguíneas, sem histórico de NIC e que apresentaram o último exame ginecológico normal, realizado no prazo máximo de um ano antecedente à coleta do sangue (mulheres sem lesão). 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/presença de HPV de alto risco ou oncogênicos. Essas pacientes e controles foram recrutadas por meio de uma ação integrada envolvendo o Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade, o Departamento de Tocoginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal do Paraná e o Hospital Erasto Gaertner, em Curitiba, Paraná, Brasil.

Esse estudo tem aprovação do Comitê de Ética para Pesquisa Clínica do Hospital Erasto Gaertner (protocolo CEP: 81520-060, P.P n ° 1943) e “*Termo de Consentimento livre e esclarecido*” assinado pelas participantes após esclarecimentos sobre os objetivos do presente estudo. Todas as mulheres participantes foram entrevistadas e para cada uma delas foi preenchido um formulário com questões abordando aspectos sócio-culturais e hábitos de saúde.

Genotipagem

Extração de DNA do sangue periférico foi feita através da técnica de *Salting out*, descrita por LAHIRI e NURNBERGER, 1991. As reações de PCR incluíram os seguintes reagentes: Tampão de *Taq* 1X (70 mM Tris-HCl, pH 8.8, 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), 0,45 mM de cada dNTP, 2 mM de MgCl, 2 U *Taq* (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*), 20 mM de cada oligonucleotídeo iniciador (*primer*) específico para cada um dos 2 fragmentos amplificados (descritos por SILVA, 2009a) e 50ng de DNA.

A amplificação da região 5' URR, para a análise dos 8 SNPs, foi realizada pelo uso de um par de oligonucleotídeos iniciadores distintos. Este par de oligonucleotídeos, que abrangeu a região LCR, foi constituído pelas sequências: *forward* ACATTCTAGAAGCTTCACAAGAATG e *reverse* GTGTGCCTTTGAATCCCGATGC, com um produto amplificado de 638pb. A denaturação inicial ocorreu a 96°C durante 5 min; seguido por 35 ciclos de 96°C por 30 seg, 66°C por 30 sec e 72°C por 1 min; e uma extensão final a 72°C por 5 min. O produto da amplificação foi purificado com 10 U de Exonuclease I e 1 U Fosfatase Alcalina do Camarão (*Shrimp Alkaline Phosphatase*) (*USB Corporation, Staufen, Germany*) para a remoção do excesso de oligonucleotídeos iniciadores e dNTPs, seguindo para a reação de seqüenciamento com *ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.1* (*Applied Biosystems, CA, USA*). Usando o seqüenciador *ABI 3130 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems, CA, USA*) foi possível elucidar por eletroforese os produtos seqüenciados. As sequências foram alinhadas pelo *SeqScape Software* versão 2.5 (*Applied Biosystems, CA, USA*) e comparadas com a sequência FASTA obtida no Ensemble. Depois cada SNP foi detectado e individualmente anotado.

Estatística

Freqüências alélicas foram estimadas por contagem direta e testadas para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg através do Programa Arlequin 3.5. As frequências haplotípicas foram inferidas por meio do Programa Phase 2.1 usando o método *Pseudo Bayesiano* que permite a reconstrução de haplótipos.

Para o estudo de associação os dados foram analisados em tabelas de contingência, usando o Teste Exato de Fisher considerando significância estatística quando $p \leq 0,05$. As comparações foram estratificadas em *Controle x NIC II*, *Controles x NIC III* e *Controle x Paciente (NIC II + NIC III)*, utilizando-se tabelas de contingência 2 x 2 para cada haplótipo e calculando-se a “*Odds Ratio*” - “OR” com IC 95% para comparações com significância estatística através do programa BioEstat versão 5.0.

Resultados

Observou-se que nos grupos paciente e controle, os 8 SNPs (-1447, -810) localizados na região *LCR* do gene HLA-G, estavam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A Tabela I apresenta as posições dos SNPs e também os haplótipos encontrados no presente trabalho, utilizou a nomenclatura e agrupados conforme SILVA *et al* (2013).

A Tabela II apresenta as comparações entre os grupos analisados, podendo-se observar um aumento significativo na frequência do Haplótipo H1.1 em mulheres controles quando das seguintes comparações: mulheres *NIC III x CLS* ($p=0.0130$; OR=1,87; IC=1,10-3,17). Aumento significativo também observado neste mesmo haplótipo, comparando-se os grupos CLS x PAC (NIC II +NIC III; $p=0.0471$; OR=1,5; IC=0,98-2,27). Quando agrupados os haplótipos nos grupos H1 e H2, notou-se um aumento significativo em casos da frequência dos haplótipos agrupados em H2 nas

comparações *NIC III* x *CLS* ($p=0.0281$; $OR=1,7$; $IC=1,01-2,84$) e *CLS* x *PAC* ($p=0.0192$; $OR=1,5$; $IC=1,04-2,42$).

Tabela I – SNPs Estudados e Haplótipos da Região LCR

	-1306	-1179	-1155	-1140	-1138	-1121	-990	-964
H1.1	G	A	G	A	A	C	G	G
H2.1	A	G	G	T	A	C	G	A
H2.2	A	G	A	A	A	C	G	A
H1.3	G	G	G	A	G	C	G	G
H1.2	G	A	G	A	A	T	G	G
H2.3	A	G	G	A	A	C	G	A
Agrupados								
H1	G	G/A	G	A	G/A	C/T	G	G
H2	A	G	G/A	T/A	A	C	G	A

Tabela II - Frequências Haplótípicas da Região LCR de pacientes e controles

	NIC II (70)		NIC III (51)		(NIC II + III (121))		(CLS) (73)		p (CLS vs NIC II)	p (CLS vs NIC III)	(NIC II vs NIC III)	p (CLS vs NIC II + III)
	+	-	+	-	+	-	+	-				
H1.1	56	84	33	69	89	149	69	77	0.1317	0.0130 OR=1,8	0.1393	0.0471 OR=1,5
H2.1	45	95	37	65	82	156	39	107	0.1899	0.0836	0.3731	0.0699
H2.2	17	123	14	88	31	207	13	133	0.2419	0.1605	0.5592	0.1429
H1.3	13	127	11	91	24	214	16	130	0.3932	0.5686	0.5564	0.5383
H1.2	4	136	7	95	11	227	3	143	0.4768	0.0598	0.1226	0.1531
H2.3	3	137	0	102	2	236	1	145	0.2956	0.5887	0.1919	0.6767
Agrupados												
H1	73	67	51	51	124	114	88	58	0,1026	0,0703	0,4211	0,0723
H2	65	75	51	51	115	123	54	92	0,0668	0,0281 OR= 1,7	0,3376	0,0192 OR= 1,5

Discussão

Diferentemente dos genes HLA clássicos, que exibem um extensa diversidade alélica e, ampla distribuição nas células somáticas, o pequeno repertório de variantes alélicas presentes no gene HLA-G parece ser alvo de um forte controle transcricional, fazendo com que sua expressão seja restrita a certos tipos celulares, ou condições fisiológicas específicas.

À semelhança dos genes clássicos, o gene *HLA-G* apresenta vários elementos ou seqüências reguladores em *cis* conservadas em sua região promotora, tais como TATA Box, o módulo CCAAT, que controlam sua expressão basal. Outras seqüências reguladoras (*Enhancer* ou elemento A, ISRE-*Interferon-stimulated regulatory element* e o módulo SXY) situadas no promotor proximal (-220 até -110) apresentam variações nas seqüências nucleotídicas, mutações e/ou deleções que compõem características estruturais distintas daquelas observadas nos genes HLA-Ia. Por exemplo, o *Enhancer A* não efetua a transativação por meio do NF κ B, a seqüência ISRE está parcialmente deletada, não havendo sítio para indução por INF- γ , mas há estímulo por INF- β e, por essa razão não pode mediar, significativamente, a expressão induzida de HLA-G pelos interferons IFN γ e IFN β . O módulo SXY não pode ser ativado pelo transativador de Classe II (CIITA) (SOLIER et al.; 2001).

Os SNPs investigados no presente estudo (-1306, -1179, -1155, -1140, -1138, -1121, -990, -964) fazem parte de um importante módulo funcional, referido como *locus LCR*, situado em posição distal a 5'URR na região promotora de HLA-G. A região LCR ocupa aproximadamente 250 pb localizada a 1.1kb do sítio do início da transcrição de HLA-G. Está próxima a outros elementos reguladores situados no promotor proximal, entre -220 e - 770 distantes do sítio de início da transcrição dentre os quais, *ISRE*, *GAS* e *HSE*.

Na publicação de Silva *et al.* (2013) foi realizada uma re-análise da composição de SNPs observados em estudos prévios do próprio grupo e daqueles reportados na literatura, sobre a configuração de haplótipos presentes na região reguladora de HLA-G. Identificou-se duas regiões conservadas e que foram

nomeadas como regiões promotoras H-Dist e H-Prox, sugerindo-se também que algumas configurações haplotípicas nesses módulos poderiam estar mais fortemente relacionadas com a regulação da expressão de HLA-G.

No presente estudo investigou-se a região LCR, a qual contém os SNPs observado nos haplótipos referidos como H-dist (Silva *et al*, 2013). O Haplótipo H1.1(*H1.1 GAGAACGG*) nas comparações de *CLS x NIC III* ($p=0,0130$) e *CLS x NIC II + NIC III* ($p=0.0471$). Por outro lado mostrou-se associado aos haplótipos do grupo H2 (*AGG/AT/AACGA*), quando do agrupamento dos mesmos para comparações H1 vs H2 entre *CLS x NIC III* ($p=0,0281$) e *CLS x NIC II + NIC III* ($p=0.0192$).

Ferguson *et al* (2012) em análise do polimorfismo 14 pb ins/del 3`UTR tem sido associada com a magnitude da produção de HLA-G , em particular , através da modulação da estabilidade do HLA-G mRNA. Embora os mecanismos implicada não foram elucidados , alelos HLA-G apresentavam a inserção de sequência de 14 pb foram associados diminuir a produção mRNA. Por outro lado, uma fracção de HLA-G transcritos de mRNA que apresentam a inserção da base 14 pode ser processado alternativamente por remoção de 92 bases do mRNA maduro HLA- G, rendendo transcritos menores HLA-G , relatou a ser mais estáveisdo que o mRNA Na forma completa. A inserção de 14 pb ocorre em alta freqüência em carcinomas de células renais , quando comparados com o epitélio normal do rim , no entanto , não houve correlação entre o polimorfismo de 14 pb e o nível de expressão de HLA -G. O genótipo HLA- G * 01:01:01 alelo confere proteção contra câncer invasivo , enquanto a variante HLA- G * 01:01:02 , -G * 01:06 e - G * 30UTR 14 pb inserção de alelos aumentou cervical risco de câncer. O HLA -G * 01:01:02 e G * 01:06 alelos ambos ter uma substituição sinônima no códon 57 . Embora esta mutação não altera a HLA-G –amino composição de ácidos , que se situa na vizinhança de Glu-63 que interage com a posição P2 carregado peptide. Portanto, é possível que esta mutação pode afectar a carga de tumor peptídeos e , conseqüentemente, influencia mediada por células imunitárias respostas . O HLA-G * 01:06 alelo tem sido previamente associada a complicações da gravidez , tais como pré- eclampsia e abortamentos recorrentes. seu trabalho demonstrou que o polimorfismo do HLA-G é um fator de risco independente para o desenvolvimento de câncer cervical invasivo, e fornece fortes evidências que apoia a implicação da molécula de HLA-G na

formação de um microambiente do tumor para favorecer o escape da resposta imune.

