

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
RENATA SLOWIK**

**POLIMORFISMO ins/del 14pb, ALELOS DO GENE *HLA-G*, EXPRESSÃO DE
sHLA-G E NEOPLASIAS INTRA-EPITELIAL CERVICAL DE GRAUS II (NIC II) E III
(NIC III)**

**CURITIBA
2012**

RENATA SLOWIK

POLIMORFISMO ins/del 14pb, ALELOS DO GENE *HLA-G*, EXPRESSÃO DE *sHLA-G* E NEOPLASIAS INTRA-EPITELIAL CERVICAL DE GRAUS II (NIC II) E III (NIC III)

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Genética da
Universidade Federal do Paraná.
Orientadora Prof^a. Dr^a. Maria da Graça Bicalho

CURITIBA

2012

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Slowik, Renata

Polimorfismo ins/del 14pb, alelos do gene *HLA-G*, expressão de *sHLA-G* e neoplasias intra-epitelial cervical de graus II (NIC II) e III (NIC III). / Renata Slowik. – Curitiba, 2012.

62 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Maria da Graça Bicalho

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Colo uterino – Cancer 2. Antígenos HLA-G 3. Virus do papiloma I. Título II. Bicalho, Maria da Graça III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação Genética.

CDD (20. ed.) 616.99466



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 **RENATA SLOWIK**, 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 ao candidato o conceito "B".

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

Curitiba, 27 de fevereiro de 2012

Doutor Newton Sergio Carvalho
Hospital de Clínicas/UFPR – Membro Titular

Professora Doutora Maria Luiza Petzl-Erler
Dep. Genética/UFPR – Membro Titular

Professora 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



AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais pelo apoio e dedicação que sempre tiveram comigo.

Especialmente ao Samuel, meu companheiro, amigo e colega, pelo carinho de sempre, pela paciência e apoio nas minhas horas de desespero e pelas indispensáveis aulas e auxílio que ajudaram a concluir esse trabalho. Sem você não sei onde estaria. Te amo.

À Fabíola. Companheira querida de laboratório, e amiga para desabafos e risadas. Obrigada por se aventurar nas técnicas laboratoriais comigo, pela ajuda e incentivo em todos os passos deste trabalho.

Obrigada à Equipe e colegas do LIGH pelo companheirismo e disposição.

Obrigada ao programa de Pós Graduação em Genética e aos seus professores pela minha formação.

Ao programa REUNI pelo apoio financeiro que permitiu realizar esse trabalho com dedicação exclusiva, e a FUNPAR pelo apoio financeiro que permitiu que esse projeto se desenvolvesse.

Por fim, muito obrigada a minha orientadora, Professora Dra. Maria da Graça Bicalho que tornou esse projeto possível pelo seu empreendedorismo, obrigada pelo seu apoio e confiança.

RESUMO

O câncer cervical (CC) é o segundo câncer que mais afeta mulheres no mundo todo, ele progride a partir de lesões no cervix uterino causadas pelo vírus HPV, estas lesões são denominadas neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC). As NICs são classificadas em lesão e baixo grau (NIC I) e lesões de alto grau (NIC II e III). O desenvolvimento do CC depende da persistência do vírus no organismo e esta persistência está diretamente relacionada com a eficiência da resposta imune contra as células infectadas. O antígeno leucocitário humano (*HLA*)-G é um gene HLA de classe I não clássico que apresenta um papel imunorregulatório. Ele é capaz de inibir a resposta imune quando interage com receptores inibitórios presentes nas células *Natural Killer* e em Linfócitos T. A proteína HLA-G pode ser expressa na forma ligada à membrana celular, ou solúvel (sHLA-G). A expressão de HLA-G já foi relacionada com diversas patologias e diferentes tipos de cânceres como uma estratégia de escape do sistema imune. Neste estudo o objetivo foi investigar a associação de polimorfismos do gene *HLA-G* e sua expressão solúvel com o desenvolvimento de lesões cervicais. A amostra constitui de 100 mulheres diagnosticadas com NIC II, 101 NIC III, e 106 mulheres saudáveis, negativas para NIC. Foi feita a tipagem alélicas para o gene *HLA-G* e para o polimorfismo de 14 pb presente no exon 8 deste gene; além disso foi realizada a quantificação sérica de sHLA-G. Não foi registrada associação entre a frequência dos alelos identificados na amostra, ou do polimorfismo de 14 pb e a quantificação de sHLA-G com predisposição ou proteção ao desenvolvimento de lesões cervicais. Também não foi possível definir associações entre os níveis séricos de sHLA-G com os alelos, ou com a presença ou ausência dos 14 pb.

Palavras chave: *HLA-G*, sHLA-G, HPV, NIC e câncer cervical.

ABSTRACT

Cervical cancer (CC) is the second cancer that most affects women worldwide, it progresses from lesions in the uterine cervix caused by HPV virus, these lesions are called cervical intraepithelial neoplasia (CIN). CINs are classified in low-grade (CIN I) and high-grade lesions (CIN II and III). The development of the CC depends on the persistence of the virus in the body and this persistence is directly related to the efficiency of the immune response against infected cells. Human leukocyte antigen (*HLA*)-G is an HLA class I non-classic that presents an immunoregulatory role. It is able to inhibit the immune response when interacting with inhibitory receptors present on natural killer cells and T lymphocytes. The HLA-G protein can be expressed in the membrane bound form, or soluble (sHLA-G). The expression of HLA-G has been associated with several diseases and different types of cancers as a strategy to escape from the immune system. In this study the aim was to investigate the association of polymorphisms of the *HLA-G* gene and its soluble expression with the development of cervical lesions. The sample consisted of 100 women diagnosed with CIN II, 101 with CIN III, and 106 healthy women negative for CIN. Allele typing for the gene *HLA-G* and for the 14 bp polymorphism present in exon 8 of this gene was done, also serum sHLA-G was quantified. No association was recorded between the frequency of the alleles identified in the sample, or 14 bp polymorphism and quantification of sHLA-G with predisposition or protection to the development of cervical lesions. Nor was it possible to define associations between serum levels of sHLA-G with the alleles, or the presence or absence of 14 bp.

Keywords: *HLA-G*, sHLA-G, HPV, NIC and cervical cancer.

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA.....	11
1.1	<i>CÂNCER CERVICAL: EPIDEMIOLOGIA.....</i>	<i>11</i>
1.2	<i>CÂNCER CERVICAL: FATORES DE RISCO.....</i>	<i>11</i>
1.3	<i>VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO – HPV.....</i>	<i>13</i>
1.3.1	<i>Infecção por HPV.....</i>	<i>16</i>
1.3.2	<i>Neoplasias Intraepitelial Cervical – NIC.....</i>	<i>18</i>
1.3.3	<i>Patogênese e Efeito Oncogênico.....</i>	<i>19</i>
1.4	<i>RESPOSTA IMUNE CONTRA O HPV.....</i>	<i>23</i>
1.5	<i>ESTRATÉGIAS DE RASTREAMENTO E PREVENÇÃO.....</i>	<i>25</i>
1.6	<i>MHC.....</i>	<i>26</i>
1.7	<i>HLA-G.....</i>	<i>29</i>
1.7.1	<i>O gene, a proteína e as isoformas do HLA-G.....</i>	<i>30</i>
1.7.2	<i>Polimorfismos no Gene HLA-G.....</i>	<i>31</i>
1.7.3	<i>HLA-G e a evasão da resposta imune tumoral.....</i>	<i>33</i>
1.7.4	<i>A expressão de HLA-G e correlação clínica no câncer.....</i>	<i>34</i>
2	OBJETIVO GERAL.....	38
2.1	<i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</i>	<i>38</i>
3	JUSTIFICATIVA.....	39
4	ARTIGO.....	40
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1– ESTRUTURA EXTERNA DO VÍRUS HPV, MOSTRANDO O CAPSÍDEO ICOSAÉDRICO CONSTITUÍDO POR 72 CAPSÔMEROS.	14
FIGURA 2 – ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO ..	16
FIGURA 3 – ESQUEMA DE EVENTOS MOLECULARES ASSOCIADOS AO VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO (HPV) ENVOLVIDOS NA CARCINOGENESE CERVICAL	18
FIGURA 4 – MECANISMO DA CARCINOGENESE POR HPV	21
FIGURA 5 – MAPA DO COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE (MHC) HUMANO.....	28
FIGURA 6: ESQUEMA DA CONSTITUIÇÃO DO GENE HLA-G E SUAS ISOFORMAS.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	- <i>Antigen Presenting Cell</i> (Célula Apresentadora de Antígeno)
ASCUS	- <i>Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance</i> (Células Escamosas Atípicas de Significância Indeterminada)
BaP	- Benzo[a]pireno
CC	- Câncer Cervical
CKI	- <i>Cyclin Kinase Inhibitor</i> (Inibidores de Ciclina-Quinase)
CL	- Células de Langerhans
CT	- <i>Chlamydia trachomatis</i>
CTL	- <i>Citotoxic T Lymphocytes</i> (Linfócitos T Citotóxicos)
E	- Região de proteínas de expressão precoce (<i>early proteins</i>)
ELISA	- <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> (Ensaio Imunoenzimático Direto)
E6AP	- Proteína ligase associada à E6
GM-CSF	- Fator Estimulante de Colônia de Granulócitos-Macrófagos
HIV	- <i>Human Immunodeficiency virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana)
HLA	- <i>Human Leucocytes Antigens</i> (Antígenos Leucocitários Humano)
HPV	- <i>Human Papillomavirus</i> (Vírus do Papiloma Humano)
HSIL	- <i>High-Grade Squamous Intraepithelial Lesions</i> (Lesão Escamosa Intra-epitelial de Alto Grau)
HSV-2	- <i>Herpes Simplex Virus 2</i> (Vírus do Herpes Simples do Tipo II)
IARC	- <i>International Agency for Research on Cancer</i>
IFN	- Interferon
ICESCC	- <i>International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer</i> (Colaboração internacional de Estudos Epidemiológicos do Câncer Cervical)
ILT	- <i>Immunoglobulin-Like Transcrip</i> (Transcritos Tipo Imunoglobulinas)
IL- 10	- Interleucina 10
KIR	- <i>Killer Immunoglobulin-like receptors</i> (Receptores de Células NK Semelhantes a Imunoglobulinas)
L	- Região de proteínas de expressão tardia (<i>late proteins</i>)
LCR	- <i>Long Control Region</i> (região longa de controle)
LIF	- <i>Leucocyte Inhibitory Factor</i> (Fator Inibitório de Leucócitos)
LRC	- <i>Leukocyte Receptor Complex</i> (Complexo de Receptores Leucocitários)
LSIL	- <i>Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions</i> (Lesão Escamosa Intra-epitelial de Baixo Grau)
MHC	- <i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complexo Principal de Histocompatibilidade)
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	- <i>Natural Killer Cells</i>
OR	- <i>Odds Ratio</i> (Razão de Probabilidades)
ORFs	- <i>Open Reading Frames</i> (Matriz Aberta de Leitura)
PCR	- <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)

<i>RB1</i>	- Gene do Retinoblastoma 1
RR	- Risco Relativo
RT-PCR	- <i>Reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction</i> (Reação da Transcriptase Reversa seguida de Reação Cadeia da Polimerase)
TAP	- Transportador Associado ao Processamento de Antígeno
TCR	- Receptores de células T
TGF β	- Fator de Crescimento Tumoral β
TNF α	- Fator de Necrose Tumoral α
<i>TP53</i>	- Tumor Protein p53 Gene
UTR	- <i>Untranslated Region</i> (Região não Traduzida)

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 CÂNCER CERVICAL: EPIDEMIOLOGIA

Com aproximadamente 500 mil novos casos por ano, o câncer cervical (CC) é um dos tipos de cânceres mais incidentes em todo mundo, 80% de todas as mortes por CC ocorrem em países em desenvolvimento (PARKIN *et al.*, 2005). O CC é o segundo tipo de câncer mais comum entre as mulheres (WHO/ICO, 2010; BRASIL. Ministério da Saúde, 2010).

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, estima-se, para o ano de 2012, a ocorrência de 518.510 casos novos de câncer, sendo esperados 17.540 novos casos de câncer no colo do útero (BRASIL. Ministério da Saúde, 2012).

A incidência do câncer de colo do útero 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, 2012).

Estima-se que cerca de 25% das mulheres da população brasileira estejam infectadas pelo vírus e, somente uma pequena fração (entre 3% a 10%) das mulheres infectadas com um tipo de HPV com alto risco de câncer desenvolverá câncer do colo do útero (BRASIL. Ministério da Saúde, 2012).

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

1.2 CÂNCER CERVICAL: FATORES DE RISCO

A presença de infecção pelo HPV é reconhecida como um pré-requisito para o surgimento do câncer do colo do útero, e determinados tipos de HPV são designados como uma condição necessária para o CC (PRENDIVILLE e DAVIES,

2004). As lesões epiteliais malignas e pré-malignas 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, responsáveis por, aproximadamente, 70% de todos os cânceres cervicais de todo o mundo (CASTELLSAGUÈ, 2008).

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

O tabagismo parece aumentar o risco de CC em mulheres positivas para o HPV. Subprodutos carcinogênicos do tabaco, como a nicotina e a cotidina, podem danificar diretamente o DNA das células cervicais ou comprometer a resposta imunológica local, facilitando a persistência do HPV (CASTELLSAGUE e MUÑOZ, 2003).

Mulheres com elevado número de gestações também têm um risco maior de desenvolver a doença, podendo estar relacionado com a manutenção prolongada da zona de transformação na exocérvice ou a alterações hormonais, como níveis aumentados de estrogênio e progesterona (HILDESHEIN et al.,2001; CASTELLSAGUE e MUNOZ, 2003).

A infecção concomitante com outros agentes infecciosos como o vírus da Imunodeficiência humana (HIV), ou o vírus do herpes simples tipo II (HSV-2) e as bactérias *Chlamydia trachomatis* (CT) e *Neisseria gonorrhoeae* (NG) também foram relacionados ao aumento do risco ao CC. O HSV-2, a CT e a NG causariam uma reação inflamatória gerando a produção de radicais livres e levando ao desenvolvimento de instabilidade genética, e o HIV estaria relacionado ao estado de imunossupressão, o que reforça a importância de co-fatores imunológicos do hospedeiro na carcinogênese pelo HPV (SMITH et. al., 2002; WHO, 2010)

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

Além disso, o baixo nível sócio-econômico também tem sido relacionado como um fator de risco ao CC, uma vez que muitas mulheres não têm acesso adequado aos serviços de saúde. Tais mulheres também podem apresentar subnutrição o que poderia aumentar o risco do desenvolvimento de CC. (HERRERO *et al.*, 1991).

