

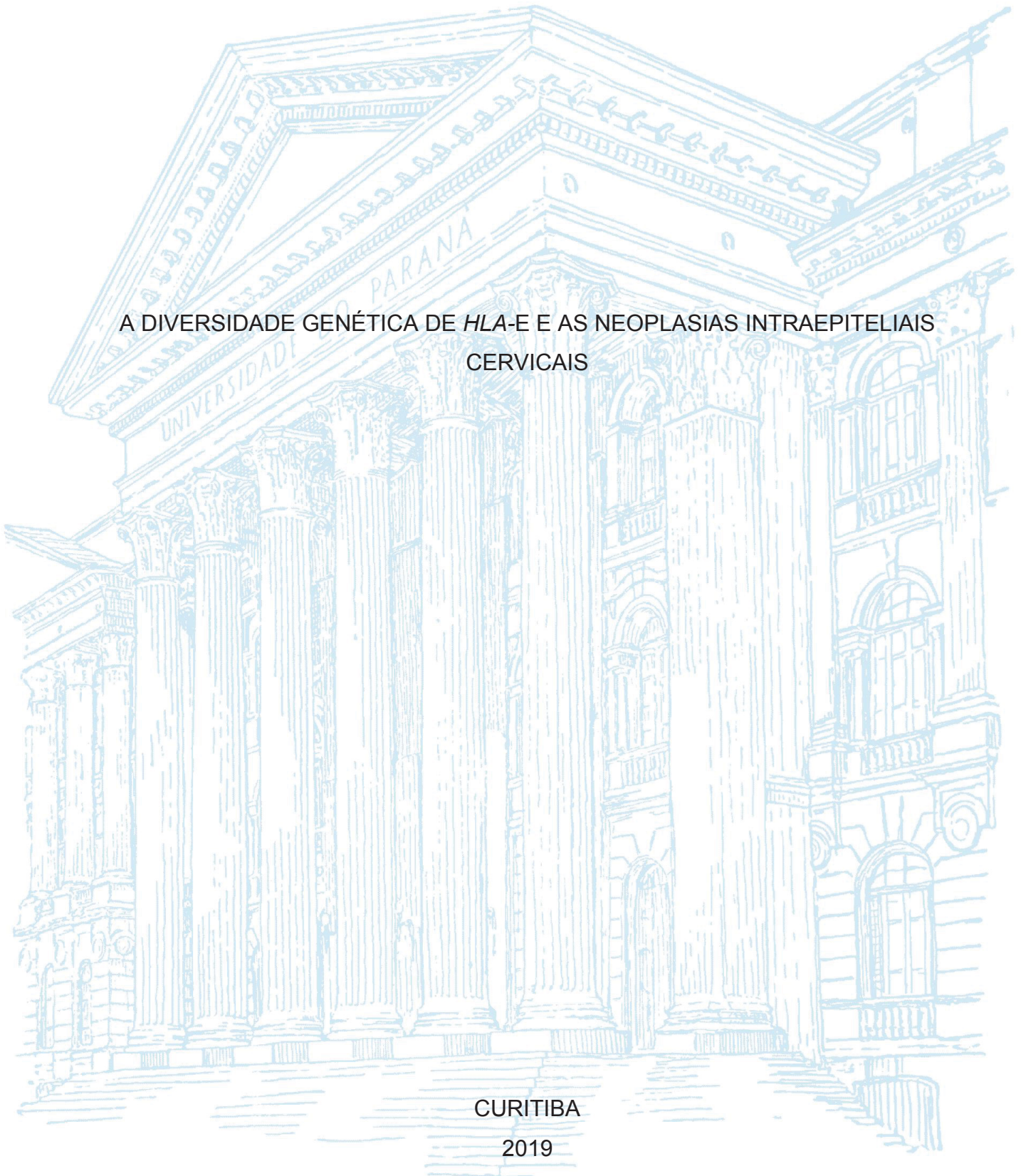
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JACKLINE RACHEL FRANCIOSI SKROCK

A DIVERSIDADE GENÉTICA DE *HLA-E* E AS NEOPLASIAS INTRAEPITELIAIS  
CERVICAIS

CURITIBA

2019



JACKLINE RACHEL FRANCIOSI SKROCK

A DIVERSIDADE GENÉTICA DE *HLA-E* E AS NEOPLASIAS INTRAEPITELIAIS  
CERVICAIS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tocoginecologia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria da Graça Bicalho  
Coorientador: Prof. Dr. Newton Sérgio de Carvalho

CURITIBA

2019

F817 Franciosi, Jackline Rachel  
A diversidade genética de HLA-E e as neoplasias intraepiteliais  
cervicais [recurso eletrônico] / Jackline Rachel Franciosi – Curitiba, 2019.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em  
Tocoginecologia. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal  
do Paraná.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria da Graça Bicalho  
Coorientador: Prof. Dr. Newton Sérgio de Carvalho

1. Neoplasia intraepitelial cervical. 2. Neoplasias do colo do útero.  
3. Papillomaviridae. I. Bicalho, Maria da Graça. II. Carvalho, Newton  
Sérgio de. III. Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia.  
Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

NLMC: WP870

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR -  
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE, BIBLIOTECÁRIA: RAQUEL PINHEIRO COSTA JORDÃO  
CRB8/091

## TERMO DE APROVAÇÃO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRO-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO TOCÓGINECOLOGIA E  
SAÚDE DA MULHER - 40001018094P2

### TERMO DE APROVAÇÃO

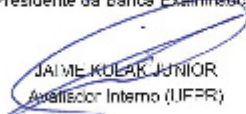
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em TOCÓGINECOLOGIA E SAÚDE DA MULHER da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **JACKLINE RACHEL FRANCIOSI SKROCK**, intitulada: **A DIVERSIDADE GENÉTICA DE HLA-E NAS NEOPLASIAS INTRAEPITELIAIS CERVICAIS.**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, não de parecer pela sua Aprovado no rito de defesa.

A outorga do título de Mestre está sujeita à homologação pelo Colegiado, no atendimento de todas as indicações e condições solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 29 de Março de 2019.

  
MARIA DA GRAÇA BICALHO  
Presidente da Banca Examinadora

  
PATRÍCIA SAVIO DE ARAÚJO SOUZA  
Avaliador Externo (UFPR)

  
JAI ME KULAK JUNIOR  
Avaliador Interno (UFPR)

Dedico a Deus, essencial em minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus filhos, pela capacidade de acreditarem em mim, compartilhando alegrias e dores, com vocês, nas pausas entre um parágrafo e outro de produção, melhora tudo o que tenho produzido na vida. A presença de vocês, significa a certeza de que não estou sozinha nesta caminhada.

Ao grande amigo João, por todo o incentivo, por me mostrar o valor da minha fé. Aos professores do programa de Tocoginecologia em especial ao Prof. Dr. Newton, grande mestre, obrigado, suas palavras foram muito importantes para minha vida acadêmica. Sem deixar de mencionar a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria da Graça Bicalho, pela paciência, incentivo e suporte, o que tornou possível a conclusão deste trabalho.

Ao Vinicius, do PGTOCO, gentileza incomparável.

À minha amiga Dr.<sup>a</sup> Renate, que de uma forma especial e carinhosa, me deu força.

À minha amiga Cinthia, pelo apoio constante.

Aos colegas, Geórgia e Samuel do Laboratório LIGH, o conhecimento compartilhado engrandeceu este trabalho.

Frequentemente é necessário ter mais coragem para ousar fazer certo do que  
temer fazer errado.

**Abraham Lincoln**

## RESUMO

Quando tratado precocemente, o Câncer Cervical (CC) é passível de bom prognóstico. Ainda assim, a vulnerabilidade observada em mulheres, principalmente de alguns países em desenvolvimento está diretamente relacionada com as condições sócio econômicas e estilo de vida. Esta neoplasia é a quarta causa de morte entre a população feminina brasileira. Causada pelo HPV ou Papilomavírus Humano é geralmente assintomática e considerada como doença sexualmente transmissível. Como medida preventiva o Ministério da Saúde recomenda o exame cito-patológico anual (Papanicolau) para mulheres entre 25 a 59 anos. Estratégias de conscientização e disponibilização de exames preventivos ainda estão restritos a centros economicamente privilegiados. Entretanto, já há alguns anos vem aumentando no mundo a preferência por metodologias moleculares, capazes de identificar a presença do vírus antes do desenvolvimento das alterações neoplásicas, assim como a associação de genótipos à pré-disposição da lesão. A molécula HLA-E e os receptores CD94 / NKG2, que são expressos predominantemente, mas não exclusivamente, na superfície das células NK, são responsáveis por ativar ou inibir a atividade citotóxica de acordo com sua função. A interação entre as moléculas HLA-E e CD94 / NKG2 é um dos mecanismos fundamentais de vigilância em pacientes com NIC I, II e III, onde a expressão de HLA-E aumentou significativamente, especialmente em infecções por HPV 16 e 18. Maior expressão de HLA-E foi observada na maioria dos tipos histopatológicos de CC, e ao mesmo tempo foi correlacionada com a melhor sobrevida do paciente. Esta dissertação tem como objetivo resumir e discutir o papel imunológico do HLA-E no contexto da infecção pelo HPV e evasão do sistema imunológico, e o processo oncogênico do câncer do colo do útero. Em um estudo transversal com 183 amostras de mulheres da cidade de Curitiba e Região Metropolitana, entre 16 e 45 anos de idade, foram comparadas as frequências alélicas e genotípicas do gene *HLA-E* com lesões neoplásicas intraepiteliais cervicais (NIC I, II e III) e grupo controle. Aplicou-se questionário epidemiológico, foram realizados coleta de 10ml de sangue venoso para extração DNA, para posterior genotipagem de *HLA-E*, amplificação dos éxons 2 e 3 pela metodologia de Sequenciamento por Sanger. As sequencias obtidas foram alinhadas com os alelos oficiais do Sistema de Informação Internacional de Imunogenética, para a determinação do genótipo. As análises estatísticas empregadas foram: determinação das frequências alélicas e genotípicas por contagem direta e comparação pelo teste G com significância  $p < 0,05$ . Não foram observadas diferenças significativas nas frequências alélicas e genotípicas entre os grupos.

Palavras-chave: Câncer Cervical. *HLA-E*. Neoplasias. HPV. MHC.

## ABSTRACT

When treated early, Cervical Cancer (CC) is likely to have a good prognosis. Even so, the vulnerability observed in women, especially in some developing countries, is directly related to socio-economic conditions and lifestyle. This neoplasm is the fourth cause of death among the Brazilian female population. Caused by HPV or Human Papillomavirus is generally asymptomatic and considered as a sexually transmitted disease. As a preventive measure the Ministry of Health recommends the annual cytological examination (Papanicolau) for women between 25 and 59 years. Awareness-raising strategies and the availability of preventive exams are still restricted to economically privileged centers. However, the use of molecular methodologies to identify the presence of the virus before the development of neoplastic alterations, as well as the association of genotypes with the pre-disposition of the lesion, has been increasing for some years now. The HLA-E molecule and CD94 / NKG2 receptors, which are expressed predominantly, but not exclusively, on the surface of NK cells, are responsible for activating or inhibiting cytotoxic activity according to their function. The interaction between HLA-E and CD94 / NKG2 molecules is one of the fundamental mechanisms of surveillance in patients with CIN I, II and III, where HLA-E expression increased significantly, especially in HPV 16 and 18 infections. Higher HLA-E expression was observed in most histopathological types of CC, and at the same time correlated with better patient survival. This dissertation aims to summarize and discuss the immunological role of HLA-E in the context of HPV infection and immune system evasion, and the oncogenic process of cervical cancer. In a cross-sectional study with 183 samples from the city of Curitiba and Metropolitan Region, between 16 and 45 years of age, the allelic and genotypic frequencies of the *HLA-E* gene were compared with cervical intraepithelial neoplasia (IAS I, II and III) and control group. An epidemiological questionnaire was applied, 10 ml of venous blood was collected for DNA extraction, for subsequent *HLA-E* genotyping, amplification of exons 2 and 3 by the Sanger Sequencing methodology. The sequences obtained were aligned with the official alleles International Information System of Immunogenetics, for the determination of the genotype. The statistical analyzes employed were determination of the allele and genotype frequencies by direct counting and comparison by the G test with significance  $p < 0.05$ . No significant differences were observed in allele and genotype frequencies between groups.