Silva *et al* (2013) Avaliou-se o papel de dois loci 3`UTR do HLA-G gene , 14bp In/ Del e 3142 C/ G, em lesões de alto grau e invasivos câncer cervical nas amostras do sudeste brasileiro. Embora a infecção por HPV é o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer cervical , e tem mostrado uma forte associação com cancro invasivo do colo do útero , também podemos observar que, para o HPV, alguns alelos do gene 3`UTR HLA-G estão associados susceptibilidade a HSIL e ICC . Com exceção do genótipo Del / Del em pacientes com teste e controle , todas as outras associações foram principalmente relacionados ao tabagismo. Fumar está relacionada com um risco aumentado de desenvolver o cancro do colo do útero, e este risco é proporcional à número de cigarros fumados por dia, especialmente quando se fuma é iniciada em tenra idade. Em conclusão, verificou-se que o HLA -G 30`TR polimorfismos (especialmente no alelo 14bp/ Ins) pode ser associado com um maior risco de cervical desenvolvimento de câncer entre os pacientes infectados pelo HPV e fumante.

Li *et al* (2012) Verificou em análises de tecido cervical que a expressão do HLA-G aumentou progressivamente desde a lesão pré-maligna a lesões cervicais malignas. Dado suas propriedades imunotolerantes, sugere que a expressão induzida de HLA-G em células do câncer do colo do útero pode ser um mecanismo adicional para a evassão da imunovigilância do hospedeiro para as células tumorais.

Dong *et al* (2012) realizou uma análise imuno-histoquímica de HLA-G em tecidos de câncer baseada na utilização de um anticorpo monoclonal HGY. apresentou que a expressão de HLA-G pode ser detectada em ambas as lesões (NICs e estágios iniciais de CC), notou que a expressão aumenta progressivamente desde lesão pré-maligna a lesões malignas, verificou uma maior expressão de HLA-G significativamente maior em NICs infectados por HPV 16/18 e em CC do que em pacientes HPV negativas, concluindo que a Expressão de HLA-G pode ter um papel na inibição da resposta imune do hospedeiro.

Não foi encontrado na literatura até o momento trabalhos com a região alvo.

É interessante notar que, muito embora as diferenças observadas quando das comparações entre pacientes NIC II e Controles, que não foram estatisticamente significantes, observou-se a mesma tendência daquela observada nas comparações entre mulheres paciente NIC III e controles, ou seja, número reduzido do haplótipo H1.1 e aumento do número de haplótipos do grupo H2. Desta forma o fator de proteção e susceptibilidade associado às pacientes NIC III poderia também ser estendido também para as pacientes NIC II, considerando-se as diferenças estatisticamente significantes nas comparações controle x pacientes (NIC II + NIC III).

Num outro estudo do mesmo grupo realizado Costa *et al* (2011) fundamentados em estudo sobre o papel de HLA-G na reprodução humana, sugeriram uma associação entre a posição -1140 e a ins/del 14pb, relatando que o alelo -1140A associado a uma alta transcrição de HLA-G poderia ter o resultado de uma expressão ideal quando junto com a ins de 14 pb, uma vez que o mRNA estaria mais instável; por outro lado o alelo -1140T associado com a baixa transcrição de HLA-G apresentaria a quantidade ideal se presente juntamente com a del 14pb, devido a maior estabilidade do pouco mRNA transcrito. No atual estudo, a análise futura deste polimorfismo de ins/del poderia corroborar para uma conclusão funcional hipotética mais lucida sobre um possível efeito protetor e/ou de susceptibilidade dos haplótipos que apresentaram diferença significativa genotipicamente.

Analisando-se a composição do haplótipo H1.1 (GAGAACGG), a base “A” na posição -1140 poderia agir de forma a aumentar a transcrição de HLA-G, às portadoras desse haplótipo em relação ao desenvolvimento das neoplasias cervicais intraepiteliais. Por outro lado, os indivíduos portadores do Haplótipo H2.1 (AG(G/AT)AACGA), o único que apresenta a base “T” na posição -1140. Este efeito contrário apresentou apenas uma tendência a significância CLS vs NIC III $p=0,0836$; CLS vs PAC(NIC II + NIC III $p=0,0699$), e o aumento do n amostral, juntamente com análises do polimorfismo de ins/del 14pb presentes no exon 8 deverão ser realizados que poderá corroborar essa associação.

As análises de ins/del 14pb estariam avaliando a estabilidade do mRNA por que esta associado com a integridade do RNA mensageiro, isso pode ser uma

explicação para o H1 com A na posição -1140 estar mais frequente nos controles, esta posição é promotor e está associada com alelos de alta ou baixa produção, pensando nisso o mRNA dessas mulheres deveria ser mais instável.

A manifestação das neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) e sua evolução para o câncer cervical, muito provavelmente são de etiologia multifatorial com contribuição de fatores genéticos e não genéticos. No que se refere ao componente genético, *HLA-G* seria um fator importante na regulação da resposta imune por inibir a ação proliferativa e ativação de células da resposta imune (linfócitos T, células NK). Várias linhas de evidência disponíveis na literatura (Castelli et al.; 2011) indicam que polimorfismos em regiões reguladoras 5`URR (*upstream regulatory region*) e 3` (UTR *untranslated region*) podem influenciar os níveis de expressão de HLA-G. Sabe-se que *clusters ou agrupamento de* elementos reguladores propiciam a atuação sinérgica ou aditiva na ativação dos genes MHC classe I. Da mesma forma, grupamentos de SNPs intra módulos (LCR, por exemplo), poderiam ser sugestivos de que proteção/susceptibilidade estaria relacionada à combinação dos SNPs que estruturam os haplótipos da região LCR, contribuindo para os níveis de expressão do gene HLA-G, de forma mais significativa do que quando tratado cada SNP individualmente.

Desta forma, estudos adicionais, poderão corroborar e elucidar a presente associação de HLA-G e haplótipos da região reguladora do gene HLA-G com as lesões intraepiteliais cervicais. Além disso, estudos com maior número amostral, poderão contribuir para que o gene HLA-G torne-se um candidato a ser melhor investigado como biomarcador de estados de tolerância imunológica permissivos ao desenvolvimento de infecções virais associadas às lesões precursoras e ao complexo desenvolvimento do CC.

Referências

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

CAROSELLA, E.D.; MOREAU, P.; LE MAOULT, J.; LE DISCORDE, M.; ROUASFREISS, N. HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. *Adv. Immunol.*, v. 81, p. 199-252, 2003.

CASTELLI, E. C; MENDES-JUNIOR, C. T; VEIGA-CASTELLI, L. C; ROGER, M; MOREAU, P; DONADI, E. A. A comprehensive study of polymorphic sites along the HLA-G gene: Implication for gene regulation and evolution. *Mol Biol Evol*, 28: 3069-89. 2011.

COSTA, C.H.; GELMIN, G. F.; WOWK, P. F.; MATTAR, S. B.; VARGAS, R. G.; ROXO, V. M. M.S.; SCHUFFNER, A. BICALHO, M.G. HLA-G regulatory and implantation outcome in couples who underwent assisted reproduction treatment. *Human Immunology*, v.73, p.891-897, 2012.

DONG,D.D.; YANG,H.; LI, K.; XU, G.; SONG,L.H.; FAN, X.L.; JIANG, X.L.; YIE, S.M.;. Human Leukocyte Antigen-G (HLA-G) Expression in Cervical Lesions: Association With Cancer Progression, HPV 16/18 Infection, and Host Immune Response. 2012.

Ferguson, R.; Ramanakumar, A.V., Koushik, A.; Coutl, F.; Franco, E.; Roger, M.; and the Biomarkers of Cervical Cancer Risk Study Team. Human leukocyte antigen G polymorphism is associated with an increased risk of invasive cancer of the uterine cervix. 2012.

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.

LI, X. J.; ZHANG, X.; LIN,A.; RUAN,Y.Y.;YAN, W.H.;. Human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression in cervical cancer lesions is associated with disease progression. *Human Immunology*. p. 946-949. 2012.

RIZZO R, BORTOLOTTI D, BARICORDI OR, FAINARDI E. New insights into HLA-G and inflammatory diseases. *Inflamm Allerg Drugs Targets*, 11(6):448-463, 2012.

ROUAS-FREISS, N.; MOREAU, P.; FERRONE, S.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D. HLA-G proteins in cancer: do they provide tumor cells with an escape mechanism? *Cancer Research*, v. 65, n. 22, p. 10139-10144, 2005.

SOLIER, C; MALLET, V; LENFANT, F; BERTRAND, A; HUCHENQ, A; LE, BOUTEILLER,P. HLA-G unique promoter region: Functional implications. *Immunogenetics*, 53: 617-625,200.1

SELIGER, B; SCHLAF, G. STRUCTURE. Expression and function of HLA-G in renal cell carcinoma. *Semin Cancer Biol*. P 444-50. 2007.

SILVA, J. S. Região reguladora,promotora e exon 4 de HLA-G em casais com histórico de abortamento recorrente. Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná 2009.

SILVA, J. S. SLOWIK, R. BICALHO, M.G. Considerations on regulatory sequences of the distal promoter region of the HLA-G gene.*Human Immunology*, p. 473-477. 2013.

SILVA, I. D; MUNIZ, Y. C. N; SOUSA, M. C. P. S; SILVA, K. R; CASTELLI, E. C; FILHO, J. C.G; OSTA, A. P; LIMA, M. I. M; SIMÕES, R. T. HLA-G 3'UTR polymorphisms in high grade and invasive cervico-vaginal cancer. *Human Immunology*. P452-458. 2013.

SVEJGAARD, A. JERSILD, C. STAUB-NIELSEN, L. BODMER, W.F. HLA antigens and diseases: statistical and genetical considerations. *Tissue Antigens* 4: 95-150. 1974.