A susceptibilidade genética também teria grande impacto no CC. Mulheres com histórico familiar de CC são mais sujeitas ao desenvolvimento da doença, por uma condição herdada, levando a uma menor capacidade em combater a infecção pelo HPV. Estudos epidemiológicos genéticos mostraram que os fatores genéticos contribuem significativamente ao risco da doença (MAGNUSSON e GYLLENSTEN, 2000).

1.3 VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO – HPV

A classificação mais utilizada dos HPVs agrupa os 40 tipos que infectam a área genital ao gênero alfa, enquanto os tipos associados com epidermodisplasia verrucosiforme cutânea, ao gênero beta. Os tipos genitais de HPV podem ser classificados segundo o risco que conferem ao desenvolvimento de lesões neoplásicas do colo uterino em: Tipos de baixo risco (HPVs 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81) causadores de verrugas genitais externas (condiloma acuminado) e lesões benignas do colo uterino; Tipos de alto risco: encontrados em lesões de alto grau e carcinoma invasor (citados abaixo); e Tipos de risco indeterminado (DE VILLIERS *et al.*, 2004; PRENDIVILLE e DAVIES, 2004).

Dos mais de 200 HPVs reconhecidos, dos tipos que infectam a área genital cerca de 16 têm potencial oncogênico (GARLAND, 2002). Os tipos 16, 18, 26, 31,

33, 35, 39, 45, 50, 51, 52, 53, 56, 55, 56, 58, 59, 60, 64, 68 e 73 são oncogênicos, (MOTOYAMA, *et al.*, 2004). Os tipos oncogênicos de alto risco prevalentes mundialmente são 16, 18, 31, 45 e 56 (MUÑOZ *et al.*, 2002; STUBENRAUCH e IFTNER, 2009).

As partículas virais completas não são envelopadas, são envolvidas por um capsídeo composto por duas proteínas estruturais que se organizam em 72 subunidades (capsômeros) num arranjo icosaédrico (poliedro constituído por 20 faces de triângulos equiláteros), com cerca de 50 a 55nm de diâmetro (FIGURA 1) (HOWLEY, 1994; ZUR HAUSEN, 2002; HOORY *et al.*, 2008).

O capsídeo do vírus *HPV* é formado por 2 proteínas estruturais, L1 e L2, sendo a primeira correspondente a 90% do conteúdo protéico do vírus. Os capsômeros protéicos revestem o DNA dupla fita, circular, que contém cerca de 8000 pares de bases (SPPV, 2009).

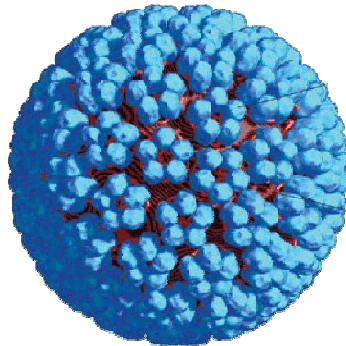


FIGURA 1– ESTRUTURA EXTERNA DO VÍRUS HPV, MOSTRANDO O CAPSÍDEO ICOSAÉDRICO CONSTITUÍDO POR 72 CAPSÔMEROS.
FONTE: SPPV, 2009

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

O genoma do HPV divide-se em 3 regiões: região de proteínas precoces (E), região de proteínas tardias (L) e região longa de controle (LCR), sem potencial codificante, que inclui promotores e seqüências reguladoras (FIGURA 2) (PRENDIVILLE e DAVIES, 2004).

A região E possui de 7 a 8 genes (*E1 – E8*). O produto do gene *E1* é envolvido com a replicação viral, com o controle da transcrição gênica, além de ter função de helicase. Essa proteína é similar entre todos os tipos virais. O produto do gene *E2* é um fator transcricional viral, essencial para a replicação viral e controle transcricional, além de promover a segregação do genoma e encapsulamento. A proteína codificada pelo gene *E4* interage com proteínas do citoesqueleto (citoqueratina), e é responsável pela montagem e liberação do vírus. Os genes *E5*, *E6* e *E7* codificam proteínas envolvidas com a estimulação da proliferação celular, imortalização e transformação da célula, através da interação com proteínas celulares. Os genes *E3* e *E8* codificam produtos sem função conhecida, estando presentes apenas em uma minoria dos HPVs. Em 2004, foi descrita uma nova proteína E2, a qual consiste na fusão do produto formado pela pequena ORF E8 com parte da proteína E2. Essa fusão protéica é capaz de reprimir a replicação e a transcrição do DNA viral e, portanto, acredita-se que ela desempenha o papel principal na manutenção da latência viral observada nas células basais do epitélio infectado. A região L contém 2 genes: *L1*, o qual codifica a principal proteína do capsídeo e *L2*, que codifica a proteína secundária que compõe o capsídeo. A região LCR, formada por 500 a 1000pb, é formada pela origem de replicação e outras regiões reguladoras, as quais contêm elementos *cis* que regulam a expressão gênica, a replicação e o empacotamento de partículas virais (PRENDIVILLE e DAVIES, 2004).

Os vírus HPVs descritos são classificados em tipos, subtipos ou variantes com base na homologia do seu DNA. Um novo tipo é definido quando possui menos de 90% de homologia com a seqüência nucleotídica de L1, após o seqüenciamento

completo do genoma. Os subtipos são definidos quando apresentam entre 2 e 10% de divergência com a seqüência nucleotídica de L1, enquanto as variantes apresentam menos de 2% de divergência (BERNARD *et al.*, 1994).

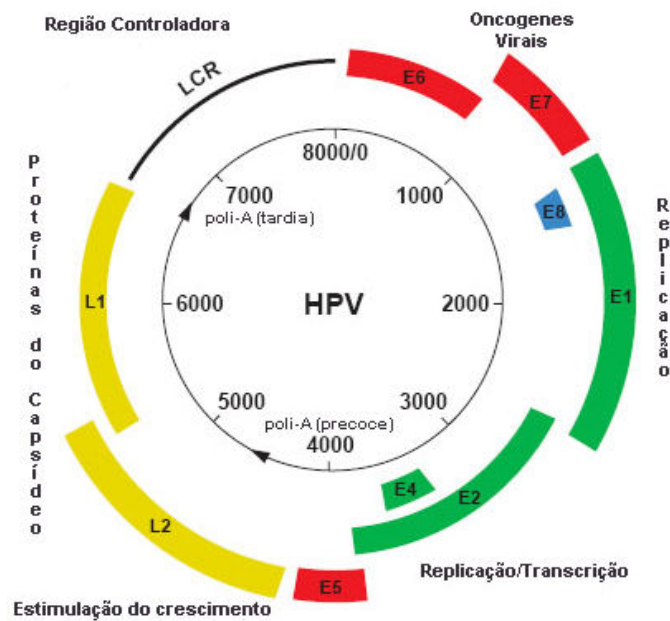


FIGURA 2 – ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO
 FONTE: PRENDIVILLE e DAVIES, 2004.

1.3.1 Infecção por HPV

O HPV é transmitido de uma pessoa para outra através do contato sexual com a pele da região afetada, não sendo necessário o contato com fluidos corporais. A infecção por HPV pode envolver áreas que não são facilmente cobertas por preservativos ou que o uso não ofereça proteção contra a infecção (CANCER RESERCH UK., 2008).

Os HPVs podem causar verrugas ou papilomas, os quais são tumores benignos, em várias partes do corpo. Os que ocorrem nas regiões genitais feminina e masculina e na região anal são denominados condiloma acuminado e são

causados em sua maioria pelos HPV's 6 e 11, raramente relacionados ao CC e classificados como de baixo risco (BRASIL. Ministério da Saúde, 2012).

A infecção por *HPV* tem um padrão transitório, sendo que a maioria das mulheres infectadas pelos tipos de *HPV* causadores de CC não desenvolve a doença. Geralmente, a infecção desaparece sem nenhum tratamento e o vírus é eliminado devido à ação do sistema imune, em um período de 12 a 24 meses após o diagnóstico inicial a maioria das mulheres já eliminou o vírus naturalmente (70% a 90%) (HO *et al.*, 1998). A infecção persistente, incidente em 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 em uma média de 9 a 15 anos após a infecção persistente (KOUTSKZ *et al.*, 1997).

Após a infecção pelo *HPV* a sucessão dos eventos moleculares biológicos pode seguir diferentes vias, podendo resultar na eliminação completa do vírus, no desenvolvimento de lesões precursoras do CC e no desenvolvimento do CC. Se o vírus não é eliminado pelo organismo, ele pode desencadear anormalidades nucleares primárias, incluindo a tetraploidização, que levam à formação de Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau I (NIC I), em um prazo médio de 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 e 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, quando os clones celulares com propriedades invasivas possuem vantagem de crescimento (FIGURA 3) (SOUTHERN e HERRINGTON, 1998).

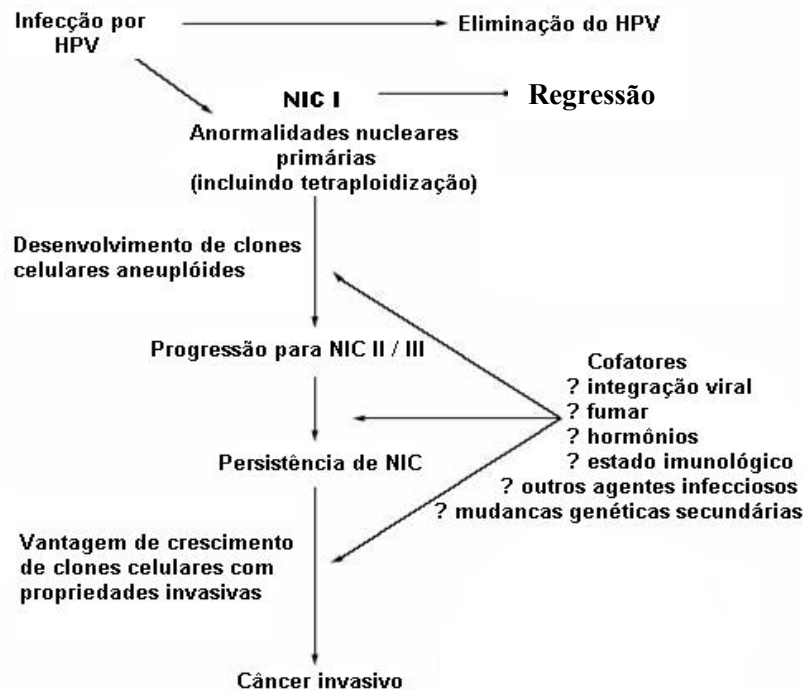


FIGURA 3 – ESQUEMA DE EVENTOS MOLECULARES ASSOCIADOS AO VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO (HPV) ENVOLVIDOS NA CARCINOGÊNESE CERVICAL

FONTES: SOUTHERN e HERRINGTON, 1998. Adaptado

NOTA: NIC – Neoplasia Intraepitelial Cervical

1.3.2 Neoplasias Intraepitelial Cervical – NIC

Lesões pré-cancerígenas são aquelas que, em princípio, possuem o potencial de progredir para um CC invasivo, se não tratadas. Fenotipicamente, são caracterizadas pela presença de DNA de *HPV* de alto risco e por instabilidade cromossômica que resulta em aneuploidias. (IARC, 2005).

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

1.3.3 Patogênese e Efeito Oncogênico

O cérvix uterino possui forma cilíndrica e constitui o terço inferior do útero que se estende até a vagina. Ele possui uma abertura central que se abre no canal endocervical o qual possui comunicação com a cavidade uterina (IARC, 2005).

Devido a escoriações ou microlesões na superfície mucocutânea, o vírus *HPV* infecta a camada de células basais do epitélio escamoso estratificado do cérvix uterino. Essas células constituem a camada germinativa responsável pela divisão celular e pela manutenção do mecanismo de substituição das células superficiais que descamam. As células basais expressam duas moléculas das famílias das integrinas, $\alpha 6\beta 1$ e $\alpha 6\beta 4$, identificadas como os receptores do *HPV* (FRAZER e TINDLE, 1992; EVANDER *et al.*, 1997).

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

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

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

O *HPV* afeta as células-tronco, onde baixos níveis de DNA viral são sintetizados, com um número de 50 a 100 genomas episomais (DNA não integrado ao cromossomo) por célula. O vírus se auto-replica, expressando as proteínas precoces na camada proliferativa e mais tarde nas células mais diferenciadas, onde

ocorre a síntese do capsídeo e as partículas virais são estruturadas, resultando em alto nível de replicação do genoma viral (FRAZER e TINDLER, 1992).

As proteínas E6 e E7 são as oncoproteínas virais mais importantes. A transcrição dos genes *E6* e *E7* é continuamente observada em carcinomas cervicais, sendo esse o primeiro indício de um importante papel desses genes na tumorigênese associada ao HPV (PRENDIVILLE e DAVIES, 2004). Um esquema simplificado demonstrando o mecanismo de carcinogênese devido ao HPV é demonstrado na FIGURA 4.

A ORF E6 codifica uma pequena proteína de aproximadamente 150 aminoácidos e peso molecular de 16-18kDa. Uma cooperação com a proteína E7 é requerida para uma capacidade completa de transformação e imortalização celular (PRENDIVILLE e DAVIES, 2004).

O mecanismo de ação da proteína E6 é a inibição da função da proteína supressora de tumor p53, produto do gene *TP53* (*tumor protein p53*). 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.

Em células não infectadas a degradação de p53 mediada por ubiquitina é acionada pela proteína mdm-2, enquanto em células infectadas por HPV de alto risco o complexo E6-E6AP substitui o mdm-2 no controle dos níveis de p53, levando p53 à degradação proteolítica através da via da ubiquitina, diminuindo os níveis de p53 nas células infectadas. Essa mudança reduz drasticamente a meia-vida de p53 de 3 horas para 20 minutos, diminui a função biológica e reduz o nível da proteína p53 em células do carcinoma cervical a menos da metade do nível encontrado em células de um epitélio normal (WERNESS, LEVINE e HOWLEY, 1990). 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).