Key words: Cervical Cancer. HLA-E. Neoplasms. HPV. MHC.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	MAPA DA REGIÃO DO MHC HUMANO.....	09
FIGURA 2	REPRESENTAÇÃO DO GENE <i>HLA-E</i> .....	10
TABELA 1	FREQUÊNCIA DE DADOS EPIDEMIOLÓGICOS .....	
	ENTRE PACIENTES E CONTROLES .....	17
TABELA 2	FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE <i>HLA-E</i> NOS GRUPOS PACIENTE (N=110) E CONTROLE (N=76).....	18
TABELA 3	FREQUÊNCIA ALÉLICA DE <i>HLA-E</i> NOS SUBGRUPOS PACIENTE (NIC II=55) E CONTROLES (HPV- N=63; HPV+ N=10).....	18
TABELA 4	FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE <i>HLA-E</i> NOS GRUPOS PACIENTE E CONTROLE.....	19
TABELA 5	FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE <i>HLA-E</i> NOS SUBGRUPOS PACIENTE (NIC II=55) E CONTROLES (HPV- N=63; HPV+ N=10) .....	19

## LISTA DE ABREVIATURAS

AHO	Anticoncepcional Hormonal Oral
CC	Câncer Cervical
CCU	Câncer de Colo Uterino
CD94	Marcador de célula NK
CLS	Controles
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DST	Doença Sexualmente Transmissível
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HPV	Papilomavírus Humano
HSIL	Lesão intraepitelial de alto grau
LSIL	Lesão intraepitelial de baixo grau
MHC	Major Histocompatibility Complex
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
NK	Célula NK
NKG2	Receptor de célula NK
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
TCR	Receptor de célula T

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>05</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>07</b>
2.1	O AGENTE ETIOLÓGICO HPV.....	07
2.2	GENES HLA E NIC.....	08
2.3	O GENE <i>HLA-E</i> E A PROTEÍNA HLA-E .....	09
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>12</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>13</b>
4.1	OBJETIVO GERAL.....	13
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>14</b>
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA .....	14
5.2	EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO .....	14
5.3	GENOTIPAGEM DE <i>HLA-E</i> .....	15
5.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	16
<b>6</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>17</b>
6.1	CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DAS AMOSTRAS .....	17
6.2	ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE <i>HLA-E</i> E SUA RELAÇÃO COM A INFECÇÃO E PERSISTÊNCIA DO HPV .....	18
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>22</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>23</b>
	<b>APÊNDICE 1 - ARTIGO DE REVISÃO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO BIOMED RESEARCH .....</b>	<b>27</b>
	<b>ANEXO 1- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....</b>	<b>40</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer do colo do útero (CCU) tem uma alta taxa de mortalidade entre as mulheres em todo o mundo. Com a introdução de programas de rastreamento em mulheres assintomáticas, através do exame citológico do colo do útero (Papanicolau), seguimento e tratamento específico dos casos alterados, as taxas de incidência e mortalidade diminuíram em países desenvolvidos (WHO, 2006). No Brasil, o Ministério da Saúde recomenda o exame citopatológico anual (Papanicolaou), para mulheres entre 25 e 64 anos.

O Papilomavírus Humano (HPV), o principal agente etiológico (WALBOOMERS, *et al.*, 1999). A infecção pelo HPV é uma doença sexualmente transmissível (DST) geralmente assintomática (COCUZZA, *et al.*, 2017), que se manifesta pelo desenvolvimento de verrugas genitais, Lesões intraepiteliais de baixo grau (LSIL), Lesão intraepiteliais de alto grau (HSIL) e carcinoma epidermóide invasor (ZUR HAUSEN, 2008). Os tipos de HPV de alto risco e a infecção persistente são pré-requisitos para o desenvolvimento da doença.

A resposta imune do hospedeiro tem extrema importância para a persistência viral e a progressão da doença (BOSCH, *et al.*, 2007). A maioria das infecções pelo HPV é transitória e a involução da doença, depende da versatilidade genética da resposta imune do indivíduo ao vírus (KANODIA, *et al.*, 2007). Outros fatores de risco, tais como tabagismo, atividade sexual precoce, múltiplos parceiros, multiparidade e baixo nível socioeconômico interagem com a suscetibilidade genética do sistema imunológico e algumas mulheres infectadas não são capazes de eliminar os vírus (MAGNUSSON, GYLLENSTEN, 2000), podendo evoluir para HSIL (NIC II e III).

A utilização de metodologias moleculares capazes de detectar a presença do vírus antes do desenvolvimento das alterações neoplásicas têm sido utilizadas para maior compreensão dos mecanismos celulares e moleculares que acompanham as infecções por HPV e o processo oncogênico. Embora todos os tipos de HPV mostrem semelhanças estruturais em seu DNA, variações no potencial oncogênico de diferentes tipos parecem estar concentradas nas proteínas E6 e E7, principalmente na capacidade dessas proteínas em interagir, alterar ou desregular moléculas que controlam o ciclo celular (BOSCH, *et al.*, 2002). A oncoproteína viral HPV E7 interfere com a transcrição de genes HLA de Classe I e conseqüentemente com a posição das proteínas *HLA* na membrana celular, onde elas apresentariam peptídeos virais

desempenhando seu papel essencial na imunovigilância (STEIMBACH E RIEMER, 2018). A molécula *HLA-E* que é o principal ligante de receptores CD94/NKG2, estes últimos expressos predominantemente, mas não exclusivamente na superfície das células Natural Killer (NK), são responsáveis por ativar ou inibir sua atividade citotóxica. A interação entre *HLA-E* e CD94/NKG2 é um dos mecanismos fundamentais de imunovigilância em pacientes com NIC I, II e III, onde a expressão de *HLA-E* aumenta significativamente em infecções causadas pelos HPVs 16 e 18 (GONÇALVES et al., 2008). Níveis altos de *HLA-E* foram observados em todos os tipos histopatológicos de CCU, e ao mesmo tempo correlacionados com a maior sobrevida da paciente (SPAAN et al., 2012).

O presente estudo teve como objetivo analisar se a diversidade alélica do gene *HLA-E* e sua distribuição entre as amostras de pacientes NIC (I, II e III) e controles, influenciou na infecção e patogênese das lesões precursoras do CCU.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 O AGENTE ETIOLÓGICO HPV

Presente na mucosa e pele de vários animais, os HPVs são vírus que possuem tropismo pela epiderme.

Zur Hausen *et al.*, (2008), isolaram dois tipos diferentes de DNA do vírus HPV de verrugas genitais. Posteriormente o mesmo grupo clonou e caracterizou o DNA viral como HPV 16 e 18 do material obtido de biópsias de CC e de lesões precursoras.

Dos 40 tipos virais que infectam a área genital, alguns foram classificados como a principal causa do CC em todo o mundo. Podem ser categorizados como, baixo risco (causam verrugas genitais externas e lesões benignas do colo uterino, HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72 e 81) (GARLAND, 2002), ou de alto risco de acordo com suas lesões malignas (HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 50, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 60, 64, 68 e 73) (MOTOYAMA *et al.*, 2004). Apesar de polêmicas quanto a algumas nomenclaturas, os tipos oncogênicos prevalentes mundialmente são HPV 16, 18, 31, 45 e 56 (MUÑOZ *et al.*, 2002), sendo o HPV 16 o responsável por uma alta proporção (85%), de todos os tumores HPV não cervicais (LOWY *et al.*, 1994). Os tipos oncogênicos do HPV, apesar de comumente associados à população feminina e a alterações malignas do colo do útero, podem estar presentes na vulva, ânus, pênis e orofaringe. Em 70% dos casos, os tipos encontrados são HPV 16 ou o HPV 18 (PRENDIVILLE, DAVIES, 2004).

As lesões de alto risco são mais frequentes em mulheres sexualmente com taxas que variam de 15% a 40% (VILLA, 1997), porém quando são analisadas amostras cervicais de mulheres em acompanhamento, a maioria das infecções são tidas como transitórias (EVANDER, 1995).

Em contrapartida, em algumas mulheres a infecção pelo HPV pode persistir levando ao desenvolvimento de lesões pré-malignas NIC II e III, e nesses casos o fator genético também pode influenciar nesta persistência (HO *et al.*, 1995) (KRENSKY, 1997). As células tumorais desenvolvem mecanismos capazes de escapar da vigilância do sistema imune oferecendo ao tumor condições de crescer paulatinamente (DUNN *et al.*, 2002), podendo alterar o prognóstico do paciente. Uma destas transformações que ocorrem nas células tumorais é a baixa regulação de

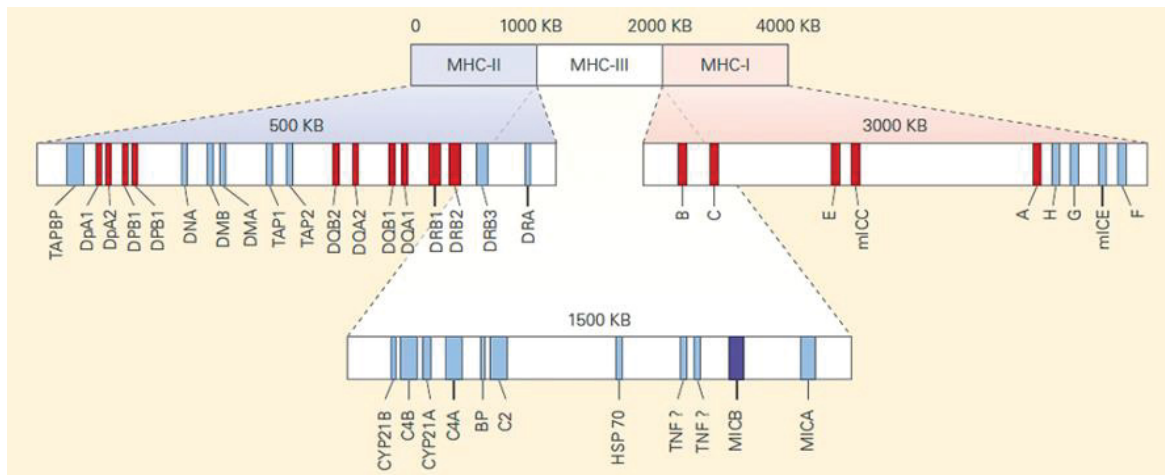
expressão de antígeno leucocitário humano de Classe I (HLA-I), minimizando a expressão e reconhecimento do antígeno para a destruição (CAVALLO *et al.*, 2011).