3. DISCUSSÃO

Não se pode ignorar o contexto multifatorial atribuído ao desenvolvimento de várias patologias e que, certamente, estão atuando quando da infecção pelo HPV e suas implicações no desenvolvimento das lesões precursoras do CC. No que se refere ao HLA-G, que poderia ser um dos múltiplos fatores associados, mudanças nos módulos reguladores de sua expressão poderiam influenciar na função imunomoduladora da proteína por ele codificada, contribuindo para a persistência do HPV em células cervicais.

Ferguson et al (2012) em análise do polimorfismo 14 pb ins/del 3`UTR tem sido associada com a magnitude da produção de HLA-G , em particular , através da modulação da estabilidade do HLA-G mRNA. Embora os mecanismos implicada não foram elucidados , alelos HLA-G apresentavam a inserção de sequência de 14 pb foram associados diminuir a produção mRNA. Por outro lado, uma fracção de HLA-G transcritos de mRNA que apresentam a inserção da base 14 pode ser processado alternativamente por remoção de 92 bases do mRNA maduro HLA- G, rendendo transcritos menores HLA-G , relatou a ser mais estáveisdo que o mRNA Na forma completa. A inserção de 14 pb ocorre em alta freqüência em carcinomas de células renais , quando comparados com o epitélio normal do rim , no entanto , não houve correlação entre o polimorfismo de 14 pb e o nível de expressão de HLA -G. O genótipo HLA- G * 01:01:01 alelo confere proteção contra câncer invasivo , enquanto a variante HLA- G * 01:01:02 , -G * 01:06 e - G * 30UTR 14 pb inserção de alelos aumentou cervical risco de câncer. O HLA -G * 01:01:02 e G * 01:06 alelos ambos ter uma substituição sinônima no códon 57 . Embora esta mutação não altera a HLA-G -amino composição de ácidos , que se situa na vizinhança de Glu-63 que interage com a posição P2 carregado peptide. Portanto, é possível que esta mutação pode afectar a carga de tumor peptidos e , conseqüentemente, influencia mediada por células imunitárias respostas . O HLA-G * 01:06 alelo tem sido previamente associada a complicações da gravidez , tais como pré- eclampsia e abortamentos recorrentes. seu trabalho demonstrou que o polimorfismo do HLA-G é um fator de risco independente para o desenvolvimento de câncer cervical invasivo, e fornece fortes evidências que apoia a implicação da molécula de HLA-G na

formação de um microambiente do tumor para favorecer o escape da resposta imune.

Silva *et al* (2013) Avaliou-se o papel de dois loci 3`UTR do HLA-G gene , 14bp In/ Del e 3142 C/ G, em lesões de alto grau e invasivos câncer cervical nas amostras do sudeste brasileiro. Embora a infecção por HPV é o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer cervical , e tem mostrado uma forte associação com cancro invasivo do colo do útero , também podemos observar que, para o HPV, alguns alelos do gene 3`UTR HLA-G estão associados susceptibilidade a HSIL e ICC . Com exceção do genótipo Del / Del em pacientes com teste e controle , todas as outras associações foram principalmente relacionados ao tabagismo. Fumar está relacionada com um risco aumentado de desenvolver o cancro do colo do útero, e este risco é proporcional à número de cigarros fumados por dia, especialmente quando se fuma é iniciada em tenra idade. Em conclusão, verificou-se que o HLA -G 30`TR polimorfismos (especialmente no alelo 14bp/ Ins) pode ser associado com um maior risco de cervical desenvolvimento de câncer entre os pacientes infectados pelo HPV e fumante.

Li *et al* (2012) Verificou em análises de tecido cervical que a expressão do HLA-G aumentou progressivamente desde a lesão pré-maligna a lesões cervicais malignas. Dado suas propriedades imunotolerantes, sugere que a expressão induzida de HLA-G em células do câncer do colo do útero pode ser um mecanismo adicional para a evassão da imunovigilância do hospedeiro para as células tumorais.

Dong *et al* (2012) realizou uma análise imuno-histoquímica de HLA-G em tecidos de câncer baseada na utilização de um anticorpo monoclonal HGY. apresentou que a expressão de HLA-G pode ser detectada em ambas as lesões (NICs e estágios iniciais de CC), notou que a expressão aumenta progressivamente desde lesão pré-maligna a lesões malignas, verificou uma maior expressão de HLA-G significativamente maior em NICs infectados por HPV 16/18 e em CC do que em pacientes HPV negativas, concluindo que a Expressão de HLA-G pode ter um papel na inibição da resposta imune do hospedeiro.

Não foi encontrado na literatura até o momento trabalhos com a região alvo deste estudo.

No estudo de Silva *et al.* (2013) foram reanalisados diferentes estudos descritivos da região reguladora de HLA-G e pode-se identificar duas regiões haplotípicas conservadas, nomeadas como H-Dist e H-Prox, propondo-se que poderiam estar relacionados com a regulação da expressão de HLA-G.

No presente estudo avaliou-se a região LCR e os mesmos SNPs que compõem os haplótipos observados em H-dist (Silva *et al.*, 2013). Observou-se o Haplótipo H1.1 nas comparações de *CLS x NIC III* ($p=0,0130$) e *CLS x PAC* ($p=0.0471$). Foi observado os haplótipos H2 quando foram agrupados em H1 e H2 nas comparações de *CLS x NIC III* ($p=0,0281$) e *CLS x PAC* ($p=0.0192$).

Tanto no haplótipo H1.1 e no grupo H2 as diferenças observadas entre *CLS x NIC II* não foram significativas, no entanto a amostra *NIC II* segue o mesmo perfil de *NIC III* com redução do haplótipo H1.1 e aumento do grupo H2.

Costa *et al.* (2011) fundamentados em estudo sobre o papel de HLA-G na reprodução humana, sugeriram uma associação entre a posição -1140 e a ins/del 14pb, relatando que o alelo -1140A associado a uma alta transcrição de HLA-G poderia ter o resultado de uma expressão ideal quando junto com a ins de 14 pb, uma vez que o mRNA estaria mais instável; por outro lado o alelo -1140T associado com a baixa transcrição de HLA-G apresentaria a quantidade ideal se presente juntamente com a del 114pb, devido a maior estabilidade do pouco mRNA transcrito. No atual estudo, a análise futura deste polimorfismo de ins/del poderia corroborar para uma conclusão funcional hipotética mais lucida sobre um possível efeito protetor e/ou de susceptibilidade dos haplótipos que apresentaram diferença significativa genotipicamente.

A análise do haplótipo como um todo, permitiu as seguintes considerações: a) Em H1.1 Nos haplótipos agrupados como H1, observa-se exclusivamente a base “**A**” na posição -1140 a qual, poderia ocupar uma posição crítica na configuração haplotípica e, dessa forma contribuir com maior peso na expressão de HLA-G; b) O Haplótipo H2.1 (que faz parte do conjunto de haplótipos agrupados) é o único que apresenta a base “**T**” na posição -1140, numa posição crítica onde a ausência de “**A**” poderia resultar num menor peso na expressão e transcrição do gene HLA-G. Este efeito contrário apresentou apenas uma tendência a significância *CLS vs NIC III*

$p=0,0836$; CLS vs EGN $p=0,0699$, e o aumento do n amostral, juntamente com análises do polimorfismo de ins/del 14pb presentes no exon 8 deverão ser realizados que poderá confirmar a relação.

As análises de ins/del 14pb estariam avaliando a estabilidade do mRNA por que esta associado com a integridade do RNA mensageiro, isso pode ser uma explicação para o H1 com A na posição -1140 estar mais frequente nos controles, esta posição é promotor e está associada com alelos de alta ou baixa produção, pensando nisso o mRNA dessas mulheres deveria ser mais instável.

4. CONCLUSÕES

- O haplótipo H1.1(GAG**A**ACGG), menos representado no grupo de mulheres pacientes e mais frequente no grupo de mulheres controles. *CLS x NIC III* ($p=0,0130$) e *CLS x NIC II + NIC III* ($p=0.0471$).
- Os haplótipos do grupo H2 (AG(G/A)(**T**/A)ACGA), quando do agrupamento dos mesmos para comparações H1 vs H2 entre *CLS x NIC III* ($p=0,0281$) e *CLS x NIC II + NIC III* ($p=0.0192$).
- Nos haplótipos agrupados como H1, observa-se exclusivamente a base “**A**” na posição -1140 a qual, poderia ocupar uma posição crítica na configuração haplotípica e, dessa forma contribuir com maior peso na expressão de HLA-G.
- O Haplótipo H2.1 (que faz parte do conjunto de haplótipos agrupados) é o único que apresenta a base “**T**” na posição -1140, numa posição crítica onde a ausência de “**A**” poderia resultar numa menor expressão e transcrição do gene HLA-G. O aumento do n amostral, juntamente com análises do polimorfismo de ins/del 14pb presentes no exon 8 deverão ser realizados que poderá corroborar essa proposição.
- O gene HLA-G constitui-se num gene candidato a ser investigado como biomarcador do desenvolvimento das lesões intraepiteliais cervicais precursoras do CC e, mais estudos poderão elucidar melhor a associação observada no presente estudo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.; TRIPATHI, P.; NAIK, S.; AGRAWAL, S.; Analysis of human leukocyte antigen (HLA)-G polymorphism in normal women and in women with recurrent spontaneous abortions. *Eur J Immunogenet*, vol. 31, pp. 275, 2004.

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

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Molecular Biology of The Cell*. 4.ed. USA: Garland Science, 2002.

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

ALLELES, 2013. Disponível em: <<http://hla.alleles.org/>>. Acesso em: 08/08/2013.

ALLELE FREQUENCIES, 2012. Disponível em: <<http://www.allelefreqencies.net/>>. Acesso em: 10/08/2013

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.

BAHRAM, S.; BRESNAHAN, M.; GERAGHTY, D.E.; SPIES, T. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 91, p. 6259-6263, 1994.

BENSUSSAN, A.; MANSUR, I.G.; MALLET, V.; RODRIGUES, A.M.; GURR, M.; WEISS, E.H.; BREM, G.; BPUMSELL, L.; GLUCKMAN, E.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D.; LEBOUTEILLER, P.; Detection on membrane-bound HLA-G translated products with a specific monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 92, pp. 10292, 1995.

BERNARD, H.U.; CHAN, S.Y.; MANOS, M.M.; ONG, C.K.; VILLA, L.L.; DELIUS, H.; BAUER, H.M; PEYTON, C.; WHEELER, C.M. Assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction, restriction digest, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *The journal of infectious disease*, Chicago, v.170, p.1077-1085, 1994.