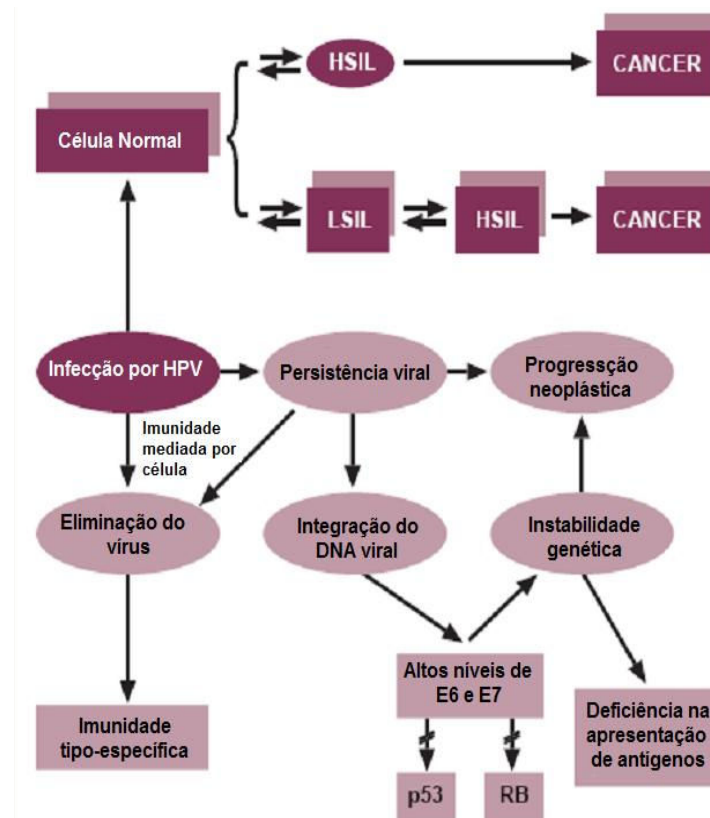


FIGURA 4 – MECANISMO DA CARCINOGENESE POR HPV

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).

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). Com o decorrer do tempo, portanto, uma célula persistentemente infectada adquire cada vez mais falhas em importantes genes do controle celular, os quais se tornam cruciais para a progressão maligna da célula infectada (STUBENRAUCH e IFTNER, 2009).

A oncoproteína E7 é uma pequena fosfoproteína nuclear, de aproximadamente 100 aminoácidos e peso molecular de 10kDa. 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, pela interação com a família E2F dos fatores transcricionais, controla a replicação celular (BOYER, WAZER e BAND, 1996).

Após lesões no DNA, a proteína p53 normalmente é ativada e induz inibidores de ciclina-quinase (CKI), assim como quinases (ciclina D,E-quinase), as quais são responsáveis pela fosforilação de pRb, produto do gene retinoblastoma (*RB1*). A ausência de fosforilação faz com que os fatores transcricionais E2F permaneçam ligados à Rb e o ciclo celular permanece detido na fase G1, até o dano no DNA ser reparado, através do sistema de reparo do DNA (STUBENRAUCH e IFTNER, 2009).

A ligação de E7 à forma ativa de pRb leva à fosforilação da pRb e subsequente liberação dos fatores transcricionais E2F que estimulam a entrada da célula na fase-S do ciclo celular, desencadeando a replicação (MUNGER, BASILE e DUENSING, 2001). Essa interação induz múltiplas respostas celulares, incluindo mecanismos que estabilizam p53, a qual, portanto, não controla a proliferação celular (PRENDIVILLE e DAVIES, 2004).

Os tipos de HPV anogenital de baixo risco, como o HPV 6, são incapazes de degradar p53, portanto, a capacidade das proteínas E6 e E7 dos tipos virais anogenital degradarem p53 ou pRb parece estar correlacionada com seu potencial oncogênico. Essa correlação não tem sido demonstrada para os HPVs cutâneos (PRENDIVILLE e DAVIES, 2004).

1.4 RESPOSTA IMUNE CONTRA O HPV

O epitélio é uma interface entre o vírus e o ambiente, e o vírus e o sistema imune. Existe uma imunidade local natural no cérvix contra vírus e bactérias. Na região cervicovaginal há bacilos de Doderlein, naturais da vagina, que secretam ácido láctico, abaixando o pH da vagina, promovendo um microambiente ácido, que também dificulta infecções. Além disso, as células epiteliais secretam defensinas, que são peptídeos com atividade antibacteriana e antiviral que são drenados através do muco cervicovaginal (HO *et al.*, 1998).

Quando a imunidade local não é suficiente para impedir a infecção por *HPV*, o vírus infecta as células basais, tendo como alvo as células tronco. A expressão de altos níveis de proteínas virais ocorre apenas nas camadas superficiais do epitélio escamoso. O tempo desde a infecção até a liberação do vírus é de aproximadamente 3 semanas (que é o tempo que um queratinócito da camada basal completa a sua diferenciação e sofre descamação naturalmente), e esse período é denominado período de incubação (ORIEL, 1971; MIDDLETON *et al.*, 2003). Sabe-se que a vigilância imune sistêmica e local pode explicar a latência da infecção por *HPV* genital (GONÇALVES e DONADI, 2004).

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 se encontram em maior concentração no epitélio da mucosa cervical que na vagina e 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+ (RONCALI *et al.*, 1988).

Os queratinócitos do epitélio cervical têm o potencial de apresentar peptídeos virais, uma vez que o *HPV* multiplica-se dentro dessas células sem causar a sua lise. Eles também expressam moléculas *MHC-II*, entretanto, apenas sob

indução, principalmente do INF- γ e não constitutivamente. Sendo assim os queratinócitos também gerariam uma fonte de citocinas, e induziriam resposta imune pelas células T (GONÇALVES e DONADI, 2004).

Além das células citadas acima, populações de monócitos e macrófagos também foram encontradas na mucosa do trato uterino. Em tecidos não afetados há um maior número de macrófagos em relação ao número de CL, ao contrário do que ocorre em tecidos afetados (BANKS *et al.*, 1991).

As células *natural killer* (NK) também são importantes na infecção por HPV, uma vez que a quantidade dessas células aumenta em displasias mais severas. Os interferons (INF) de tipo 1, interferon- α e interferon- β são sintetizados pelas células infectadas e têm atividade antiviral, antiproliferativa, antiangiogênica e propriedades imunestimulatórias que ativam as células dendríticas imaturas (LE BON e TOUGH, 2002; THEOFILOPOULOS *et al.*, 2005).

Normalmente, quando uma célula é infectada por um vírus, os antígenos virais são ubiquitinados, e levados ao proteassoma, onde sofrem degradação. Os fragmentos do peptídeo viral são transportados ao retículo endoplasmático através das proteínas transportadoras TAP1 e TAP2, e lá se associam às moléculas MHC-I. O complexo resultante é expresso na membrana celular, e o peptídeo viral é apresentado aos linfócitos TCD8+. A interação da APC com o linfócito TCD8+ ativa os linfócitos T citotóxicos, que secretam perforina e granzima que provocam a lise da célula infectada.

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

Na maioria dos casos, a infecção por *HPV* é eliminada, mesmo quando já foram desenvolvidas NIC I e II e o vírus presente é potencialmente oncogênico. Entretanto, alguns estudos demonstraram que o vírus não é associado, em alguns casos, com alterações histopatológicas. Nesses casos a infecção é caracterizada por *HPV* latente, ocorrendo assintomaticamente, o que demonstra a atividade de um mecanismo de defesa funcional dos vírus. Quando o sistema imune não é sinalizado quanto à presença do vírus no organismo, pode resultar em cronicidade e persistência da infecção.

1.5 ESTRATÉGIAS DE RASTREAMENTO E PREVENÇÃO

A prevenção primária do câncer do colo do útero pode ser realizada através do uso de preservativos durante a relação sexual, embora o uso dos mesmos não impeça totalmente a transmissão do vírus. Já a prevenção secundária seria através da realização do exame preventivo do câncer do colo do útero (BRASIL. Ministério da Saúde, 2010).

Até a década de 90, o teste Papanicolaou ou citologia cervical constituiu-se na principal estratégia utilizada em programas de rastreamento voltados para o controle do câncer do colo do útero. O exame consiste na coleta de material citológico do colo do útero, sendo coletada uma amostra da parte externa (ectocérvice) e outra da parte interna (endocérvice) (BRASIL. Ministério da Saúde, 2010).

O exame deve ser realizado em todas as mulheres com vida sexual ativa ou não, pelo menos uma vez ao ano. Novos métodos de rastreamento como testes de detecção do DNA do *HPV* e inspeção visual do colo do útero são apontados em vários estudos como eficazes na redução das taxas de mortalidade por câncer do colo do útero (BRASIL. Ministério da Saúde, 2010).

No início dos anos 90 (1991 – 1993), foram desenvolvidas duas vacinas contra os tipos virais mais presentes no câncer de colo do útero (HPV-16 e HPV-18) (JAVIER e BUTEL, 2008). Mas o real impacto da vacinação contra o câncer de colo de útero só poderá ser observado após décadas. Há duas vacinas comercializadas no Brasil. Uma delas é a quadrivalente, ou seja, previne contra os tipos 16 e 18, presentes em 70% dos casos de câncer de colo do útero e contra os tipos 6 e 11, presentes em 90% dos casos de verrugas genitais. A outra é específica para os subtipos 16 e 18 (BRASIL. Ministério da Saúde, 2010).

1.6 MHC

Os linfócitos T possuem os receptores de células T (TCR) que reconhecem antígenos apresentados pelas células apresentadoras de antígenos (APCs). A capacidade das APCs apresentarem antígenos às células T é devida à presença de proteínas especializadas codificadas por genes presentes no Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*) (ALAM *et al.*, 1996).

Nas décadas de 60 e 70 foi descoberto que os genes do *MHC* eram fundamentais para todas as respostas imunológicas contra antígenos protéicos, uma vez que codificam moléculas MHC que têm habilidade de ligar e apresentar peptídeos derivados de várias proteínas antigênicas (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

O Complexo de Histocompatibilidade Humano (HLA, do inglês *Human Leucocyte Antigen*) foi descoberto na década de 50, por Dausset, Payne e van Rood. (BELL, 1989).

O sistema gênico HLA encontra-se no cromossomo 6 na banda 6p21.31 e abrange 4 megabases de extensão. Essa região possui diversos genes associados ao sistema imune, sendo vários não pertencentes ao sistema *HLA* (PARHAM, 2001). Essa região do genoma, de acordo com a estrutura e função das proteínas

codificadas a partir dos genes nela existentes, foi subdividida em regiões de classe I, II e III (FIGURA 5) (CHRISTIANSEN et al., 1994).

Na região de Classe I situam-se os genes *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C*; conhecidos como HLA clássicos, ou de classe Ia; e *HLA-E*, *HLA-F* e *HLA-G*; conhecidos como HLA não clássicos ou de classe Ib. Os genes clássicos codificam para a cadeia α das moléculas HLA de classe I cuja estrutura se completa com uma cadeia leve de β 2-microglobulina, codificada por um gene de mesmo nome localizado no cromossomo 15, são expressos em todas as células nucleadas. Os genes não clássicos apresentam distribuição tecidual restrita, são pouco polimórficos e podem apresentar diferentes isoformas, devido ao processamento alternativo do mRNA. (LEWIN, 2001; FAINARDI et al., 2003).

Na região de Classe II situam-se os genes que codificam para as proteínas ou antígenos de Classe II, *HLA-DR*, *HLA-DQ* e *HLA-DP*. As moléculas codificadas pelos genes *HLA-DRA* e *-DRB*, *-DQA* e *-DQB*, *-DPA* e *-DPB* estão presentes apenas em células do sistema imune como os linfócitos B e T, e macrófagos. Também na região de Classe II encontram-se os genes *TAP1*, *TAP2* e *LMP2*, entre outros, que codificam para produtos moleculares que não são de antígenos de histocompatibilidade, mas possuem importante papel na implementação da resposta imune adaptativa (LEWIN, 2001).

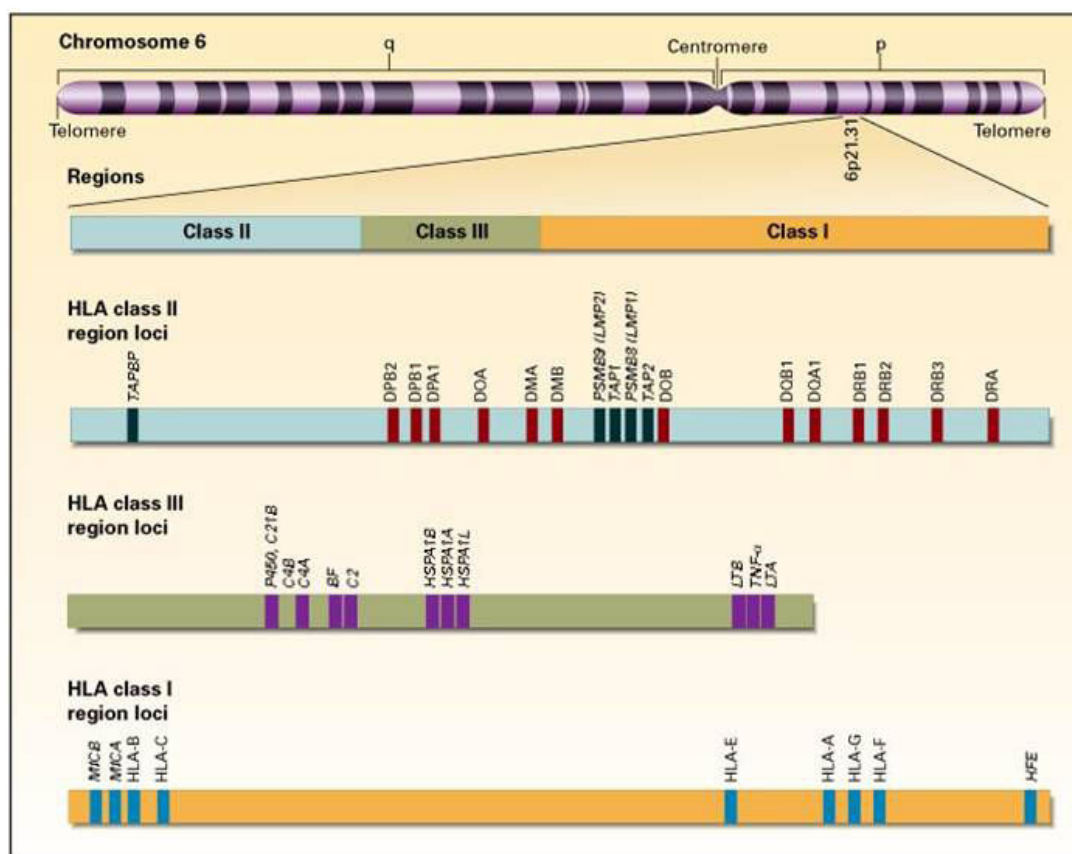


FIGURA 5 – MAPA DO COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE (MHC) HUMANO
 FONTE: <http://e-gastroped.com.br/jun05/cel02.jpg> (Sociedad Latinoamericana de Gastroenterología Pediátrica, Hepatología y Nutrición, 2006). Adaptado.