## 2.2 GENES HLA E NIC

No cromossomo 6, situa-se uma região genômica 6p2.1.3 conhecida como MHC, (do inglês, Major Histocompatibility Complex) ou CPH (Complexo Principal de Histocompatibilidade), em referência ao papel atribuído a esses genes na aceitação de tecidos transplantados e seu impacto na histocompatibilidade e imunologia dos transplantes. Grupamentos gênicos situados nessa região genômica, codificam produtos moleculares que atuam principalmente na resposta imune. Distribuem-se em três regiões: Classe I, II e III de acordo com a estrutura e função dos produtos por eles codificados. O MHC humano é denominado HLA (do inglês *Human Leucocyte Antigen*), sigla que será utilizada ao longo da dissertação, em referência aos genes *HLA* de Classe I e Classe II (ABBAS *et al.*, 2008).

Nas regiões de Classe I e II, localizam-se respectivamente os genes HLA clássicos, *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C* e *HLA-DR*, *DQ* e *DP*. Seus produtos moleculares atuam na resposta imune adaptativa, apresentando peptídeos endógenos, virais ou próprios alterados e peptídeos derivados de microrganismos exógenos para linfócitos T  $CD8^+$  e  $CD4^+$ , respectivamente (TOWNSEND, BODMER, 1989). Adicionalmente, *HLA-C*, *HLA-A* e *HLA-B* atuam como ligantes para receptores das células NK e participam também da imunidade inata à semelhança dos produtos dos genes de classe I não clássicos (*Ib*), *HLA-E*, *HLA-F* e *HLA-G*, os quais apresentam estrutura capaz de apresentar peptídeos para linfócitos T. No entanto, caso atuem como moléculas apresentadoras de antígenos, isso poderá acontecer num contexto imune diferente interagindo com outros tipos de receptores não restritos aos linfócitos T e, desempenhando funções imunomoduladoras. Na região de classe III não estão presentes genes *HLA* e sim outros genes que codificam proteínas mediadoras de outras funções imunes, tais como, componentes do sistema complemento e de citocinas (HORTON *et al.*, 2004; ABBAS, *et al.*, 2008) (FIGURA 1).

FIGURA 1- MAPA DA REGIÃO DO MHC HUMANO



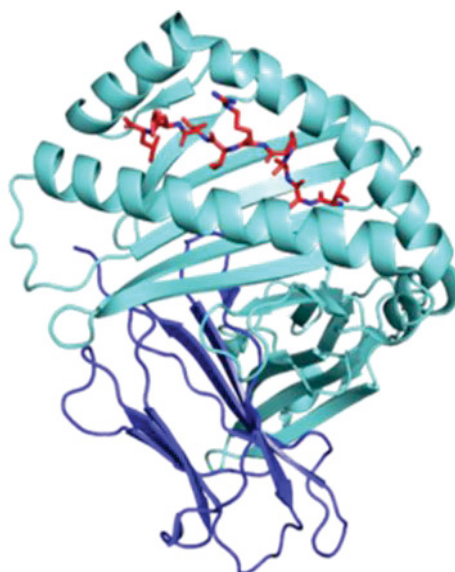
FONTE: Bellanti, JA (Ed). Immunology IV: Clinical Application in health and Disease. I Care Press, Bethesda, MD, 2012.

### 2.3 O GENE *HLA-E* E A PROTEÍNA HLA-E

Interações com receptores inibidores presentes em várias células da resposta imune, em especial com células NK são sugestivas de uma função tolerogênica e imunomoduladora da resposta imune, tanto para HLA-G quanto para *HLA-E*. A proteína HLA-G é expressa na interface fetal e em sítios imunologicamente privilegiados. *HLA-F* parece ter atuação intracelular colaborando com a função dos genes *HLA-Ia*. *HLA-E* expressa-se em todos os tecidos, porém apresenta níveis baixos de expressão. Possui menos alelos e função mais especializadas na resposta imune, se comparado aos genes *HLA Ia* (ULBRECHT *et al.*, 1998; STRON *et al.*, 2003; IWASKO, BOGUNIA, 2011). Muitas têm sido as evidências da relevância funcional de *HLA-G* e *HLA-E* na implantação embrionária, na aceitação de aloenxertos e também na evasão imune de tumores e vírus (WISCHHUSEN, *et al.*, 2007; CAROSSELLA, *et al.*, 2008; CAROSSELLA, 2011).

O gene *HLA-E* foi descrito por Koller em 1988, e abaixo está representada a proteína de mesmo nome por ele codificada, cuja estrutura é semelhante à estrutura das moléculas *HLA* de Classe I (FIGURA 2). A proteína *HLA-E* atua na resposta imune interagindo como ligante de receptores CD94/NKG2 e TCRS, presentes em células NK e linfócitos T, entre outros componentes celulares da imunidade inata e adaptativa.

FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO DA PROTEÍNA HLA-E.



FONTE: <https://en.wikipedia.org/wiki/HLA-E>

No que se refere à infecção pelo HPV e neoplasias intraepiteliais e/ou câncer cervical, vários estudos de associação com genes *HLA*, têm sido conduzidos em várias populações. Inicialmente investigou-se a variação genética dos genes *HLA* clássicos (*HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DR*, *-DQ*) e sua possível associação com as NIC ou CC. Diferentes alelos *HLA* mostraram-se associados com riscos de magnitude diferentes, às vezes contrastantes, no desenvolvimento das neoplasias e/ou o câncer cervical. *HLA-A2*, *-A\*01*, *-A\*24*, *-A\*11:04*, *HLA-B7*, *-B15*, *-B63* e *HLA-Cw\*02:02*, *HLA-DQA1\*01*, *-\*03*, *HLA-DQB1\*02*, *-\*03*, *-\*04*, *-\*06*, entre outros mostraram-se associados com o risco aumentado de desenvolvimento de neoplasias e câncer cervical. Como fator de proteção foram identificados os alelos, *HLA-A\*02:07*, *HLA-A\*02:15N*, *HLA-A\*24:02* e *HLA-DQA1\*05:01*. *HLA-DQB1\*02:01*, *-\*01:03*, *-\*0301/\*0501*, *-\*04*, *-\*05*, *-\*05:02:01* (CHATTOPADHYAY, 2001).

Quanto aos genes *HLA* não clássicos (*HLA-G*, *HLA-E*, *HLA-F*), estudos de expressão do gene *HLA-G*, em tecidos tumorais, foram sugestivos de associação do mesmo, com um pior prognóstico e com implicações no escape imune viral e tumoral (MENIER *et al.*, 2011; FERNS *et al.*, 2016).

A expressão de *HLA-E* foi observada pela primeira vez, na maioria dos subtipos histopatológicos (53%) do câncer cervical, tais como, adenocarcinoma (AC), ASC carcinoma adenoescamoso (ASC) e carcinoma escamoso (SCC), sendo mais frequentes no subtipo AC além de observarem que altos níveis de expressão de *HLA-E*, mostraram-se associados com a melhora na sobrevida da paciente, uma sinalização positiva para um eventual biomarcador nos subtipos tumorais (SPAANS *et al.*, 2012).

Várias características distinguem o gene *HLA-E* dos demais genes de Classe Ia (*HLA-A*, *-B* e *-C*). Notavelmente, sendo capaz de se ligar e apresentar antígenos a Linfócitos T, a proteína *HLA-E* expressa-se na membrana celular, ligada preferencialmente a peptídeos próprios derivados das demais proteínas *HLA* de Classe Ia. Nessa condição, interage com receptores CD94/NKG2, atuando na imunidade inata e participando da transdução de sinais imunomoduladores da resposta imune. Variações alélicas, ou diferenças, ou alterações em sequências nucleotídicas reguladoras ou codificadoras do gene *HLA-E*, podem alterar os níveis de expressão da proteína *HLA-E* correspondente, interferindo dessa forma em suas interações e afinidades diferenciais como ligante com receptores ou com o peptídeo. Como consequência, diferenças quantitativas no número de complexos *HLA-E* a receptores e/ou peptídeos poderiam ser formados a qualquer momento na superfície celular como também na distinção qualitativa das moléculas, quanto à sua afinidade efetiva de interagir com os peptídeos/receptores/ (STRONG *et al.*, 2003, PIETRA *et al.*, 2009).

### 3 JUSTIFICATIVA

A interferência de oncoproteínas virais com o sistema imune do hospedeiro e seu potencial de induzir transformações neoplásicas abre perspectivas para o estudo de genes de resposta imune e sua influência na evolução das lesões intraepiteliais que resultam no desenvolvimento do CC. Variantes genéticas de genes que participam da resposta imune, muitas vezes apresentam participação relevante no risco de desenvolver a doença.

O gene *HLA-E* tem papel importante na resposta imune e codifica proteína que atua como ligante a receptores CD94/NKG2 e TCRs, presente em componentes celulares da imunidade inata e adaptativa. Dessa forma, o estudo da diversidade do *HLA-E* e o perfil de sua distribuição entre pacientes NIC (I, II e III) e controles, permitirá observar sua possível influência na patogênese das lesões precursoras do CC. Com isso pretende-se investigar seu potencial como marcador genético e sua contribuição no prognóstico, acompanhamento e tratamento das lesões e futuras terapias requer estudo prospectivos.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Realizar estudos sobre a variabilidade genética de *HLA-E* e a sua relação com a infecção pelo HPV e as neoplasias epiteliais cervicais.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização epidemiológica da amostra paciente.
- Estimar as frequências alélicas e genótípicas do gene *HLA-E* entre grupos de mulheres HPV + e controles HPV-
- Investigar a existência de associação entre alelos e/ou genótipos *HLA-E* e a infecção pelo HPV em mulheres HPV - e HPV+.
- Estimar as frequências alélicas e genótípicas do gene *HLA-E* entre grupos de mulheres com lesões neoplásicas intraepiteliais cervicais de graus II e III e grupo controle (HPV- e HPV+) e investigar se existe associação entre alelos e/ou genótipos de *HLA-E* e os diferentes estágios das lesões neoplásicas intraepiteliais.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra investigada foi composta por 183 mulheres, sendo 73 controles (sendo 63 controles HPV- e 10 HPV +) e 110 pacientes (55 NIC II e 55 NIC III) recrutadas entre 2010 e 2012 em Curitiba e Região Metropolitana. Todas as mulheres, pacientes e controles, que participaram da pesquisa, leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO I). Da mesma forma, também responderam a um questionário sobre seu histórico médico, cujas perguntas incluíam, entre outras, paridade, atividade sexual, tabagismo. Adicionalmente foi coletada uma amostra de sangue venoso para genotipagem de *HLA-E*.

O grupo controle foi selecionado entre mulheres que procuraram o Serviço de Patologia Cervical e a Seção de Doenças Genitais do Trato Inferior do Hospital Erasto Gaertner durante os programas de rastreamento do Câncer Cervical. Mulheres. Como critério de elegibilidade as mesmas, deveriam ter exames laboratoriais para HPV e idade entre 16 e 45 anos. Esse último critério visando excluir mulheres com possíveis displasias associadas à idade e a menopausa.