BARNARD, P.; MCMILLAN, N.A. The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon-alpha. *Virology*, v. 259, p. 305-313, 1999.

BARNARD, P.; PAYNE, E.; MCMILLAN, N.A. The human papillomavirus E7 protein is able to inhibit the antiviral and anti-growth functions of interferon-alpha. *Virology*, v. 277, p. 411-419, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Neoplasia Intra-epitelial cervical – NIC: condutas do INCA/MS. *Revista brasileira de cancerologia*, Rio de Janeiro, v. 46, n.4, p. 355-357, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativas 2012: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/>. Acesso em: 07/08/2013

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativas 2013: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Rastreamento (Série A: Normas e Manuais Técnicos. Cadernos de Atenção Primária nº29). Brasília, 2012.

BREUNING, M.H.; VAN DEN BERG-LOONEN, E.M.; BERNINI, L.F.; BIJLSMA, J.B.; VAN LOGHEM, E.; MEERA KHAN, P.; NIJENHUIS, L.E. Localization of HLA on the short arm of chromosome 6. *Hum Genet*, v. 37, p. 131-139, 1977.

BJORKMAN, P.J.; SAPER, M.A.; SAMRAOUI, B.; BENNETT, W.S.; STROMINGER, J.L.; WILEY, D.C.; The foreign antigen binding site and T-cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature*, vol. 329, pp. 512, 1987.

BLASCHITZ, A.; JUCH, H.; VOLZ, A.; HUTTER, H.; DAXBOECK, C.; DESOYE, G.; DOHR, G.; The soluble pool of HLA-G produced by human trophoblasts does not include detectable levels of the intron 4-containing HLA-G5 and HLA-G6 isoforms. *Mol Hum Reprod*, vol. 11, pp. 699, 2005

BLANCHET, O.; BOURGE, J.F.; ZINSZER, H.; ISRAEL, A.; KOURILSKY, P.; DAUSSET, J.; DEGOS, L.; PAUL, P.; Altered binding of regulatory factors to HLA class I enhancer sequence in human tumor cell lines lacking class I antigen expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, vol 89, pp. 3488, 1992.

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

BOHJANEN, P.R.; PETRYNIAK, B.; JUNE, C.H.; THOMPSON, C.B.; LINDSTEN, T.; An inducible cytoplasmic factor (AU-B) binds selectively to AUUUA multimers in the 3'utr of lymphokine mRNA. *Mol Cell Biol*, vol. 11, pp. 3288, 1991.

BONTKES, H.J. *et al.* 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.

BOSS, JM.; Regulation of transcription of MHC class II genes. *Curr Opin Immunol*, vol. 9, pp. 107, 1997.

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.

CANCER RESEARCH UK. Disponível em: <<http://info.cancerresearchuk.org/cancerstats/geographic/world/?a=5441>>. Acesso em: 31/08/2013.

CHELIMO, C.; WOULDES, T. A.; CAMERON, L. D.; ELWOOD, J. M. Risk factors and prevention of human papillomaviruses (HPV), genital warts and cervical cancer. *Journal of Infection*, v. 66, p207-217. 2012.

CARRINGTON M, *et al.* Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci. *J Exp Med* 201:1069–1075. 2005.

CAROSELLA, E.D; MOREAU, P.; LE MAOULT, J.; ROUAS-FREISS, N. HLA-G: from biology to clinical benefits. *Trends Immunology*, v. 29, n. 3, p. 125-32, 2008a.

CAROSELLA, E.D.; FAVIER, B.; ROUAS-FREISS, N.; MOREAU, P.; LEMAOULT, J. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. *Blood*, v. 111, n. 10, p. 4862-4870, 2008b.

CAROSELLA, E.D.; MOREAU, P.; LE MAOULT, J.; LE DISCORDE, M.; ROUASFREISS, N. HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. *Adv. Immunol.*, v. 81, p. 199-252, 2003.

CARROLL, M.C.; CAMPBELL, R.D.; PORTER, R.R.; Mapping of steroid 21-hydroxylase genes adjacent to complement component C4 genes in HLA, the major histocompatibility complex in man. *Proc Natl Acad Sci USA*, vol.82, pp. 521, 1985.

CASTELLI, E.C.; MOREAU, P.; OYA E CHIROMATZO, A.; MENDES-JÚNIOR, C.T.; VEIGA-CASTELLI, L.C.; YAGHI, L.; GIULIATTI, S.; CAROSELLA, E.D.; CONADI, E.A.; In silico analysis of microRNAs targeting the HLA-G 3' untranslated region alleles and haplotypes. *Hum Immunol*, 2009, doi: 10.1016/j.humimm.2009.07.028.

CASTELLI, E. C; MENDES-JUNIOR, C. T; VEIGA-CASTELLI, L. C; ROGER, M; MOREAU, P; DONADI, E. A. A comprehensive study of polymorphic sites along the HLA-G gene: Implication for gene regulation and evolution. *Mol Biol Evol*, 28: 3069-89. 2011.

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.

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.

CIRULLI, V.; ZALATAN, J.; MCMASTER, M.; PRINSEN, R.; SALOMON, D.R.; RICORDI, C.; TORBETT, B.E.; MEDA, P.; CRISA, L. The class I HLA repertoire of pancreatic islets comprises the nonclassical class Ib antigen HLA-G. *Diabetes*, v. 55, n. 5, p. 1214-1222, 2006.

COSTA, C.H.; GELMIN, G. F.; WOWK, P. F.; MATTAR, S. B.; VARGAS, R. G.; ROXO, V. M. M.S.; SCHUFFNER, A. BICALHO, M.G. HLA-G regulatory and implantation outcome in couples who underwent assisted reproduction treatment. *Human Immunology*, v.73, p.891-897, 2012.

CDC- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/cancer/cervical/>>. Acesso em: 16/08/2012.

CRESSWELL, P.; Antigen presentation. Getting peptides into *MHC* class II molecules. *Current Biology*, Cambridge, v.4, n.6, p. 541-543, 1994.

CRISA, L.; MCMASTER, M.T.; ISHII, J.K.; FISHER, S.J.; SALOMON, D.R. Identification of a thymic epithelial cell subset sharing expression of the class Ib HLA-G molecule with fetal trophoblasts. *Journal Exp. Med.*, v. 186, n. 2, p. 289-298, 1997.

CHUA, J.H.; ARGUGAM, A.; JEYASEELAN, K.; MicroRNAs: biogenesis, function and applications. *Curr Opin Mol Ther*, vol. 11, n. 2, pp. 189, 2009.

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.

DIEHL, M.; MÜNZ, C.; KEILHOLZ, W.; STEVANOVIC, S.; HOLMES, N.; LOKE, Y.W.; RAMMENSEE, H.G.; Nonclassical HLA-G molecules are classical peptide presenters. *Curr Biol*, vol. 6, pp. 305, 1996.

DIEPSTRA, A.; POPPEMA, S.; BOOT, M.; VISSER, L.; NOLTE, I.M.; NIENS, M.; TEMEERMAN, G.J.; VAN DEN BERG, A. HLA-G protein expression as potential immune escape mechanism in classical Hodgkin's lymphoma. *Tissue Antigens*, v. 71, n. 3, p. 219-226, 2008.

DONAGHY, L.; GROS, F.; AMIOT, L.; MARY, C.; MAILLARD, A.; GUIGUEN, C.; GANGNEUX, J.P. Elevated levels of soluble non-classical major histocompatibility class I molecule human leucocyte antigen (HLA)-G in the blood of HIV-infected patients with or without visceral leishmaniasis. *Clinical Experimental Immunology*, v. 147, n. 2, p. 236-240, 2007.

DONG, D.D.; YANG, H.; LI, K.; XU, G.; SONG, L.H.; FAN, X.L.; JIANG, X.L.; YIE, S.M.; Human Leukocyte Antigen-G (HLA-G) Expression in Cervical Lesions: Association With Cancer Progression, HPV 16/18 Infection, and Host Immune Response. 2012.

DUGGAN-KEEN, M.F. *et al.* 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, S.A.; PALMER, M.S.; MCMICHAEL, A.J.; Human trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA class I molecule. *J Immunol*, vol. 144, pp. 731, 1990.

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 $\alpha 6$ integrin as a candidate receptor for papillomavirus. *Journal of virology*, Baltimore, v. 71, p. 5449-5459, 1997.

Ferguson, R.; Ramanakumar, A.V., Koushik, A.; Coutl, F.; Franco, E.; Roger, M.; and the Biomarkers of Cervical Cancer Risk Study Team. Human leukocyte antigen G polymorphism is associated with an increased risk of invasive cancer of the uterine cervix. 2012.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (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: 17/08/2013.

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

FUJII, T.; ISHITANI, A.; GERAGHTY, D.E. A soluble form of the HLA-G antigen is encoded by a messenger ribonucleic acid containing intron 4. *J. Immunol.*, v. 153, n. 12, p. 5516-5524, 1994.

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

FUZZI, B.; RIZZO, R.; CRISCUOLI, L.; NOCI, I.; MELCHIORRI, L.; SCARSELLI, B.; BENCINI, E.; MENICUCCI, A.; BARICORDI, O.R.; HLA-G expression in early embryos is a fundamental prerequisite for the obtainment of pregnancy. *Eur J Immunogenet*, vol. 32, pp. 311, 2002.

FREITAS, A.C.; MARIZ, F.C.; SILVA, M.A.R.; JESUS, A.L.S. Human Papillomavirus Vertical Transmission: Review of Current Data. *Review Article*. 2013.

GAO, G.F.; TORMO, J.; GERTH, U.C.; WYER, J.R.; MCMICHAEL, A.J.; STUART, D.I.; BELL, J.I.; JONES, Y.E.; JAKOBSEN, B.K.; Crystal structure of the complex between human CD8 α - α and HLA-A2. *Nature*, vol. 387, pp. 630, 1997.

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

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

Genbank, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, acessado em agosto 2013.

GERAGHTY, D.E.; WEI, X.H.; ORR, H.T.; KOLLER, B.H. Human leukocyte antigen F (HLA-F). An expressed HLA gene composed of a class I coding sequence linked to a novel transcribed repetitive element. *J. Exp. Med.*, v. 171, n. 1, p. 1-18, 1990.

GERAGHTY, D.E. Structure of the HLA class I region and expression of its resident genes. *Immunology*, v. 5, p. 3-7, 1993.

GERAGHTY, D.E.; KOLLER, B.H.; ORR, H.T.; A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proc Nat Acad Sci USA*, vol. 84, pp. 9145, 1987.

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

GOBIN, S.J.P.; PEIJNENBURG, A.; KEIJERS, V.; VAN DER ELSEN, P.; Site a is crucial for two routes of IFN γ -induced MHC class I transactivation: The ISRE-mediate route and a novel pathway involving CIITA. *Immunity*, vol. 6, pp. 601, 1997a.