A região de Classe III, localizada entre as regiões de classe I e II, contém pelo menos 59 genes e possui a maior densidade gênica das três regiões *HLA*. Entretanto, não é conhecido se todos os genes identificados na Região III são funcionais ou pseudogenes. Foram definidos genes que atuam no processo de ativação do sistema complemento (*Bf*, *C2*, *C4A*, *C4B*) e genes da 21-hidroxilase, *TNF* e *LTA*, que codificam as citocinas $TNF-\alpha$ e $LT-\alpha$ (antigo $TNF-\beta$) respectivamente, além de genes para susceptibilidade a doenças como a Doença de Graves, Doença de Crohn, entre outros (MATSUZAKA et al. 2001).

Há algum tempo, alelos *HLA-I* alterados em pacientes com CC têm sido reconhecidos e a presença de alguns alelos *HLA-II* específicos podem ser decisivos no risco ao CC (SOUTHERN e HERRINGTON, 1998). O mecanismo mais

possivelmente envolvido é uma hipo-regulação desses antígenos durante a carcinogênese cervical (SOUTHERN e HERRINGTON, 1998).

Devido à grande importância desses genes nos processos imunológicos e a identificação de associação com CC em outras populações, será investigada nesse trabalho a existência de associação entre variantes alélicas do gene *HLA-G* em mulheres da região sul do Brasil, as quais desenvolveram NIC II e III.

1.7 *HLA-G*

HLA-G possui uma limitada distribuição tecidual (HVIID et al., 1997). Inicialmente, foi detectado no fluido amniótico e soro de mulheres grávidas, e pensava-se que estivesse restrito somente a estes, mas, posteriormente, detectou-se que 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 L 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).

Alguns tecidos expressam *HLA-G* na tentativa de subverter a resposta imune favorecendo o escape tumoral e inibindo o ataque das células tumorais por células *natural killer* (NK) e linfócito T citotóxico, porém o grau de expressão da molécula varia de acordo com o tecido (ROUAS- FREISS et al., 2005).

De modo semelhante aos tumores, os vírus desenvolvem estratégias para escapar do sistema imune. Sendo assim a indução da expressão da molécula de *HLA-G* por células infectadas por vírus pode ser um mecanismo adicional e induzido 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).

1.7.1 O gene, a proteína e as isoformas do HLA-G

O gene HLA-G é composto por oito exons, sete introns e uma região 3' não traduzida (3' UTR) pertencente ao exon 8. O exon 1 codifica o peptídeo sinal; os exons 2, 3 e 4 codificam os domínios α_1 , α_2 e α_3 respectivamente; o exon 5 codifica a região transmembrana; os exons 6, 7 e 8 codificam o domínio citoplasmático. O exon 6 apresenta um códon de terminação (UGA) que leva à produção de uma proteína truncada com a perda de 19 resíduos de aminoácidos, que nas moléculas HLA clássicas são altamente conservados. Como conseqüências a região ou cauda citoplasmática da cadeia α da proteína HLA-G possui apenas 6 aminoácidos, enquanto nas moléculas de classe Ia essa cauda possui 30 aminoácidos. (VAN DER VEN et al., 2000; CAROSELLA et al., 1999).

O transcrito primário do mRNA de HLA-G pode sofrer processamento alternativo, gerando sete isoformas de proteínas distintas HLA-G1, -G2, -G3 e -G4 ligadas à membrana e as formas solúveis HLA-G5, -G6 e -G7 (FIGURA 6) (PAUL et al., 2000).

HLA-G-1 possui os três domínios extracelulares, um domínio transmembrana e uma cauda citoplasmática curta. Um processamento alternativo que resultou nas isoformas HLA-G2, -G3, e -G4 e que exclui respectivamente o éxon 3, os éxon 3 e 4, ou o éxon 4 geram isoformas que retêm somente o domínio α_1 para -G3, os domínios α_1 e α_3 para -G2 e os domínios α_1 e α_2 para -G4 unidos a região transmembrana. As formas solúveis HLA-G5 e HLA-G6 são devidas à tradução do intron 4, o qual contém um códon de parada, evitando a tradução das seqüências transmembrana e citoplasmática. Já a isoforma solúvel HLA-G7 é decorrente da retenção do intron 2 ao mRNA, produzindo uma molécula com 117 aminoácidos que contém apenas o domínio α_1 da molécula ligado a 2 aminoácidos no terminal carboxila codificado pelo intron 2 (PAUL et al., 2000).

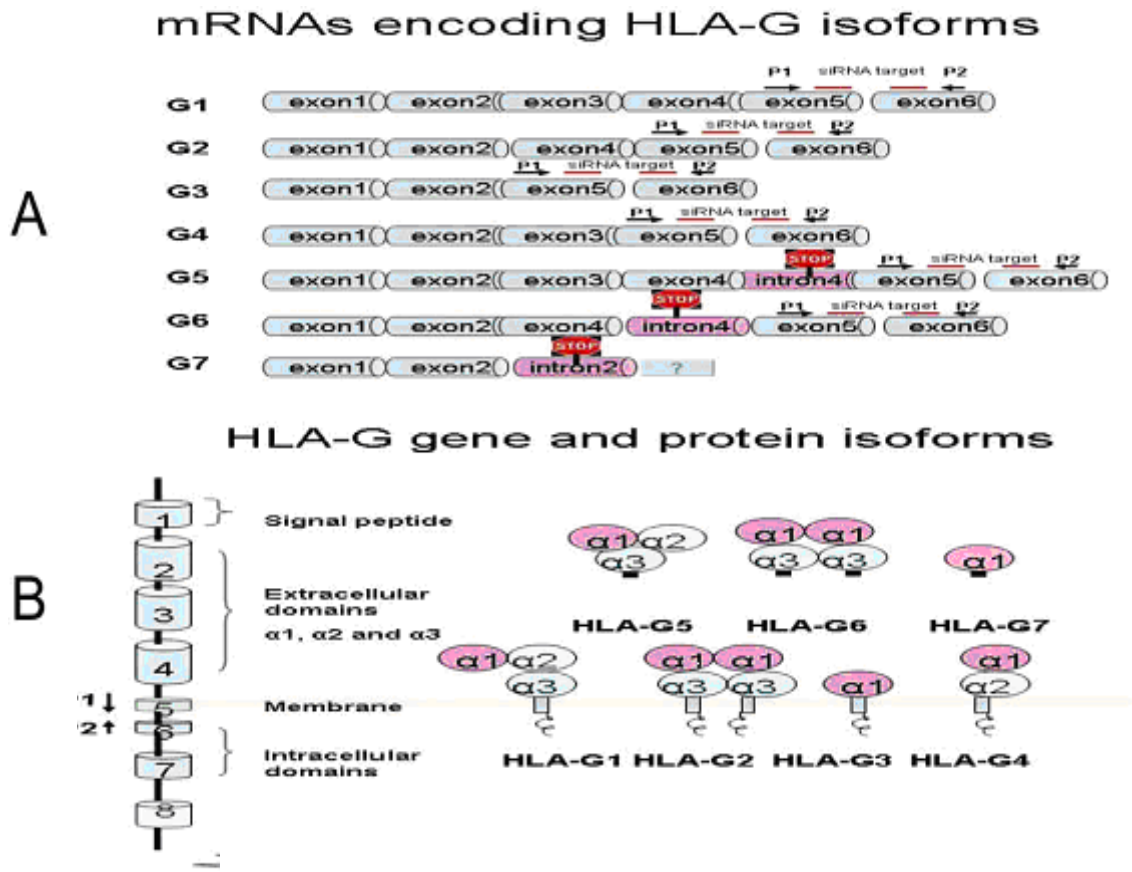


FIGURA 6: ESQUEMA DA CONSTITUIÇÃO DO GENE *HLA-G* E SUAS ISOFORMAS
Estrutura dos mRNA que codificam as diferentes isoformas do gene *HLA-G* (A). Estrutura do gene *HLA-G* e domínios apresentados por cada isoforma.
Fonte: Adaptado de Sun, 2008.

As isoformas vinculadas à membrana atuam no local onde são expressas, entretanto, as isoformas solúveis, como por exemplo, HLA-G5, podem exercer suas funções em locais distantes de distribuição, através do sistema circulatório (ROUAS-FREISS et al., 2005).

1.7.2 Polimorfismos no Gene *HLA-G*

O polimorfismo alélico do gene *HLA-G* é reduzido quando comparado com os genes HLA clássicos. Substituições nucleotídicas, principalmente nos exons 2, 3 e 4 caracterizam 47 alelos, sendo dois deles nulos, que resultam em apenas 15

proteínas diferentes devido a presença de várias substituições sinônimas entre os diferentes alelos (IMGT/HLA database, Janeiro, 2012).

Apesar de uma baixa variabilidade na região codificadora desse gene, um alto grau de variação é observado tanto na região promotora, como na região 3' UTR, ambas podendo influenciar nos níveis de expressão de HLA-G. A população brasileira representa uma das mais heterogêneas do mundo, resultado de cinco séculos de mistura étnica entre europeus, africanos e nativos indígenas principalmente. Por essa razão essa população apresenta a maior variabilidade de HLA-G já detectada (CASTELLI et al., 2009).

Em 1991 Harrison e col. descreveram a existência de um polimorfismo de 14 pb (5'-ATTTGTTTCATGCCT-3') no exon 8 do gene HLA-G (HARRISON, 1991). A presença da deleção do fragmento de 14pb exerce influência na estabilidade do mRNA de HLA-G. A deleção e a presença da seqüência de 14pb estão presentes em aproximadamente 58% e 42%, respectivamente, da população caucasiana (Hviid, 2006).

Foi observado que alelos HLA-G que apresentavam a seqüência de 14pb (exon 8) sofriam um processamento alternativo (splicing) que removia os primeiros 92pb do exon 8 tornando a molécula mais estável (ROUSSEAU, 2004). No entanto, alelos do *HLA-G* contendo esta sequencia foram associados com baixa produção de mRNA para a maioria das isoformas tanto solúveis como de membrana em amostras de trofoblastos, o que influencia na função do HLA-G e é importante em certas complicações na gravidez (CRISPIM, 2007). Dessa forma, variantes alélicas de *HLA-G* podem influenciar nos níveis de HLA-G solúvel (sHLA-G) no plasma (REBMANN, 2001).

1.7.3 HLA-G e a evasão da resposta imune tumoral

HLA-G pode ser expresso nas células tumorais tanto na sua forma solúvel como ligado à membrana (ROUAS-FREISS et al., 2005). Essa expressão de HLA-G por células malignas pode impedir a rejeição imune ao tumor, devido à capacidade que a molécula HLA-G tem de inibir células *natural killers* (NK), linfócitos T citotóxicos e células apresentadoras de antígenos (APCs).

Esta inibição ocorre através de sua ligação direta aos receptores inibitórios ILT (*Immunoglobulin-Like Trascript*), 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 é um receptor específico para HLA-G (CAROSELLA et al., 2003; LE MAOULT et al., 2005). As expressões de 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 *versus* estímulo, favorecendo assim a inibição de sinais, e aumentando os limiares de ativação para estas células (ROUAS-FREISS et al., 2007).

A molécula HLA-G5 exibe propriedades inibitórias e possui a capacidade de se ligar à CD8 e a receptores inibitórios, tal como o HLA-G1. Na verdade, a isoforma solúvel HLA-G5 inibe células mediadoras de lise como NK e LT CD8+, e a resposta alogênica de linfócitos T citotóxicos. 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 (CAROSELLA et al., 2003).

Várias citocinas podem induzir a expressão de HLA-G, tais como GM-CSF (Fator Estimulante 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). Curiosamente, 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 interleucina aparece fortemente associada à expressão de HLA-G. Devido a estas propriedades imunossupressoras, HLA-G junto à 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 mais recentemente *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. Assim sendo, 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).

1.7.4 A expressão de HLA-G e correlação clínica no câncer

Células transformadas são inicialmente eliminadas pela resposta imune inata mediada por células como NK; durante a progressão tumoral a resposta adaptativa, mediada pelos linfócitos T, pode se desenvolver. Porém a seleção imune resulta em células tumorais que inibem a expressão de HLAs de classe I e II, reduzindo a quantidade de antígenos tumorais apresentados, facilitando o escape do ataque imune e permitindo a progressão e metástase. Devido às propriedades tolerogênicas do HLA-G em relação às células NK, T e células apresentadoras de antígeno, sua função no câncer é considerada importante como um mecanismo de escape na fase avançada do câncer (ROUAS-FREISS et al., 2007).

Os primeiros indícios de que a expressão ectópica de HLA-G se estendia para lesões de melanoma malignas foram apresentados por Paul et al. (PAUL et al., 2008).

Rebmann e colaboradores confirmaram a presença de níveis significativamente maiores de sHLA-G no sangue de pacientes sofrendo de

melanoma maligno, câncer de mama e ovário, e glioblastoma. Também mostraram que além das células tumorais, células do sangue periférico são capazes de secretar sHLA-G, dando destaque aos monócitos como maiores secretores (REBMANN et al., 2003)

A detecção de sHLA-G foi sugerida como um marcador molecular no diagnóstico de ascite maligna em pacientes de carcinoma ductal de mama e carcinoma seroso de ovário, os níveis da molécula solúvel foram significativamente maiores na ascite maligna que na benigna. A detecção da molécula solúvel mostrou ser um exame de maior resolução que o exame citológico uma vez que a quantidade de células malignas na ascite tende a ser muito baixa, dificultando a detecção das mesmas (SINGER et al., 2003).