O comitê de Ética para pesquisa médica em seres humanos do Hospital de Clínicas da UFPR aprovou este estudo, conforme documentado no protocolo do CEP nº 1008.047/2005-04, e este foi realizado com as recomendações das Boas Práticas Clínicas e sob resoluções nº 251 e 196/96 das Leis Reguladoras Brasileiras do Ministério da Saúde.

### 5.2 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

O DNA sob a forma de *buffy-coat* para análises genéticas já estava disponível e armazenado no Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade do Departamento de Genética da UFPR tendo sido processado de acordo com o seguinte protocolo:

Dez ml de sangue periférico foram obtidos por punção venosa de todas as mulheres participantes, coletados em tubos estéreis do tipo Vacutainer® contendo

EDTA. As amostras foram centrifugadas de forma a obter o *buffy-coat*, forma de armazenamento disponibilizado para a extração do DNA genômico.

A extração do DNA das amostras foi realizada através do método de *salting-out*, que possibilita a obtenção de DNA de alto peso molecular e consiste, basicamente, no rompimento mecânico e/ou enzimático dos tecidos, extração das proteínas e ácidos graxos pela ação de solventes orgânicos e precipitação do DNA com etanol (JOHN et al, 1990, modificado por LAHIRI e NURNBERGER, 1991). A concentração de DNA das amostras foi quantificada pela leitura da densidade ótica (D.O.), utilizando-se o Espectrofotômetro Nanodrop. A diluição das amostras, foi feita com água ultrapura, até a obtenção da concentração desejada para PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

### 5.3 GENOTIPAGEM DO *HLA-E*

Após a diluição das amostras de DNA, realizou-se a amplificação dos éxons 2 e 3 do gene *HLA-E* pela metodologia de PCR, resultando em um produto de 985 pares de base, conforme metodologia proposta por ANTOUN *et al.*, (2008) e COOK *et al.*, (2003), com pequenas modificações. Os seguintes oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) foram utilizados:

Senso: 5' GGGGTCGGGATGGAAACGGC 3'

Antissenso: 5' TGAGGTCTGTCAGCTGTGGG 3'

O volume total de reação foi, 25 µl consistindo em tampão de PCR 1X (Tris-HCl 70 mM pH 8.8, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 20 Mm), MgCl<sub>2</sub> 1,5 Mm, 3,0 mM de cada DNTP, 2,25 UI de Taq DNA-polimerase Platinum (Invitrogen, Carlshad, CA), 1,2 ml de DNA genômico, e 0,40 pMol de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores acima citados. O ciclo inicial de desnaturação foi conduzido a 94°C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de: 94°C por 30s, 68°C durante 30s e 72°C por 1 minuto e uma fase de extensão final a 72°C durante 7 minutos.

Após a amplificação, o produto de PCR foi purificado com (Exo I) Exonuclease I e (SAP) Fosfatase Alcalina de Camarão, conforme protocolo abaixo, isolamos os produtos de PCR: Produto de PCR 6,0µl, 1µl de Exo I 10U, 2µl de SAP 2U e Tampão SAP 10X. O ciclo inicial da purificação foi conduzido a 37°C por 1 hora, seguido de um novo ciclo a 85°C durante 15 minutos para inativar a atividade da exonuclease.

O produto purificado correspondente aos éxons 2 e 3 do *HLA-E* foi sequenciado usando o *Kit Big Dye Terminator 3.1* (Applied Biosystem) e o sequenciador ABI PRISM 3130 Analisador Genético (Applied Biosystem, CA, USA). Os *primers* utilizados durante a reação de sequenciamento foram os mesmos utilizados na reação de PCR (senso e antissenso).

Os dados obtidos no sequenciamento para os éxons 2 e 3 foram visualizados com a ajuda do software *Sequencing Analysis* (Applied Biosystem). Cada amostra foi alinhada com as sequencias genômicas de alelos oficiais IMGT com o auxílio do software *SeqScape 3.7* que possibilitou a identificação dos genótipos individuais.

#### 5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As frequências alélicas e genótípicas foram estimadas por contagem direta. O programa *BioEstat 5.0*, foi utilizado para comparações entre os diferentes grupos por meio do Teste G para os grupos pacientes e controles, assim como para as comparações entre os grupos estratificados (63 controles HPV-; 10 controles HPV +; 55 NIC II e 55 NIC III), respectivamente. O Equilíbrio de Hardy-Weimbeg foi estimado por meio do Programa Arlequim.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DAS AMOSTRAS

Os dados epidemiológicos das amostras controle (CLS HPV-, CLS HPV +) e pacientes (NIC II e III) foram analisados e observou-se que a média de idade nas amostras acima foi 35,5 a; 31,9 a; 30,3 a e 31,5 a, respectivamente. Com relação à média de idade da 1ª relação sexual os resultados foram: 17,7 a; 17,3 a; 16,0 a e 16,2 a, enquanto a média do número de parceiros sexuais foi: 4,3; 8,3; 5,1 e 6,1. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as amostras em nenhuma dessas características. Quando foram analisados o tabagismo, o uso de anticoncepcionais hormonais orais (AHO) e a etnia observou-se diferenças entre as amostras pacientes (NIC II+ NICIII) e controles (CLS- + CLS +) (TABELA 1).

TABELA - 1 FREQUÊNCIA DE DADOS EPIDEMIOLÓGICOS ENTRE PACIENTES E CONTROLES

Característica	Pacientes N=120*	Controles N=73*	Valor de p	OR (IC 95%)
Tabagismo (n) (%)	Sim=41 (34,2) Não=79 (65,8)	Sim=14 (19,5) Não=58 (80,5)	0,03 <sup>a</sup>	2,15(1,07-4,31)
Etnia (n) (%)	Branca=40 (38,1) Parda= 63 (60) Negra=2 (1,9)	Branca=49(67,1) Parda=23 (31,5) Negra=1 (1,4)	0,003 <sup>b</sup>	
Uso de AHO (n) (%)	Sim=82 (74,5) Não=28 (25,5)	Sim=38 (52,8) Não=34 (47,2)	0,002 <sup>a</sup>	2,62 (1,39-4,92)

<sup>a</sup>Chi-quadrado de Pearson; <sup>b</sup>Teste exato de Fisher.

\* N está variando devido à falta de informação de alguns dados.

O tabagismo pode ser descrito como fator associado a uma chance maior (2,15 vezes) de persistência viral e progressão da lesão epitelial cervical quando comparado com as mulheres não fumantes. O mesmo resultado foi observado com o uso de AHO, aumentando a chance de persistência viral e progressão da lesão epitelial cervical em 2,62 vezes.

## 6.2 ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE *HLA-E* E SUA RELAÇÃO COM A INFECÇÃO E PERSISTÊNCIA DO HPV

A análise comparativa entre os grupos pesquisados revelou que o alelo *HLA-E\*01:01* foi o mais frequente, variando de 54% até 65%, tanto em Pacientes quanto em Controles em todos os subgrupos avaliados (controle HPV + e HPV-, NIC II e NIC III). O segundo alelo mais frequente foi o *HLA-E\*01:03* nos dois grupos e nos subgrupos. O alelo *HLA-E\*01:05* foi observado em apenas um indivíduo no subgrupo NIC III. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as frequências alélicas encontradas (TABELAS 2 e 3).

TABELA 2 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE *HLA-E* NOS GRUPOS PACIENTE (N=110) E CONTROLE (N=73).

Alelos	Pacientes NIC a (%)	Controle a (%)	Valor de p
<i>HLA-E*01:01</i>	123 (0,559)	93 (0,637)	0,29*
<i>HLA-E*01:03</i>	96 (0,436)	53 (0,363)	
<i>HLA-E*01:05</i>	1 (0,004)	0	
Total alelos	220	146	

FONTE: A autora (2019).

NOTA: \* Teste T global.

LEGENDA: a= frequência absoluta de alelos

TABELA 3 - FREQUÊNCIA ALÉLICAS DE *HLA-E* NOS SUBGRUPOS PACIENTES (NIC II=55; NIC III=55) E CONTROLES (HPV- N=63; HPV + N=10).

Alelos	NIC II N (%)	NIC III N (%)	Controles HPV- N (%)	Controles HPV+ N (%)	Valor de p
<i>HLA-E*01:01</i>	64 (0,58)	59 (0,536)	80 (0,63)	13 (0,65)	0,84*
<i>HLA-E*01:03</i>	46 (0,42)	50 (0,454)	46 (0,37)	7 (0,35)	
<i>HLA-E*01:05</i>	0	1 (0,009)	0	0	
Total	110	110	126	20	

FONTE: A autora (2019).

NOTA: \* Teste T global.

Na análise genotípica, o genótipo *HLA-E\*01:01/HLA-E\*01:03* foi mais frequente no grupo controle, seguido pelos subgrupos NIC II e III, porém sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos (TABELAS 4 e 5).

TABELA 4 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE *HLA-E* NOS GRUPOS PACIENTE E CONTROLE

Genótipos	Pacientes	Controles	Valor de p
HLA-E*01:01/HLA-E*01:01	37 (0,336)	27 (0,370)	
HLA-E*01:01/HLA-E*01:03	48 (0,436)	39 (0,534)	0,15*
HLA-E*01:01/HLA-E*01:05	1 (0,09)	0	
HLA-E*01:03/HLA-E*01:03	24 (0,218)	7 (0,096)	
Total	110	73	

FONTE: A autora (2019).

NOTA: \* Teste G global

TABELA 5 - FREQUÊNCIAS DE *HLA-E* NOS SUBGRUPOS PACIENTE (NIC II=55; NIC III=55) E CONTROLES (HPV- N=63; HPV + N=10).

Genótipo	Controle HPV- N (%)	Controle HPV+ N (%)	NIC II N (%)	NIC III N (%)	Valor de p
HLA-E*01:01/HLA-E*01:01	24 (0,381)	3 (0,30)	19 (0,345)	18 (0,327)	
HLA-E*01:01/HLA-E*01:03	32 (0,508)	7 (0,70)	26 (0,473)	22 (0,40)	p=0.59*
HLA-E*01:01/HLA-E*01:05	0	0	0	1 (0,018)	
HLA-E*01:03/HLA-E*01:03	7 (0,111)	0	10 (0,182)	14 (0,254)	
Total	63	10	55	55	

FONTE: A autora (2019).

NOTA: \* Teste G global

## 7 DISCUSSÃO

A região genômica que abriga os genes *HLA* contém mais de 200 genes, em sua grande maioria, atuantes na imunidade inata e adaptativa (HORTON *et al.*, 2004).

As neoplasias intraepiteliais e o câncer cervical, são de natureza complexa e sua manifestação, depende de diferentes genes e de tantos outros fatores ambientais predisponentes. Não se pode atribuir por exemplo a um único fator genético, o protagonismo principal na susceptibilidade ou resistência em desenvolver as neoplasias e /ou câncer cervical. No entanto, os estudos de associação entre fatores genéticos e fenótipos de susceptibilidade permitem incluir outros componentes para a análise de riscos genéticos associados, por exemplo, à infecção pelo HPV, possibilitando uma melhor compreensão das interações entre fatores genéticos e ambientais com a doença. Além disso, algumas dessas associações ressaltam a importância dessa região genômica no curso da resposta imune sendo algumas delas representativas do impacto da variação alélica *HLA* no prognóstico e desenvolvimento das neoplasias e do câncer cervical.

Em nosso estudo não detectamos associação entre a variação genética de *HLA-E* e o desenvolvimento dos diferentes estádios das neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC II e/ou NIC III) em pacientes HPV+.