GOBIN, S.J.P.; KEIJERS, V.; WOLTMAN, A.M.; PEIJNENBURG, A.; WILSON, L.; VAN DEN ELSEN, P.J.; Locus-specific regulation of HLA class I gene expression. In.: D. Charron (ed): Genetic diversity of HLA. *Func Med Implic* vol. 2, pp. 295, 1997b.

GOBIN, S.J.P.; PEIJNENBURG, A.; VAN EGGERMOND, M.; VAN ZUTPLHEN, M.; VAN DEN BERG, R.; VAN DEN ELSEN, P.J.; The RFX complex is crucial for the constitutive and CIITA mediated transactivation of MHC class I and β_2m genes. *Immunity*, vol 9, pp. 531, 1998.

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.

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

GOES, N.; SIMS, T.; URMSON, J.; VINCENT, D.; RAMASSAR, V.; HALLORAN, P.F.; Disturbed MHC regulation in de INF- γ knock-out mouse. Evidence for three states of MHC expression with distinct roles for INF- γ . *J Immunol*, vol. 155, pp. 4559, 1995.

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

HARRISON, G.A.; HUMPHREY, K.E.; JAKOBSEN, I.B.; COOPER, D.W.; A 14bp deletion polymorphism in the HLA-G gene. *Hum Mol Genet*, vol. 2, pp. 2200, 1993.

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.

HENGSTERMANN, A.; LINARES, L.K.; CIECHANOVER, A.; WHITAKER, 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 journal of epidemiology*, Baltimore, v. 134, n. 11, p. 1335-1346, 1991.

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.

HOBART, M.; RAMASSAR, V.; GOES, N.; URMSON, J.; HALLORAN, P.F.; INF regulatory factor-1 plays a central role in the regulation of the expression of class I and II MHC genes *in vivo*. *J Immunol*, vol 158, pp. 4260, 1997.

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.

HUNT, J.S.; JADHAV, L.; CHU, W.; GERAGHTY, D.E.; OBER, C. Soluble HLA-G circulates in maternal blood during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, v. 183, pp. 682, 2000.

HVIID, T.V.; SORENSEN, S.; MORLING, N.; Polymorphism in the regulatory region located more than 1.1 kilobases 5' to the start site of transcription, the promoter region, and exon 1 of the HLA-G gene. *Hum Immunol*, vol. 60, pp. 1237, 1999.

HVIID, T.V.; HYLENIUS, S.; RORBYE, C.; NIELSEN, L.G.; HLA-G variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels. *Immunogenetics*, vol. 55, pp. 63, 2003.

HVIID, T.V.F.; RIZZO, R.; MELCHIORRI, L.; STIGNANI, M.; BARICORDI, O.R. Polymorphism in the 5'upstream regulatory and 3'unstrated region of the HLA-G in relation to soluble HLA-G and IL-10 expression. *Hum Immunol*, v. 67, p. 53, 2006.

IIGENFRITZ, C. M; Dissertação De Mestrado. Modelagem Por Homologia E Dinâmica Molecular Da Estrutura Selvagem Completa De E6 De Hpv 16. PUC-RS, 2009.

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

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias>>. Acesso em: 15/08/2013.

IMBRAIM, E.C.; MORANGE, M.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D.; PAUL, P.; Heat shock and arsenite induce expression of the nonclassical class I histocompatibilityHLA-G gene in tumor cell lines. *Cell Stress & Chaperones*, vol. 5, pp. 207-218, 2000.

IMGT/HLA *Database* , disponível em <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html>, acessado em agosto de 2013.

INCA. MINISTERIO DA SAUDE – BRASIL . Estimativa 2012. Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012.pdf>> .Acesso em: 31/08/2013.

INCA. MINISTERIO DA SAUDE – BRASIL . Tipos de câncer, detecção precoce. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/>> . Acesso em: 31/08/2013.

INCASSATI, A.; PATEL, D.; McCANCE, D.J. Induction of tetraploidz through loss of p53 and upregulation of PIK1 by human papillomavirus type-16, E6. *Oncogene*, Basingstoke, v. 25, p. 2444-2451, 2006.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). IARC Handbooks of Cancer Prevention. Lyon: IARC press, 2005.

ISHITANI, A.; SAGESHIMA, N.; LEE, N.; DOROFEEVA, N.; HATAKE, K.; MARQUARDT, H.; GERAGHTY, D.E.; Protein expression and peptide binding suggest unique and interacting functionsl roles for HLA-E, F, and G in maternal-placental immune recognition. *J Immunol*, vol. 171, pp. 1376, 2003.

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.

JONES, E. Y. MHC class I and class II structure. *Current Opinion Immunology*,

v.9, p.75-79, 1997.

KIM CJ, *et al.* Regulation of cell growth and HPV genes by exogenous estrogen in cervical cancer cells. *Int J Gynecol Cancer*; 10:157–64. 2000

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.

KING, A.; BURROWS, T.; LOKE, Y.W.; Human uterine natural killer cells. *Nat Immunity*, vol. 15, pp. 41, 1996.

KOLLER, B.H.; GERAGHTY, D.E.; SHIMIZU, Y.; DEMARS, R. A Novel HLA Class I Gene Expressed in Resting T Lymphocytes. *Print*, v. 141, p. 897-904, 1988.

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

KOVATS, S.; MAIN, E.K.; LIBRACH, C.; STUBBLEBINE, M.; FISHER, S.J.; DEMARS, R.; A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblast. *Science*, vol. 248, pp. 220, 1990.

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.

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.

LAMM, L.U.; OLAISEN, B.; Report of the committee on the genetic constitution of chromosomes 5 and 6. *Cytogenet Cell Genet*, vol. 40, pp. 128, 1985.

LE BOUTEILLER, P.; HLA class I chromosomal region, genes and products: facts and questions. *Crit Rev Immunol*, vol. 14, pp. 89, 1994.

LE BOUTEILLER, P.; BLASCHITZ, A.; The functionality of HLA-G is emerging. *Immunol Rev*, vol. 167, pp. 233, 1999.

LE BOUTEILLER, P.; SOLIER, C.; PRÖLL, J.; AGUERRE-GIRR, M.; FOURNEL, S.; LENFANT, F.; Placental HLA-G expression *in vivo*: where and what? *Hum Reprod Up*, vol. 5, pp. 223, 1999.

LE BOUTEILLER, P.; LENFANT, F.; Antigen-presenting functions of the non-classical HLA-E,-F and –G class I molecules: the beginning of a story. *Res Immunol*, vol. 147, pp.301, 1996.

LE DISCORDE, M.; MOREAU, P.; SABATIER, P.; LEGEAI, J.M.; CAROSELLA, E.D. Expression of HLA-G in human cornea, an immune-privileged tissue. *Human Immunology*, v. 64, n. 11, p. 1039-1044, 2003.

LEFEBVRE, S.; MOREAU, P.; GUIARD, V.; IBRAHIM, E.C.; ADRIAN-CABESTRE, F.; MENIER, C.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D.; PAUL, P.; Molecular mechanisms controlling constitutive and IFN-gamma-inducible HLA-G expression in various cell types. *J Reprod Immunol*, vol. 43, pp. 213, 1999.

LEFRANC, M.P.; FRANCE, M. IMGT, the international ImMunoGeneTics information system®. Disponível em: <<http://imgt.cines.fr/>> Acesso em: 16 ago. 2013.

LE MAOULT , J.; LE DISCORDE, M.; ROUAS-FREISS, N.; MOREAU, P.; MENIER, C.; MCCLUSKEY, J.; CAROSELLA, E.D. Biology and functions of human leukocyte antigen-G in health and sickness. *Tissue Antigens*, v. 62, n. 4, p. 273-284, 2003.

LE MAOULT , J.; ZAFARANLOO, K.; LE DANFF, C.; CAROSELLA, E.D. HLA-G up-regulates ILT2, ILT3, ILT4, and KIR2DL4 in antigen presenting cells, NK cells, and T cells. *FASEB J.*, v. 19, n. 6, p. 662–664, 2005.

LE MAOULT , J.; CAUMARTIN, J.; DAOUYA, M.; FAVIER, B.; LEROND, S.; GONZALEZ, A.; CAROSELLA, E.D. Immune regulation by pretenders: cell-to-cell transfers of HLA-G make effector T cells act as regulatory cells. *Blood*, v. 109, n. 5, p. 2040, 2007.

LEE, N.; MALACKO, A.R.; ISCHITANI, A.; CHEN, M.C.; BAJORATH, J.; MARQUARDT, H.; GERAGHTY, D.E.; The membrane-bound and soluble forms of HLA-G bind identical sets of endogenous peptides but differ with respect to TAP association. *Immunity*, vol. 3, pp. 591, 1995.

LINSINGEN, R. V.; BICALHO, M. G.; Polimorfismos de Genes de Citocinas e do Gene Mica em Pacientes com Neoplasia Intraepitelial Cervical. *Dissertação de Doutorado*. 2008.

LI, X. J.; ZHANG, X.; LIN, A.; RUAN, Y. Y.; YAN, W. H.; Human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression in cervical cancer lesions is associated with disease progression. *Human Immunology*. p. 946-949. 2012.

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

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. MARTIN MP, *et al.* HLA-Cw group 1 ligands for KIR increase susceptibility to invasive cervical cancer. *Immunogenetics*. 62:761–765. 2010.

MEHRA, N.K.; KAUR, G.; Gene map of the human leukocyte antigen (HLA) region. *Exp Rev Mol Med*, vol. 4, pp. 1, 2003.

MENIER, C.; RABREAU, M.; CHALLIER, J.C.; LE DISCORDE, M.; CAROSELLA, E.D.; ROUAS-FREISS, N. Erythroblasts secrete the nonclassical HLA-G molecule from primitive to definitive hematopoiesis. *Blood*, v. 104, n. 10, p. 3153-3160, 2004.

MÉGRET, F.; PREHAUD, C.; LAFAGE, M.; MOREAU, P.; ROUAS-FREISS, N.; CAROSELLA, E.D.; LAFON, M. Modulation of HLA-G and HLA-E expression in human neuronal cells after rabies virus or herpes virus simplex type 1 infections. *Hum. Immunol.*, v. 68, n. 4, p. 294-302, 2007.

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.

MITSDOERFFER, M.; SCHREINER, B.; KIESEIER, B.C.; NEUHAUS, O.; DICHGANS, J.; HARTUNG, H.P.; WELLER, M.; WIENDL, H. Monocyte-derived HLA-G acts as a strong inhibitor of autologous CD4 T cell activation and is upregulated by interferon-beta in vitro and in vivo: rationale for the therapy of multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.*, v. 159, n. 1-2, p. 155-164, 2005.