Em câncer colorretal foi demonstrado que a expressão de HLA-G foi significativamente maior em tecido maligno, em comparação com tecido normal, por RT-PCR (FUTUSHUMA et al., 1998); e por imunohistoquímica, além da sua expressão ter sido relacionada com diversos dados clínicos patológicos como a extensão da invasão, grau histológico, resposta imune do hospedeiro, metástase no linfonodo, e estágio clínico da doença (YE et al., 2007). Zhu e colaboradores propuseram a quantificação de sHLA-G no soro como um marcador para diferenciar câncer colorretal de doenças benignas que atingem o mesmo tecido (ZHU et al., 2010).

Sayed e colaboradores mostraram que a detecção de sHLA-G no sangue pode ser utilizado como um marcador na detecção precoce de câncer de mama, além de atuar como uma forma de monitorar o estado da paciente após tratamento. Eles observaram que entre as pacientes que apresentavam níveis séricos de sHLA-G muito maiores que a média (19,5 ng/ml; neste estudo) apresentaram uma queda nos níveis para abaixo da média após um ano do tratamento cirúrgico. A única paciente cujos níveis não reduziram foi detectada a presença de metástase distante (SAYED et al., 2010).

Em geral, a expressão aumentada de HLA-G em cânceres ginecológicos foi associada com progressão da lesão, particularmente em câncer de ovário (SHEU e SHIN, 2007) e adenocarcinoma endometrial (BARRIER et al, 2006). A expressão de HLA-G por tumores trofoblásticos também é confirmada. De fato esse tipo de tumor, apesar de raro, pode muitas vezes ser confundido com câncer cervical, pois ambos envolvem o segmento inferior do útero e cérvix. A distinção entre os tipos tumorais é importante, pois as formas de tratamento são diferentes, sendo assim a análise da expressão de HLA-G por imunohistoquímica foi sugerida com uma ferramenta eficiente, juntamente com outros marcadores moleculares, na distinção entre os tumores (KALHOR et al., 2009).

Alguns vírus, incluindo citomegalovírus (PANGAULT et al., 2004), vírus da raiva (LAFON et al., 2005) e Epstein-Barr (GAZIT et al., 2007) podem induzir a expressão de HLA-G. Apesar da expressão de HLA-G em células cancerosas já ter sido determinada em vários estudos poucos foram os estudos que avaliaram a expressão de HLA-G em lesões cervicais ou câncer cervical causadas pelo HPV.

Cânceres de diferentes origens exibem um comportamento preferencial de superexpressão de HLA-G na doença avançada, ao invés de nas lesões tumorais iniciais, suportando seu papel tolerogênico na fase final da imunoeedição (UROSEVIC e DUMMER, 2008). No entanto a expressão de HLA-G em lesões cervicais e câncer cervical exibe um padrão controverso. Estudos indicam para diferentes direções. A superexpressão da proteína já foi associada com os estágios iniciais da doença e foi observado o decréscimo da expressão a medida que as lesões progridem para alto grau e câncer (ZHOU et al, 2006; YOON et al, 2007; GONÇALVES et al, 2008; GUIMARÃES et al, 2010), sugerindo que talvez a molécula seja essencial nos estados iniciais da carcinogênese. Outros estudos indicam aumento da expressão de HLA-G em lesões de alto grau e no câncer cervical tanto *in situ*, como a na forma solúvel (DONG et al, 2010; ZHENG et al, 2011).

O alelo HLAG*01:03 foi considerado como protetor contra lesões causadas por HPV quando comparadas com controles em um estudo realizado por Simões e colaboradores, o mesmo efeito foi atribuído ao haplótipo HLAG*01:03/+14pb, e ao genótipo G*01:01/01:04; no entanto o alelo HLAG*01:03 é conhecido por sempre estar associado a inserção de 14pb na população brasileira, que foi alvo do estudo. O efeito protetor conferido ao alelo HLAG*01:03 baseou-se no fato que este alelo é o terceiro mais comum na população normal brasileira, porém não foi encontrado em pacientes. Em contrapartida, os haplótipos G*01:04/+14pb e G*01:04/-14pb parecem conferir suscetibilidade a desenvolver lesões cervicais quando comparadas com controles. Pacientes apresentando o haplótipo G*01:04/+14pb e co-infecção com HPV-16 e -18 mostraram-se especialmente suscetíveis a desenvolver lesões de alto grau, talvez pelo grupo alélico HLA-G*01:04 ser associado à alta produção de HLA-G que, em conjunto com o fator estabilizante +14 pb, influenciaria na maior produção da molécula, gerando um maior escape do ataque das células NK (SIMÕES et al., 2009). Este estudo mostra que os polimorfismos apresentados pelo *HLA-G*, em conjunto com o tipo viral, podem estar associados ao desenvolvimento de lesões cervicais.

Ferguson e colaboradores (FERGUSON et al, 2011) associaram os alelos HLA-G*01:02:02 e -G*01:06, e a presença do polimorfismo de 14pb com um risco aumentado de desenvolver o câncer cervical invasivo; quando estes três alelos estavam em homozigose.

HLA-G possui um grande potencial com marcador de diagnóstico e prognóstico em diferentes patologias, porém sua relação com lesões cervicais e o câncer cervical merece investigações contínuas.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão da molécula HLA de classe I não-clássica solúvel HLA-G no soro, e verificar a existência de associação entre variantes alélicas e polimorfismos da região 3' UTR do gene *HLA-G* no desenvolvimento de neoplasias intra-epitelial cervical de graus II e III.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a tipificação do gene *HLA-G* em nível alélico em 200 mulheres, com NIC de graus II e III, e em 100 mulheres saudáveis, sem NIC, com exame citopatológico realizado no último ano.
- Calcular as freqüências alélicas do gene mencionado acima, e do polimorfismo ins/del 14pb presente no exon 8.
- Investigar a existência de associação entre as variantes alélicas do gene mencionado acima e os diferentes graus de NIC (II e III).
- Avaliar se o eventual aumento da expressão sérica da molécula HLA-G está relacionado aos diferentes graus de NIC (II e III) ou a alelos específicos.

3 JUSTIFICATIVA

O câncer cervical (CC) é um importante problema de saúde pública em todo mundo, principalmente em países em desenvolvimento. A susceptibilidade genética à infecção por HPV parece ser importante na determinação do risco individual ao desenvolvimento deste câncer induzido pelo vírus (MAGNUSSON e GYLLENSTEN, 2000).

Apesar do vasto conhecimento a respeito da infecção pelo HPV, pouco se sabe sobre a história natural das infecções por HPV de alto risco. É importante conhecer as causas da persistência da infecção por HPV oncogênicos e o que faz com que lesões precursoras progridam e não regridam.

Um bom conhecimento da base genética do desenvolvimento de lesões de alto risco que resultam em câncer cervical pode contribuir para acompanhamento diferencial de indivíduos que apresentam lesões pré-cancerosas através de tipagens genéticas. Um estudo caso/controle cujo gene candidato (*HLA-G*) está direta ou indiretamente envolvido com a progressão ou regressão de infecções causadas por HPV pode contribuir para esclarecer a complexa base genética da predisposição ou proteção contra o desenvolvimento de câncer causado por HPV.

4 ARTIGO

As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Conclusão serão abordadas a seguir na forma de um artigo científico.

HLA-G variation and expression in a Case-Control study of Cervical Intraepithelial Neoplasias in a South-Brazilian population

Renata Slowik^{1,A}; Fabíola da Silva Nardi^{1,B}; José Samuel da Silva^{1,C}; Marina Bárbara Souza Xavier^{1,D}; Gorete Ynaquievi Tomaz Rezende^{12,E}; Patrícia Pinho França^{1,F}; Newton Sérgio de Carvalho^{2,G}; Maria da Graça Bicalho^{1,H}.

¹ Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade - LIGH, Departamento de Genética, Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná-UFPR
Av. Coronel Francisco H. dos Santos, Jardim das Américas. Curitiba, Paraná, Brazil. CEP: 81530990.
Caixa Postal 19071
Phone/Fax: 55-4133611729

² Departamento de Tocoginecologia, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba (PR), Brasil
Rua General Carneiro, 181, Centro. Curitiba, Paraná, Brazil. CEP: 80.060-900.

^A renata_slowik@hotmail.com

^B fsnardi@gmail.com

^C samuel-bio@hotmail.com

^D mbsxavier@yahoo.com.br

^E ynagorete@gmail.com

^F patpfufpr@yahoo.com.br

^G newtonsd@gmail.com

^H mgbicalho@gmail.com

ABSTRACT:

Cervical cancer is associated with persistent HPV infection; it progresses from cervical intraepithelial neoplasias (CIN). *HLA-G* is a non-classical human leukocyte antigen with immunoregulatory function that interacts with inhibitory receptor in Natural killer cells and T lymphocytes; its expression has been associated with several cancer types and virus infections. In this study we evaluated *HLA-G* alleles and genotypes, the 14bp in/del polymorphism present in exon 8 and sHLA-G serum expression in 94 women with CIN II, 97 women with CIN III and compared with 96 healthy women, all from South of Brazil. Risk factors related to smoking habits, as well as sexual behavior (beginning of sexual activity and number of partners) support the works already published. Regarding *HLA-G* allele and genotype frequencies, as well *HLA-G* 14 bp polymorphism, there were no associations with protection or susceptibility. For the sHLA-G expression there was no difference among the groups. However *HLA-G* is a potential prognosis and diagnosis marker in several diseases and malignances; although among the several data already collected it is not observed a consistent pattern of associations regarding cervical lesions, reinforcing the need for more studies.

Keywords: MHC, HLA, HPV, CIN, sHLA-G.

ABBREVIATIONS: CC: Cervical Cancer; HPV: human papillomavirus; STI: common sexually transmitted infection; CIN: cervical intraepithelial neoplasia; HLA: Human Leucocyte Antigen; ILT: Immunoglobulin-Like Trascript; HIV: Human Immunodeficiency Virus; sHLA-G: soluble HLA-G; HW: healthy women; CIN II: CIN grade II; CIN III: CIN grade III; bp: base pair.

INTRODUCTION

Cervical cancer (CC) is a health issue all over the world. It is the second most incident cancer in women, especially in developing countries [1]. In Brazil it was estimated 15,590 new CC cases for 2014 and its incidence depends on the region, being the most frequent among women in the North region and the fifth in the South [2].

The main etiological agents of CC are the oncogenic types of human papillomavirus (HPV) [1]. HPV is a common sexually transmitted infection (STI) [3]. HPV low-risk types are associated with the development of genital warts, and the high-risk types are associated with cervical lesions and cancer [1, 4, 5]. The presence of the high-risk HPV is considered a prerequisite for development of CC and, if the virus is not eliminated, it can trigger cellular abnormalities that lead to the formation of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) I, II and III. In most cases, if CIN II and III are left untreated, they can progress to invasive cancer [6]. Although necessary, HPV infection is not sufficient for the CC to establish and several other behavior factors influence the development of CC like: smoking, use of hormonal contraceptives, parity, number of sexual partners and educational status [3, 7, 8]. Also, the host immune system plays a crucial role in whether the infection will persist or not. It has been demonstrated that HPV proteins can be presented as foreign antigens and trigger the immune response [9, 10].

HLA-G is a non-classical class I HLA protein [11]. It is expressed in a limited sort of tissues, such as thymus [12], and pancreas [13]. HLA-G can be expressed by some tissues as an attempt to evade immune response, sustaining tumor development and inhibiting the attack of natural killer cells and cytotoxic T lymphocyte towards tumor cells, however, the amount of expressed protein vary depending on the tissue [14, 15]. This process happens through the interaction with the inhibitors receptors ILT (Immunoglobulin-Like Trascript), ILT-2 (LILRB1/CD85j), ILT-4 (LILRB2/CD85d) and KIR2DL4 (CD158d) (killer-cell immunoglobulin-like receptor, 2 domains, long cytoplasmic tail, 4) [16].

In a similar way, virus can also develop strategies to escape the immune system response. The induced expression of HLA-G has already been associated with many different virus such as HIV [17] and Epstein-Barr [18], among others [19, 20].

The HLA-G mRNA can undergo alternative splicing, generating seven distinct isoforms: HLA-G1, -G2, -G3 and -G4 which are membrane-bound forms and HLA-G5, -G6 and -G7 that are soluble (sHLA-G). Both soluble and membrane bound isoforms can bind the inhibitors receptors [21].

According to the IMGT Data Base, fifty alleles have been described for *HLA-G*, two of them are null, and result in 16 different proteins [22]. Also an important in/del polymorphism of 14bp (rs66554220) has been described in exon 8 of *HLA-G* gene [23]. The insertion of this 14bp (5'-ATTTGTTTCATGCCT-3') sequence grants the *HLA-G* mRNA greater stability [24], however it has also been associated with lower levels of expression [25].

Due to the fundamental role of this gene in immunological processes and its association with several different cancers [26], including its prognostic and diagnosis potential [27, 28]; we investigated the association between cervical pre malignant lesions that might be a result of HPV infection and *HLA-G* polymorphisms and soluble expression in a group of women from South of Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Subjects and samples

EDTA blood samples were collected from 191 female patients of Erasto Gaertner Hospital in Curitiba-Paraná, Brazil. Out of these women 94 were confirmed with CIN II and 97 with CIN III after histological examination. The mean age of patients group was 31 years old (range 16 – 45). In addition, 96 healthy women (HW), negative for CIN, unrelated and randomly selected also participated in this study; the mean age in this group was 35 years old (range 21 – 45). They were recruited in public campaigns for cervical screening. Exclusion criteria were: having sexual intercourse in the previous 24 hours; have presented altered cervical cytology at any time or have undergone a cauterization procedure in the cervix. The study was approved by the Ethical Committee for Clinical Research of the Erasto Gaertner Hospital (protocol CEP: 81520–060, P.P No 1943).