Com relação às frequências alélicas de *HLA-E*, observamos que os alelos *HLA-E\*01:01* e *HLA-E\*01:03*, foram os mais frequentes tanto nos grupos Paciente versus Controle comparados individualmente ou de forma estratificada. Nessas diferentes comparações os alelos *HLA-E\* 01:01* e *HLA-E\* 01:03* apresentaram frequências similares variando entre (54% - 65%) e (54% - 65%), respectivamente. Nossos resultados foram concordantes com aqueles disponíveis na literatura onde os alelos *HLA-E\*01:01* e *HLA-E\*01:03*, apresentam maior frequência (50%), sendo os demais, com ocorrência rara ou nula (VEIGA-CASTELLI *et al.*, 2012).

FERGUNSON *et al.*, (2011), em um estudo semelhante ao nosso, investigaram se *HLA-E* e/ou *HLA-G*, estariam associados com a susceptibilidade à infecção e persistência da infecção pelo HPV. Os autores reportaram uma associação entre *HLA-G\*01:01:02* e *HLA-G\*01:03* e a infecção pelo HPV. No pelo HPV quanto com a persistência da infecção nos estádios NIC II e NIC III.

STRONG e colaboradores em 2003, argumentaram que algum tipo de seleção balanceadora, poderia estar atuando para manter os alelos *HLA-E\*01:01* e *HLA-*

*E\*01:03*, com frequências similares em todas as populações já investigadas. No que se refere à sequência nucleotídica, os alelos *HLA-E\*01:01* e *HLA-E\*01:03* diferem respectivamente no códon 107. Nessa posição *HLA-E\*01:01*, possui o códon **AGG** enquanto *HLA-E\*01:03* apresenta **GGG**. Essa substituição não sinônima no códon 107 resulta na codificação de uma Arginina (**R**) ou Glicina (**G**) no polipeptídeo correspondente. Estudos realizados sobre o impacto funcional nas propriedades da proteína *HLA-E* em decorrência dessa substituição nucleotídica revelaram diferenças nos níveis de expressão na membrana celular entre os alelos *HLA-E\*01:01* e *HLA-E\*01:03*. Investigações sobre a afinidade de ligação com peptídeos também se mostraram consistentes com diferenças funcionais entre a estrutura tridimensional das proteínas *HLA-E (R)* e *HLA-E (G)*.

Portanto, essa variação alélica poderia determinar interações diferenciais e quantitativas das proteínas correspondentes tanto em sua função de ligação e apresentação de peptídeos quanto ao número de complexos *HLA-E* que poderiam ser formados a qualquer momento na superfície celular. Da mesma forma, o impacto de interações qualitativamente diversas poderia atuar em sua afinidade efetiva com os receptores presentes nas células NK e em outros tipos celulares da resposta imune (STRONG *et al.*, 2003).

No presente estudo investigamos a diversidade genética de *HLA-E* e sua relação com a infecção pelo HPV e as neoplasias intraepiteliais cervicais. Não foi possível atribuir a *HLA-E* o papel de um marcador genético com os fenótipos de susceptibilidade à infecção pelo HPV e/ou com o desenvolvimento das neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC II e NIC III). Muito embora, os genes da região *HLA* tenham sido associados com várias doenças de etiologia diversa, de natureza imune ou inflamatória, o resultado da não associação poderia ser atribuído ao número amostral, que seria um fator limitante na detecção da mesma. O impacto de *HLA-E* na pesquisa biomédica dependerá de estudos futuros de expressão gênica e caracterização da diversidade alélica de *HLA-E* com maior resolução o que permitirá melhor entendimento sobre interações entre as proteínas codificadas pelos alelos *HLA-E\*01:01* e *HLA-E\*01:03* com seus ligantes e ou receptores, e o risco da doença, bem como nas medidas que permitam selecionar estratégias de triagem genética e prevenção do câncer cervical.

## 8 CONCLUSÕES

1 - O tabagismo foi um fator associado a uma chance maior (2,15 vezes) de persistência viral e progressão da lesão epitelial cervical quando comparado com as mulheres não fumantes. O mesmo resultado foi observado com o uso de AHO, aumentando a chance de persistência viral e progressão da lesão epitelial cervical em 2,62 vezes.

2 - Não houve diferença estatisticamente significativa entre as frequências alélicas e genotípicas de *HLA-E* entre controles com e sem HPV.

3 - Não houve diferença estatisticamente significativa entre as frequências alélicas e genotípicas entre pacientes com lesões neoplásicas intraepiteliais cervicais de graus II e III e grupo controle.

## REFERÊNCIAS

ANTOUN, A.; JOBSON, S.; COOK, M.; MOSS, P.; BRIGGS, D. Ethnic variability in human leukocyte antigen-E haplotypes. **Tissue Antigens**, v. 73, p. 39-45, 2008.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

BOSCH, F. X.; DE SANJOSÉ, S. The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Dis Markers**, v. 23, n. 4, p. 213–227, 2007.

BOSCH, F. X.; LORINCZ, A.; MUNOZ, N.; MEIJER, C. J.; SHAH, K. V. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **J. Clin Pathol**, v. 55, p. 244-265, 2002.

COCUZZA, C. E.; MARTINELLI, M.; SINA, F.; PIANA, A.; SOTGIU, G.; DELL'ANNA, T.; MUSUMECI, R. Human papillomavirus DNA detection in plasma and cervical samples of women with a recent history of low grade or precancerous cervical dysplasia. **PLoS One**, v. 12, n. 1, e0188592, 2017.

CAVALLO, F.; DE GIOVANNI, C.; NANNI, P.; FORNI, G.; LOLLINI, P. L. The immune hallmarks of cancer. **Cancer Immunol Immunother**, v. 60, n. 3, p.319-26, 2011.

CAROSSELA, E. D.; MOREAU, P.; LE MAOULT; ROUAS-FREISS, N. HLA-G from biology to clinical benefits. **Trends Immunol**, v. 29, n. 3, p. 125-132, 2008.

CAROSSELA, E D. The tolerogenic molecule HLA-G. **Immunol Letters**, v. 138, n. 1, p. 22-24, 2011.

CHATTOPADHYAY, K. A. A comprehensive review on host genetic susceptibility to human papillomavirus infection and progression to cervical cancer. *Indian. J Hum Genet*, v. 17, n. 3, p. 132-44, 2011.

COOK, M. A.; MOSS, P. A. H.; BRIGGS, D. C. The distribution of 13 killer-cell immunoglobulin-like receptor loci in UK blood donors from three ethnic groups. **Eur J Immunogen**, v. 30, p. 213-221, 2003.

DUNN, G. P.; BRUCE, A. T.; IKEDA, H.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. **Nat Immunol.**, v. 3, n. 11, p. 991-8, 2002.

EVANDER, M.; EDLUND, K.; GUSTAFSSON, A.; JONSSON, M.; KARLSSON, R.; RYLANDER, E.; WADELL, G. Human papillomavirus infection is transient in Young women: a population-based cohort study. **J Infect Dis**, v. 171, p. 1026-1030, 1995.

FERNS, D.M.; HEEREN, A. M.; SAMUEL, S. S.; et al. Classical and non-classical HLA class I aberrations in primary cervical squamous- and adenocarcinomas and paired lymph node metastases. **J Immunother Cancer**, v. 4, n. 78, 2016.

FERGUSON, R.; RAMANAKUMAR, A. V.; RICHARDSON, H.; TELLIER, P. P.; COUTLEE, F.; FRANCO, E. L.; ROGER, M. Human leukocyte antigen HLA-E and HLA-G polymorphisms in human papillomavirus infection susceptibility and persistence. **Human Immunol**, v. 27, p. 337-341, 2011.

GARLAND, S. M. Human papillomavirus update with a particular focus on cervical disease. **Pathology**, v. 34, p. 213-24, 2002.

HO, G. Y.; BURK, R. D.; KADISH, A. S.; CHANG, C. J.; PALAN, P.; BASU, J.; TACHEZY, R.; LEWIS, R.; ROMNEY, S.; Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. **J Nat Cancer Inst**, v. 87, p. 1365-1371.

HORTON, R.; WILMING, L.; RAND, V.; LOVERING, R. C.; BRUFORD, E. A.; KHODIYAR, V. K.; LUSH, M. J.; POVEY, S.; TALBOT, C. C. J. R.; WRIGHT, M. W.; WAIN, H. M.; TROWSDALE, J.; ZIEGLER, A.; BECK, S. Gene map of the extended human MHC **Nature Rev Genet**. v. 5, n. 12, p. 889-99, 2004.

IWASKO, M.; BOGUNIA-KUBIK, K. Clinical Significance of the HLA-E and CD94/NKG2 Interaction. **Arch Immunol Ther Exp**, v. 5, p. 353-367, 2011.

KANODIA, S.; FAHEY, L. M.; KAST, W. M. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. **Cur Cancer Drug Targ**, v. 7, n. 1, p. 79-89, 2007.

KRENSKY, A. M. The HLA system, antigen processing and presentation. **Kidney Int Suppl**, v. 58, S2-7.

LOWY, D. R.; KIRNBAUER, R.; SCHILLER, J. T. Genital Human Papillomaviruses. **Proc Natl Acad Sci**, v. 91, p. 2436-2440, 1994.

MENIER, CATHERINE & ROUAS-FREISS, NATHALIE & CAROSELLA, EDGARDO. The *HLA-G* non-classical MHC class I molecule is expressed in cancer with poor prognosis. Implications in tumour escape from immune system and clinical applications. **Atlas Gen Cytogen Oncol Haematol**, v. 13, 2011

MOTOYAMA, S.; LADINES-LLAVE, C. A.; LUIS, VILLANUEVA, S.; MARUO, T. The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. **J. Med Sci**, v. 50, p. 9-19, 2004.

MUÑOZ, N.; FRANCESCHI, S.; BOSSETI, C.; MORENO, V.; HERRERO, R.; SMITH, J.S.; SHAH, K. V.; MEIJER, C. J.; BOSCH, F. X. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. **Lancet**, v. 359, p. 1093-101, 2002.

MCCREDIE, M. R. E.; SHARPLES, K. J.; PAUL, C.; BARANYAI, J.; MEDELEY, G. T.; JONES, R. W.; et al. Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer

in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study. **Lancet Oncol**, v. 9, p. 425-34, 2008.

MAGNUSSON, P. K.; GYLLENSTEN, U. B. Cervical cancer risk: is there a genetic component? **Mol Med Today**, v. 6, p. 145-8, 2000.

NASIELL, K.; ROGER, V.; NASIEL, M. Behavior of mild cervical dysplasia during long-term follow-up. **Obstet Gynecol**, v. 67, n. 5, p. 665-9, 1986.

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

PIETRA, G.; ROMAGNANI, C.; MORETTA, L.; MINGARI, M. C. HLA-E and HLA-E-bound peptides: recognition by subsets of NK and T cells. **Curr Pharm Des**, v. 15, n. 28, p. :3336–44, 2009.

STRONG, R.K.; HOLMES, M. A.; LI, P.; BRAUN, L.; LEE, N.; GERAGHTY, D.E. HLA-E allelic variants. Correlating differential expression, peptide affinities, crystal structures, and thermal stabilities. **J Biol Chem**, v. 278, p. 5082-5090, 2003.