MIDDLETON, K.; PEH, W.; SOUTHERN, S.; GRIFFIN, H.; SOTLAR, K.; NAKAHARA, T. Organisation 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.

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, *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.

MORENO, C.; EMERY, P.; WEST, J.E., DURAND,B., REITH,W., MACH,B., AND BOSS,M.; Purified X2 binding protein (X2BP) cooperatively binds the class II MHC X box region in the presence of purified RFX, the X box factor deficient in the Bare Lymphocyte Syndrom. *J. Immunol.*, vol. 155, pp. 4313, 1995.

MORALES, P.J.; PACE, J.L.; PLATT, J.S.; LANGAT, D.K.; HUNT, J.S.; Synthesis of beta(2)-microglobulin-free, disulphide-linked HLA-G5 homodimers in human placental villous cytotrophoblast cells. *Immunol*, vol. 122, pp. 179-188, 2007.

MORETTA, A., PENDE, D., LOCATELLI, F. activating and inhibitory 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.

MOREAU, P.; ADRIAN-CABESTRE, F.; MENIER, C.; GUIARD, V.; GOURAND, L.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D.; PAUL, P.; IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. *Int Immunol*, vol. 11, pp. 803, 1999.

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.; MARUJO, 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.

MUÑOZ N, FRANCESCHI S, BOSETTI C, MORENO V, HERRERO R, SMITH JS, SHAH KV, MEIJER CJ, BOSCH FX; 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.

NAVARRO, F.; LLANO, M.; BELLON, T.; COLONNA, M.; GERAGHTY, D.E.; LOPEZ-BOTET, M.; The ILT-2 (LIR1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 e HLA-E molecules co-expressed on target cells. *Eur J Immunol*, vol. 29, pp. 277, 1999.

NELSON, N.; MARKS, M.S.; DRIGGERS, P.H.; OZATO, K.; Interferon consensus sequence-binding protein, a member of the interferon regulatory factor family, suppresses interferon-induced gene transcription. *Mol Cell Biol*, vol. 13, pp. 588, 1993.

NICCOLAI, LM., MEHTA, NR., HADLER, JL. Racial/Ethnic and Poverty Disparities in Human Papillomavirus Vaccination Completion. *American Journal of Preventive Medicine*. 41(4):428–433. 2011.

OBER, C.; ALDRICH, C.; ROSINSKY, B.; ROBERTSON, A.; WALTER, M.A.; WILLADSEN, S.; VERP, M.S.; GERAGHTY, D.E.; HLA-G1 protein expression is not essential for fetal survival. *Placenta*, vol. 19, pp. 127, 1998.

OBER, C.; ALDRICH, C.L.; CHERVONEVA, I.; BILLSTRAND, C.; RAHIMOV, F.; GRAY, H.L.; HYSLOP, T.; Variation in the HLA-G promoter region influences miscarriage rates. *Am J Hum Genet*, vol. 72, pp. 1425, 2003.

ORIEL, J.D. Natural history of genital warts. *The British journal of venereal diseases*, London, v.47, p. 1-13, 1971.

PAUL, P.; CABESTRE, F.A.; IBRAHIM, E.C.; LEFEBVRE, S.; KHALIL-DAHER, I.; VAZEUX, G.; QUILES, R.M., BERMOND, F.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D. Identification of HLA-G7 as a new splice variant of the HLA-G mRNA and expression of soluble HLA-G5, -G6, and -G7 transcripts in human transfected cells. *Human Immunology*, v. 61, n. 11, p. 1138–1149, 2000.

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.

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).

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

QIU, J.; TERASAKI, P.I.; MILLER, J.; MIZUTANI, K.; CAI, J.; CAROSELLA, E.D. Soluble HLA-G expression and renal graft acceptance. *Am. J. Transplant.*, v. 6, n. 9,

p. 2152-2156, 2006.

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

REBMANN, V.; PFEIFFER, K.; PÄBLER, M; FERRONE, S.; MAIER, S.; WEISS, E.; GROSSE-WILDE, H.; Detection of soluble HLA-G molecules in plasma and amniotic fluid. *Tissue Antigens*, vol. 53, pp. 14, 1999.

REBMANN, V.; VAN DER VEN, K.; PÄBLER, M.; PFEIFFER, K.; KREBS, D.; GROSSE-WILDE, H.; Association of soluble HLA-G plasma levels with HLA-G alleles. *Tissue Antigens*, vol. 57, pp. 15, 2001

RITEAU, B.; FAURE, F.; MENIER, C.; VIEL, C.; CAROSELLA, E. D.; AMIGORENA, S.; ROUAS-FREISS, N. Exosomes bearing HLA-G are released by melanoma cells. *Human Immunology*, v. 64, p. 1064-1072, 2003.

RIZZO, R.; STIGNANI, M.; MELCHIORRI, L.; BARICORDI, O.R.; Possible role of human leukocyte antigen-G molecules in human oocyte/embryo scretome. *Hum Immunol*, vol. 70, pp. 970-975, 2009a.

ROUAS-FREISS, N.; MOREAU, P.; MENIER, C.; LE MAOULT, J.; CAROSELLA, E.D. Expression of tolerogenic HLA-G molecules in cancer prevents antitumor responses. *Seminars in Cancer Biology*, v. 17, n. 6, p. 413-421, 2007.

ROUAS-FREISS, N.; MOREAU, P.; FERRONE, S.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D. HLA-G proteins in cancer: do they provide tumor cells with an escape mechanism? *Cancer Research*, v. 65, n. 22, p. 10139-10144, 2005.

SABATIER, C.; GIMENEZ, C.; CALIN-LAURENS, V.; RABOURDIN-COMBE, C.; TOURAINE, J-L.; Type III lymphocyte syndrome: lack of HLA class II gene expression and reduction in HLA class I gene expression. *Curr Res Acad Sci*, vol. 319, p. 789, 1996.

SCHMIDT, C.M.; EHLENFELDT, R.G.; ATHANASIOU, M.C.; DUVICK, L.A.; HEINRICH, H.; DAVID, C.S.; ORR, H.T.; Extraembryonic expression of the human MHC class I gene HLA-G in transgenic mice – evidence for a appositive region located 1kb 5' to the start site of transcription. *J Immunol*, vol. 151, p. 2633, 1993.

SELIGER, B; SCHLAF, G. STRUCTURE. Expression and function of HLA-G in renal cell carcinoma. *Semin Cancer Biol*. P 444-50. 2007.

SILVA, J. S. Região reguladora, promotora e exon 4 de HLA-G em casais com histórico de abortamento recorrente. Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná 2009.

SILVA, J.S. SLOWIK, R. BICALHO, M.G. Considerations on regulatory sequences of the distal promoter region of the HLA-G gene. *Human Immunology*, p. 473-477. 2013.

SILVA, I. D; MUNIZ, Y. C. N; SOUSA, M. C. P. S; SILVA, K. R; CASTELLI, E. C; FILHO, J. C.G; OSTA, A. P; LIMA, M. I. M; SIMÕES, R. T. HLA-G 3'UTR polymorphisms in high grade and invasive cervico-vaginal cancer. *Human Immunology*. P452-458. 2013.

SNELL, G.D. Methods for the study of histocompatibility genes. *J Genet*, v. 49, p. 87-108, 1948.

SVEJGAARD, A. JERSILD, C. STAUB-NIELSEN, L. BODMER, W.F. HLA antigens and diseases: statistical and genetical considerations. *Tissue Antigens* 4: 95-150. 1974.

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.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CITOPATOLOGIA (SBC). Disponível em: <www.citopatologia.org>. Acesso em : 31/08/2013.

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

SOLIER, C; MALLET, V; LENFANT, F; BERTRAND, A; HUCHENQ, A; LE, BOUTEILLER, P. HLA-G unique promoter region: Functional implications. *Immunogenetics*, 53: 617-625, 2001.

SPPV – SOCIEDADE PORTUGUESA DO PAPILOMAVIRUS HUMANO. Disponível em <http://www.sppv.org/info_ciencia.html>. Acesso em: 31/08/2013.

STANLEY, M. Pathology and epidemiology of HPV infection in female. *Gynecologic Oncology*, v 117, s5-s10. 2010.

STUBENRAUCH F.; IFTNER, T. Krebserkrankungen durch Papillomviren. Disponível em: <http://www.medizin.uniteuebingen.de/virologie/exp_viro/Exp_Viro_de/Forschung/Projekte/target.html> Acesso em: 12/08/2013.

SHIROISHI, M.; TSUMOTO, K.; AMANO, K.; SHIRAKIHARA, Y.; COLONNA, M.; BRAUD, V.M.; ALLAN, D.S.; MAKADZANGE, A.; ROWLAND-JONES, S.; WILLCOX, B.; JONES, E.Y.; VAN DER MERWE, P.A.; KUMAGAI, I.; MAENAKA, K. Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 100, p. 8856-8861, 2003.

SULLIVAN, L.C.; HOARE, H.L.; McCLUSKEY, J.; ROSSJOHN, J.; BROOKS, A.G. A structural perspective on MHC class Ib molecules in adaptive immunity. *Trends Immunology*, v. 27, n. 9, p. 413-420, 2006.

TAN, Z.; RANDALL, G.; FAN, J.; CAMORETTI-MERCADO, B.; BROCKMAN-SCHNEIDER, R.; PAN, L.; SOLWAY, J.; GERN, J.E.; LEMANSKE, R.F.; NICOLAE, D.; OBER, C.; Allele-specific targeting of microRNAs to HLA-G and risk of asthma. *Am J Hum Genet*, vol. 81, pp. 829, 2007.

TAN, C.Y.; HO, J.F.V.; CHONG, Y.S.; LOGANATH, A.; CHAN, Y.H.; RAVICHANDRAN, J.; LEE, C.G.; CHONG, S.S.; Paternal contribution of HLA-G*0106 significantly increases risk for pré-eclampsia in multigravid pregnancies. *Mol Hum Reprod*, vol. 14, pp. 317, 2008.

THANOS, D.; MANIATIX, T.; NF- κ B: a lesson in family values. *Cell*, vol 80, pp. 529, 1995.

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. *The Journal 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, et al. Human papillomavirus infection and reinfection in adult women: the role of sexual activity and natural immunity. *Cancer Research*. 70(21):8569–8577. 2010

TROWSDALE, J.; Genetics and polymorphism: class II antigens. *Br Med Bull*, vol. 43, pp 15, 1987.