All participants gave written informed consent before blood withdrawal and responded to an epidemiological questionnaire. Ethical characterization was assigned by the interviewer when the questionnaire was applied. Participants were defined as Euro, Afro or Asian descendent and as Brazilian Mixed; which corresponds to a mix of Euro, Afro, Asian and Amerindian ancestry; after asked about their family history and composition.

For sHLA-G evaluation the serum from all participants was used. Peripheral blood was collected in a recipient without anticoagulant. The specimens were centrifuged at 1500 rpm for 7 minutes and stored at -80°C until used.

Allele determination

HLA-G alleles were determined by direct DNA sequencing analysis of exons 2, 3 and 4 using ABI Prism Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA, USA) and analyzed at an ABI Prism 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems, CA, USA) as previously performed and described in our lab [29]. DNA was obtained from peripheral blood using a salting out procedure [30].

sHLA-G Quantification in Peripheral Blood

ELISA was performed using a commercial kit (EXBIO/BioVendor, Praha, Czech Republic) according to the manufacturer's instructions. The detection limit of the test was 3.9 U/ml.

14 bp polymorphism characterization

The exon 8 fragment was obtained using the following primers: G85S= TGATGGGCTGTTTAAAGTGTCACC and G83S= GAAGGAATGCAGTTCAGCATGA, as previously described by Hviid et al. [31], and were analyzed by 8% polyacrylamide gel electrophoresis and visualized by silver staining.

Statistical analysis

Observed frequencies of *HLA-G* alleles and 14 bp polymorphism were determined by direct counting, and compared to Hardy-Weinberg equilibrium using the Arlequin 3.5 software [32]. Allelic and genotype frequencies were compared

among CIN II, CIN III and Healthy women; and between Patients and Healthy women using G Test. This test was also used for compare ethnic and smoke habits among groups.

sHLA-G concentration data is presented as median after testing Gaussian distribution. The serum levels were compared among CIN II, CIN III and Healthy women using Kruskal-Wallis Test; and between Patients and Healthy women through and Mann-Whitney Test. These three tests were also performed to compare the age of first sexual relation and total number of sexual partners.

All comparisons used the significance level as 0.05.

RESULTS

Sample characterization:

Most of healthy women (HW) group was composed of Euro-descendents (65.6%), while the majority of patient group was composed of Brazilian Mixed (59.1%) as shows in Table 1. This difference in ethical distribution was statistically significant ($p=0.0005$, global G Test).

The frequency of women with smoking habits was significantly higher in the patient group ($p=0.0007$ global G Test), also presented in Table 1.

Age at beginning of sexual activity was significantly higher in the HW group ($p=0.0009$, Kruskal-Wallis Test), where the median age was 17, contrasting with 15 in CIN II group and 16 in CIN III group, between CIN II and CIN III there is no significant difference. A box Plot of the age at beginning of sexual activity is present in Figure 1.

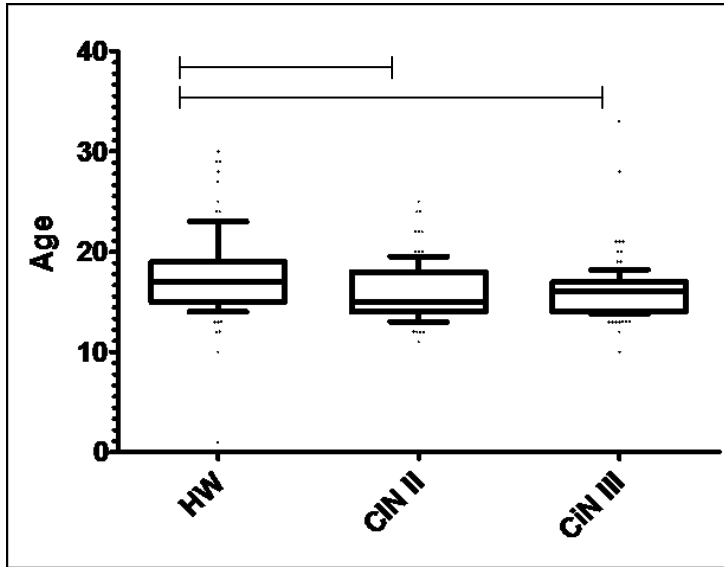


Figure 1: Beginning age of sexual activity box Plot.

Note: The bars above the groups indicate significantly differences between groups, using Mann-Whitney Test.

The median number of sexual partners was significantly lower in the HW group ($p < 0.0001$, Kruskal-Wallis Global Test), where the median was 2 partners, contrasting with 4 in CIN II and CIN III groups, between CIN II and CIN III there is also no significant difference. A box Plot of the number of sexual partners is present in Figure 2.

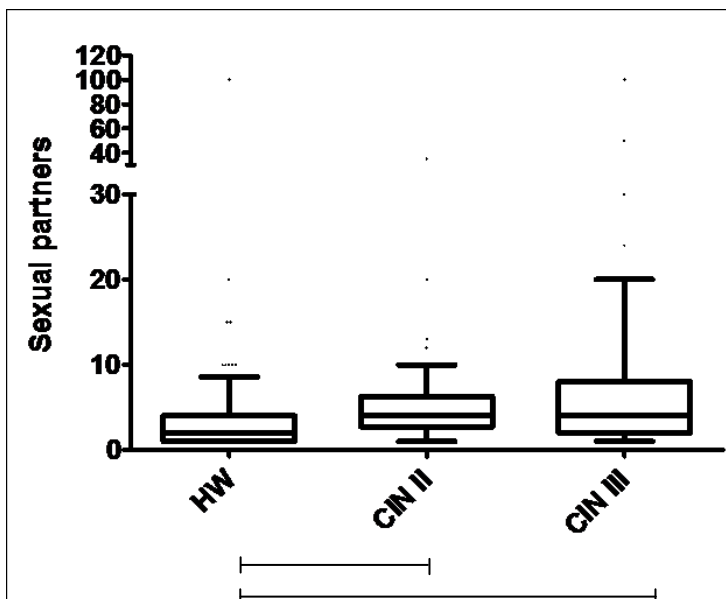


Figure 2: Number of sexual partners box Plot.

Note: The bars under the groups indicate significantly differences between groups, using Mann-Whitney Test.

	HW		CIN II		CIN III	
Ethical characterization						
Euro-descendents	63^a	65.6%	34^b	36.2%	36^b	37.1%
African-descendents	3	3.1%	4	4.3%	1	1.0%
Brazilian Mixed	30^a	31.3%	55^b	58.5%	58^b	59.8%
Asian-descendents	0	0.0%	0	0.0%	1	1.0%
Not informed	0	0.0%	1	1.1%	1	1.0%
Smoking habits distribution						
Never Smoked	67^a	69.8%	42^b	44.7%	44^b	45.4%
Ex-Smoked	12^a	12.5%	17^{ab}	18.1%	25^b	25.8%
Smoker	16^a	16.7%	35^b	37.2%	28^b	28.9%
Not Informed	1	1.0%				
Total	96		94		97	

Table 1: Ethical and Smoking habits characterization.

Note: Different letters indicates significantly differences between groups, in two by two comparisons using G Test.

Allele and genotype determination

Nineteen different alleles were identified in the sample; they are shown in Table 2 along with the absolute and relative frequencies in each group.

HLA-G*	HW		CIN II		CIN III	
<i>G*01:01:01</i>	74	38.5%	74	39.4%	80	41.2%
<i>G*01:01:02</i>	38	19.8%	44	23.4%	44	22.7%
<i>G*01:01:03</i>	8	4.2%	5	2.7%	11	5.7%
<i>G*01:01:04</i>	0	0.0%	1	0.5%	0	0.0%
<i>G*01:01:05</i>	0	0.0%	0	0.0%	1	0.5%
<i>G*01:01:06</i>	1	0.5%	1	0.5%	0	0.0%
<i>G*01:01:08</i>	8	4.2%	5	2.7%	3	1.5%
<i>G*01:01:09</i>	2	1.0%	0	0.0%	0	0.0%
<i>G*01:01:12</i>	0	0.0%	1	0.5%	0	0.0%
<i>G*01:01:14</i>	0	0.0%	1	0.5%	1	0.5%
<i>G*01:01:15</i>	0	0.0%	1	0.5%	0	0.0%
<i>G*01:01:17</i>	0	0.0%	1	0.5%	0	0.0%
<i>G*01:01:19</i>	1	0.5%	0	0.0%	0	0.0%
<i>G*01:01:20</i>	2	1.0%	0	0.0%	0	0.0%
<i>G*01:03:01</i>	20	10.4%	18	9.6%	14	7.2%
<i>G*01:04:01</i>	19	9.9%	11	5.9%	19	9.8%
<i>G*01:04:04</i>	6	3.1%	10	5.3%	10	5.2%
<i>G*01:05N</i>	1	0.5%	2	1.1%	7	3.6%
<i>G*01:06</i>	12	6.3%	13	6.9%	4	2.1%
TOTAL	192		188		194	

Table 2: Allele frequencies overview.

Once there was significant difference in the ethnical distribution of the sample, the comparisons among the samples in allele frequencies was according to ethnical group and only in protein level to avoid many comparisons, this data are present in Table 3. The comparisons in genotype frequencies was also according to ethnical group and in protein level, this data are present in Table 4. No significance was observed in allele and genotype frequencies.

Ethnic	Genotype	HW		CIN II		CIN III	
Euro-descendants	01:01/01:01	34	54,0%	18	52,9%	19	52,8%
	01:01/01:03	5	7,9%	4	11,8%	3	8,3%
	01:01/01:04	11	17,5%	9	26,5%	9	25,0%
	01:01/01:05	0	0,0%	2	5,9%	1	2,8%
	01:01/01:06	7	11,1%	0	0,0%	1	2,8%
	01:03/01:04	2	3,2%	1	2,9%	1	2,8%
	01:03/01:06	2	3,2%	0	0,0%	0	0,0%
	01:04/01:04	2	3,2%	0	0,0%	1	2,8%
	01:04/01:05	0	0,0%	0	0,0%	1	2,8%
TOTAL	63			34		36	
							<i>p=0.2144</i>
African-descendants	01:01/01:01	0	0,0%	0	0,0%	1	100,0%
	01:01/01:03	1	33,3%	0	0,0%	0	0,0%
	01:01/01:04	1	33,3%	2	50,0%	0	0,0%
	01:01/01:06	1	33,3%	1	25,0%	0	0,0%
	01:03/01:03	0	0,0%	1	25,0%	0	0,0%
TOTAL	3			4		1	
							<i>p=0.3425</i>
Brazilian Mixed	01:01/01:01	13	43,3%	27	49,1%	33	56,9%
	01:01/01:03	8	26,7%	7	12,7%	5	8,6%
	01:01/01:04	3	10,0%	7	12,7%	7	12,1%
	01:01/01:05	1	3,3%	2	3,6%	2	3,4%
	01:01/01:06	2	6,7%	8	14,5%	2	3,4%
	01:03/01:03	0	0,0%	1	1,8%	0	0,0%
	01:03/01:04	2	6,7%	2	3,6%	4	6,9%
	01:03/01:05	0	0,0%	0	0,0%	1	1,7%
	01:04/01:04	1	3,3%	0	0,0%	2	3,4%
	01:04/01:05	0	0,0%	0	0,0%	1	1,7%
	01:04/01:06	0	0,0%	1	1,8%	1	1,7%
TOTAL	30			55		58	
							<i>p=0.4935</i>
Asian-descendants	01:01/01:01	1	100,0%		0	0,0%	
Not informed	01:01/01:01	0	0,0%		1	100,0%	

Table 4: Comparison of genotype frequencies.

Note: A *p-value* is presented for a multiple comparisons inside which group using global G-Test. Asian-descendants and "Not informed" was not tested because the N size.

sHLA-G quantification

From the 287 serum samples quantified, 178 (62%) were under the detection limit of the kit (3.9 U/ml) and therefore excluded from the analysis. The remaining 109 were classified as follow: 32 CIN II (representing 34% of this group), 33 CIN III (34% of this group), and 44 healthy women (45.8% of this group). The detected values for sHLA-G in each group were: 5.07 – 355.14 U/ml (median 17.71 U/ml) for CIN II, 4.11 – 308.19 U/ml (median 20.65 U/ml) for CIN III, and 3.93 – 314.76 U/ml (median 22.19 U/ml) for the Healthy group. The distribution of sHLA-G is presented in Figure 3. No statistical difference was found when the measurements of the three groups was compared ($p=0.9081$, Kruskal-Wallis test).

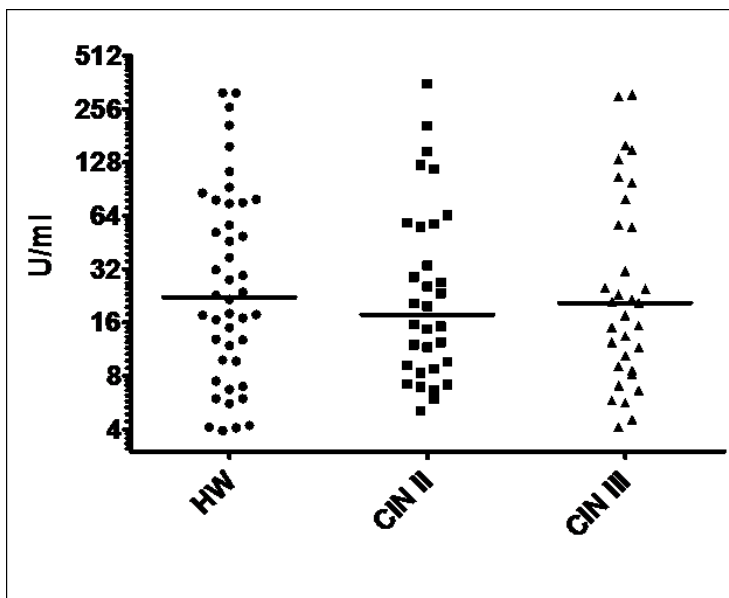


Figure 3: Distribution of sHLA-G in the three compared groups. Measurements are given in units per milliliter (U/ml). The graph shows logarithmic scale and the bar represent the median.

14 bp polymorphism characterization

Regarding the frequency of insertion and deletion of the 14bp fragment, there was no difference in the frequency among the groups, or between patients and healthy women considering either allele frequencies or genotype frequencies. The genotype frequencies are show in Table 5.