SPAANS, V. M.; PETERS, A. A.; FLEUREN, G.J.; JORDANOVA, E. S. HLA-E expression in cervical adenocarcinomas: association with improved long-term survival. **J Transl Med**, v. 10, p. 184, 2012.

TOWNSEND, A.; BODMER, H. Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes. **Ann. Rev. Immunol**, v. 7, p. 601-624, 1989.

ULBRECHT, M.; MODROW, S.; SRIVASTAVA, R.; PETERSON, P. A.; WEISS, E. H. Interaction of HLA-E with peptides and the peptide transporter in vitro: implications for its function in antigen presentation. **J Immunol**, v. 160, p. 4375-4385, 1998.

VILLA, L. L. Human papillomaviruses and cervical cancer. **Adv Cancer Res**, v. 71, p. 321-341, 1997.

VEIGA-CASTELLI, L. C.; CASTELLI E. C.; MENDES, C. T. JR.; DA SILVA, W. A. JR.; FAUCHER, M. C.; BEAUCHEMIN, K.; ROGER, M.; MOREAU, P.; DONADI, E. A. Non-classical *HLA-E* gene variability in Brazilians: a nearly invariable locus surrounded by the most variable genes in the human genome. **Tissue Antigens**, v. 80, n. 1, p. 70-71, 2012.

WHO. **Comprehensive Cervical Cancer Control: a guide to essential practice**. 2 ed, Geneva; 2006.

WALBOOMERS, J. M.; JACOBS, M. V.; MANOS, M. M. *et al.* Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer. Chattopadhyay K. A comprehensive review on host genetic susceptibility to human papillomavirus infection and progression to cervical cancer. **Indian J Hum Genet**, v. 17, n. 3, p. 132-44, 1999.

WISCHHUSEN, J.; WASCHBJSCH A.; WIENDL, H. Immune-refractory cancers and their little helpers an extended role for immune-tolerogenic MHC molecules HLA-G and HLA-E? ***Semin Cancer Biol***, v. 17, n. 6, p. 459-68, 2007.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses to vaccination and beyond. ***Biochem***, v. 73, n. 5, p. 498-503, 2008.

## APÊNDICE 1 - ARTIGO DE REVISÃO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO *BIOMED RESEARCH*

### **HLA-E and cervical cancer: a contemporary view.**

Jackline Rachel Franciosi<sup>1</sup>, Georgia Fernanda Gelmini<sup>2</sup>, Newton Sergio de Carvalho<sup>3</sup>, Maria da Graça Bicalho<sup>1,2</sup>.

1,3 Departamento de Tocoginecologia, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba (PR), Brasil. 1,2 Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba (PR), Brasil. Correspondence to Prof. Maria da Graça Bicalho, Ph.D. Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná. R. Cel. Francisco H. dos Santos S/N, Centro Politécnico – Jardim das Américas  
CP 19071, CEP 81.530.990, Curitiba –PR, Brazil  
Tel: +55 41 3361 1546, Fax: +55 41 3361 1729  
e-mail: ligh@ufpr.br; [mgbicalho@gmail.com](mailto:mgbicalho@gmail.com)

### **ABSTRACT**

Cervical Cancer incidence worldwide exceeds half a million new cases per year. The papilloma virus (HPV) being the major causative agent of CC uses a variety of strategies to evade immune surveillance, where the immune status varies from individual to individual. This immune evasion altered by HPV is reflected in persistent infections, causing the evolution of cervical neoplasia. The role of the immune system in viral recognition and elimination is of extreme relevance in the development of CC. HLA-E molecule and CD94/NKG2 receptors, which are expressed predominantly, but not exclusively, on NK cells' surface, are responsible for activating or inhibiting cytotoxic activity according to their function. The interaction between HLA-E and CD94/NKG2 molecules is one of the fundamental surveillance mechanisms in patients with CIN I, II and III, where HLA-E expression increased significantly, especially in HPV 16 and 18 infections. Higher HLA-E expression was observed in most histopathological types of CC, and at the same time was correlated to best survival of the patient. This review aims to summarize and discuss the immunologic role of HLA-E in the context of HPV infection and immune system evasion, and the oncogenic process of cervical cancer.

## **1.0 An introduction to human papillomavirus (HPV) infection and cervical cancer.**

Human papillomavirus (HPV) infection is associated with the oncogenic process of cervical cancer (CC). The CC incidence worldwide exceeds half a million new cases per year, especially in developing countries [1]. According to the International Agency for Research on Cancer (IARC) of the World Health Organization (WHO), more than 20 million new cases are expected in developing countries by 2025 [2]. The cervical cancer is the third most frequent type of cancer in Brazilian women, behind breast and colorectal, and the fourth leading cause of cancer death [3].

Cervical Cancer commonly affects women belonging to less favored socio-economic groups, with lower access to information and basic health services, which is the main path to the early detection of this kind of injuries. Following the human papillomavirus (HPV) infection, some factors are related to a significant increase in developing cervical abnormalities, such as multiple parity, early sexual intercourse, sexual promiscuity and smoking habits, especially in young people [4].

In the 90s, the improvement of molecular biology techniques has positively contributed to the identification of HPV that is responsible for 90% to 98% of the cases in neoplastic process. Effective procedures like early detection, suitable diagnosis and appropriate treatment have reduced the CC's mortality in developed countries, highlighting the relevance of new studies in this respect. In humans, specific HPV viruses' types were related to CC [5, 6].

In 2008, Harald Hausen received the Nobel Prize in Physiology or Medicine for having announced - more than three decades ago - the association between HPV viruses and cervical cancer. In his study, it was observed that cancer cells containing an oncogenic virus could present the viral DNA in their genome. In 1983, he discovered human papillomavirus type 16 (HPV 16), which together with HPV 18, are present in 80% of the biopsies performed in patients with CC [7, 8].

More than 200 HPV genotypes (denominated as types) are known and categorized based upon the phylogenetic genera, designated Alpha, Beta, Gamma, Mu and Nu, and numbered species. Each HPV type is evolutionarily adapted to particular human epithelial tissue. The Alpha genus contains the types that cause particularly important human disease. According to their presence in cervix malignant lesions, approximately 30 types of HPVs are classified as low-risk (6, 11, 42, 43 and 44) and high-risk (16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52 and 56) types. The high-risk types of the Alpha genus are sexually transmitted and are normally controlled

immunologically within 1–2 years. The HPV infections related to high-risk viruses are more susceptible to cervical cancer. Furthermore, HPV16 causes an even larger fraction of all other HPV-related non-cervical cancers (~85%). This unparalleled carcinogenicity of HPV16 compared with other high-risk HPV types makes it one of the most important human carcinogens [9, 10, 11].

The causal relation between HPV and cervical cancer is relied on extensive experimentation on tissue biopsies, tissue culture and other molecular biology analysis systems. Although some details still speculative and require further elucidation, the cellular and molecular mechanisms that follow HPV infections and the oncogenic process culminating in cervical cancer are more enlightened. Even though all HPV types show structural similarities in their DNA, variations in the carcinogenic potential of different types appear to be concentrated in the E6 and E7 proteins, mainly in the ability of these proteins to interact, alter or deregulate molecules that control the cell cycle [12].

## **2.0 HPV and immunological evasion strategies.**

Human papillomavirus (HPV) consists in a small double-stranded DNA molecule. The viral infection of mucosa keratinocytes' and the high-risk HPV types persistence in cutaneous mucosal tissues added to the continuous expression of viral proteins E6 and E7 have been associated with neoplastic progression and cervical cancer. The HPV life cycle differs from the other viruses types by remaining in contact with the host epithelium for a longer period than is necessary for its replication. This persistence, which results from evasion mechanisms, increases the risk of injuries and malignant transformations, such as the low level of expression of oncogenes and viral proteins characteristic of the early stages of infection, which are also not secreted (E1, E2, E4, E5, E6 and E7). Viral avoidance strategies that interfere with peptide transportation pathways prevent proper detection of T-lymphocyte-infected cells. Furthermore, as HPV does not cross the basement membrane it becomes less exposed to the action of immune cells, which contribute to the progression of the infection and the establishment of cervical neoplasms and/or cervical cancer [11, 12, 13].

Diversified mechanisms of active immune system evasion are used by HPV, in both early and late stages of the infection. Such strategies may occur in the intracellular environment by interfering with gene expression and the function of proteins in the host cell that would normally induce an antiviral response, like DNA methylation and suppression of immune-related genes. In the extracellular environment, HPV promotes decreased expression of

adhesion molecules, toll like receptors (TLRs) and chemokines, which impact on the network of interactions mediated by antigen presenting cells (APCs) and effector cells. The HPV E7 viral protein, for example, interferes with the transcription of the Class I HLA genes and the consequent displacement of HLA proteins into the cell membrane where they should present the viral peptides and play their essential role in immune vigilance. In addition, HLA-A and HLA-B molecules can be retained intracellularly by various mechanisms mediated by the viral protein E5. Interestingly, HLA-C and HLA-E are not influenced by the E5 protein [13, 14].

### **3.0 HLA molecules and cancer immunosurveillance.**

The concept that immune system can control cancer has been comprehensively discussed. Currently, the immune system is recognized for acting in three different manners to prevent cancer: (i) protecting the host against viral infection and hence suppressing virus-induced tumors, (ii) preventing the establishment of an inflammatory environment that favors tumorigenesis by pathogens elimination and prompt resolution of inflammation; and (iii) eliminating tumor cells in certain tissues since nascent transformed cells often co-express ligands for activating receptors on innate immune cells and tumor antigens that are recognized by immune receptors on lymphocytes of the adaptive immune system. A recent postulation suggests that tumors could be “edited” through a Darwinian selection process into poorly immunogenic tumor cell variants, which are invisible to the immune system and capable of grow progressively [15, 16].

An important gene cluster is located on the human chromosome 6, in a genomic region called the Major Histocompatibility Complex (MHC). Similar regions, considering the organization and gene content, have been described in all vertebrates and are given different denominations according to the species. In humans, the MHC is frequently referred as HLA. The *HLA* Class I and II genes encode proteins of the same name, which are expressed in all nucleated cell membranes’ and whose main function is the presentation of peptides to T lymphocytes. HLA proteins play an important role in adaptive and also in innate immunity. In the implementation of the adaptive immune response, CD8<sup>+</sup> T lymphocytes interact with antigen-presenting cells (APCs) and recognize HLA molecule associated with a peptide derived from pathogens. In the counterpart of innate immune response, HLA molecules interact with inhibitory/activating receptors present in NK cells. The diversity of HLA class I and II proteins found in different populations, generate individual and differential efficiency in peptide presentation, which could determine patterns of susceptibility and/or protection fundamental

for the establishment and progression of a disease, whether of infectious or neoplastic nature [17, 18, 19, 20].

#### **4.0 HLA-E and its biological function.**

The *HLA-E* gene was described in 1988 by Koller *et al.* and was characterized by a notable loss of homology with other class I sequences (*HLA-A*, *-B* e *-C*) previously described. These differences results in the use of a different initiation codon, a leader peptide of only 21 amino acids, three unique amino acids at positions 2, 3 and 4, an in-frame termination codon in exon 7 and a class I protein shorter than most HLA-B and HLA-A heavy chains. Three *Alu* elements are found associated with this gene; one in the initiation codon, a second in intron 5, and a third in the 3' untranslated region. A second polyadenylation signal is located within the *Alu-3* sequence in intron 5. The 3' noncoding sequence is contained in exons 7 and 8 and has several features differentiating it from that of other class I genes. The most interesting difference is the larger number of amino acid substitutions in the *HLA-E* encoded protein at positions conserved among *HLA* class I genes. These structural features make *HLA-E* easily distinguishable from other class I genes. As a matter of fact, *HLA-E* looks like a “patchwork” of the *HLA-A*, *-B* and *-C* genes, suggestive of gene conversion or nonreciprocal recombination occurring between *HLA-E* and other class I genes [21].