UROSEVIC, M.; WILLERS, J.; MUELLER, B.; KEMPF, W.; BURG, G.; DUMMER, R. HLA-G protein upregulation in primary cutaneous lymphomas is associated with interleukin-10 expression in large cell T-cell lymphomas and indolent B-cell lymphomas. *Blood*, v. 99, n. 2, p. 609–617, 2002.

VAN DEN ELSEN, P.J.; PEIJNENBURG, A.; VAN EGGERMOND, M.C.J.A.; GOBIN, S.J.P.; Shared regulatory elements in the promoters of MHC class I and class II genes. *Immunology Today*, vol 19, n. 7, pp. 308, 1998a.

VAN DEN ELSEN, P.J.; GOBIN, S.J.P.; VAN EGGERMOND, M.C.J.A.; PEIJNENBURG, A.; Regulation of MHC class I and class II genes transcription: differences and similarities. *Immunogenetics*, vol 48, pp 208, 1998b.

VAN DER VEN, K.; OBER, C.; HLA-G polymorphisms in African Americans. *J Immunol*, vol. 153, pp. 5628, 1994.

VAN DER VEN, K.; PFEIFFER, K.; SKRABLIN, S; HLA-G polymorphisms and molecule function – questions and more questions – a review. *Placenta*, vol. 21, pp. 86, 2000.

VAN LIEROP, M.J.; WINANDS, F.; LEKE, Y.W.; EMMER, P.M.; LUKASSEN, H.G.; VAN DER BRAAT, D.D.M.A.; MOSSELMAN, S.; JOOSTEN, J.; Detection of HLA-G by a specific sandwich ELISA using monoclonal antibodies G233 and 56B. *Mol Hum Reprod*, vol. 8, pp. 776, 2002.

VARGAS, R.G. Repertório dos genes *KIR* e polimorfismos dos genes *HLA-Cw*, *KIR2dl4* e *HLA-G* no abortamento recorrente. *Tese* apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná. 2009.

VAZ, A. J.; TAKEI, K.; BUENO, E. C.; *Imunoensaios: Fundamentos e aplicações*. RJ: Guanabara Koogan, 2007.

VIEIRA, K.B. *et al.* Tumor necrosis factor alpha interferes with the cell cycle of normal and papillomavirus-immortalized human keratinocytes. *Cancer Reserach*. 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.

XUE, S.; YANG, J.; YAO, F.; XU, L.; FAN, L.; Recurrent spontaneous abortions patients have more -14 bp/114 bp heterozygotes in the 3'UT region of the HLA-G gene in a Chinese Han population. *Tissue Antigens*, vol. 69, pp. 153, 2007.

YAMAMOTO, A.; MIZUKAMI, Y.; SAKURAI, H.; Identification of a novel class of target genes and a novel type of binding sequence of heat shock transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, vol. 280, pp. 11911-19, 2005.

YIE, S.M; LI, L.H.; XIAO, R.; LIBRACH, C.L.; A single base-pair mutation in the 3'-untranslated region of HLA-G mRNA is associated with pré-eclampsia. *Mol Hum Reprod*, vol. 14, pp. 649, 2008.

WALBOOMERS, J.M.; JACOBS, M.V.; MANOS, M.M.; BOSCH, F.X.; KUMMER, J.A.; SHAH, K.V.; SNIJDERS, P.J.; PETO, J.; MEIJER, C.J.; MUÑOZ, N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of pathology*, London, v. 189, n. 1, p. 1-3, 1999.

WARNER, C.M.; TYAS, D.A.; GOLDSTEIN, C.; COMISKEY, M.; COHEN, J.; BRENNER, C.A.; Genotyping: the HLA system and embryo development. *Reprod Biomed On*, vol. 4, pp. 133, 2002.

WIENDL, H.; FEGER, U.; MITTELBRONN, M.; JACK, C.; SCHREINER, B.; STADELMANN, C.; ANTEL, J.; BRUECK, W.; MEYERMANN, R.; BAR-OR, A.; KIESEIER, B.C.; WELLER, M. Expression of the immune-tolerogenic major histocompatibility molecule HLA-G in multiple sclerosis: implications for CNS immunity. *Brain*, v. 128; n. 11, p. 2689-2704, 2005.

WERNES, 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 action. WHO guide for effective programmes. Switzerland. Disponível em: <www.who.int/cancer/modules/Prevention%20Module.pdf>. Acesso em: 14/08/2013.

WHO – World Health Organization. Cervical cancer screening in developing countries: report of a WHO consultation. Geneva: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2002.

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

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

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, 2007a.

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 – BRAZIL. Barcelona: WHO/ICO, 2007b.

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

WU, R.; COLENAN, N.; HIGGINS, G. Lymphocyte-mediated cytotoxicity to HPV 16 infected cervical keratinocytes. In: STANLEY, M.A. Immunology of Human Papillomaviruses. New York: Plenum Press, 1994. p.255-259.

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

APÊNDICES

APÉNDICE I

MATERIAI E MÉTODOS

CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Para o estudo transversal caso-controle, foram selecionados três grupos totalizando 194 mulheres, a partir do banco de dados do Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH) da UFPR. O grupo denominado “caso”, é subdividido em 2 grupos, um composto por uma amostra de 70 mulheres com NIC II e o outro por 51 mulheres com NIC III. O grupo “controle” é formado por uma amostra de 73 mulheres sem lesão.

As duas amostras de pacientes (casos) são compostas por 121 mulheres portadoras de HPV, cuja presença do DNA viral tenha sido confirmada pelo teste de biologia molecular de Captura Híbrida. Essas mulheres estiveram em tratamento no Departamento de Patologia Cervical do Hospital Erasto Gaertner, e apresentaram diagnóstico citológico, colposcópico e histológico de NIC II e NIC III. São ainda considerados como critérios de inclusão: não apresentar imunossupressão ou doenças auto-imunes e não possuírem parentesco consangüíneo. Foram selecionadas as mulheres que compareceram para atendimento ginecológico e que foram indicadas ao tratamento cirúrgico da NIC.

Para as amostras-controle, composto por 73 mulheres HPV negativo para o exame da captura híbrida, não consangüíneas, sem histórico de NIC e que apresentaram o último exame ginecológico normal, realizado no prazo máximo de um ano antecedente à coleta do sangue (mulheres sem lesão). 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/presença de HPV de alto risco ou oncogênicos.

As informações epidemiológicas foram obtidas através de um questionário elaborado por um grupo multiprofissional, verificando fatores de risco para o contágio do vírus HPV e possibilidade de desenvolvimento do CC, neste questionário foram obtidas informações com relação a: idade da 1^o relação sexual, número de parceiros, uso do preservativo, uso de métodos contraceptivos, se eram fumantes ou não.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em seres Humanos do Hospital Erasto Gaertner, com o projeto intitulado: “Polimorfismos genéticos e expressão de genes relacionados ao sistema imune e ciclo celular no carcinoma uterino associado à infecção pelo papilomavírus humano” sob o protocolo nº 1943 (Anexos 2 e 3). Os integrantes do estudo receberam treinamentos em Boas Práticas Clínicas de acordo com a resolução 196/96 e os responsáveis pela aplicação do questionário epidemiológico receberam treinamento específico prévio para a sua execução.

Todas as mulheres participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 4) previamente a qualquer procedimento do estudo. Na sequência responderam a um questionário epidemiológico, apresentado no Anexo 5. A inscrição no BANPESQ está sob o nº.: 2009024062.

Critérios de inclusão e de exclusão

Os critérios de inclusão utilizados foram:

- ter entre 15 e 45 anos de idade;
- ser soronegativa para HIV;
- ter vida sexual ativa.
- possuir diagnóstico histológico de NIC II ou III após procedimento cirúrgico (Cirurgia de Alta Frequência – CAF ou Conização) (exclusivo do grupo caso)
- ter realizado exame citológico no dia da entrevista (exclusivo do grupo controle).

Os critérios de exclusão compreenderam:

- tido relação sexual há 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;
- serem soropositivas para o HIV.

PROCESSAMENTO DA AMOSTRA

O processamento e análise das amostras foram realizados no LIGH, do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná.

Extração

Dez mililitros (10 mL) de sangue periférico foram coletados de cada indivíduo, através de punção venosa, em tubos estéreis tipo *vacutainer*® com anticoagulante EDTA. 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).

Esse método desenvolve-se essencialmente em cinco etapas:

- obtenção da camada de leucócitos por centrifugação do sangue total coletado com anticoagulante EDTA;
- lise de eritrócitos através do uso de tampão de lise de células vermelhas (RCLB 1X) pH 7,6;
- quebra da membrana nuclear com SDS a 20% remoção de enzimas como DNases e RNases por meio de proteinase K e tampão da proteinase K;
- precipitação de proteínas com NaCl 6M;
- precipitação do DNA com etanol absoluto.

Posteriormente, realizou-se a leitura de densidade óptica (através de espectrofotômetro NanoDrop®) para verificação da concentração e pureza, para realizar a diluição das amostras para uma concentração de uso de 50ng de DNA.

Identificação dos polimorfismos da região 5'URR

Tabela 1: Polimorfismos estudados no presente trabalho.

Região	SNPs	rs
-1306	A/G	rs116663600
-1179	A/G	rs114115214
-1155	A/G	rs115107669
-1140	T/A	rs115371574
-1138	A/G	rs114214896
-1121	C/T	rs114871936
-990	A/G	rs115338359
-964	A/G	rs116304399

Amplificação das regiões alvo

Após confirmação da pureza e concentração de cada amostra foi realizada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), contendo um volume final de 50µL, composto por tampão *Taq* 1X, 0,45pM de cada dNTP (*Invitrogen*), 2mM de MgCl, 2U *Taq* (*Invitrogen*), 20pM de cada oligonucleotídeo iniciador (*primer*) (*Forward* ACATTCTAGAAGCTTCACAAGAATG; *Reverse* GTGTGCCTTTGAATCCCGATGC) (descritos por SILVA, 2009a) e 50ng de DNA (Tabela 2). A PCR, é realizada a termo ciclagem com desnaturação inicial a 96°C por 5 minutos, seguindo-se 35 ciclos de 96°C por 30 segundos, 66°C por 30 segundos e 72° por 30 segundos, além de um alongamento final a 72°C por 5 minutos (Tabela 3), o produto amplificado obtido foi de 638pb.

Através do sequenciamento direto do DNA foram genotipados 8 SNPs compreendidos entre as posições -1446 e -964, da região reguladora e promotora do gene *HLA-G*. Os fragmentos da região promotora foram amplificados com protocolos diferenciados, a região de estudo compreende 638 bases, aqui chamadas de Fragmento 1 (FI -1446F/ -830R).

Tabela 2: Condições para a amplificação.