Ethnic	14 pb	HW		CIN II		CIN III	
Euro-descendents	del/del	23	36,5%	14	41,2%	12	33,3%
	ins/del	23	36,5%	12	35,3%	20	55,6%
	ins/ins	17	27,0%	8	23,5%	4	11,1%
	TOTAL	63		34		36	
							<i>p=0.2278</i>
African-descendents	del/del	1	33,3%	1	25,0%	1	100,0%
	ins/del	1	33,3%	2	50,0%	0	0,0%
	ins/ins	1	33,3%	1	25,0%	0	0,0%
	TOTAL	3		4		1	
							<i>p=0.6616</i>
Brazilian Mixed	del/del	9	30,0%	13	23,6%	13	22,4%
	ins/del	15	50,0%	29	52,7%	36	62,1%
	ins/ins	6	20,0%	13	23,6%	9	15,5%
	TOTAL	30		55		58	
							<i>p=0.7161</i>
Asian-descendents	del/del	0	0,0%	0	0,0%	1	100,0%
Not informed	ins/del	0	0,0%	1	100,0%	0	0,0%
	ins/ins	0	0,0%	0	0,0%	1	100,0%

Table 5: Comparison of genotype frequencies of 14bp polymorphism.

Note: A *p-value* is presented for a multiple comparisons inside which group using global G-Test. Asian-descendents and "Not informed" was not tested because the N size.

DISCUSSION

The differences related to smoking habits, beginning of sexual activity and number of sexual partners observed in this study corroborates these features as risk factors for cervical lesion development [7, 33-35].

Simões et al. [36] found that the allele *HLA-G*01:03* and the genotype *-G*01:01, 01:04* could result in protection against cervical lesions, and that the haplotypes *-G*01:04/ins* and *-G*01:04/del* would bring susceptibility. Another study [37] identified a higher risk of invasive cancer when the following alleles were present in homozygosis: *-G*01:01:02*, *-G*01:06* and 14bp ins; and related the presence of the *-G*01:01:01* allele with a reduced risk of developing invasive cancer, but found no association between *HLA-G* polymorphisms and pre-invasive cervical lesions. The same group [38] performed a longitudinal study and found association of *-G*01:01:02* and *-G*01:01:08* with increased risk of HPV infection, and *-G*01:01:02*

and $-G^*01:03$ with persistent HPV infection, which could be related to the consequent development of cervical lesion.

Metcalf and colleagues [39] in another longitudinal study associated the alleles $-G^*01:01:02$ with a protection to HPV infection, $-G^*01:04:01$ in homozygosis conferred protection to high-risk HPV infection, while $-G^*01:01:01$ was associated to a higher risk of low-risk HPV infection.

In a Brazilian study, Silva and colleagues [40] found that 14bp del/del genotype was associated with decrease risk of developing intra cervico-vaginal cancer, but no associations with 14bp alleles in the same comparison. Yang and colleagues [41] found no association for 14bp ins/del alleles or genotypes with cervical squamous cell carcinoma in a Taiwanese population.

In the present study no association of any allele or genotype with the development of high grade lesions in the uterine cervix was found. Also, there was no correlation when the 14 bp polymorphism frequencies were compared.

As presents above, many associations of *HLA-G* alleles and genotypes were found and no consensus result for a genetic marker against cervical lesions were obtained over populations.

The lack of association in this study could be related to the actual non existence of a specific genetic marker that could influence in the cervical lesion development in the studied population, considering that each population has its own characteristics and frequencies that cannot be disregarded.

Regarding the soluble *HLA-G* expression, there was no difference concerning lesion grade and healthy controls, or the presence of lesion and healthy controls. Usually the expression of *HLA-G* by cancer cells and other diseases follows a preferential patter of over expression during advanced stages of the pathology [42]. However, *HLA-G* expression on cervical lesions and cervical cancer exhibits a controversial patter. So far there are evidences for the over expression of this protein on the initial stages of the disease, and progressive decrease as the lesion progress to higher grades and cancer [43-46], suggesting that this protein might be important for the initial stages of carcinogenesis and virus persistence. There is also evidence of *HLA-G* over expression in higher lesion grades, and cervical cancer [47, 48], corroborating with the patters in other pathologies [49, 50]. The correlation of *HLA-G* expression and higher grades of CIN was not present in this study, however we were not able to test the possible correlation with CIN I.

In conclusion the evaluated sample didn't show HLA-G soluble expression association with progression of CIN lesions or as a prognostic marker. Considering that pre malignant cervical lesions undergo cellular alterations due HPV proteins action, the investigation of other regions, such as promoter and an increased number of subjects, might be of great importance in determining significant and characteristic alterations that could be associated with CIN development. HLA-G association with CIN and cervical cancer is a field of research with great potential that deserves further investigation.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the women who accorded to provide samples for this study. We are also thankful to Erasto Gaertner Hospital clinical support and LIGH staff for technical support. This study was supported by the FUNPAR- LIGH research fund.

REFERENCES

1. Walboomers, J.M., et al., *Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide*. J Pathol, 1999. **189**(1): p. 12-9.
2. *Estimate/2014 – Cancer Incidence in Brazil*. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. 2014; Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>.
3. Baseman, J.G. and L.A. Koutsky, *The epidemiology of human papillomavirus infections*. J Clin Virol, 2005. **32 Suppl 1**: p. S16-24.
4. Steben, M. and S.M. Garland, *Genital warts*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2014. **28**(7): p. 1063-73.
5. Rousseau, M.C., et al., *Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types as a predictor of acquisition and persistence of HPV infection*. J Infect Dis, 2001. **184**(12): p. 1508-17.
6. Southern, S.A. and C.S. Herrington, *Molecular events in uterine cervical cancer*. Sex Transm Infect, 1998. **74**(2): p. 101-9.
7. Castellsague, X. and N. Munoz, *Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis--role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking*. J Natl Cancer Inst Monogr, 2003(31): p. 20-8.
8. Tota, J.E., et al., *Epidemiology and burden of HPV infection and related diseases: implications for prevention strategies*. Prev Med, 2011. **53 Suppl 1**: p. S12-21.
9. Bourgault Villada, I., et al., *Human papillomavirus 16-specific T cell responses in classic HPV-related vulvar intra-epithelial neoplasia. Determination of strongly immunogenic regions from E6 and E7 proteins*. Clin Exp Immunol, 2010. **159**(1): p. 45-56.
10. Chan, P.K., et al., *T-cell response to human papillomavirus type 58 L1, E6, And E7 peptides in women with cleared infection, cervical intraepithelial neoplasia, or invasive cancer*. Clin Vaccine Immunol, 2010. **17**(9): p. 1315-21.

11. Hviid, T.V., et al., *Polymorphism of exon 3 of the HLA-G gene*. J Reprod Immunol, 1997. **35**(1): p. 31-42.
12. Crisa, L., et al., *Identification of a thymic epithelial cell subset sharing expression of the class Ib HLA-G molecule with fetal trophoblasts*. J Exp Med, 1997. **186**(2): p. 289-98.
13. Cirulli, V., et al., *The class I HLA repertoire of pancreatic islets comprises the nonclassical class Ib antigen HLA-G*. Diabetes, 2006. **55**(5): p. 1214-22.
14. Rouas-Freiss, N., et al., *HLA-G proteins in cancer: do they provide tumor cells with an escape mechanism?* Cancer Res, 2005. **65**(22): p. 10139-44.
15. Bukur, J., S. Jasinski, and B. Seliger, *The role of classical and non-classical HLA class I antigens in human tumors*. Semin Cancer Biol, 2012. **22**(4): p. 350-8.
16. LeMaout, J., et al., *HLA-G up-regulates ILT2, ILT3, ILT4, and KIR2DL4 in antigen presenting cells, NK cells, and T cells*. FASEB J, 2005. **19**(6): p. 662-4.
17. Donaghy, L., et al., *Elevated levels of soluble non-classical major histocompatibility class I molecule human leucocyte antigen (HLA)-G in the blood of HIV-infected patients with or without visceral leishmaniasis*. Clin Exp Immunol, 2007. **147**(2): p. 236-40.
18. Gazit, E., et al., *HLA-G expression is induced in Epstein-Barr virus-transformed B-cell lines by culture conditions*. Hum Immunol, 2007. **68**(6): p. 463-8.
19. Pangault, C., et al., *HLA-G expression in Guillain-Barre syndrome is associated with primary infection with cytomegalovirus*. Viral Immunol, 2004. **17**(1): p. 123-5.
20. Lafon, M., et al., *Modulation of HLA-G expression in human neural cells after neurotropic viral infections*. J Virol, 2005. **79**(24): p. 15226-37.
21. Paul, P., et al., *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*. Hum Immunol, 2000. **61**(11): p. 1138-49.
22. Robinson, J., et al., *IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence databases for the study of the major histocompatibility complex*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(1): p. 311-4.
23. Harrison, G.A., et al., *A 14 bp deletion polymorphism in the HLA-G gene*. Hum Mol Genet, 1993. **2**(12): p. 2200.
24. Rousseau, P., et al., *In vivo, RFX5 binds differently to the human leucocyte antigen-E, -F, and -G gene promoters and participates in HLA class I protein expression in a cell type-dependent manner*. Immunology, 2004. **111**(1): p. 53-65.
25. Chen, X.Y., et al., *The 14 bp deletion polymorphisms in HLA-G gene play an important role in the expression of soluble HLA-G in plasma*. Tissue Antigens, 2008. **72**(4): p. 335-41.
26. Rebmann, V., et al., *Secretion of sHLA-G molecules in malignancies*. Semin Cancer Biol, 2003. **13**(5): p. 371-7.
27. Singer, G., et al., *HLA-G is a potential tumor marker in malignant ascites*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(12): p. 4460-4.
28. Sayed, D., et al., *HLA-G and its relation to proliferation index in detection and monitoring breast cancer patients*. Tissue Antigens, 2010. **75**(1): p. 40-7.
29. Nardi Fda, S., et al., *Analysis of HLA-G polymorphisms in couples with implantation failure*. Am J Reprod Immunol, 2012. **68**(6): p. 507-14.
30. Lahiri, D.K. and J.I. Nurnberger, Jr., *A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(19): p. 5444.
31. Hviid, T.V., et al., *HLA-G polymorphisms in couples with recurrent spontaneous abortions*. Tissue Antigens, 2002. **60**(2): p. 122-32.

32. Excoffier, L., G. Laval, and S. Schneider, *Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis*. *Evol Bioinform Online*, 2005. **1**: p. 47-50.
33. Matsumoto, K., et al., *Tobacco smoking and regression of low-grade cervical abnormalities*. *Cancer Sci*, 2010. **101**(9): p. 2065-73.
34. Munoz, N., et al., *Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study*. *Lancet*, 2002. **359**(9312): p. 1093-101.
35. Silva, K.C., et al., *Risk factors associated with human papillomavirus infection in two populations from Rio de Janeiro, Brazil*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2009. **104**(6): p. 885-91.
36. Simoes, R.T., et al., *HLA-G polymorphisms in women with squamous intraepithelial lesions harboring human papillomavirus*. *Mod Pathol*, 2009. **22**(8): p. 1075-82.
37. Ferguson, R., et al., *Human leukocyte antigen G polymorphism is associated with an increased risk of invasive cancer of the uterine cervix*. *Int J Cancer*, 2011.
38. Ferguson, R., et al., *Human leukocyte antigen (HLA)-E and HLA-G polymorphisms in human papillomavirus infection susceptibility and persistence*. *Hum Immunol*, 2011. **72**(4): p. 337-41.
39. Metcalfe, S., et al., *The association between human leukocyte antigen (HLA)-G polymorphisms and human papillomavirus (HPV) infection in Inuit women of northern Quebec*. *Hum Immunol*, 2013. **74**(12): p. 1610-5.
40. Silva, I.D., et al., *HLA-G 3'UTR polymorphisms in high grade and invasive cervicovaginal cancer*. *Hum Immunol*, 2013. **74**(4): p. 452-8.
41. Yang, Y.C., et al., *Human leucocyte antigen-G polymorphisms are associated with cervical squamous cell carcinoma risk in Taiwanese women*. *Eur J Cancer*, 2014. **50**(2): p. 469-74.
42. Urosevic, M. and R. Dummer, *HLA-G and IL-10 expression in human cancer--different stories with the same message*. *Semin Cancer Biol*, 2003. **13**(5): p. 337-42.
43. Zhou, J.H., et al., *Altered expression of cellular membrane molecules of HLA-DR, HLA-G and CD99 in cervical intraepithelial neoplasias and invasive squamous cell carcinoma*. *Life Sci*, 2006. **78**(22): p. 2643-9.
44. Yoon, B.S., et al., *Expression of human leukocyte antigen-G and its correlation with interleukin-10 expression in cervical carcinoma*. *Int J Gynaecol Obstet*, 2007. **98**(1): p. 48-53.
45. Goncalves, M.A., et al., *Classical and non-classical HLA molecules and p16(INK4a) expression in precursors lesions and invasive cervical cancer*. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2008. **141**(1): p. 70-4.
46. Guimaraes, M.C., et al., *Low expression of human histocompatibility soluble leukocyte antigen-G (HLA-G5) in invasive cervical cancer with and without metastasis, associated with papilloma virus (HPV)*. *J Histochem Cytochem*, 2010. **58**(5): p. 405-11.
47. Dong, D.D., et al., *Human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression in cervical lesions: association with cancer progression, HPV 16/18 infection, and host immune response*. *Reprod Sci*, 2010. **17**(8): p. 718-23.
48. Zheng, N., et al., *Up-regulation of HLA-G expression in cervical premalignant and malignant lesions*. *Tissue Antigens*, 2011. **77**(3): p. 218-24.
49. Barrier, B.F., et al., *Characterization of human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression in endometrial adenocarcinoma*. *Gynecol Oncol*, 2006. **103**(1): p. 25-30.
50. Sheu, J.J. and M. Shih Ie, *Clinical and biological significance of HLA-G expression in ovarian cancer*. *Semin Cancer Biol*, 2007. **17**(6): p. 436-43.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia Celular e Molecular**. REALI, C. [Trad] 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- ALAM, S.M.; TRAVERS, P.J.; WUNG, J.L.; NASHOLDS, W.; REDPATH, S.; JAMESON, S.C.; GASCOIGNE, N.R. T cell receptor affinity and thymocyte positive selection. **Nature**, London, v. 381, p. 616-620, 1996.
- ALAM, S.; CONWAY, M.J.; HORNG-SHEN, C.; MEYERS, C. The cigarette smoke carcinogen benzo[a]pyrene enhances human papillomavirus synthesis. **Journal of virology**, Baltimore, v. 82, n. 2, p. 1053-1058, 2008.
- 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.
- BARRIER, B.F; KENDALL B.S.; SHARPE-TIMMS K.L.; KOST E.R. Characterization of human leucocyte antigen-G (HLA-G) expression in endometrial adenocarcinoma. **Gynecologic Oncology**, v. 103, p. 25-30, 2006.
- BELL, J. Chromosome crawling in the MHC. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 5, n. 9, p. 289-290, 1989.
- 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.
- 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.
- 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, 2012.
- CAROSELLA, E.D.; ROUAS-FREISS, N.; PAUL, P.; DAUSSET, J. HLA-G: a tolerance molecule from the major histocompatibility complex. **Immunology Today**, Amsterdam, v. 20, n. 2, p. 60-62, 1999.
- 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.
- CAROSELLA, E.D; MOREAU, P.; LE MAOULT, J.; ROUAS-FREISS, N. HLA-G: from biology to clinical benefits. **Trends Immunol.**, v. 29, n. 3, p. 125-32, 2008a.
- CAROSELLA, E.D.; FAVIER, B.; ROUAS-FREISS, N.; MOREAU, P.; LE MAOULT, J. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. **Blood**, v. 111, n. 10, p. 4862-4870, 2008b.
- CASTELLI, E.C.; MOREAU, P.; OYA E CHIROMATZO, A.; MENDES-JUNIOR, C.T.; VEIGA-CASTELLI, L.C.; YAGHI, L.; GIULIATTI, S.; CAROSELLA, E.D.; DONADI, E.A. In silico analysis of

microRNAs targeting the HLA-G 3' untranslated region alleles and haplotypes. **Hum Immunol.**, v. 70, n. 12, p. 1020-1025, 2009.

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.

CHRISTANSEN, O.B.; RASMUSSEN, K.L.; JERSIL, C.; GRUNNET, N. HLA class II alleles confer susceptibility to recurrent fetal losses in Danish women. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 44, p. 225-233, 1994.

CIRULLI, V.; ZALATAN, J.; MCMMASTER, 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.

CRISA, L.; MCMMASTER, 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. **J. Exp. Med.**, v. 186, n. 2, p. 289-298, 1997.

CRISPIM, J.C.; MENDES-JUNIOR, C.T.; WASTOWSKI, I.J.; COSTA, R.; CASTELLI, E.C.; SABER, L.T.; DONADI, E.A. Frequency of insertion/deletion polymorphism in exon 8 of HLA-G and kidney allograft outcome. **Tissue Antigens**, v. 71, n. 1, p. 35-41, 2008.

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.

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. **Clin Exp Immunol.**, v. 147, n. 2, p. 236-240, 2007.

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.

FAINARDI, E.; RIZZO, R.; MELCHIORRI, L.; VAGHI, L.; CASTELLAZZI, M.; MARZOLA, A.; GOVONI, V.; PAOLINO, E.; TOLA, M.R.; GRANIERI, E.; BARICORDI, O.R. Presence of detectable levels of soluble HLA-G molecules in CSF of relapsing-remitting multiple sclerosis: relationship with CSF soluble HLA-I and IL-10 concentrations and MRI findings. **Journal of Neuroimmunology**, Amsterdam, v. 142, n. 1-2, p. 149-158, 2003.

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

FRAZER, I. Immunology of papillomavirus infection. **Current Opinion in Immunology**, v. 8, p. 484-491, 1996.

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

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

GAZIT E.; SHERFT M.; BALBIN E.; MURATOV A.; GOLDSTEIN I.; LOEWENTHAL R. HLA-G expression is induced in Epstein-Barr virus-transformed B-cell lines by culture conditions. **Human Immunology**, v. 68, p. 463-468, 2007.

GUIMARÃES M.C.M.; SOARES C.P.; DONADI, E.A.; DERCHAIN S.F.M.; ANDRADE L.A.L.A.; SILVA T.G.A.; HASSUMI M.K.; SIMÕES R.T.; MIRANDA F.A.; LIRA R.C.P.; CRISPIM J.; SOARES E.G. Low Expression of Human Histocompatibility Soluble Leukocyte Antigen-G (HLA-G5) in Invasive Cervical Cancer With and Without Metastasis, Associated With Papilloma Virus (HPV). **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 58(5), p. 405-411, 2010.

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

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.

GONÇALVES, M.A.G.; LE DISCORDE M.; SIMÕES R. ; RABREAU M. ; SOARES E.G. ; DONADI, E.A. ; CAROSELLA E.D. Classical and non-classical HLA molecules and p16INK4a expression in precursors lesions and invasive cervical cancer. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 141, p. 70-74, 2008.

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.

HARRISON, G.A.; HUMPHREY K.E.; JAKOBSEN, I.B.; COOPER, D.W. A 14 bp deletion polymorphism in the HLA-G gene. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 2, p. 2200, 1993.

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.

HILDESHEIN, A.; HERRERO, R.; CASTLE, P.E.; WACHOLDER ,S.; BRATTI, M.C.; SHERMAN, M.E.; LORINCZ, A.T.; BURK, R.D.; MORALES, J.; RODRIGUEZ, A.C.; HELGESEN, K.; ALFARO, M.; HUTCHINSON, M.; BALMACEDA, I.; GREENBERG, M.; SCHIFFMAN, M. HPV co-factors related to the development of cervical cancer: results from a population-based study in Costa Rica. **British journal of cancer**, London, v. 84, n. 9, p. 1219-1226, 2001.

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

HOWELL, P.M., Jr; LIU, S.; REN, S.; BEHLEN, C.; FODSTAD, O.; RIKER, A.I. Epigenetics in human melanoma. **Cancer Control**, v. 16, n. 3, p. 200-218, 2009.

HVIID, T. V.; MELDGAARD, M.; SORENSEN, S.; MORLING, N. Polymorphism of exon 3 of the HLA-G gene. **Journal of Reproductive Immunology**, Shannon, v. 35, p. 20-28, 1997.

Hviid TV. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics,function and pregnancy complications. **Hum Reprod Update**2006;12: 209–32.

IMGT/hla Database. Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/> 20/01/2012

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

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

KALHOR N.; RAMIREZ P.T.; DEEVERS M.; MALPICA A.; SILVA E.G. Immunohistochemical Studies of Trophoblastic Tumors. **Am J Surg Pathol**, v. 33, p.633–638, 2009.

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.

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

LAFON M.; PREHAUD C.; MEGRET F.; LAFAGE M.; MOUILLOT G. ; ROA M. ; MOREAU P. ; ROUAS-FREISS N. ; CAROSELLA E.D. Modulation of HLA-G Expression in Human Neural Cells after Neurotropic Viral Infections. **Journal of Virology**, v.79, n.24, p. 15226-15237, 2005.

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.

LE BON, A.; TOUGH, D.F. Links between innate and adaptive immunity via type 1 interferon. **Current opinions in immunology**, London, v.14, p.432-436, 2002.

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

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.

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.

LEWIN, B. **Genes VII**. Editora Artmed: Porto Alegre, 2001.

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

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.

MATSUZAKA, Y; MAKINO, S; NAKAJIMA, K; TOMIZAWA, M; OKA, A; BAHRAM, S; KULSKI, JK; TAMIYA, G; INOKO, H. New polymorphic microsatellite markers in the human MHC class III region. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 57, n. 5, p. 397-404, 2001.

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.

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.

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

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.

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

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

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

MUNGER, K.; BASILE, J.R.; DUENSING, S.; EICHTEN, A.; GONZALEZ, S.L.; GRACE, M.; ZACNY, V.L. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. **Oncogene**, Basingstoke, v. 20, p. 7888-7898, 2001

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.

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

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).

PANGAULT C.; LE TULZO Y.; MINJOLLE S. ; LE PAGE E. ; SEBTI Y. ; GUILLOUX V. ; FAUCHET R. ; AMIOT L. HLA-G Expression in Guillain-Barré Syndrome Is Associated with Primary Infection with Cytomegalovirus. **Viral immunology**, v.17, n.1, p. 123-125, 2004.

PAUL, P.; ROUAS-FREISS N.; KHALIL-DAER I.; MOREAU, P.; RITEAU, B.; LE GAL F.A.; AVRIL M.F.; DAUSSET, J.; GUILLET J.G.; CAROSELLA, E.D. HLA-G expression in melanoma: A way for tumor cells to escape from Immunosurveillance. **Immunology**, v.95, p. 4510-4515, 1998.

PAUL, P.; CABESTRE, F.A.; IBRAHIM, E.C.; LEFEBVRE, S.; KHALIL-DAHER, I.; VAZEUX, G.; QUILES, R.M.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 transcript in human transfected cells. **Human Immunology**, New York, v. 64, n. 11, p. 1138-1149, 2000.

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

REBMANN V.; VAN DER VEN K.; PAßLER M.; PFEIFFER K.; KREBS D.; GROSSE-WILDE H. Association of soluble HLA-G plasma levels with HLA-G alleles. **Tissue Antigens**, v.57, p. 15-21, 2001.

REBMANN V.; REGEL J.; STOLKE D.; GROSSE-WILDE H. Secretion of sHLA-G molecules in malignancies. **Seminars in Cancer Biology**, V.13, P. 371-377, 2003.

RONCALLI, M.; SIDERI, M.; GIE, P.; SERVIDA, E. Immunophenotypic analysis of the transformation zone of human cervix. **Laboratory investigations**, New York, v. 58, p. 141-149, 1988.

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 Res.**, v. 65, n. 22, p. 10139-10144, 2005.

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

ROUSSEAU, P.; MASTERNAK, K.; KRAWCZYK, M.; REITH, W.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D.; MOREAU, P. In vivo, RFX5 binds differently to the human leukocyte antigen-E, -F, and -G promoters and participates in HLA class I protein expression in a cell type-dependent manner. **Immunology**, Oxford, v. 111, n. 1, p. 53-65, 2004.

SAYED D.; BADR G.; MAXIMOUS D.; MIKHAIL N.N.H.; ABU-TARBOUSH F.; ALHAZZA I.M. HLA-G and its relation to proliferation index in detection and monitoring breast cancer patients. **Tissue antigens**, v.75, p. 40-47, 2010.

SIMÕES R.T.; GONÇALVES M.A.G.; CASTELLI E.C.; JUNIOR C.M.; BETTINI J.S.R.; DISCORDE M.L.; DUARTE G.; QUINTANA S.M.; SIMÕES A.L.; MOREAU P.; CAROSELLA E.D.; SOARES E.G.; DONADI E.A. HLA-G polymorphisms in women with squamous intraepithelial lesions harboring human papillomavirus. **Modern Pathology**, v.22, p. 1075-1082, 2009.

SINGER G.; REBMANN V.; CHEN Y.; LIU H.; ALI S.Z.; REINSBERG J.; MCMASTER M.T.; PFEIFFER J.; CHAN D.W.; WARDELMANN E.; DROSSE-WILDE H.; CHENG C.; KURMAN R.J.; SHIH I. HLA-G Is a Potential Tumor Marker in Malignant Ascites. **Clinical Cancer Research**, v. 9, p. 4460-4464, 2003.

SHEU J.J.; SHIH I. Clinical and biological significance of HLA-G expression in ovarian cancer. **Seminars in Cancer Biology**, V. 17, P. 436-443, 2007.

SMITH, J.S.; HERRERO, R.; BOSETTI, C.; MUÑOZ, N.; XAVIER BOSCH, F.; ELUF-NETO, J.; CASTELLSAGUÉ, X.; MEIJER, C.J.LM.; VAN DEN BRULE, A.J.C.; FRANCESCHI, S.; ASHLEY, R. Herpes Simplex Virus-2 as a Human Papillomavirus cofactor in the Etiology of Invasive Cervical Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, Washington, v. 94, n. 21, p. 1604-1613, 2002.

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

SPPV – SOCIEDADE PORTUGUESA DO PAPILOMAVIRUS HUMANO. Disponível em <http://www.sppv.org/info_ciencia.html>. Acesso em: 20/05/2010.

STUBENRAUCH, F.; IFTNER, T. Krebserkrankungen durch Papillomviren. Disponível em: <http://www.mezizin.uni-tuebingen.de/virologie/exp_viro/Exp_Viro_de/Forschung/Projekte/target.html> Acesso em: 12/05/2010.

SUN, L.L.; HAN, Y.; CHEN, J.H.; YAO, Y.Q. Down-regulation of HLA-G boosted natural killer cell-mediated cytotoxicity in JEG-3 cells cultured in vitro. **Fertil Steril**, v. 90, n. 6, p. 2398-2405, 2008.

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.

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 DER VEN, K.; PFEIFFER, K.; SKRABLIN, S. HLA-G polymorphisms and molecule function-questions and more questions- a review. **Placenta**, London, v. 21, p. S86-S92, 2000.

VELDMAN, T.; LIU, X.; YUAN, H.; SCLEGEL, R. Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to a cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, p. 8211-82216, 2003.

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.

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

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.

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

YE S.; YANG H.; LI K.; DONG D.; LIN X.; YIE S. Human leukocyte antigen G expression: as a significant prognostic indicator for patients with colorectal cancer. **Modern Pathology**, v. 20, p. 375-383, 2007.

ZHOU J.; YE F.; CHEN H.; ZHOU C.; LU W.; XIE X. Altered expression of cellular membrane molecules of HLA-DR, HLA-G and CD99 in cervical Intraepithelial neoplasias and invasive squamous cell carcinoma. **Life Sciences**, v. 78, p. 2643-2649, 2006.

ZHU C.; WANG C.; ZHANG X.; ZHANG J.; LI W. Serum sHLA-G levels: a useful indicator in distinguishing colorectal cancer from benign colorectal diseases. **International Journal of Cancer**, não impresso, 2010

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical applications. **Nature reviews**, London, v. 2, p.342-350, 2002.

ZUR HAUSEN, H. **Infections causing human cancer**. New York: Wiley-VCH, 2006.