The human leukocyte antigen (HLA)-E differing from the other class Ib molecules is expressed in most tissues, although at lower levels than class Ia molecules. Primarily recognized for its role in innate immunity, recent evidence suggests HLA-E acting as a ligand for T cells and participating in transplantation outcome. The overall structure of HLA-E is very similar to the class Ia molecules, with the conservation of interaction with  $\beta$ 2-microglobulin, the conformation of the CD8-binding loop, the size of the groove and the general orientation of the peptide within the groove [22, 23].

The structure of HLA-E shows the molecule to be highly adapted for specific binding of class I leader peptides derived from 3-11 amino acid residues of most HLA-A, -B, -C and -G molecules [23]. The loading of these peptides into HLA-E depends on the transporter associated with antigen processing (TAP), as cell lines deficient in TAP, like lymphoblastoid cell line LCL 721.134, are unable to express HLA-E at cell surface [24]. The close correlation between the surface expression of HLA-E and other MHC class I molecules suggested a possible role for HLA-E in NK-cell mediated recognition of target cells [25].

This mechanism may be important in preventing auto-reactivity of NK cells, in particular by NK cells lacking KIR specific for self-HLA class I molecules [26].

The peptide binding groove of HLA-E is composed of five anchor residues at positions P2, P3, P6, P7 and P9 that together impose stringent restrictions on the peptide sequence capable of binding to HLA-E, in contrast to classical MHC-I molecules that are commonly constrained at two or three positions of the peptide. In addition, the loop on the  $\alpha 3$  domain of HLA-E molecule, corresponding to the region associated with binding to CD8, contains a significant difference from the structure of class Ia molecules [22].

HLA-E was primarily involved in the regulation of innate immunity. The interaction between HLA-E molecules and CD94/NKG2 receptors is one of the fundamental immune surveillance mechanisms. These receptors are members of the C-type lectin superfamily, and consist of an invariant CD94 subunit disulfide-bound to a component of the NKG2 family. The NKG2 family comprises inhibitory (2A and 2B) and activating (2C, 2E and 2H) isoforms and when in complex with CD94 are capable of transducing signals upon ligation with HLA-E. The NK cells are characterized by their ability to detect neoplastic transformation or viral infection and to lyse a wide spectrum of cell types [22, 27].

Binding affinity between HLA-E and CD94/NKG2 receptor has been shown to correlate strongly with the intensity of the killer cells' response. A difference is observed between CD94/NKG2A inhibitory receptors and CD94/NKG2C activating receptors, and these receptors' properties allow for dynamic control of cytotoxicity and cytokine secretion. Lysis is triggered only when the reactive dominance of inhibitory receptors falls below a critical threshold. HLA-E could gradually change its peptide repertoire from NK cell protective to non-protective complexes during infections and inflammatory responses. Such a mechanism could be important to decrease the threshold for NK cell activation during an immune response against infections, without necessarily involving a specific pathogen-induced cellular change. Thus, HLA-E plays a dual role as a marker for cellular health and integrity [22, 26, 27, 28].

A new function for HLA-E was recently established when the molecule was implicated in adaptive immunity through interaction with T-cell receptor (TCR), expressed by  $\alpha\beta$ CD8 T cells. The best characterized example is the complex of HLA-E and human cytomegalovirus (HCMV) UL 40 antigen. Furthermore, HLA-E can also interact and present antigens derived from viruses, mycobacteria and heat-shock protein (hsp60) [28, 29, 30].

The *HLA-E* gene presents 27 alleles encoding 8 different proteins and 1 null allele according to data available on the IMGT website [31], being the gene with the lowest number of alleles of all *HLA* class I genes. Among these alleles, two subtypes are more frequently found in different population and association studies and are derived from a non-synonymous polymorphism in exon 3, located in the  $\alpha 2$  domain of the heavy chain peptide. The *HLA-E\*01:01* allele encodes for an arginine at amino acid position 107, while *HLA-E\*01:03* encodes a glycine. Several studies revealed significant differences between the variants E\*01:01 and E\*01:03, considering the level of expression on the cell surface and their affinity for ligands. The change in position 107 of the protein structure could alter both the interaction of HLA-E with CD94-NKG2 and with other receptors, such as the TCR. Therefore, this allelic variation could have two effects on receptor interaction, the first determining quantitative differences in the number of HLA-E complexes that could be formed at any time on the cell surface, and the second on the qualitative distinction of the molecules as to their effective affinity of interacting with receptors [32].

## **5.0 HLA-E in the context of HPV infection and cervical cancer.**

In the study made by Marin *et al.* (2003), which main focus was to investigate HLA-E expression on human tumors, it was observed that tumor cells that exhibit complex HLA class I phenotypes (allelic or haplotype *HLA* loss rather than total HLA loss) may show significant HLA-E expression at the cell surface. This efficient immune escape mechanism, simultaneously inhibit CTLs by losing the restriction element and NK cells activities by expressing HLA-E at the cell surface, allowing tumor cells to escape immune surveillance [33].

The genotypic and phenotypic integrity of all available HLA class I loci in patients diagnosed with CC was measured in the investigation conducted by Sheu *et al.* (2005). The association and infected status of HPV strains were also evaluated. It was demonstrated significant alterations of HLA genotypes with reduced HLA class I molecule expression in human CC cells and that HPV integrations correlate, at least in part, with the HLA genetic alterations and decreased HLA expression. The disruptions of the HLA genes can be possible tactics carried out by HPV to attain the potential carcinogenetic purposes, and thus the cancer immune escape [34]

Ashrafi *et al.* (2005), investigate the role of E5 Protein of Human Papillomavirus Type 16 in the regulation of surface HLA Class I molecules. It was observed that HPV-16 E5 prevents the transport of HLA class I complexes to the cell surface due to retention in the Golgi apparatus and selectively downregulates HLA-A and HLA-B molecules on the cell surface but does not affect the transport of HLA-C and HLA-E. Furthermore, E5 can disrupt several critical components of the cell-mediated immune response to viruses, which may contribute to the establishment and persistence of HPV infection. However, the downregulation of HLA class I in cervical carcinomas, which often do not express E5, is common to other cancer types and therefore unlikely to be due to E5. No correlation was made between HLA class I downregulation and E5 expression in CIN, and this point warrants further investigation [35].

In order to evaluate the associations between HLA class I classical (A–C) and non-classical (G and E) molecules and CC, Gonçalves *et al.* (2008) assessed the expression of these molecules in cervical biopsies stratified according to the grade of the lesion and to the presence of high-risk HPV types (HPV16 and 18), using p16INK4a staining (recognized biomarker for cervical lesion progression). They hypothesized that similarly to other viral models, HPV infection may downregulate MHC class I molecules, by producing peptides homologous to HLA class I leader peptides, which upregulate HLA-E expression, allowing HPV to escape NK immune surveillance. The HLA-E molecule overexpression was interestingly linked to CIN progression and HPV16/18 infection, with potential applications for cervical cancer prediction [36].

In a different approach investigation made by Ferguson *et al.* (2011), they examined whether *HLA-E* and/or *HLA-G* polymorphisms could be associated with human papillomavirus (HPV) infection susceptibility and persistence. They report evidence of an association between some *HLA-G* alleles (*HLA-G\*01:01:02* and *-G\*01:03* alleles) and HPV infection. However, *HLA-E* polymorphism was not associated with either risk of acquisition or persistence of HPV infection [37].

In another evaluation of HLA-E expression in the context of cervical and ovarian cancer, Gooden *et al.* (2011) observed that HLA-E hampers activity of antitumor CTLs in the tumor microenvironment. Instead of inhibiting NK cells, which are hardly present in these tumor types, the main role of HLA-E seems to be the inhibition of infiltrating CD8<sup>+</sup> CTLs. Hence, HLA-E expression in ovarian and cervical cancer is the result of a smoldering inflammatory response. These results are suggestive of an emerging concept that entails the

presence of an inflammatory milieu that can either promote tumor progression or antitumor activity [38].

Spaans *et al.* (2012) report, for the first time, the expression of HLA-E in a large and well-defined cohort of cervical adenocarcinoma (AC) patients and compare this expression with previous measurements of HLA-E expression in cervical squamous cell carcinoma (SCC) and adenosquamous (ASC). Furthermore, they investigate the associations between HLA-E expression, clinicopathological parameters, and disease-specific and recurrence-free survival of these cervical cancer patients. High expression of HLA-E occurred in 53% of all histopathological subtypes, although HLA-E was more frequently overexpressed in cervical AC patients than in cervical SCC and ASC. High expression of HLA-E in AC patients was found to be associated with improved long-term disease-specific and recurrence-free survival. This study also highlights the importance of careful and reliable histopathological evaluation to precisely define histopathological tumor subtypes [39].

## 6.0 Conclusion

Molecular methodologies are key tools used throughout the world for their ability to accuse the presence of HPV viruses before the development of neoplastic alterations. The progressive knowledge about HLA-E function and expression in the context of HPV infection and cervical cancer, signalize to potential applications of this molecule for prediction. Furthermore, in a recent study of Cicchini *et al.* (2017), global gene expression and DNA methylation analyses were performed to identify key host factors and pathways altered by HPV-directed DNA methylation in human keratinocytes. They found that most class I major histocompatibility complex (MHC-I) molecules were transcriptionally downregulated in an E7-dependent manner. Further, non-classical *HLA-E*, which regulates NK and CD8<sup>+</sup> T cells, was significantly downregulated by E7-mediated hypermethylation in a distal regulatory CpG island (CGI). The main finding was that high-risk HPV E7 significantly downregulates *HLA-E* expression in keratinocytes, while low-risk HPV E7 increases *HLA-E* expression. This epigenetic repression of *HLA-E* expression by E7 suggests a previously undescribed immune evasion mechanism employed by high-risk E7, but not by low-risk E7. Additionally, HLA-E expression can be restored through treatment with the demethylating agent, 5-aza, which may provide a new therapeutic approach to treat HPV-positive lesions by activating the HLA-E mediated antitumor immune responses of NK and CD8<sup>+</sup> T cells.

### Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

### Authors' Contributions

Jackline Rachel Franciosi and Georgia Fernanda Gelmini contributed equally to this work. Newton Sergio de Carvalho and Maria da Graça Bicalho shared sênior authorship.

### Acknowledgements

This study was supported by the research fund of FUNPAR- LIGH and Coordination of improvement of higher-level personnel- CAPES/Brazil.

## REFERENCES

- [1] .TORPY, J. M.; BURKE, A. E.; GLASS, R. M. JAMA Patient Page. **Human Papillomavirus Infection**. JAMA, vol 297, nº 8, article nº 912. 2007.
- [2]. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The Cancer Incidence in Five Continents. Lyon, International Agency for Research on Cancer**. 1987, p 3-5. <http://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014>
- [3] INSTITUTO NACIONAL DO CANCER, **Colo do Útero**, INCA, 2018. [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo\\_uterio/definicao](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_uterio/definicao)
- [4] HARRIS, R. W. C.; BRINTON, L. A.; COWDELL, R. H.; SKEGG, D. C. G.; SMITH, P. G.; VESSEY, M.; DOLL, R.; **Characteristics of Women with Dysplasia or Carcinoma in situ of the Cervix Uterini**. Br. J. Cancer, vol.4, p.359-369, 1980.
- [5] PARKIN, D. M.; BRAY, F. **Chapter 2: The Burden of HPV Related Cancers**. Vaccine 24S3, p.11-25, 2006.
- [6] FRANCO, E. L.; VILLA. L. L.; RUIZ. A.; COSTA. M. C. **Transmission of Cervical Human Papillomavirus Infection by Sexual Activity: Differences between Low and High Oncogenic Risk Types**. Journal of Infectious Diseases, v.172, p.756 – 763, 1995.
- [7] THE NOBEL FOUNDATION. **2008 Nobel Prize Winner “for his discovery of human papiloma viruses causing cervical cancer”**. <http://nobelprize.org>
- [8] HAUSEN, Z. H. **Papillomaviruses in the Causation of Human Cancers – a brief historical account**. Virology, v.384, p.260-265, 2009.
- [9] LOWY, D. R.; KIRNBAUER, R.; SCHILLER, J.T. **Genital Human Papillomaviruses**. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 91, p.2436 – 2440, 1994.
- [10] LONDESBOROUGH, P. Ho. L.; TERRY, G.; CUZICK, J.; WHEELER, C.; SINGER, A. **Human Papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities**. International Journal of Cancer, v. 69, p. 364 – 368, 1996.

[11] SCHIFFMAN, M.; DOORBAR, J.; WENTZENSEN, N.; DE SANJOSÉ, S.; FAKHRY, C.; MONK, B.J.; STANLEY, M.A.; FRANCESCHI, S. **Carcinogenic human papillomavirus infection**. *Nat. Rev. Dis. Primers*, v. 2, p.1-20, 2016.

[12] BOSCH, F. X.; LORINCZ, A.; MUNOZ, N.; MEIJER, C. J.; SHAH, K.V. **The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer**. *J Clin Pathol*, v.55, p.244-265, 2002.

[13] STEINBACH, A.; RIEMER, A.B. **Immune evasion mechanisms of human papillomavirus: an update**. *International Journal of Cancer*, v.142, p.224-229, 2018.

[14] KUSS-DUERKOP, S.K.; WESTRICH, J.A.; PYEON, D. **DNA tumor virus regulation of host DNA methylation and its implications for immune evasion and oncogenesis**. *Viruses*, v.10, p.1-24, 2018.

[15] SCHREIBER, R. D.; OLD, L. J.; SMYTH, M. J. **Cancer immunoediting integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion**. *Science*, v.331, p.1565-1570, 2011.

[16] ZEESTRATEN, E. C. M.; REIMERS, M. S.; SAADATMAND, S.; DEKKER, J. W. T.; LIEFERS, G. J.; ELSSEN, V. D. P. J.; VELDE, V. D. C. J. H.; KUPPEN, P. J. K. **Combined analysis of HLA class I, HLA-E and HLA-G predicts prognosis in colon cancer patients**. *British Journal of Cancer*, v.110, p.459 – 468, 2014.

[17] TOWNSEND, A.; BODMER, H. **Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes**. *Ann. Rev. Immunol*, v.7, p.601-624, 1989.

[18] VELUCHAMY, J. P.; HEEREN, A. M.; SPANHOLTZ, J.; VAN EENDENBURG, J. D. H.; HEIDEMAN, D. A. M.; KENTER, G.G.; VERHEUL, H. M.; VAN DER VLIET, H. J.; JORDANOVA, E. S.; GRUIJL, T. D. **High-efficiency lysis of cervical cancer by allogenic NK cells derived from umbilical cord progenitors is independent of HLA status**. *Cancer Immunol Immunother*, v.66, p.51-61, 2017.

[19] BERG VAN DER, H. A.; RAND, D. A.; BURROUGHS, N. J. **A reliable and safe T cell repertoire based on low-affinity T cell receptors**. *J. Theor. Biol*, v.209, p.465-486, 2001.

[20] SVEJGAARDA, A.; PLATZ, P.; RYDER, L. P.; NIELSEN, L.S.; THOMSEN, M. **HLA and disease associations - a survey**. *Transplant Ver*, v.22, p.3-43, 1975.

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

[22] SULLIVAN, L.C.; CLEMENTS, C.S.; BROOKS, A.G. The major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E at the interface between innate and adaptive immunity. **Tissue Antigens**, v. 72, p. 415-424, 2008.

[23] O'CALLAGHAN, C.; BELL, J.I. **Structure and function of the human MHC class Ib molecules HLA-E, HLA-F and HLA-G**. *Immunological Reviews*, v.163, p.129-138, 1998.

[24] LEE, N., GOODLETT, D.R., ISHITANI, A., MARQUARDT, H., GERAGHTY, D.E. **HLA-E surface expression depends on binding of TAP-dependent peptides derived from certain HLA class I signal sequences**. *J. Immunol*, v.160, p. 4951–4960, 1998.

[25] BRAUD, V. M.; McMICHAEL, A. J. **Regulation of NK Cell Functions Through of the CD94/NKG2 Receptors with the Nonclassical Class I Molecule HLA-E**. *Curr Top Microbiol Immunol*, v.244, p.85-95, 1999.

[26] BORREGO, F.; ULBRECHT, M.; WEISS, E. H.; COLIGAN, J.E.; BROOKS, A.G. **Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2**

**confers protection from natural killer cell-mediated lysis.** *J Exp Med.*, v.187, p.813-818, 1998.

[27] IWASZKO, M.; BOGUNIA-KUBIK, K. Clinical Significance of the HLA-E and CD94/NKG2 Interaction. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, v.5, p.353-367, 2011.

[28] MICHAELSSON, J.; DE MATOS, C.T.; ACHOUR, A.; LANIER, L.L.; KARRE, K.; SODERSTROM, K. **A signal peptide derived from hsp60 binds HLA-E and interferes with CD94/NKG2A recognition.** *J. Exp. Med.*, v.196, p.1403–1414, 2002

[29] PIETRA, G.; ROMAGNANI, C.; FALCO, M.; VITALE, M.; CASTRICONI, R.; PENDE, D.; MILLO, E.; ANFOSSI, S.; BIASSONI, R.; MORETTA, L.; MINGARI, M.C. **The analysis of the natural killer-like activity of human cytolytic T lymphocytes revealed HLA-E as a novel target for TCR alpha/beta-mediated recognition.** *Eur. J. Immunol.*, v.31, p.3687–3693, 2001.

[30] TOMASEC, P.; BRAUD, V.M.; RICKARDS, C.; POWELL, M.B.; MCSHARRY, B.P.; GADOLA, S.; CERUNDOLO, V.; BORYSIEWICZ, L.K.; MCMICHAEL, A.J.; WILKINSON, G.W. **Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40.** *Science*, v.287, p.1031–1033, 2000.

[31] ROBINSON, J.; HALLIWELL, J.A.; MARSH, S.G. IMGT/HLA and the Immuno Polymorphism Database. *Methods in Molecular Biology*, v.1184, p.109-21, 2014.

[32] STRONG, R.K.; HOLMES, M.A.; LI, P.; BRAUN, L.; LEE, N.; GERAGHTY, D.E. **HLA-E allelic variants. Correlating differential expression, peptide affinities, crystal structures, and thermal stabilities.** *J Biol Chem*, v. 278, p.5082-5090, 2003.

[33] MARÍN, R.; RUIZ-CABELLO, F.; PEDRINACI, S.; MÉNDEZ, R.; JIMÉNEZ, P.; GERAGHTY, D. E.; GARRIDO, F. **Analysis of HLA-E Expression in Human Tumors.** *Immunogenetics*, v. 54, p.767–775, 2003.

[34] SHEU, B.C; CHIOU, S.H.; CHANG, W.C.; CHOW, S.N.; LIN, H.H.; CHEN R.J.; HUANG, S.C.; HO, H.N.; HSU, S.M. **HLA genotype aberration and reduced HLA class I molecule expression in human cervical carcinoma.** *Clinical Immunology*, v.115, p.295–301, 2005.

[35] ASHRAFI, G.H.; HAGHSHENAS, M.R.; MARCHETTI, B.; O'BRIEN, P.M.; SAVERIA CAMPO, M. **E5 Protein of Human Papillomavirus Type 16 Selectively Downregulates Surface HLA Class I.** *Int. J. Cancer*, v.113, p.276–283, 2005.

[36] GONÇALVES, M. A.; LE DISCORDE, M.; SIMÕES, R. T.; RABREAU, M.; SOARES, E. G.; DONADI, E. A.; CAROSELLA, E. D. **Classical and Non-Classical HLA Molecules and p16(INK4a) Expression in Precursors Lesions and Invasive Cervical Cancer.** *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, v141, p.70–74, 2008.

[37] FERGUSON, R.; RAMANAKUMAR, A.V.; RICHARDSON, H.; TELLIER, P.P.; COUTLEE., F.; FRANCO, E.L.; ROGER, M. **Human leukocyte antigen (HLA)-E and HLA-G polymorphisms in human papillomavirus infection susceptibility and persistence.** *Human Immunology*, v.72, p. 337–341, 2011.

[38] GOODEN, M.; LAMPEN, M.; JORDANOVA, E. S.; LEFFERS, N.; TRIMBOS, J. B.; VAN DER BURG, S. H.; NIJMAN, H.; VAN HALL, T. **HLA-E Expression by Gynecological Cancers Restrains Tumor-infiltrating CD8+ T Lymphocytes.** *Proc Natl Acad Sci*, v. 108, p.10656-10661, 2011.

[39] SPAANS, V. M.; PETERS, A. W. A.; FLEUREN, J. G.; JORDANOVA, S. E. **HLA-E Expression in Cervical Adenocarcinomas: Association with Improved Long-term Survival.** *Journal of Translational Medicine*, v.10, p.1-11, 2012.

[40] CICCHINI, L.; BLUMHAGEN, R.Z.; WESTRICH, J.A.; MYERS, M.E; WARREN, C.J.; SISKI, C.; RABEN, D.; KECHRIS, K.J.; PYEON, D. **High-Risk Human Papillomavirus E7 Alters Host DNA Methylome and Represses *HLA-E* Expression in Human Keratinocytes**. *Scientific Reports*, v.7, p.1-12, 2017.

## ANEXO 1- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

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

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

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

e) Não há riscos envolvidos para você.

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

g) A sua participação neste estudo é voluntária.

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

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

i) Os pacientes e controles participando do estudo não tem obrigação financeira e não tem que pagar por qualquer coisa relacionada a este projeto.

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

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

Eu, \_\_\_\_\_ li o texto acima e compreendi a natureza e o objetivo da pesquisa para a qual eu fui convidada a participar. A explicação recebida enfatizou o fato de eu precisar doar uma amostra de sangue e do colo do útero e de que eu sou livre de interromper a minha participação a qualquer momento que eu decida fazê-lo.

Eu voluntariamente concordo em participar desta pesquisa.

\_\_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Paciente/Controle Assinatura

Data

Pesquisador