Água Ultrapura	34,95 µL
dNTPs (1,8pM)	5,0 µL
Tampão Taq 1X	6,0 µL
MgCl ₂	2,0 µL
Oligonucleotídeos Iniciadores (50pM)	0,4 µL
Taq Platinum Invitrogen	0,45 µL
DNA Molde	1,2 µL
Total	50,0 µL

Tabela 3: Condições de temperatura para a amplificação

Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
96°C	3 minutos	1 ciclo
96°C	1 minuto	35 ciclos
66°C	1 minuto	
72°C	1 minuto	
72°C	5 minutos	1 ciclo
4°C	∞	1 ciclo

Para confirmar a amplificação da região de interesse realizou-se a eletroforese do produto amplificado em gel de agarose 1%, misturando-se 3 μL do produto amplificado a 2 μL de gel de *red GelRed™* (Figura 1). A corrida do gel ocorreu a 125V, 70A, por 15 minutos, usando como tampão TBE 1x. 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 (Fragmentos 1) formadas pelo região de interesse, possibilitando progredir para a próxima etapa da técnica.

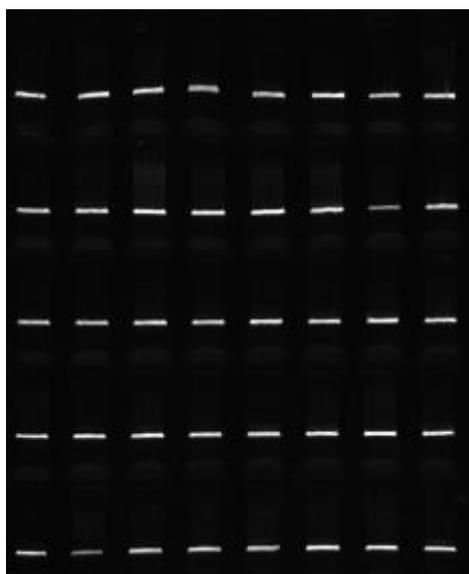


Figura1: Gel de agarose 1% para checagem da PCR.

Purificação

Em seguida foi realizada a purificação enzimática dos produtos de amplificação com *Exonuclease I* (*EXO I* – *Amersham Biosciences* - E70073Z (2.500U)), 8U, e Fosfatase Alcalina de Camarão (*Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP), *Amersham Biosciences* - E70092X 5000U), 1U, e tampão da SAP (Tabela 4) a 37°C por 1 hora e a 80°C durante 15 minutos para degradação das enzimas (Tabela 5). Posteriormente, a ação enzimática, foi adicionado 15 μL de Água MiliQ.

Tabela 4: Condições de purificação enzimática.

Produto de PCR	6,0 μ L
EXO (10U)	0,8 μ L
SAP (1U)	1,6 μ L
Tampão (10X)	0,8 μ L
Total	9,2 μ L

Tabela 5: Condições de temperatura para a purificação

	Temperatura	Tempo
Atividade enzimática	37°	60 min
Desativação enzimática	80°	15 min

Sequenciamento

As amostras foram submetidas à reação de sequenciamento de forma separada para cada *primer*, seguindo-se o procedimento: amostra de DNA amplificada e purificada na concentração de 50ng por reação; *primer* de seqüenciamento na concentração de 1,6 pM para 1,6 μ L; *BigDye*®(v3.1) 1,0 μ L; save tampão 1,5 μ L; água ultrapura 3,5 μ L (Tabela 6).

Tabela 6: Condições para a reação de seqüenciamento.

Reagente	Concentração
Produto purificado (50ng)	6,9 μ l
Primer (1,6pM)	1,6 μ l (1,6 pmol)
Big Dye	1,0 μ l
Tampão (Save) (10X)	0,5 μ l

Para reação de seqüenciamento foram utilizados os mesmos *primers* da PCR em associação com o kit *ABI PRISM*® *BigDye*®, 35 ciclos de 96°C por 15 segundos,

54°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto e 30 segundos, posteriores a desnaturação inicial a 96°C. A reação ocorreu conforme Tabela 7:

Tabela 7: Condições de temperatura para a seqüenciamento.

Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
96°C	1 minutos	1 ciclo
96°C	15 segundos	
54°C	15 segundos	35 ciclos
60°C	1 minuto e 30 segundos	1 ciclo
4°C	∞	1 ciclo

Precipitação

Precipitou-se o produto amplificado com os marcadores fluorescentes com acetato de sódio, seguindo o protocolo: foi adicionado aos 10 µl da reação de seqüenciamento 2µl de acetato de sódio e 25µl de etanol absoluto, homogeneizado mecanicamente (Vortex) por 30 seg e centrifugado a 4000 rpm por 40 min, o excesso foi retirado por *spin* invertido 800 rpm por 10 seg (em papel toalha), após foi adicionado 50µL de etanol 80%; homogeneizado mecanicamente (Vortex) e centrifugado a 4000 rpm por 10 min; seguido por *spin* invertido a 800 rpm por 10 seg, retirando o excesso, seguido por secagem de 5 min a 60°C em termociclador, adição de 12µl de Formamida (*HI FI*), homogeneização mecânica (Vortex) seguido de um *spin* a 800 rpm por 10 seg, termociclagem a 95°C por 3 min, choque térmico a -80°C por 40 seg e inserção no sequenciador ABI Prism 3130 (Applied Biosystems®).

Análise

As análises dos eletroferogramas (Figura 2) foram realizadas por comparação através do programa Seqscape® entre a sequência FASTA disponível na página <<http://www.ensembl.org/index.html>> e a sequência obtida pelo programa SeqAnalysis®. As frequências genotípicas e alélicas foram obtidas por contagem direta.

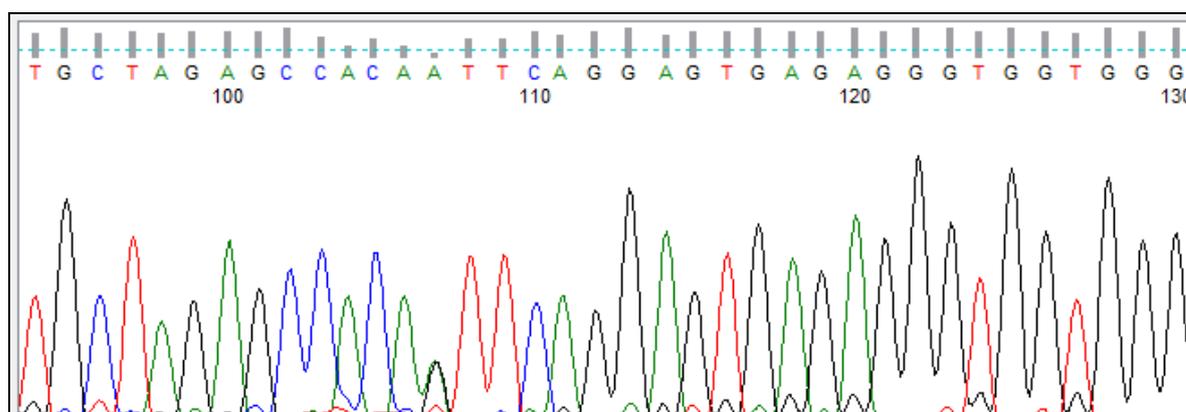


Figura 2: Parte de um eletroferograma, mostrando um indivíduo heterozigoto.

As genotipagens foram feitas por seqüenciamento da região -1446bp a -964bp contemplando 8 SNPs e os haplótipos inferidos através PHASE 2.0.

APÉNDICE II

ANEXO 1 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA



Curitiba, 27 de outubro de 2009.

Patrícia Pinho de França
Pesquisadora Responsável

Prezada Pesquisadora,

Gostaríamos de informar que o projeto de pesquisa intitulado como: **“Polimorfismos genéticos e expressão de genes relacionados ao sistema imune e ao ciclo celular no carcinoma uterino associado à infecção pelo papilomavírus humano”**, cujo número de protocolo é P.P. nº 1943 e tem como pesquisadora responsável V. Sa. foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e foi aprovado.

a) Projeto reapresentado e sem restrições.

Sem mais agradecemos a atenção e colocamo-nos a disposição para maiores esclarecimentos.

Dr. Jordan Zanetti Silva
Coordenador do Comitê de
Ética em Pesquisa
HEG - L.P. 110 - CRM-PR 14.457

Atenciosamente,

Membros do CEP:

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

ANEXO 2 – PARECER CONSUBSTANCIADO



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. Jurandir Zanetti Silva
Coordenador do Comitê de
Ética em Pesquisa
HEG - L.P.D. - CRM-PR 14.457

Membros do CEP:

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

ANEXO 3 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

a) Você está sendo convidado para participar na pesquisa intitulada " 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 Papanicolaou, 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 Papanicolaou 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 Papanicolaou 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 à 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

ANEXO 4 – QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO**HPV. Câncer Cervical. Estudo do HLA-G**

Questionário para avaliação dos fatores de risco.

ID: Nome: _____

Data de nascimento: _____

Estado civil: _____

RG/CPF: _____

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

2. Data da última relação sexual |_|_|

3. Número de parceiros sexuais desde o início da atividade sexual |_|_|

4. Número de parceiros sexuais nos últimos 12 meses |_|_|

5. Uso de preservativo nos últimos 12 meses:

i. regular |_| ii. ocasional |_| iii. nunca |_|

6. Uso de hormônios contraceptivos:

a. Faz uso de hormônios contraceptivos Sim |_| Não |_|

Qual

(is): _____

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

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

d. Usuária de DIU |_| sim |_| não

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

7. Número de gestações a termo (9 meses) |_|_|

i. Idade ao primeiro parto |_|_|

8. Escolaridade:

() Ens. Fundam. Incomp. () Ens. Médio Incomp. () Ens. Superior Incomp () Ens. Fund. Comp. () Ens. Médio Comp. () Ens. Superior Comp.

9. Etnia: () Branco () Preto () Pardo () Asiático

10. Fumante

a. **Nunca** |_|_|

b. **Ex-fumante** |_|_|

i. Parou a quanto tempo? (anos) |_|_|

ii. Fumou por quanto tempo (anos) |_|_|

iii. Cigarros/dia |_|_|

c. **Sim** |_|

i. Fuma há quanto tempo? (anos) |_|_|

ii. Cigarros/dia |_|_|

11. 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.

12. Cauterização:

a. Já teve alguma cauterização? Não |_|

Sim |_| Colo |_| Vagina |_| Vulva |_| Ânus |_|

13. Quantas citologias oncóticas (preventivo) foram feitas durante a vida? |_|

14. Quando foi o último preventivo? |_|_|_|_|_|

dia mês ano

15. Apresentou alguma citologia oncológica (PREVENTIVO) alterada? Sim

Não

Entrevistador

Data: Unidade de coleta: