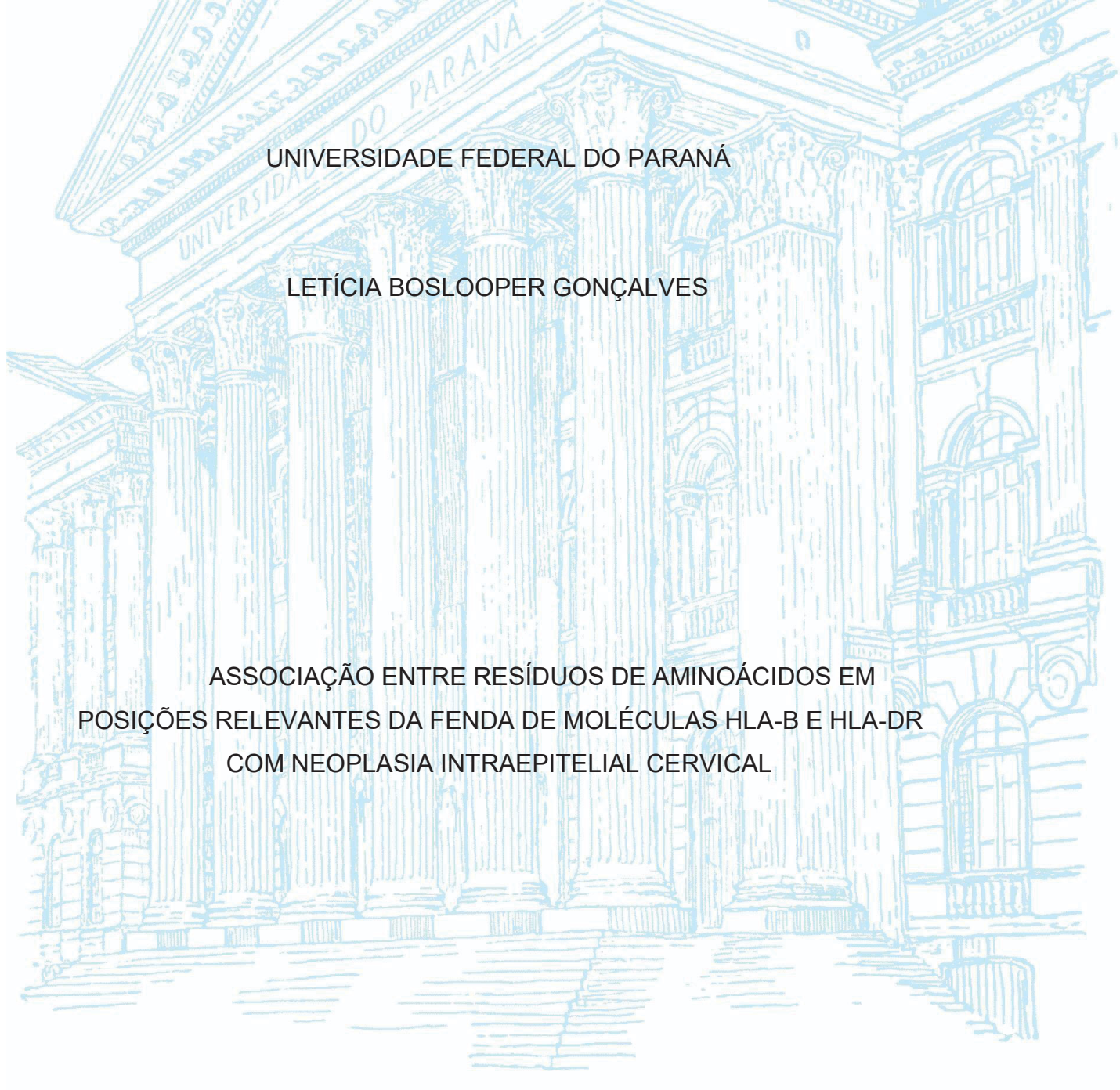




UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LETÍCIA BOSLOOPER GONÇALVES

ASSOCIAÇÃO ENTRE RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS EM
POSIÇÕES RELEVANTES DA FENDA DE MOLÉCULAS HLA-B E HLA-DR
COM NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL

CURITIBA

2020

LETÍCIA BOSLOOPER GONÇALVES

ASSOCIAÇÃO ENTRE RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS EM
POSIÇÕES RELEVANTES DA FENDA DE MOLÉCULAS HLA-B E HLA-DR
COM NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre, do Programa de pós-graduação em Genética, Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Patrícia Savio de Araujo Souza

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Angélica Beate Winter Boldt

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Gonçalves, Letícia Boslooper.

Associação entre resíduos de aminoácidos em posições relevantes da fenda de moléculas HLA-B e HLA-DR com neoplasia intraepitelial cervical. / Letícia Boslooper Gonçalves. – Curitiba, 2020.
117 f. : il.

Orientadora: Patrícia Savio de Araújo Souza.

Coorientadora: Angélica Beate Winter Boldt.

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

1. Câncer - Pesquisa. 2. Colo uterino - Câncer. 3. HPV. 4. Vírus do papiloma. I. Título. II. Souza, Patrícia Savio de Araújo. III. Boldt, Angélica Beate Winter. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (20. ed.) 616.994

ATA Nº325

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM GENÉTICA

No dia oito de abril de dois mil e vinte às 14:00 horas, na sala Sala 65, Departamento de Genética, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação da mestranda **LETÍCIA BOSLOOPER GONÇALVES**, intitulada: **Associação entre resíduos de aminoácidos em posições relevantes da fenda de moléculas HLA-B e HLA-DR com neoplasia intraepitelial cervical**, sob orientação da Profa. Dra. PATRICIA SAVIO DE ARAUJO SOUZA. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: PATRICIA SAVIO DE ARAUJO SOUZA (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), MARIA LUIZA PETZL ERLER (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), DOUGLAS ADAMOSKI MEIRA (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de mestre está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, PATRICIA SAVIO DE ARAUJO SOUZA, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 08 de Abril de 2020.

Assinatura Eletrônica

27/04/2020 13:54:54.0

PATRICIA SAVIO DE ARAUJO SOUZA

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

27/04/2020 10:30:18.0

MARIA LUIZA PETZL ERLER

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

27/04/2020 09:49:29.0

DOUGLAS ADAMOSKI MEIRA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO GENÉTICA -
40001016006P1

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **LETÍCIA BOSLOOPER GONÇALVES** intitulada: **Associação entre resíduos de aminoácidos em posições relevantes da fenda de moléculas HLA-B e HLA-DR com neoplasia intraepitelial cervical**, sob orientação da Profa. Dra. PATRICIA SAVIO DE ARAUJO SOUZA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 08 de Abril de 2020.

Assinatura Eletrônica

27/04/2020 13:54:54.0

PATRICIA SAVIO DE ARAUJO SOUZA

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

27/04/2020 10:30:18.0

MARIA LUIZA PETZL ERLER

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

27/04/2020 09:49:29.0

DOUGLAS ADAMOSKI MEIRA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Setor de Ciências Biológicas, Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1587 - E-mail: ppg-gen@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 40203

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 40203

À minha mãe, Margareth Boslooper, que sempre esteve presente na minha
vida e soube prezar pela minha educação.

AGRADECIMENTOS

À Deus e ao universo;

À minha mãe, Margareth Boslooper, por sempre me apoiar e proferir palavras de apoio em momentos difíceis, além de abraçar meus sonhos junto comigo;

Às professoras Dr.^a Patrícia Savio de Araujo-Souza e Dr.^a Angelica Beate Winter Boldt, por me orientarem brilhantemente e estarem sempre dispostas a me ajudar;

À professora Maria da Graça Bicalho, por disponibilizar os dados de *HLA-B* e *HLA-DRB1* para reanálise;

Ao LIGH, por disponibilizar o treinamento necessário, dado pela Dr.^a Renata, para o uso do *HLA Fusion* e o espaço físico para realizar as análises;

Aos colegas de trabalho, especialmente à Natália Petry, por ajudar no desenvolvimento deste projeto;

Aos voluntários que aceitaram participar do trabalho, que se disponibilizaram a colaborar para o avanço da ciência;

À CAPES, pela disponibilização da bolsa de auxílio ao pesquisador, durante todo o período do mestrado.

RESUMO

O carcinoma do colo do útero (CCU) é um dos principais responsáveis pela mortalidade feminina mundial. Diferentemente da maioria dos cânceres, o CCU apresenta estádios precursores que podem levar anos até a progressão para um carcinoma invasivo. Estas lesões denominam-se neoplasias intraepiteliais cervicais (NICs) e são classificadas como de baixo (NIC I) ou de alto grau (NIC II e III). A infecção pelo HPV é um fator necessário, mas não suficiente para o desenvolvimento de NICs e CCU. Fatores ambientais e genéticos também podem influenciar no desenvolvimento e progressão da doença. As moléculas HLA são responsáveis pela apresentação de antígenos aos linfócitos T, que tem um papel fundamental na resposta imunológica frente ao HPV. As moléculas HLA clássicas são codificadas pelos genes HLA, como *HLA-B* e *HLA-DRB1*. Alelos destes genes já foram previamente associados com infecções virais e câncer, dentre eles o CCU. Resíduos de aminoácidos presentes nas moléculas HLA também já foram associados ao CCU, em especial os da posição 156 da cadeia polipeptídica de *HLA-B* e 13 e 71 do *pocket* 4 de *HLA-DRB1*, presentes na fenda de ligação aos peptídeos. O objetivo deste trabalho é investigar se há associação entre alelos dos genes *HLA-B* e *HLA-DRB1*, assim como os resíduos de aminoácidos presentes nas posições 156 da cadeia polipeptídica de *HLA-B* e 13 e 71 do *pocket* 4 de *HLA-DRB1* com neoplasia intraepitelial cervical, na população de Curitiba e região metropolitana. Dados sócio comportamentais foram obtidos através de questionários epidemiológicos e amostras de sangue e raspado cervical foram coletadas de mulheres com citologia normal, NIC II e NIC III. O DNA do sangue periférico foi utilizado na genotipagem de *HLA-B* e *HLA-DRB1*, realizada por PCR-SSOP. O resultado foi interpretado com auxílio do programa *HLA Fusion*, bem como a determinação dos resíduos de aminoácidos encontrados nas posições de interesse. Os testes do qui-quadrado e exato de Fisher bicaudal foram utilizados nas análises univariadas. As análises multivariadas foram feitas por regressão logística. Quando aplicável, foi calculado o *odds ratio* (OR) com intervalo de confiança de 95% (IC 95%). Valores de *p* menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes. Os alelos *HLA-B*39* e *HLA-DRB1*13:01* foram associados negativamente a NIC II/III (*p* = 0,04; OR = 0,37 [IC 95% = 0,14-0,97]; *p* = 0,02; OR = 0,43 [IC 95% = 0,21-0,90]); respectivamente). A associação com o alelo *HLA-DRB1*13:01* se manteve após a regressão logística (*p* = 0,006; OR = 0,32; [IC 95% = 0,14-0,72]), mas o mesmo não ocorreu com *HLA-B*39* (*p* = 0,21; OR = 0,47; [IC 95% = 0,15-1,52]). Foi observada uma associação entre o genótipo histidina/tirosina, na posição 13 de *HLA-DRB1*, e NIC II/III (*p* = 0,03; OR = 3,97 [IC 95% = 1,1-14,37]) e tendência semelhante foi verificada na regressão logística (*p* = 0,05; OR = 2,86 [IC95% = 0,99-15,01]). O aminoácido serina, presente na mesma posição, foi associado negativamente com NIC II/III na análise univariada (*p* = 0,02; OR = 0,58 [IC 95% = 0,37-0,92], contudo a associação não foi mantida após a regressão (*p* = 0,28; OR = 0,71 [IC 95% = 0,38-1,32]). Nossos resultados sugerem que o polimorfismo dos genes *HLA-B* e *HLA-DRB1* influencia a suscetibilidade às lesões cervicais causadas pelo HPV.

Palavras-chave: *HLA-B*. *HLA-DRB1*. Neoplasia intraepitelial cervical. HPV

ABSTRACT

Cervical cancer (CC) is one of the main causes of women mortality worldwide. Differently from other types of cancer, CC presents precancerous lesions stages, which can take years until the progression to invasive cancer, called cervical intraepithelial neoplasia (CIN). It can be classified as low-grade (CIN I) and high grade (CIN II/III). Although HPV infection is a necessary cause for CIN and CC development, it is not enough. Environmental and genetic factors play an important role in disease development and progression. Classical HLA molecules are responsible for antigen presentation to T cells, which play a fundamental role in the immune response against HPV and CC. HLA molecules are coded by HLA genes, such as *HLA-B* and *HLA-DRB1*. Alleles from these genes have been previously associated with viral infections and cancer, including CC. Amino-acids residues at HLA molecules have also been associated with CC, especially the ones carried at position 156 in *HLA-B* and positions 13 and 71 in pocket 4 of *HLA-DRB1*. We aimed to investigate if there are *HLA-B* and *HLA-DRB1* polymorphism association with CIN II/III, as well as the amino-acids residues at position 156 in *HLA-B* and positions 13 and 71 in pocket 4 of *HLA-DRB1*, in a population from Curitiba-Brazil. Sociodemographic and behavioural characteristics were obtained by questionnaire. Cervical and blood samples were collected from women with normal cytology, CIN II and CIN III. DNA from blood samples were submitted to HLA typing, by PCR-SSOP. HLA Fusion interpreted the results from PCR-SSOP, as well as the amino-acids residues determination. Univariate statistical analyses were carried out using Chi-square and Fisher's Exact tests. Multivariate analyses were carried out using logistic regression. When it was applicable, the odds ratio (OR) with its respective 95% confidence interval (CI 95%) was calculated. P values < 0.05 were considered statistically significant. The Alleles *HLA-B*39* and *HLA-DRB1*13:01* were negatively associated with CIN II/III ($p = 0.04$; OR = 0.37 [CI 95% = 0.14-0.97]; $p = 0.02$, OR = 0.43 [CI 95% = 0.21-0.90]). The *HLA-DRB1*13:01* association persisted after logistic regression ($p = 0.006$, OR = 0.32 [CI 95% = 0.14-0.72]), but not with *HLA-B*39* ($p = 0.21$, OR = 0.47, [CI 95% = 0.15-1.52]). The amino-acid combination histidine/tyrosine, carried at position 13 in pocket 4 of *HLA-DRB1*, was associated with CIN II/III susceptibility ($p = 0.03$, OR = 3.97 [CI 95% = 1.1-14.37]). In logistic regression analyses, we found a tendency to association ($p = 0.05$, OR = 2.86 [CI 95% = 0.99-15.01]). Additionally, the serine amino-acid residue, carried at the same position, was associated with CIN II/III protection ($p = 0.02$, OR = 0.58 [CI 95% = 0.37-0.92]). However, it was not kept after logistic regression ($p = 0.28$, OR = 0.71 [CI 95% = 0.38-1.32]). Our outcomes suggest that polymorphism in *HLA-B* and *HLA-DRB1* genes make an important influence in genetic susceptibility to CIN, caused by HPV.

Keywords: *HLA-B*. *HLA-DRB1*. Cervical intraepithelial neoplasia. HPV.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	10
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1	NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL (NIC II E III) E CARCINOMA DE COLO DO ÚTERO (CCU)	11
2.2	INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV).....	15
2.3	A RESPOSTA IMUNOLÓGICA CELULAR	18
2.3.1	Mecanismos de evasão do sistema imunológico pelo HPV.....	19
2.4	GENES E MOLÉCULAS HLA.....	22
2.5	RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS PRESENTES NA 156 ^a POSIÇÃO DA CADEIA POLIPEPTÍDICA DE HLA-B E 13 ^a E 71 ^a POSIÇÕES DA CADEIA POLIPEPTÍDICA DE HLA-DRB1	28
3.	JUSTIFICATIVA	33
4.	OBJETIVOS	34
4.1	OBJETIVO GERAL.....	34
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
5.	MATERIAIS E MÉTODOS	35
5.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO	35
5.2	DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DE HPV	36
5.3	EXTRAÇÃO DE DNA E GENOTIPAGEM DE <i>HLA-B</i> E <i>HLA-DRB1</i>	36
5.4	GENOTIPAGEM EM ALTA RESOLUÇÃO DE <i>HLA-B</i> E <i>HLA-DRB1</i>	37
5.5	DEFINIÇÃO DOS AMINOÁCIDOS CODIFICADOS PELO CÓDON 156 DE HLA-B E CÓDONS 13 E 71 DA CADEIA DE HLA-DRB1.....	38
5.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
6.	RESULTADOS	43
6.1	CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO	43
6.2	GENE <i>HLA-B</i>	48
6.2.1	Resíduos de aminoácidos na posição 156 da cadeia polipeptídica de HLA-B	55
6.3	GENE <i>HLA-DRB1</i>	57
6.3.1	Aminoácidos na 13 ^a posição da cadeia polipeptídica de HLA-DRB1.....	61

SUMÁRIO

7.	DISCUSSÃO.....	66
8.	CONCLUSÕES.....	71
	REFERÊNCIAS	72
	APÊNDICE 1 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE <i>HLA-B</i> EM BAIXA RESOLUÇÃO EM PACIENTES E CONTROLES	78
	APÊNDICE 2 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE <i>HLA-B</i> EM ALTA RESOLUÇÃO EM PACIENTES E CONTROLES	83
	APÊNDICE 3 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE VARIANTES ALÉLICAS DE <i>HLA-DRB1</i> EM BAIXA RESOLUÇÃO.....	90
	APÊNDICE 4 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE VARIANTES ALÉLICAS DE <i>HLA-DRB1</i> EM ALTA RESOLUÇÃO	93
	APÊNDICE 5 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DOS AMINOÁCIDOS ENCONTRADOS NA POSIÇÃO 71 DE <i>HLA-DRB1</i>	100
	ANEXO 1 - APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	101
	ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	102
	ANEXO 3 - QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO	105
	ANEXO 4 - ALELOS CONTEMPLADOS PELAS SONDAS QUE HIBRIDIZAM NO CÓDON 156 DE <i>HLA-B</i>	107
	ANEXO 5 - ALELOS CONTEMPLADOS PELAS SONDAS QUE HIBRIDIZAM NO CÓDON 13 DE <i>HLA-DRB1</i>	109
	ANEXO 6 - ALELOS CONTEMPLADOS PELAS SONDAS QUE HIBRIDIZAM NA POSIÇÃO 71 DE <i>HLA- DRB1</i>	110
	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	102

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma do colo do útero (CCU) é um dos principais responsáveis pela mortalidade feminina mundial, especialmente em países emergentes, onde os programas de rastreio de lesões precursoras - as neoplasias intraepiteliais cervicais (NICs) - são limitados (SANJOSE et al., 2011; WHO, 2014). No Brasil, excetuando casos de câncer de pele não melanoma, este é o terceiro câncer com maior incidência em mulheres, após o câncer de mama feminino e o de cólon e reto (INCA, 2020). A infecção pelo papilomavirus humano (HPV) é um fator necessário para o desenvolvimento do CCU, porém não é suficiente. O HPV é um vírus epiteliotrópico, transmitido sexualmente e o DNA dos tipos de alto risco podem ser encontrados em 99,7% dos casos de CCU (WALBOOMERS et al., 1999). Mais de 200 tipos de HPV já foram identificados, sendo que aproximadamente 40 podem colonizar o trato genital. Cerca de 90% das infecções se tornam inativas entre 12 e 14 meses após a infecção pelo vírus. Entretanto, infecções pelos HPVs de alto risco oncogênico podem se tornar persistentes, aumentando o risco de progressão para NIC e CCU (LOPEZ et al., 2018). Fatores genéticos e imunológicos do hospedeiro, bem como fatores exógenos, também interferem no desenvolvimento da doença (SCHIFFMAN et al., 2016). A contribuição genética associada ao risco de desenvolver carcinoma de colo do útero pelo HPV é sustentada por diversas linhas de pesquisa. Dentre elas pode-se destacar as associações encontradas com polimorfismos de genes HLA, como o *HLA-B* e *HLA-DRB1*. Os alelos *HLA-B*07*, *B*44*, *B*51* e *B*57* foram previamente associados com HPV e CCU, em diversas populações (ZEHBE; MYTILINEOS; WIKSTRO, 2003; CHAN et al., 2006; BHATTACHARYA; SENGUPTA, 2007), assim como *HLA-DRB1*15* e *DRB1*13* (MACIAG et al., 2000a; CHAN et al., 2007; HU et al., 2014). Recentemente foi verificada a associação entre alelos que codificam determinados resíduos de aminoácidos presentes na 156ª posição de *HLA-B* e na 13ª e 71ª posições do *pocket 4* de *HLA-DRB1* com CCU. O resíduo de aminoácido serina, presente na posição 13 de *HLA-DRB1* foi associado com a diminuição do risco de apresentar CCU ($p = 5,14 \times 10^{-10}$; OR = 0,77)., enquanto o genótipo histidina/arginina, presente na mesma posição, foi associado ao aumento do risco ($p = 1,11 \times 10^{-16}$; OR = 1,37). Foi observada associação entre o resíduo de aminoácido alanina, presente na

posição 71 de HLA-DRB1, e o aumento do risco de apresentar carcinoma de colo do útero (OR = 1,42, $p = 1,44 \cdot 10^{-11}$). Já o aminoácido ácido glutâmico, presente na mesma posição, apresentou uma associação negativa com a doença (OR = 0,67, $p = 2,57 \cdot 10^{-11}$) (LEO et al., 2018). Entretanto, essas associações não foram investigadas em outras populações. Tendo em vista esses dados, o principal objetivo deste trabalho é verificar se há associação entre os alelos dos genes *HLA-B* e *HLA-DRB1* ou de resíduos de aminoácidos específicos presentes na 156ª posição da cadeia polipeptídica de HLA-B e na 13ª e 71ª posições do *pocket* 4 de HLA -DRB1 com NIC II/III em mulheres de Curitiba e região metropolitana.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL (NIC II E III) E CARCINOMA DE COLO DO ÚTERO (CCU)

O carcinoma de colo do útero (CCU) é um dos principais responsáveis pela mortalidade feminina ao redor do mundo. A maioria das infecções é causada pelo HPV16, sendo que este apresenta um alto potencial carcinogênico e rápida progressão em infecção persistente, NICs e CCU, em comparação aos demais tipos de HPV (MUÑOZ et al., 2003a). Diferentemente da maioria dos cânceres que acometem outros sítios, o CCU acomete mulheres jovens, normalmente abaixo dos 30 anos (BAANDRUP et al., 2012; SCHIFFMAN et al., 2016). Em 2008, foi relatada a prevalência de aproximadamente 27,1% da infecção por HPV de alto risco (HR-HPV) em mulheres com idade abaixo de 25 anos, residentes das cidades de São Paulo e Campinas (RAMA et al., 2008). Em Ouro Preto, um estudo mostrou que a maior prevalência de infecção por HPV ocorre em mulheres com menos de 30 anos (17,2%), que também mostraram ter um risco 4 vezes maior de apresentar infecção por HPV, quando comparado a mulheres com 50 anos ou mais (MIRANDA et al., 2012).

A maioria dos casos de CCU ocorre em países em desenvolvimento. Em 2018, aproximadamente 85% das 311.000 mortes causadas pelo CCU ocorreram nestes países (BRAY et al., 2018). No Brasil, estima-se que ocorrerão

16.590 novos casos em 2020, sendo este o terceiro câncer com maior incidência em mulheres no país, após o câncer de mama feminino e o de cólon e reto (tabela 1) (INCA, 2020). Vale ressaltar que os dados de câncer de pele não melanoma não foram considerados na tabela 1.

TABELA 1 - INCIDÊNCIA ESTIMADA CONFORME A LOCALIZAÇÃO PRIMÁRIA DO TUMOR EM MULHERES, NO BRASIL, EM 2020

Localização primária	Casos novos	%
Mama feminina	66.280	29,7
Cólon e reto	20.470	9,2
Colo do útero	16.590	7,4
Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6
Glândula tireoide	11.950	5,4
Estômago	7.870	3,5
Ovário	6.650	3,0
Corpo do útero	6.540	2,9
Linfoma não-Hodgkin	5.450	2,4
Sistema nervoso central	5.220	2,3
Todas as neoplasias, exceto pele não melanoma	222.980	100,0
Todas as neoplasias	316.140	

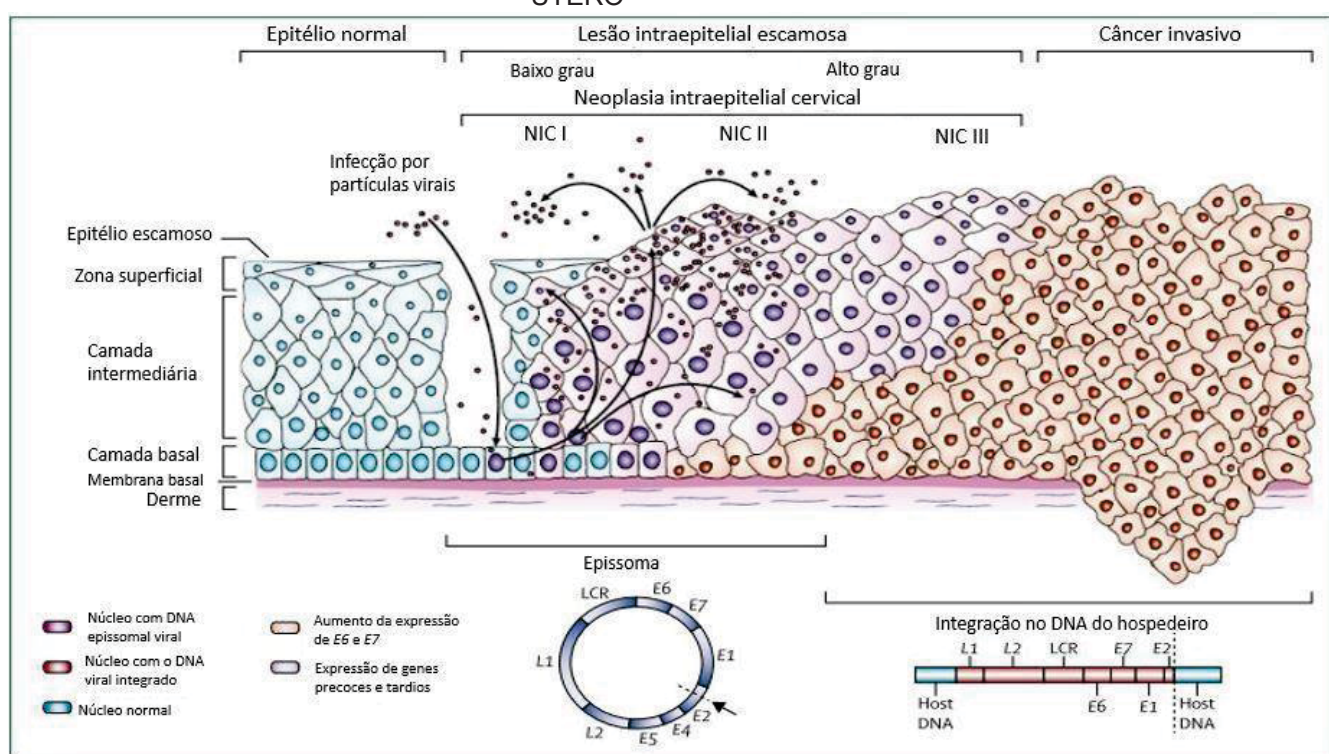
FONTE: MS / INCA / Estimativa de Câncer no Brasil, 2020 e MS / INCA / Coordenação de Prevenção e Vigilância / Divisão de Vigilância e Análise de Situação

LEGENDA: não foram levados em consideração para os cálculos de estimativa os dados referentes à câncer de pele não melanoma.

Diferentemente da maioria dos cânceres, o CCU apresenta estádios precusores que podem perdurar por anos antes de se tornar um câncer invasivo, o que gera uma ampla oportunidade de detecção e tratamento de lesões iniciais. Todavia, estes estádios precusores são normalmente assintomáticos, de forma que o diagnóstico normalmente é feito por exames de rotina. O principal exame é o citológico cervical, também conhecido como Papanicolaou, responsável por detectar mudanças morfológicas nas células epiteliais da zona de transformação do colo do útero (CHEN et al., 2016). De acordo com as alterações nos resultados deste exame, o diagnóstico mais preciso deve ser realizado, através de biópsia cervical. O resultado histológico classifica as lesões, denominadas neoplasias intraepiteliais cervicais, de acordo a extensão da displasia no epitélio.

NIC I é uma lesão intraepitelial escamosa de baixo grau, sendo que em cerca de 70 a 80% dos casos regredem espontaneamente sem a necessidade de tratamento; NIC II e NIC III são consideradas displasias de alto grau ou lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (figura 1) (COX; SCHIFFMAN; SOLOMON, 2003). Tanto NIC II quanto NIC III podem progredir para um carcinoma de colo do útero. NIC III normalmente progride para câncer em lesões que apresenta cópias do genoma viral integrado ao DNA do hospedeiro (SÁNCHEZ-SILES et al., 2020).

FIGURA 1 - LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS E CARCINOMA DO COLO DO ÚTERO



FONTE: Adaptado de (CROSBIE et al., 2013)

LEGENDA: Possíveis resultados encontrados no exame citológico (linha superior) e histológico (a partir de biópsia cervical, linha inferior): da esquerda para direita: Epitélio Normal; Neoplasia Intraepitelial Cervical: NIC I - demonstrando uma leve displasia mas tendo a maioria de seu epitélio normal preservado; NIC II - com cerca de metade do epitélio comprometido; NIC III - displasia severa, tendo todo o epitélio comprometido com células neoplásicas; Carcinoma invasivo – o tecido epitelial completamente comprometido com células neoplásicas, neste ponto praticamente todas as células estão com o DNA viral integrado ao DNA próprio. Durante as fases de NIC I e NIC II, o DNA viral encontra-se principalmente na forma de episossoma, ou seja, DNA circular que não foi integrado ao DNA do hospedeiro; da fase final de NIC II e em NIC III o DNA viral encontra-se integrado ao DNA do hospedeiro, como demonstrado na parte inferior da imagem, através da diferenciação das células por cores. Entre os estádios de NIC II e III é possível observar o aumento da expressão dos genes virais E6 e E7, demonstrado nas células em amarelo na imagem. As células cujos citoplasmas estão corados em lilás indicam que há expressão dos genes tardios do HPV. As células com o núcleo corado em roxo apresentam o DNA viral na forma de episossoma. As células com o núcleo corado em rosa possuem o DNA viral integrado ao genoma do hospedeiro.

2.1.1 Prevenção contra o carcinoma de colo do útero

Em países desenvolvidos a incidência e mortalidade reduziram em 50% nos últimos 30 anos, desde a introdução de programas de rastreio de lesões cervicais eficazes. O rastreio é feito a partir do exame citológico Papanicolaou, realizado rotineiramente. Nos Estados Unidos e outros países desenvolvidos, a introdução de programas de rastreio organizados diminuiu em 70% a incidência e mortalidade de mulheres pelo CCU ao longo dos últimos 60 anos. Entre os anos de 2009 e 2013, O CCU foi o 11º câncer mais comum em mulheres estadunidenses, com incidência de 7,5/100.000 e mortalidade de 2,3/100.000 (HOWLADER, 2016). Contudo, esta não é a mesma realidade de diversos países emergentes. O CCU apresenta as maiores prevalências no sudeste da África, à exemplo o Zimbábue (CHOKUNONGA et al., 2013). Nestes casos, é importante criar campanhas de alerta à população sobre os fatores de risco que podem levar a doença, com o intuito de diminuir o número de casos, mesmo que não haja programas eficazes de rastreio de lesões (ASTHANA; BUSA; LABANI, 2020).

Além dos programas de rastreio, inserir a vacinação obrigatória em jovens também contribui para a diminuição no número de casos de CCU. As primeiras vacinas, bivalente (contra HPV 16 e 18) e quadrivalente (contra HPV 6, 11, 16 e 18), foram disponibilizadas em 2006 e mostraram eficácia de 90% contra a infecção pelo vírus (CROSBIE et al., 2013). No mesmo ano do lançamento destas primeiras vacinas, os Estados Unidos, Austrália e Canadá implementaram a vacinação em nível nacional. Até 2016, 86 países incluíram a vacina do HPV no calendário nacional. Destes, 74 (55%) são países desenvolvidos e apenas 12 emergentes (GALLAGHER; LAMONTAGNE; WATSON-JONES, 2018). Em 2014, o Brasil introduziu a vacina quadrivalente contra o HPV no calendário de vacinação nacional, distribuída gratuitamente pelo SUS para meninas de 9 a 14 anos e meninos de 11 a 14 anos (BRASIL, 2018). Nos países com programas de vacinação contra o HPV houve grande redução na incidência do CCU. É importante ressaltar que a vacina deve ser administrada, preferencialmente, em crianças e adolescentes com idade entre 9 e 14 anos, uma vez que este grupo apresenta menores chances de terem sido

expostos ao vírus por relações sexuais e possuem uma resposta imune mais eficaz (DOCHEZ et al., 2014).

2.2 INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

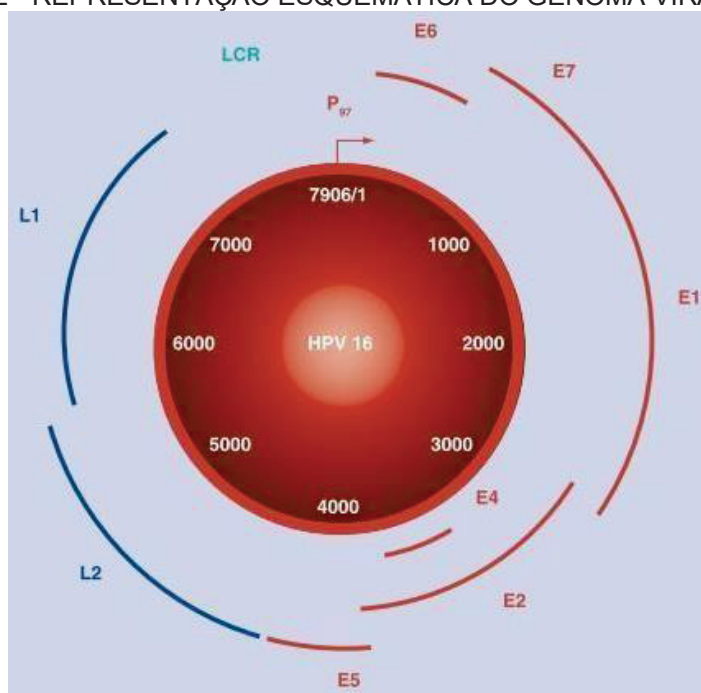
O HPV é o agente sexualmente transmissível mais frequentemente transmitido no mundo, sendo que aproximadamente 80% das pessoas serão infectadas em algum momento da vida (LOPEZ et al., 2018). A infecção inicial pelo HPV normalmente acontece durante a adolescência ou início da idade adulta, mas a maioria das infecções regride entre 18 a 24 meses sem a necessidade de intervenção terapêutica. Entretanto, em cerca de 3 e 5% das mulheres a infecção persiste, podendo levar ao desenvolvimento de lesões cervicais e, em menos de 1% dos casos, CCU invasivo (LOPEZ et al., 2018). A infecção pelo HPV é considerada uma causa necessária para o desenvolvimento de CCU, sendo o DNA de HPV detectável em 99,7% dos casos de CCU (WALBOOMERS et al., 1999). Existem mais de 200 tipos de HPV, sendo estes classificados em diferentes gêneros, espécies e tipos. Os tipos de HPV do gênero alfa são classificados em baixo e alto risco (LR-HPV e HR-HPV, respectivamente), de acordo com suas propriedades carcinogênicas. A maioria dos HR-HPV pertence às espécies alfa-9. Enquanto a maior parte dos tipos de LR-HPV causa feridas anogenitais benignas e verrugas na pele, infecções por HR-HPV podem levar a neoplasias anogenitais, como câncer do colo de útero, vagina, pênis, ânus e cânceres de cabeça e pescoço (VILLIERS, 2013). Dos casos de CCU, cerca de 60% são causados pelo HPV16 e 15% pelo HPV18 (SCHIFFMAN et al., 2016). Além destes, os tipos 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59 também são considerados de alto risco para oncogênese cervical (IARC, 2020).

A infecção pelo HPV normalmente acontece quando o vírus tem acesso as células basais do epitélio, sendo as da junção escamocolumnar do colo do útero particularmente suscetíveis à infecção e transformação pelos tipos de HR-HPV, uma vez que o vírus apresenta tropismo por estas células (MIRKOVIC et al., 2016). Após transpassar as barreiras físicas de proteção do hospedeiro contra a infecção – pele, membranas plasmática e nuclear – o vírus passa a ter a

capacidade de replicar seu DNA juntamente com o DNA da célula hospedeira, durante a fase S do ciclo celular. O uso da maquinaria de replicação do hospedeiro garante uma baixa taxa de erro na cópia do genoma do HPV (REINSON et al., 2015; RODEN; STERN, 2018).

O genoma do HPV é composto por uma dupla-fita de DNA circular, de 7,9 kb de tamanho, que normalmente apresenta 8 fases abertas de leitura (do inglês: *open reading frames* - ORFs). Pode ser dividido em três partes: região promotora não codificadora; e regiões codificadoras com genes de expressão precoce (“*early*”: *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* e *E7*) e de expressão tardia (“*late*”: *L1* e *L2*) que codificam proteínas de mesmo nome (figura 2) (RODEN; STERN, 2018). As proteínas E gerenciam a replicação viral, transcrição e transformação celular; enquanto as proteínas L constituem as proteínas do capsídeo, responsáveis pelo empacotamento do genoma viral (DOORBAR et al., 2016). As oncoproteínas virais *E5*, *E6* e *E7* desregulam vias de sinalização responsáveis pela proliferação e diferenciação celular. Os genes *E6* e *E7* desempenham um papel importante na transformação celular, imortalização e no desenvolvimento de NIC e câncer (LUHN et al., 2015). Nas doenças cervicais, normalmente os níveis de expressão de *E6* e *E7* aumentam conforme a progressão avança, tendo baixos níveis de expressão em NIC I, intermediários em NIC II e altos em NIC III. (DOORBAR et al., 2012).

FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO GENOMA VIRAL DE HPV16.



FONTE: (DE ARAUJO SOUZA; SICHERO; MACIAG, 2009)

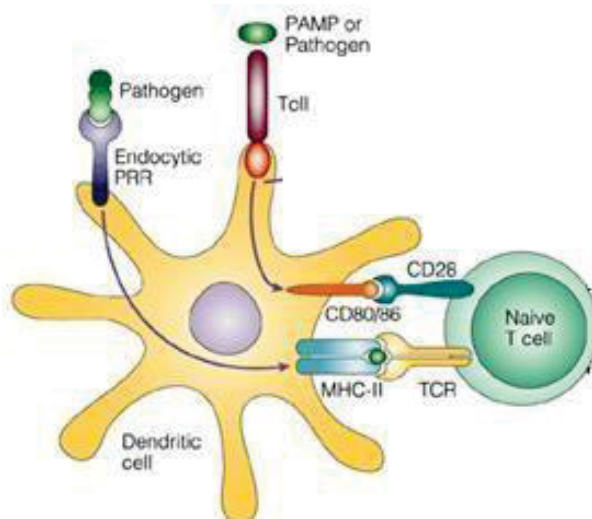
LEGENDA: O genoma circular do HPV16 encontra-se representado em vermelho, com ~7,9kb de tamanho, demonstrado a cada 1000 bases (1, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000 e 7906). A seta indica o sítio de início da replicação do genoma. As localizações no genoma viral dos genes *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* e *E7* - genes que codificam as proteínas “early” (de expressão precoce) estão demonstrados em vermelho; os genes *L1* e *L2* - codificadores das proteínas “late” (de expressão tardia) estão demonstrados em azul; e a região LCR (do inglês: *upstream regulatory region*), acima em verde.

A replicação do DNA do HPV ocorre mais lentamente nas células do hospedeiro quando comparado a de outros vírus. Desta forma, o vírus necessita de mecanismos efetivos de escape do sistema imunológico para que a infecção persista tempo suficiente para que a replicação viral aconteça completamente (STEINBACH; RIEMER, 2018). O sistema imunológico naturalmente controla a maioria dos casos de infecção por HPV (STEINBACH; RIEMER, 2018). Entretanto, uma pequena parte dos indivíduos infectados pelo HPV não desenvolvem uma resposta imune efetiva, o que acarreta na persistência da infecção, podendo progredir para lesões intraepiteliais cervicais e CCU (CROSBIE et al., 2013).

2.3 A RESPOSTA IMUNOLÓGICA CELULAR

A resposta imune celular é a principal no combate às infecções intracelulares, como as virais, e aos tumores. Esta resposta é mediada pelos linfócitos T CD4⁺ auxiliares (Th) e T CD8⁺ citotóxicos. O papel imunoregulador dos linfócitos Th resulta de sua capacidade de secreção diferencial de citocinas, capazes de estimular ou inibir outras células que participam da resposta imune. Células como os linfócitos T CD8⁺, que possuem papel efetor na eliminação de células tumorais ou infectadas por vírus, dependem da ação de citocinas secretadas pelas células T CD4⁺ ou outros sinais provenientes da interação com as células apresentadoras de antígenos (APC), para diferenciar-se em linfócitos citotóxicos (MURPHY, 2014). As APCs captam antígenos em sítios periféricos e os processam durante a migração aos órgãos linfoides secundários (OLS). Nos OLS, elas apresentam os antígenos às células T. A ativação das células T depende do reconhecimento do antígeno, através da interação específica entre o receptor da célula T (TCR) e o complexo HLA-peptídeo antigênico da APC. As moléculas HLA de classe I são responsáveis pela apresentação de antígenos aos linfócitos T CD8⁺, enquanto as moléculas HLA de classe II apresentam os antígenos aos linfócitos T CD4⁺ (figura 3) (MURPHY, 2014).

FIGURA 3 - APRESENTAÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIGÊNICOS PELAS APCs ÀS CÉLULAS T CD4⁺



FONTE: (MEDZHITOV, 2001)

LEGENDA: A célula dendrítica (um exemplo de APC) apresenta o peptídeo antigênico ancorado à fenda de ligação da molécula HLA de classe II (MHC-II) à célula T *naive*.

Alterações no processo de apresentação e reconhecimento antigênico podem levar a ativação parcial de células T, com produção de citocinas, porém sem proliferação celular, ou mesmo anergia. Este fenômeno pode ser atribuído a diferenças na avidéz da ligação entre APC e célula T, resultante de diferenças na afinidade entre TCR-peptídeo-HLA, na densidade destes complexos ou ainda a variações em sinais coestimulatórios (MURPHY, 2014).

2.3.1 Mecanismos de evasão do sistema imunológico pelo HPV

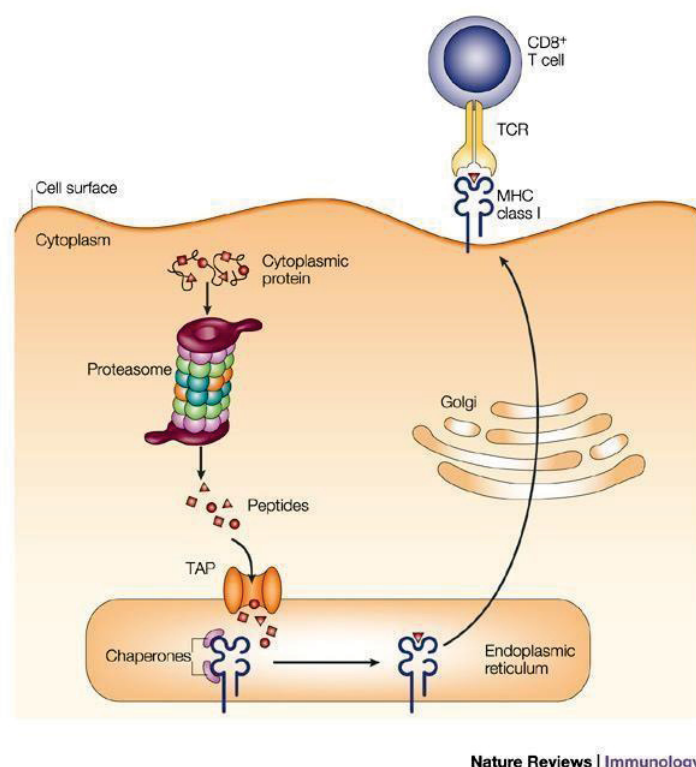
Aproximadamente 3 a 5% das infecções pelo HPV no colo do útero evoluem para infecções persistentes, o que aumenta a chance de desenvolvimento de lesões nesse tecido, e em cerca de 1% dos casos, CCU invasivo (LOPEZ et al., 2018). A progressão ocorre, em parte, devido aos mecanismos de escape do sistema imunológico desenvolvidos pelo vírus. Uma destas estratégias de evasão é a manutenção da expressão dos genes “*early*”

E6, *E7* e *E1* em baixos níveis, controlado pela proteína viral *E2*, de forma que os antígenos fiquem pouco abundantes (STEINBACH; RIEMER, 2018). A proteína *E2* controla a expressão destes genes agindo na região promotora viral, que regula a expressão de *E6*, *E7*, *E1* e do próprio gene *E2*. Durante o início da infecção, o genoma viral se encontra na forma epissomal. Contudo, com a progressão da doença, o locus *E2* é normalmente rompido e ocasiona o processo de integração do genoma do HPV no genoma do hospedeiro. A partir de então, a expressão de *E6* e *E7* aumenta. Ademais, em NIC de alto grau e CCU, a expressão destas duas proteínas permanece acentuada (MCBRIDE, 2017). Esses baixos níveis de expressão iniciais dos genes virais podem dificultar a detecção de células infectadas por APCs locais e, por sua vez, a indução de uma potente resposta imune direcionada contra células infectadas pelo HPV (STEINBACH; RIEMER, 2018).

Um processamento de antígenos efetivo e a apresentação destes pelas moléculas HLA de classe I às células T CD8⁺ - dentre elas as células T citotóxicas - são indispensáveis para uma resposta imune eficaz contra o HPV. Células T CD8⁺ são capazes de eliminar células infectadas pelo vírus, sendo cruciais no combate a infecção e respostas antitumorais. Entretanto, o HPV pode interferir no mecanismo de processamento de antígenos, diminuindo a chance de reconhecimento das células alvo pelas células T. O processamento de antígenos começa no citoplasma da célula, com a degradação das proteínas intracelulares pelo proteossoma/immunoproteossoma. Os peptídeos resultantes são, então, transportados para o interior do retículo endoplasmático (RE), onde são clivados por aminopeptidases (ERAP1 e ERAP2) resultando num tamanho adequado para a ligação às moléculas HLA. O tráfego de peptídeos antigênicos para as moléculas HLA de classe I é assistido por chaperonas, como a calnexina e a tapasina (figura 4) (LEONE et al., 2013). O transporte dos peptídeos até o RE pode ser afetado pelo HPV. Em alguns tumores observou-se a diminuição do nível das proteínas responsáveis por este transporte. A transcrição do DNA em RNA para posterior tradução da proteína de transporte TAP1 pode ser inibida pela proteína viral *E7*, além do promotor do gene ter sido encontrado metilado em casos de CCU HPV16 positivo (HASIM et al., 2012). Ademais, a perda parcial ou total da expressão de proteínas HLA de classe I, calreticulina, calnexina,

ERAP1, PDIA3 e tapasina foram previamente descritas (HASIM et al., 2012). Dentre eles pode-se destacar a alteração na quantidade de moléculas HLA de classe I na superfície das APCs, tanto devido a regulação transcricional quanto a alteração no seu tráfego para a superfície celular. Foi demonstrado que a proteína E7 bloqueia diretamente o promotor de genes HLA de classe I (GEORGOPOULOS; PRO; BLAIR, 2000). Moléculas HLA-A e HLA-B podem ser retidas por um mecanismo mediado por E5 de HPV16 dentro da célula (ASHRAFI et al., 2005). Esta proteína pode se ligar à calnexina - necessária para o dobramento correto da molécula HLA de classe I nascente, o que mantém as moléculas HLA retidas no retículo endoplasmático (STEINBACH; RIEMER, 2018).

FIGURA 4 - PROCESSAMENTO E APRESENTAÇÃO DE ANTÍGENOS PELA VIA MHC DE CLASSE I



FONTE: Adaptado de (RODGERS; COOK, 2005)

LEGENDA: Uma proteína citoplasmática é clivada em pequenos peptídeos no proteossomo. Estes peptídeos antigênicos são transportados até o retículo endoplasmático e ligados às fendas de ligação ao peptídeo das moléculas HLA-I, com auxílio de chaperonas. A molécula HLA-I é, então, liberada do retículo endoplasmático e direcionada ao complexo de Golgi, de onde será enviada à superfície celular para apresentar o peptídeo antigênico às células T CD8⁺.

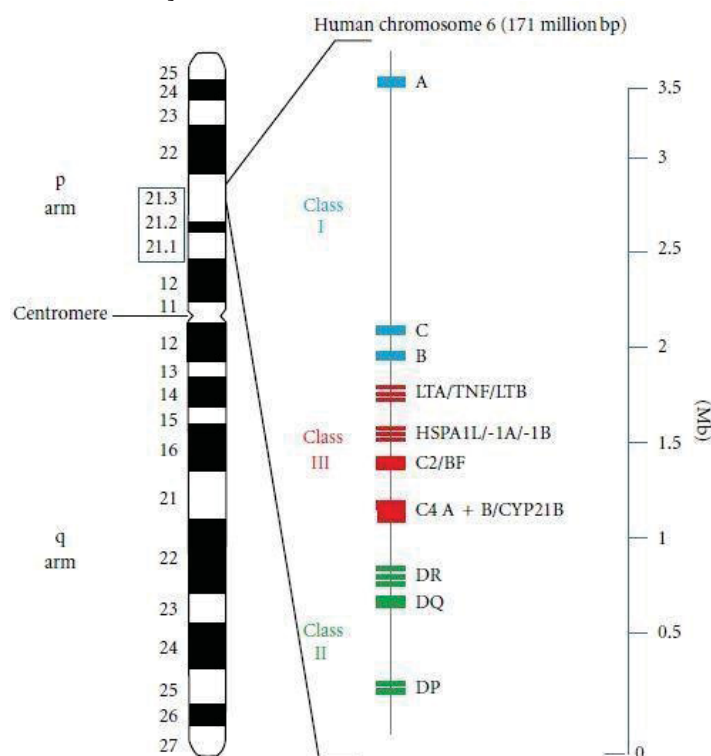
2.4 GENES E MOLÉCULAS HLA

Polimorfismos genéticos, como os presentes nos genes HLA, podem influenciar a resposta imune e a infecção por HR-HPV (SAFAEIAN et al., 2014). Os genes que codificam as moléculas HLA, as quais apresentam os peptídeos às células T, estão localizados na região do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês: *Major Histocompatibility Complex*) humano. O MHC humano está localizado no braço curto do cromossomo 6 (6p21.3) e contém muitos genes polialélicos e polimórficos (KLEIN; SATO, 2000; TROWSDALE; KNIGHT, 2013). O conjunto desses alelos e suas frequências diferem entre as populações, gerando uma grande diversidade alélica interpopulacional (CONSTANTINESCU et al., 2016).

O MHC humano ocupa cerca de 4 Mb e contém aproximadamente 260 genes (TROWSDALE; KNIGHT, 2013) e é dividido em regiões de classes I, II e III. A região de classe I inclui genes HLA clássicos (*HLA-A, B e C*) e não clássicos (*HLA-E, F e G*). A região de classe II inclui *HLA-DPA1, -DPB1, -DQA1, -DQA2, -DQB1, -DQB2, -DRA, -DRB1, -DRB2, -DRB3, -DRB4 e -DRB5*, assim como genes menos variáveis envolvidos no processamento e apresentação de antígenos. A região de classe III contém genes que codificam moléculas envolvidas na resposta inflamatória, maturação de leucócitos e na cascata do complemento (figura 5) (DENDROU et al., 2018).

A genotipagem de HLA pode ser feita em diferentes níveis de resolução. A genotipagem em baixa resolução agrupa os alelos de acordo com suas linhagens alélicas, sendo esses representados pelos dois primeiros dígitos do nome do alelo – exemplo: *HLA-B*15*. Já a genotipagem em alta resolução permite a determinação do alelo em quatro dígitos – exemplo: *HLA-B*15:07*. Os dois dígitos posteriores à linhagem alélica indicam mudanças no DNA que levam a alterações na sequência de aminoácidos da cadeia polipeptídica das moléculas HLA.

FIGURA 5 - LOCALIZAÇÃO E MAPA DO MHC HUMANO NO CROMOSSOMO 6



FONTE: (RELLE; SCHWARTING, 2014)

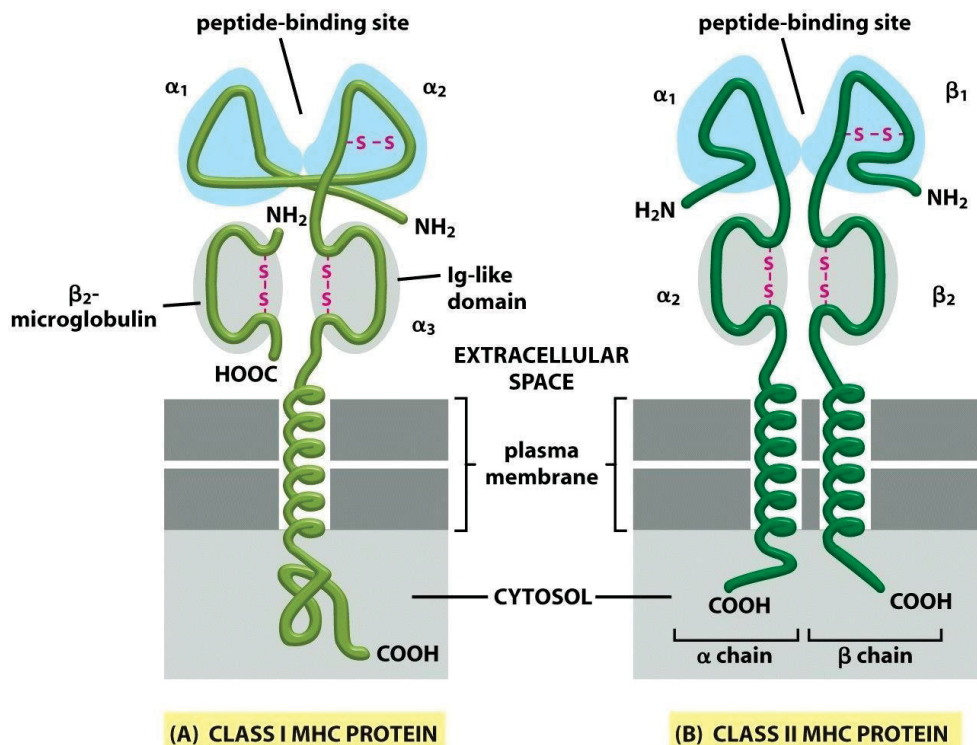
LEGENDA: Genes HLA de classe I clássicos (-A, -B, -C) representados em azul; genes HLA de classe II clássicos representados em verde (-DR, -DQ, -DP); alguns genes não-HLA presentes na região de classe III são representados em vermelho. À direita: dimensão da região, representada em milhões de pares de bases (Mb).

A região de classe I se estende por aproximadamente 1.6 – 2 Mb e contém os genes que codificam moléculas HLA clássicas e não clássicas de classe I (TROWSDALE; KNIGHT, 2013). As moléculas HLA de classe I (HLA-I) são encontradas em todas as células nucleadas, sendo que os níveis de expressão variam de acordo com o tecido analisado (KLEIN; SATO, 2000). Tais moléculas são compostas pela cadeia α ligada não-covalentemente a cadeia β_2 -microglobulina. Os genes HLA de classe I clássicos codificam a cadeia α da HLA-I, que é composta pelos domínios: α_1 , α_2 e α_3 , além da região transmembrana e a cauda citoplasmática (figura 6A). O gene que codifica a cadeia β_2 -microglobulina não está contido no MHC, mas sim no cromossomo 15 humano. Diversos estudos já demonstraram associação de alelos dos genes HLA de classe I com carcinoma de colo do útero e a infecção por HPV. Dentre eles pode-

se destacar o *HLA-B*, cujos alelos *HLA-B*07*, *-B*44*, *-B*51* e *-B*57* foram previamente associados com HPV e carcinoma de colo do útero, em algumas populações (BHATTACHARYA; SENGUPTA, 2007; CHAN et al., 2006; ZEHBE; MYTILINEOS; WIKSTRO, 2003). Também já foram demonstradas associações entre *HLA-B*44*, *HLA-B*51* ou *HLA-B*57* e lesões cervicais em mulheres portadoras de variantes específicas de HPV16 (L83V) na população sueca (ZEHBE; MYTILINEOS; WIKSTRO, 2003).

A região de classe II possui cerca de 1 – 1.2 Mb de DNA (BAXTER; JOHNSTON, 2000). Os genes HLA de classe II codificam tanto as cadeias α quanto as β das moléculas de classe II. Cada cadeia α e β de HLA-II são compostas pelo domínio de ligação ao peptídeo (α_1 ou β_1), domínio similar à imunoglobulina (α_2 ou β_2), região transmembrana e cauda citoplasmática (figura 6B) (SARRI et al., 2018). Dentre os genes de classe II, pode-se destacar o *HLA-DRB1*. Maciag e colaboradores (2000) demonstraram que os alelos *DRB1*15* (OR = 2,24; [IC 95% = 1,29-3,90]) e *DRB1*15:03* (OR = 2,52; [IC 95 = 1,16-5,48]) estavam associados com CCU (MACIAG et al., 2000a). Safaeian et al. (2014), verificaram associação de menor susceptibilidade com os alelos *HLA-DRB1*13:01* e *HLA-DRB1*13:02* e o carcinoma de colo do útero (OR = 0,61; [IC 95% = 0,41–0,93] e OR = 0,49 [IC 95% = 0,31–0,77], respectivamente), na população norte-americana (SAFAEIAN et al., 2014).

FIGURA 6: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ESTRUTURAS DAS MOLÉCULAS HLA DE CLASSE I E DE CLASSE II



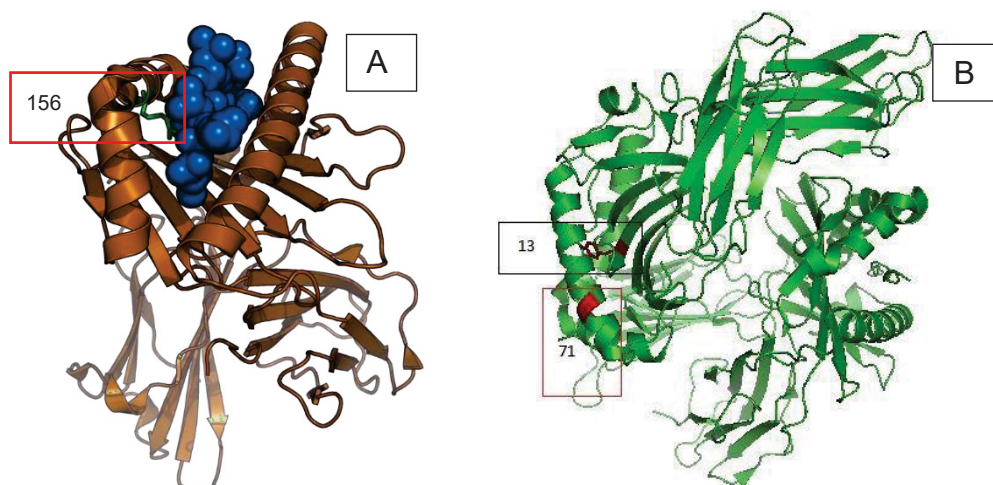
FONTE: (ALBERTS et al., 2010)

LEGENDA: (A): Proteína HLA de Classe I. Formada por um heterodímero de cadeia α, que apresenta três domínios: α₁ e α₂, que se dobram juntos em uma única estrutura e formam o sítio de ligação ao peptídeo; e α₃, que atravessa a membrana plasmática, interligando o meio extracelular ao intracelular. Este heterodímero é ligado não covalentemente à β₂-microglobulina, a qual não atravessa a membrana.

(B): Proteína HLA de classe II. Formada por duas cadeias transmembrana de glicoproteínas. Cada cadeia possui dois domínios, e as duas cadeias juntas formam uma estrutura compacta de quatro domínios (α₁, α₂, β₁ e β₂). Os domínios α₁ e β₁ foram o sítio de ligação ao peptídeo.

As moléculas de classe I são responsáveis por apresentar peptídeos antigênicos oriundos de proteínas intracelulares para as células T CD8⁺, enquanto as de classe II apresentam peptídeos derivados de antígenos exógenos às células T CD4⁺. Tanto as moléculas HLA-I quanto HLA-II clássicas possuem uma fenda onde o peptídeo antigênico irá se ligar. Na estrutura tridimensional da fenda destas moléculas é possível identificar diversos bolsos (“*pockets*” em inglês), onde as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos dos peptídeos antigênicos são ancoradas. O encaixe é estabilizado por ligações de hidrogênio e pontes de íons entre as cadeias laterais dos aminoácidos das cadeias α e β da fenda e do peptídeo. A afinidade entre esses resíduos, bem como a conformação do sítio, determinam a especificidade de ligação de um determinado peptídeo (SARRI et al., 2018). As variações alélicas nas regiões dos exons que codificam as fendas de ligação do peptídeo acarretam efeitos cruciais na seleção e apresentação dos peptídeos (KLEIN; SATO, 2000; MUÑOZ et al., 2003b). Recentemente foi hipotetizado que a associação do CCU com alelos e haplótipos *HLA* em mulheres descendentes de populações europeias seria determinada pelos resíduos de aminoácidos presentes na 156^a posição de HLA-B e na 13^a e 71^a posições de HLA-DRB1 (LEO et al., 2018). A posição 156 de HLA-B faz parte dos *pockets* D e E presentes no domínio α_2 da região de ligação ao peptídeo (figura 7A) (BADRINATH et al., 2012). Já os aminoácidos presentes nas posições 13 e 71 da cadeia polipeptídica de HLA-DRB1 encontram-se no *pocket* 4 da fenda de ligação ao peptídeo antigênico (figura 7B, C).

FIGURA 7 – ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS DAS MOLÉCULAS HLA-B E HLA-DRB1



FONTE: The MyMOL Molecular Graphics System, Version 1.74, Schödinger, LLC.

LEGENDA: **A:** Molécula HLA-B. As cadeias da molécula estão representadas em marrom; o peptídeo antigênico ancorado em azul; e a posição 156 em verde, destacada por um quadro vermelho.

B: Molécula HLA-DRB1. As cadeias da molécula estão representadas em verde; não há peptídeo antigênico ancorado à fenda; as posições 13 e 71 estão em vermelho, destacadas por um quadro preto e vermelho, respectivamente.

Como as moléculas HLA são responsáveis por apresentar antígenos aos linfócitos T, elas desempenham um papel central no reconhecimento e a consequente eliminação das células infectadas pelos vírus (DELVES; ROITT, 2000). Acredita-se que possuir moléculas HLA que se ligam com alta afinidade aos peptídeos antigênicos de HPV pode levar à proteção frente a progressão de lesões. Em contrapartida, possuir moléculas HLA que não se ligam adequadamente aos peptídeos antigênicos virais poderia aumentar o risco de NIC e CCU (PAASO et al., 2019).

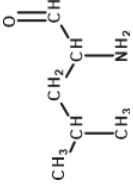
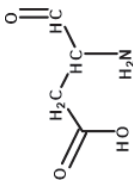
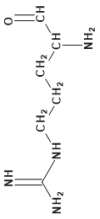
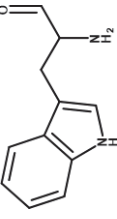
A grande variabilidade alélica dos genes HLA determina a afinidade de ligação dos peptídeos à fenda de ligação. A partir dessa variabilidade, pode ser possível identificar individualmente o risco para o desenvolvimento de CCU. Mutações de inativação no gene *HLA-B* foram detectadas em 9% de 79 amostras de CCU escamoso que foram incluídas em análise de exoma total e

transcriptoma (OJESINA et al., 2014). Além disso, uma análise de sequência total de exoma confirmou este gene como significativamente mutado em CCU (TCGA, 2017)

2.5 RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS PRESENTES NA 156ª POSIÇÃO DA CADEIA POLIPEPTÍDICA DE HLA-B E 13ª E 71ª POSIÇÕES DA CADEIA POLIPEPTÍDICA DE HLA-DRB1

A maior parte das substituições não sinônimas encontradas nos diferentes alelos dos genes HLA se concentra nas regiões que codificam a fenda de ligação aos peptídeos antigênicos (JONES et al., 2006). Diferentes resíduos de aminoácidos podem estar presentes nas fendas de ligação aos peptídeos das cadeias polipeptídicas de HLA-B e HLA-DRB1. Os aminoácidos leucina (Leu/L), arginina (Arg/R), aspartato (Asp/D) e triptofano (Trp/W) são os mais comumente encontrados na posição 156 da cadeia polipeptídica de HLA-B. As propriedades bioquímicas destes aminoácidos encontram-se descritas no quadro 1. Na 13ª posição da cadeia polipeptídica de HLA-DRB1 é possível identificar os aminoácidos arginina (Arg/R), glicina (Gly/G), histidina (His/H), serina (Ser/S), fenilalanina (Phe/F) e tirosina (Tyr/Y). As propriedades bioquímicas destes aminoácidos encontram-se descritas no quadro 2. Já na 71ª posição de HLA-DRB1 pode-se encontrar os aminoácidos arginina (Arg/R), alanina (Ala/A), glutamato (Glu/E), lisina (Lys/K) e treonina (Thr/T). As propriedades bioquímicas destes aminoácidos encontram-se descritas no quadro 3.

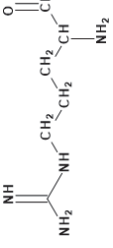
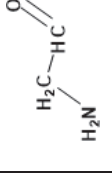
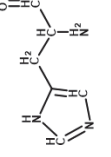
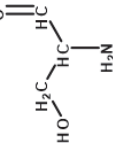
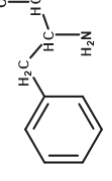
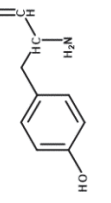
QUADRO 1 – PROPRIEDADES DOS POSSÍVEIS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS PRESENTES NA POSIÇÃO 156 DA CADEIA POLIPEPTÍDICA DE HLA-B

Aminoácido	Anel aromático ¹	Polaridade	Carga	Fórmula molecular	Estrutura
Leucina (Leu/L)	Não	Apolar e hidrofóbico	Sem carga	C ₆ H ₁₃ NO	
Aspartato (Asp/D)	Não	Polar e hidrofílico	Negativa	C ₄ H ₇ NO ₃	
Arginina (Arg/R)	Não	Polar e hidrofílico	Positiva	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	
Triptofano (Trp/W)	Sim	Relativamente apolar e hidrofóbico	Sem carga	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O	

FONTE: Nelson; Cox (2010); BIOVIA Draw (2019)

¹Presença de anel aromático no grupo .

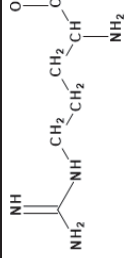
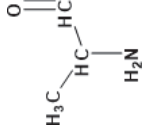
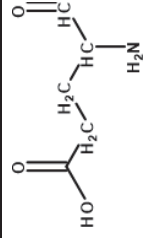
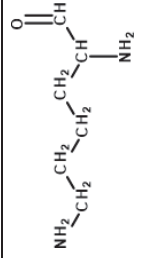
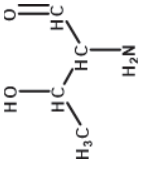
QUADRO 2 – PROPRIEDADES DOS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS PRESENTES NA POSIÇÃO 13 DA CADEIA POLIPEPTÍDICA DE HLA-DRB1

Aminoácido	Anel aromático ¹	Polaridade	Carga	Fórmula molecular	Estrutura
Arginina (Arg/R)	Não	Polar e hidrofílico	Positiva	$C_6H_{14}N_4O_2$	
Glicina (Gly/G)	Não	Apolar e hidrofóbico	Sem carga	C_2H_5NO	
Histidina (His/H)	Não	Polar e hidrofílica	Positiva	$C_6H_9N_3O$	
Serina (Ser/S)	Não	Polar e hidrofílico	Sem carga	$C_3H_7NO_2$	
Fenilalanina (Phe/F)	Sim	Relativamente apolar e hidrofóbico	Sem carga	$C_9H_{11}NO$	
Tirosina (Tyr/Y)	Sim	Relativamente apolar e hidrofóbico	Sem carga	$C_9H_{11}NO_2$	

FONTE: Nelson; Cox (2010); BIOVIA Draw (2019)

¹Presença de anel aromático no grupo R.

QUADRO 3 – PROPRIEDADES DOS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS PRESENTES NA POSIÇÃO 71 DA CADEIA POLIPEPTÍDICA DE HLA-DRB1

Aminoácido	Anel aromático ¹	Polaridade	Carga	Fórmula Molecular	Estrutura
Arginina (Arg/R)	Não	Polar e hidrofílico	Positiva	$C_2H_{14}N_4O_2$	
Alanina (Ala/A)	Não	Apolar e Hidrofóbico	Sem carga	$2C_3H_7NO_2$	
Glutamato (Glu/E)	Não	Polar e hidrofílico	Negativa	$C_5H_9NO_3$	
Lisina (Lys/K)	Não	Polar e hidrofílico	Positiva	$C_6H_{14}N_2O$	
Treonina (Thr/T)	Não	Polar e hidrofílico	Sem carga	$C_4H_9NO_2$	

FONTE: Nelson; Cox (2010); BIOVIA Draw (2019)

¹Presença de anel aromático no grupo R.

Todos os aminoácidos, com exceção da glicina, apresentam o carbono alfa ligado à quatro diferentes grupos: o grupo carboxila, o grupo amino, o grupo R e um átomo de hidrogênio. Eles diferem um do outro pelo grupo R (radical), que varia em estrutura, tamanho, carga elétrica e influência na solubilidade do aminoácido em água (propriedades hidrofílicas/hidrofóbicas e polaridade). O aminoácido glicina apresenta a estrutura mais simples dentre os 20 aminoácidos comuns, em que o grupo R é outro átomo de hidrogênio. Embora seja mais facilmente agrupado com os aminoácidos de característica apolar, sua cadeia lateral muito pequena não gera nenhuma contribuição real às interações hidrofóbicas. Os aminoácidos alanina e leucina são apolares e hidrofóbicos, as cadeias laterais desses aminoácidos tendem a se agrupar dentro das proteínas, estabilizando a estrutura das proteínas por meio de interações hidrofóbicas. Os aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano apresentam anel aromático em seu grupo R, o que os torna relativamente apolar e hidrofóbico. Todos estes são capazes de participar de interações hidrofóbicas. Tirosina e triptofano são significativamente mais polares que a fenilalanina por conta do grupo hidroxila da tirosina e o nitrogênio do anel presente no triptofano (NELSON; COX, 2010).

Os aminoácidos serina e treonina são polares e hidrofílicos, ou seja, são mais solúveis em água quando comparado aos aminoácidos apolares anteriormente mencionados. Isto acontece porque eles apresentam grupos funcionais que formam ligações de hidrogênio com a água. Os grupos R mais hidrofílicos são os que apresentam carga positiva ou negativa. Lisina, arginina e histidina apresentam carga positiva em pH 7,0. Já os aminoácidos aspartato e glutamato apresentam carga negativa em mesmo pH (NELSON; COX, 2010).

Estes aminoácidos pertencem a diferentes classes e apresentam variação em suas cargas e hidrofobicidade. Essas diferenças nas propriedades dos resíduos na posição 156 da cadeia polipeptídica de HLA-B e nas posições 13 e 71 do *pocket* 4 da fenda de ligação de HLA-DRB1 podem levar à diferentes possibilidades de interação com os peptídeos antigênicos de HPV. Essa, por sua vez, poderia acarretar em aumento ou diminuição da eficácia da resposta imunológica frente a infecção pelo vírus ou as lesões causadas por ele (LEO et al., 2018).

3. JUSTIFICATIVA

A resposta imunológica do hospedeiro induz o desfecho da infecção pelo HPV, podendo acarretar tanto na regressão espontânea da infecção quanto a persistência dessa e consequente progressão em NICs e CCU. O polimorfismo dos genes HLA de classe I e II pode influenciar o reconhecimento e ativação de células T CD4⁺ e T CD8⁺, podendo alterar a chance de células infectadas e/ou transformadas pelo HPV serem eliminadas pela ação pró-inflamatória e citotóxica destes linfócitos, respectivamente. Tal ação pode afetar a patogênese cervical através do controle imunológico da infecção viral.

Diversos estudos prévios demonstraram associações alélicas entre os genes HLA tanto com o risco quanto com a proteção ao CCU (CHAN et al., 2006; HU et al., 2014; MACIAG et al., 2000a). Entretanto, recentemente foi proposta uma nova linha de investigação, que visa verificar a presença ou ausência de determinados resíduos de aminoácidos em posições específicas da fenda de ligação das moléculas HLA, onde o peptídeo antigênico é ancorado. Em mulheres descendentes de populações europeias, os aminoácidos serina (posição 13) e o glutamato (posição 71) localizados no *pocket* 4 de HLA-DRB1 foram associados com a redução no risco de apresentar CCU. Enquanto os aminoácidos histidina e arginina presentes na posição 13 de HLA-DRB1 e a alanina presente na posição 71 foram associados com o CCU (LEO et al., 2018). Por se tratar de uma nova abordagem com relação aos genes HLA, estas associações não foram verificadas em outras populações. Desta forma, este

trabalho visa investigar se tais associações também são vistas na população de Curitiba e região metropolitana.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

- Verificar a associação entre o polimorfismo dos genes *HLA-B* e *HLA-DRB1*, bem como a presença de resíduos de aminoácidos na posição 156 de *HLA-B* e 13 e 71 de *HLA-DRB1* com neoplasia intraepitelial cervical.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Comparar as frequências alélicas dos genes *HLA-B* e *HLA-DRB1* em mulheres com Neoplasia Intraepitelial Cervical (grupo caso) e mulheres sem lesão (grupo controle) para verificar se existe associação com Neoplasia Intraepitelial Cervical;
- b) Comparar as frequências alélicas dos genes *HLA-B* e *HLA-DRB1* entre mulheres sem lesão, portadoras ou não da infecção por HPV para verificar se existe associação com a infecção viral;
- c) Comparar as frequências de portadoras dos diferentes aminoácidos na 156ª posição de *HLA-B* e na 13ª e 71ª posições de *HLA-DRB1* entre casos e controles, e verificar se estão associados a Neoplasia Intraepitelial Cervical.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

O presente trabalho é um estudo caso-controle de associação entre alelos dos genes *HLA-B* e *HLA-DRB1* com Neoplasia Intraepitelial Cervical. Ele faz parte de um projeto maior denominado “Polimorfismos genéticos e expressão de genes relacionados ao sistema imune e ao ciclo celular no carcinoma uterino associado à infecção pelo papilomavírus humano”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Erasto Gaertner (Número de protocolo: P.P N° 1943) Curitiba, Brasil (anexo I). Neste projeto foram realizadas as etapas de: coleta de material biológico, entrevista para obtenção de dados epidemiológicos, detecção e genotipagem de HPV, extração de DNA e genotipagem de *HLA-B* e *HLA-DRB1* (DE FRANÇA, 2012). Tais dados foram analisados e apresentados anteriormente na tese de doutorado “Carcinoma cervical e suas lesões precursoras: fatores epidemiológicos e o papel dos genes *MICA*, *NKG2D*, *HLA-B* e *HLA-DRB1* na oncogênese do câncer” (DE FRANÇA, 2012). Por conta disso, a metodologia destas etapas será brevemente descrita no presente trabalho. A partir dos resultados produzidos no trabalho anterior foi possível realizar novas análises de genotipagem em alta resolução de *HLA-B* e *HLA-DRB1* e de identificação dos aminoácidos presentes na posição 156 da cadeia polipeptídica de *HLA-B* e posições 13 e 71 de *HLA-DRB1*, em pacientes e controles.

O grupo de pacientes analisado no presente trabalho é formado por 184 mulheres encaminhadas para o tratamento de Neoplasia Intraepitelial Cervical de alto grau (NIC II e III) no Hospital Erasto Gaertner (HEG), Curitiba, Paraná. O grupo de controles consiste em 174 mulheres com citologia cervical normal, recrutadas em campanhas de rastreamento em Campo Largo, região metropolitana de Curitiba, em parceria com a Secretaria de Saúde. O diagnóstico dos casos foi confirmado através do laudo das biopsias oriundas da cirurgia de alta frequência (CAF) em mulheres que compareceram à atendimento ginecológico e foram indicadas ao tratamento cirúrgico de NIC II e III no Hospital Erasto Gaertner. O diagnóstico dos controles foi confirmado a partir do laudo citológico (exame Papanicolau) de mulheres que participaram de recrutamento

em campanhas de controle do CCU (DE FRANÇA, 2012). Todas as mulheres responderam a um questionário epidemiológico (anexo III), leram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (anexo II).

Foram adotados os seguintes critérios de exclusão: gravidez, infecções sistêmicas, doença autoimune e recebimento de transfusão de sangue nos últimos 60 dias. Adicionalmente, para as análises realizadas no presente estudo, foram excluídos 25 indivíduos portadores de outras infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) além do HPV, como HIV, sífilis, herpes genital, candidíase e hepatite B, de forma a evitar vieses de análise com os dados de HLA.

5.2 DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DE HPV

A detecção de HR-HPV (tipos: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68) foi realizada a partir de amostras de DNA isoladas de esfregaço cervical e submetidas a técnica de Captura Híbrida, com auxílio do kit Digene HC2 *High-Risk* HPV DNA Test (Digene), seguindo as instruções do fornecedor (DE FRANÇA, 2012). Amostras HPV-positivas foram então genotipadas por PCR-multiplex, com o intuito de detectar os sete tipos de HPV oncogênicos de maior prevalência associados ao CCU no Brasil: HPV16, 18, 31, 33, 35, 45 e 52. Amostras positivas para detecção de HPV mas negativas para a genotipagem por PCR foram testadas novamente para confirmação dos resultados, pelo método de hibridação reversa utilizando o kit comercial Digene HPV Genotyping RH (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante (GILLIO-TOS et al., 2012).

5.3 EXTRAÇÃO DE DNA E GENOTIPAGEM DE *HLA-B* E *HLA-DRB1*

O isolamento do DNA das células da camada leuco-plaquetária do sangue foi feito pela técnica de *salting-out* e sua concentração foi determinada pelo espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Massachusetts, EUA) (DE FRANÇA, 2012). A genotipagem de *HLA-B* e *HLA-DRB1* foi feita por PCR-SSOP (*Polymerase Chain Reaction - Specific Sequence of Oligonucleotides Probes*), através do kit LABType®SSO (One Lambda(r), CA,

EUA). Esta técnica consiste na amplificação da região alvo do DNA com o uso de oligonucleotídeos iniciadores biotinilados, seguida da hibridação com sondas de sequência específicas conjugadas com microesferas fluorescentes (DE FRANÇA, 2012). A leitura das reações é feita em fluorímetro de fluxo (LABScan™100), a qual emprega a tecnologia Luminex® e detecta a cor (através do laser vermelho, $\lambda = 633$ nm) e intensidade da fluorescência (através do laser verde, $\lambda = 532$ nm). A leitura dos resultados para a determinação dos alelos é feita com auxílio do software *HLA Fusion*. O programa considera a combinação de microesferas hibridizadas com o DNA amplificado para determinar os alelos, tendo um padrão de porcentagem e de quais microesferas que hibridizam em cada alelo da amostra (DE FRANÇA, 2012).

5.4 GENOTIPAGEM EM ALTA RESOLUÇÃO DE *HLA-B* E *HLA-DRB1*

O resultado da hibridação das amostras amplificadas de cada indivíduo, tanto de *HLA-B* quanto de *HLA-DRB1* (DE FRANÇA, 2012) estavam disponíveis no Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH) da UFPR e foram reanalisados com auxílio do programa *HLA Fusion* versão 4.4.0.13925. A análise feita anteriormente (DE FRANÇA, 2012) definiu apenas as linhagens alélicas, ou seja, os alelos HLA foram definidos com a numeração de 2 dígitos, apresentados após a designação do *locus* (por exemplo *HLA-DRB1*13*). Com o objetivo de considerar alelos que diferem na sequência de aminoácidos, os dados de genotipagem dos exons 2 e 3 de *HLA-B* e exon 2 de *HLA-DRB1* foram reanalisados para fazer a designação dos alelos com 4 dígitos (por exemplo *HLA-DRB1*13:01* ou *HLA-DRB1*13:02*). A análise em 4 dígitos é importante porque os dois últimos dígitos demonstram que há alterações na sequência do DNA que levam a mudanças de aminoácidos, estas que podem ser em regiões de interesse.

O resultado da hibridação das amostras com as diferentes sondas pode ser compatível com diversas combinações de alelos, portanto na genotipagem em alta resolução, o *HLA Fusion* pode sugerir diferentes genótipos para uma mesma amostra. Para inferir o genótipo mais provável dos indivíduos, os alelos foram escolhidos de acordo com suas frequências. O próprio *HLA Fusion* indica

o genótipo mais frequente, de acordo com a população de referência (CWD_TDX_3.15.0). Os dados de frequências alélicas utilizados pelo programa são oriundos do *Allele Frequency Net Database* (GONZALEZ et al., 2015). Este banco de dados disponibiliza frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas de genes cujos produtos participam da resposta imunológica, em diferentes populações do mundo. O genótipo inferido para os indivíduos foi a partir dos dois alelos mais frequentes, na população geral, dentre os possíveis indicados. Em 87 amostras genotipadas para *HLA-B* e 53 para *HLA-DRB1*, o padrão de hibridização resultou em mais de uma possibilidade de genótipos frequentes. Nestes casos, foram consideradas as frequências dos haplótipos formados pelos alelos de *HLA-B* e *HLA-DRB1* para determinar o genótipo mais provável. As frequências haplotípicas entre os diferentes alelos foram verificadas através do *Allele Frequency Net Database* (GONZALEZ et al., 2015). Aqueles cujas frequências populacionais – considerando população em geral - eram maiores foram utilizados para inferir o genótipo mais provável.

5.5 DEFINIÇÃO DOS AMINOÁCIDOS CODIFICADOS PELO CÓDON 156 DE *HLA-B* E CÓDONS 13 E 71 DA CADEIA DE *HLA-DRB1*

A partir dos dados de genotipagem de *HLA-B* e *HLA-DRB1* por PCR-SSOP (DE FRANÇA, 2012) foi possível identificar os aminoácidos presentes nas posições 156 da cadeia polipeptídica de *HLA-B* e 13 e 71 da cadeia de *HLA-DRB1*. As análises foram feitas a partir dos resultados da hibridação do DNA amplificado de cada amostra com as sondas nucleotídicas posicionadas na região dos códons 156 de *HLA-B* e 13 e 71 de *HLA-DRB1*. Onze sondas podem hibridizar na região do códon 156 de *HLA-B*, correspondendo aos aminoácidos leucina, aspartato, triptofano e arginina (quadro 4). Com relação as posições de interesse em *HLA-DRB1*, 11 sondas podem hibridizar na região do 13º códon, resultando na identificação dos aminoácidos arginina, fenilalanina, glicina, histidina, serina e tirosina (quadro 5); e 33 sondas na região do códon 71, correspondendo aos aminoácidos: alanina, arginina, glutamato, lisina e treonina (quadro 6).

Algumas sondas, como por exemplo a #036 (B474G-29) (positiva para a posição 156 de HLA-B), não indicam claramente qual seria o aminoácido equivalente na posição de interesse na posição de interesse (quadros 4, 5 e 6). Entretanto, o *HLA Fusion* disponibiliza as informações acerca dos alelos positivos para cada sonda utilizada. Desta forma, para determinar o aminoácido em questão, os alelos positivos para as sondas (anexos IV, V e VI) foram alinhados com auxílio do recurso “align” do *IPD-IMGT/HLA Database 3.39.0*. (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/align.html>). Com este recurso é possível identificar qual códon correspondente às posições de interesse (156 de HLA-B, 13 e 71 de HLA-DRB1) e, assim, determinar o aminoácido.

QUADRO 4 - SONDAS DO KIT LABTYPE®SSO (ONE LAMBDA(R), CA, EUA) DE PCR-SSOP, UTILIZADAS PARA DETERMINAR OS AMINOÁCIDOS PRESENTES NA POSIÇÃO 156 DA CADEIA POLIPEPTÍDICA DE HLA-B.

Sondas que contemplam a posição 156 de HLA-B (exon 3)	Aminoácido correspondente
#036 (B474G-29): [111----D-S-117 + 154 --- A158]	Arginina (Arg)
#042 (B225G): [93--W-R-98 + 151RE--- L -157]	Leucina (Leu)
#052 (B179): [150ARE-153 + 155- W -A-159]	Triptofano (Trp)
#061(B863G-7): [113-N-F-117 + 155- -- A158]	Leucina (Leu)
#538(B168): 154-- L -T—160	Leucina (Leu)
#546 (B130): 152 (E/V/-)--- D -A-159	Aspartato (Asp)
#568 (C437): 153--- L -A-159	Leucina (Leu)
#569 (B148): 153 ---- 157	Arginina (Arg)
#578 (B250G): [154-- D -A158 + 161--T--165]	Aspartato (Asp)
#587 (B828GC): [113(-/H)N-L116 + 154-- D -A158]	Aspartato (Asp)
#596 (B279G): [153--- W -157 + 165-EW--169]	Triptofano (Trp)

FONTE: *HLA Fusion* versão 4.4.0.13925.

LEGENDA: Está destacada em vermelho negrito a posição 156 de HLA-B. Esta pode ser ocupada pelos aminoácidos leucina (L), triptofano (W), aspartato (D) ou por traços, nas sondas cujos aminoácidos não são mostrados

QUADRO 5 - SONDAS DO KIT LABTYPE®SSO (ONE LAMBDA(R), CA, EUA) DE PCR-SSOP, UTILIZADAS PARA DETERMINAR OS AMINOÁCIDOS PRESENTES NA POSIÇÃO 13 DA CADEIA POLIPEPTÍDICA DE HLA-DRB1.

Sondas que contemplam a posição 13 de <i>HLA-DRB1</i> (exon 2)	Aminoácido correspondente
#008 (OLR4029): 9--P- R ---15	Arginina (Arg)
#010 (OLR4335): 10YST S ---16	Serina (Ser)
#041: (OLR4333): 9-----16	Fenilalanina (Phe)
#056 (OLR4338): 11V- H -----19	Histidina (His)
#065 (OLR4335): 9K-D---16	Fenilalanina (Phe)
#068 (OLR4343): 11ST G --Y--18	Glicina (Gly)
#070 (OLR4028LT): 10-G- Y K--16	Tirosina (Tyr)
#072 (OLR4020LT): 9EEV ---16	Fenilalanina (Phe)
#076 (DR702): 10YSM S -14	Serina (Ser)
#094 (DR283-6C): 9EYPT S --15	Serina (Ser)
#094(OLR4916-9C): 10YSR G --Y-17	Glicina (Gly)

FONTE: *HLA Fusion* versão 4.4.0.13925.

LEGENDA: Está destacada em vermelho negrito a posição 13 de HLA-DRB1. Esta pode ser ocupada pelos aminoácidos arginina (R), serina (S), histidina (H), glicina (G), tirosina (Y) ou por traços, nas sondas cujos aminoácidos não são mostrados

QUADRO 6 - SONDAS DO KIT LABTYPE®SSO (ONE LAMBDA(R), CA, EUA) DE PCR-SSOP, UTILIZADAS PARA DETERMINAR OS AMINOÁCIDOS PRESENTES NA POSIÇÃO 71 DA CADEIA POLIPEPTÍDICA DE HLA-DRB1.

Sondas que contemplam a posição 71 de <i>HLA-DRB1</i> (exon 2)	Aminoácido correspondente
#002 (OLR4905G): [34---N--39 + 68--DE-72]	Glutamato (Glu)
#003 (OLR4046LT): 69--K---74	Lisina (Lys)
#011 (OLR4041LT): 65-----D-71	Arginina (Arg)
#012 (OLR4751G): [68--DE-72 + 86 --- 89]	Glutamato (Glu)
#015 (OLR4102):66(-/N)I---A71	Alanina (Ala)
#018 (DR109G): [69---73 + 84-----88]	Arginina (Arg)
#019 (OLR4723): 70 ----- 75	Arginina (Arg)
#020 (OLR4133): 66-F--DE-72	Glutamato (Glu)
#022 (DR235): 66--- R-71	Arginina (Arg)
#023 (OLR4043LT): 69-D --- 74	Arginina (Arg)
#029 (DR108G): [56-S---60 + 68-----72]	Arginina (Arg)
#032 (DR298G): [56-S---60 + 66-----71]	Arginina (Arg)
#036 (OLR4914G): [56--E--60 + 68--DE-72]	Glutamato (Glu)
#037 (DRHD137): [45 ----49 + 69--A-72	Alanina (Ala)
#038 (OLR4093): 71K-GR-75	Lisina (Lys)
#043 (OLR4042): 66-I--DE-72	Glutamato (Glu)
#047 (OLR4134): 66-I--D--72	Arginina (Arg)
#048 (OLR4045) 68 ----- 73	Arginina (Arg)
#049 (OLR4088LT): 66-F--D--72	Arginina (Arg)
#049 (DR112G): [55-----59 + 71---L74 + 86V]	Arginina (Arg)
#053 (OLR4924G): [47---49 + 69-DE-72]	Glutamato (Glu)
#057 (OLR4043): 70D --- 74	Arginina (Arg)
#064 (OLR4088LT): 66-F--D--72	Arginina (Arg)
#067 (OLR4753G): [68---A-72 + 84 --- 88]	Alanina (Ala)
#077 (DR118G): [56---59 + 70D--L74 + 84 --- 87]	Arginina (Arg)
#080 (OLR4132): 70R--E74	Arginina (Arg)
#081 (DR332G): [68--R-71 + 76 -----81]	Arginina (Arg)
#084: (DR271-2): 68--DE--73	Glutamato (Glu)
#085 (DR437-3): 67I-GD--72	Arginina (Arg)
#094 (DR515G-3): [57V--S60 + 71K-G73]	Lisina (Lys)
#094 (DR307-5): 66 ---- A71	Alanina (Ala)
#098 (DRHD198): 67 ---T-72	Treonina (Thr)
#098 (DRHD198): 67 ---A71	Alanina (Ala)

FONTE: *HLA Fusion* versão 4.4.0.13925.

LEGENDA: Está destacada em vermelho negrito a posição 71 de HLA-DRB1. Esta pode ser ocupada pelos aminoácidos glutamato (E), lisina (K), alanina (A), treonina (T) ou por traços, nas sondas cujos aminoácidos não são mostrados.

Devido ao grande número de informações extraídas do programa *HLA Fusion*, todos os dados passaram por dupla verificação manual, a fim de minimizar possíveis erros.

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As frequências alélicas das variantes dos genes *HLA-B* e *HLA-DRB1* foram determinadas por contagem direta. A avaliação da hipótese de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi realizada utilizando o programa Genalex v6.502 (PEAKALL; SMOUSE, 2006). Para a realização dos cálculos de EHW, os alelos com frequências menores ou iguais a 3% foram agrupados, uma vez que, caso contrário, haveriam muitos genótipos raros na amostragem, levando ao desvio do EHW.

As análises univariadas de associação foram feitas por testes de independência entre as variáveis utilizando-se o teste exato de Fisher bicaudal. O valor de *p* da média de idade e gestações entre os grupos foram calculados utilizando o teste-t. Para as análises de associação alélica, foram considerados apenas os alelos com frequência maior ou igual a 3% em, pelo menos, um dos grupos. Para as análises de associação entre os resíduos de aminoácidos presentes nas posições 156 de *HLA-B* e 13 e 71 de *HLA-DRB1* foram considerados apenas aqueles cujas frequências eram maiores ou iguais a 2% em pelo menos um dos grupos. Análises multivariadas de associação com variáveis socio comportamentais foram feitas com base em regressão logística. Utiliza-se a regressão logística quando se deseja prever uma variável dependente qualitativa, como a presença ou ausência de uma doença, a partir de observações de uma ou mais variáveis independentes, ajustando uma função logística aos dados (HOSMER et al., 2013). Os critérios de inclusão das variáveis independentes no modelo de regressão logística são definidos por significância estatística nas análises univariadas feitas por Fisher bicaudal ($p < 0,05$) e significância estatística nas análises de regressão univariada ($p < 0,2$). O modelo reduzido final de regressão logística contou com as variáveis independentes: cor autodeclarada, idade da primeira relação sexual, uso de contraceptivo oral,

presença do alelo *HLA-DRB1*13:01* e presença dos aminoácidos histidina e tirosina na posição 13 do *pocket* 4 de HLA-DRB1. Valores de p menores que 0,05 foram considerados significantes. Para determinar a magnitude das associações, foi calculado o *odds ratio*, com intervalo de confiança de 95%. Nestas análises foram empregadas tabelas de contingência dois-a-dois, de acordo com a presença ou ausência de determinada variável (SVEJGAARD; RYDER, 1994). O cálculo da OR, diferentemente do valor de p , indica se a tendência da associação é positiva ou negativa: se o valor for 1, indica que a chance desta pessoa ser portadora da doença é a mesma de não ser. Valores acima de 1, indicam uma maior chance de ser portadora da doença, e menores, uma chance menor. Estas análises foram feitas com auxílio dos programas estatísticos *GraphPad Prism* versão 5.03, *SigmaStat* versão 3.5 e *Stata* versão 9.1.

6. RESULTADOS

6.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

A comparação das características sociais e comportamentais entre casos e controles encontra-se na tabela 2. Os dois grupos não diferem em relação a idade ($p = 0,25$) e escolaridade ($p = 0,90$). Pode-se observar que a faixa etária mais frequente em ambos os grupos é de 29 a 39 anos, com 48,9% dos indivíduos no grupo de pacientes e 45,4% no grupo controle. Não há dados disponíveis sobre a ancestralidade das participantes do estudo, apenas a cor da pele autodeclarada por estas. Dentro do grupo de pacientes, a maioria se autodeclarou parda (52,2%), enquanto o grupo controle majoritariamente se autodeclarou branco (55,2%). Este critério foi utilizado no modelo reduzido final da regressão logística e mostrou associação com NIC ($p = 0,02$; OR = 1,84 [IC95% = 1,11-3,07]). Com relação ao hábito de fumar, a maioria dos indivíduos de ambos os grupos relataram nunca terem fumado (76,1% dos pacientes e 0,3% dos controles), entretanto há diferença na frequência ($p = 0,006$). Este fator não foi incluído na análise de regressão logística multivariada pois não foi significativo na análise de regressão logística univariada (NIC x hábito de fumar, $p = 0,7$).

A maioria das mulheres (52,2% e 41,4%, em casos e controles, respectivamente) teve início da vida sexual entre os 15 e os 17 anos. Este critério foi utilizado no modelo reduzido final da regressão logística e mostrou associação com NIC ($p = 0,05$), sendo o início da vida sexual tardio (maior ou igual a 21 anos) protetor em relação ao início mais precoce ($OR = 0,91$ [IC 95% = 0,82-0,99]). Com relação aos métodos de contracepção, foi possível observar uma maior frequência de pacientes que tomam anticoncepcional oral, quando comparado aos controles (70,1% e 46,6%, respectivamente; $p < 0,0001$). Este parâmetro foi considerado para o modelo final da regressão logística, permanecendo associado com NIC ($p = 0,000$; $OR = 3,04$; [IC 95% = 1,83-5,07]). Pode-se dizer que o uso de anticoncepcional oral está associado a risco cerca de 3 vezes maior de NIC. A frequência de mulheres que faziam uso regular ou ocasional de preservativo nos últimos 12 meses foi maior em casos (44,6%) do que em controles (36,2%), ($p = 0,03$). Houve uma diferença em relação ao total de parceiros sexuais ($p = 0,002$). O grupo controle apresentou um maior número de indivíduos que relataram terem tido apenas um parceiro sexual ao longo da vida, em relação ao grupo de pacientes (54 e 31 indivíduos, com frequências de 31% e 16,9% respectivamente). A maioria dos pacientes relatou terem tido de 2 a 5 parceiros sexuais ao longo da vida (106 indivíduos, com frequência de 56,5%).

Foram detectados HR-HPV em 62 indivíduos do grupo controle. Tanto em pacientes quanto em controles foi possível observar infecção por um ou mais tipos de HR-HPV, por este motivo o número total mostrado na tabela 2 é maior que o número de amostras, pois há a repetição de indivíduos

TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS SÓCIO-COMPORTAMENTAIS DA POPULAÇÃO DE ESTUDO, N = 358

	Pacientes (N = 184)	Controles (N = 174)	p^a	OR ajustado^b [IC95%]
Idade (anos), Média ± DP	31,5 ± 6,7	30,4 ± 7,0	0,12	
Idade (anos), n (%)			0,25	
>18-28	65 (35,3)	75 (43,1)		
29-39	90 (48,9)	79 (45,4)		
≥ 40	29 (15,8)	20 (11,5)		
Cor da pele autodeclarada, n (%)			0,006	1,84 [1,11-3,07]
Branco	76 (41,3)	96 (55,2)		
Pardo	96 (52,2)	65 (37,4)		
Outros/Dado não disponível	12 (6,5)	13 (7,5)		
Escolaridade, n (%)			0,90	
Ensino Fundamental	79 (42,9)	79 (45,4)		
Ensino médio	84 (45,7)	76 (43,7)		
Ensino Superior	11 (6,0)	11 (6,3)		
Dado não disponível	10 (5,4)	8 (4,6)		
Idade da 1ª relação sexual (anos), n (%)			0,06	0,91 [0,82-0,99]
≤14	47 (25,5)	45 (25,9)		
15-17	96 (52,2)	72 (41,4)		
18-20	33 (17,9)	39 (22,4)		
≥ 21	8 (4,4)	18 (10,3)		
Uso de anticoncepcional oral, n (%)			<0,0001	3,04 [1,83-5,07]
Sim	129 (70,1)	81 (46,6)		
Não	54 (29,4)	92 (52,9)		
Dado não disponível	1 (0,5)	1 (0,6)		
Uso de anticoncepcional oral (anos), n (%)			0,28	
Nunca fez uso	19 (10,3)	24 (13,8)		
1-5	44 (23,9)	50 (28,7)		
6-10	56 (30,4)	44 (25,3)		
11-20	48 (26,1)	34 (19,5)		
>20	11 (6,0)	6 (3,5)		
Dado não disponível	6 (3,3)	16 (9,2)		

	Pacientes (N = 184)	Controles (N = 174)	p^a	OR ajustado^b [IC95%]
Idade de início do uso de anticoncepcional oral, n (%)			0,66	
≤12-14	11 (6,0)	8 (4,6)		
15-17	59 (32,1)	48 (27,6)		
18-20	51 (27,7)	54 (31,0)		
≥ 21	43 (23,4)	33 (19,0)		
Nunc/dado não disponível	20 (10,9)	31 (17,8)		
Nº de parceiros sexuais ao longo da vida, n (%)			0,002**	
1	31 (16,9)	54 (31,0)		
2-5	104 (56,5)	71 (40,8)		
≥6	48 (26,1)	49 (28,2)		
Dado não disponível	1 (0,5)	0 (0,0)		
Nº de parceiros sexuais (últimos 12 meses), n (%)			0,13	
0	13 (7,1)	22 (12,6)		
1	149 (81,0)	128 (73,6)		
≥ 2	21 (11,4)	24 (13,8)		
Dado não disponível	1 (0,5)	0 (0,0)		
Nº de gestações, Média ± DP	1,9 ± 1,8	1,8 ± 1,3	0,49	
Nº de gestações, n (%)			0,62	
0	31 (16,9)	23 (13,2)		
1-2	92 (50,0)	88 (50,6)		
3- ≥6	52 (28,3)	41 (23,6)		
Dado não disponível	9 (4,9)	22 (12,6)		
Uso de preservativo (últimos 12 meses), n (%)			0,03*	
Regular	16 (8,7)	21 (12,1)		
Ocasional	66 (35,9)	42 (24,1)		
Nunca	90 (48,9)	88 (50,6)		
Não teve relação	12 (6,5)	23 (13,2)		
Tabagismo, n (%)			0,006**	
Nunca fumou	140 (76,1)	105 (60,3)		
Sim	28 (15,2)	44 (25,3)		
Ex-fumante	15 (8,2)	24 (13,8)		
Dado não disponível	1 (0,5)	1 (0,6)		

	Pacientes (N = 184)	Controles (N = 174)	p ^a	OR ajustado ^b [IC95%]
Tempo de tabagismo em anos, n (%)	N = 28	N = 24	0,39	
1-10	15 (53,6)	9 (37,5)		
>10	12 (42,9)	13 (54,2)		
Dado não disponível	1 (3,6)	2 (8,3)		
Tabagismo: nº de cigarros ao dia, n (%)	N = 28	N = 24	0,56	
1-10	19 (67,9)	13 (54,2)		
>10	9 (32,1)	10 (41,7)		
Dado não disponível	0 (0,0)	1 (4,2)		
Infecção por HR-HPV, n (%)^c			<0,0001***	
Negativo	6 (3,3)	89 (51,2)		
Positivo para HR-HPV ^d não 16 e 18	76 (41,3)	41 (23,6)		
Positivo para HPV16 e/ou HPV18	92 (50,0)	33 (19,0)		
Dado não disponível	44 (23,9)	23 (13,2)		

FONTE: O autor (2020)

^aValor de p calculado pelo teste exato de Fisher, teste do qui-quadrado ou teste-t, de acordo com a necessidade. Os asteriscos ao lado dos valores significantes indicam o grau de significância (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,0001).

^bOR ajustado: cálculo do *odds ratio* com base em regressão logística ajustado por: cor autodeclarada, idade da primeira relação sexual, uso de contraceptivo oral, presença do alelo *HLA-DRB1*13:01* e presença dos aminoácidos histidina e tirosina na posição 13 do *pocket 4* de HLA-DRB1

^cO valor de n ultrapassa o valor total da amostra, bem como a porcentagem ultrapassa 100%, porque parte dos indivíduos analisados apresentam infecção tanto pelos tipos mais comuns (16 e 18) quanto pelos menos comuns^d.

^dHR-HPV: 31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,68,82. Tipos de HR-HPV com menores frequências, quando comparados aos tipos 16 e 18, de acordo com a classificação atual do IARC.

6.2 GENE *HLA-B*

Os dados inéditos aqui apresentados resultam da comparação da distribuição de alelos *HLA-B* entre pacientes com NIC II/III e controles sem lesões. Dentre o total de 184 pacientes incluídos neste estudo, 151 foram genotipados para *HLA-B* em alta resolução, assim como os 134 dos 174 controles. Não foi utilizado o número total de indivíduos da amostra devido a falhas na técnica de genotipagem. Além disso, apresentamos, a título de comparação, os alelos de *HLA-B* reunidos de acordo com sua linhagem alélica (tabela 3). Vale ressaltar que esta análise em baixa resolução já tinha sido realizada anteriormente (DE FRANÇA, 2012).

As frequências genotípicas referentes às genotipagens em baixa (apêndice 1) e alta (apêndice 2) resolução se encontram em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) tanto em controles ($p = 0,07$; $p = 0,31$; respectivamente) quanto em pacientes ($p = 0,26$; $p = 0,21$; respectivamente).

O alelo *HLA-B*39* foi associado negativamente a NICII/III ($p = 0,04$; OR = 0,37; [IC 95% = 0,14-0,97], indicando menor susceptibilidade a doença. Entretanto, após a análise por regressão logística esta associação não foi mantida ($p = 0,2$; OR = 0,48; [IC 95% = 0,15-1,53]) (tabela 3). Esta associação não havia sido encontrada no trabalho anterior (DE FRANÇA, 2012).

TABELA 3 - ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO ADE ALELOS HLA-B COM NIC II/III

Alelos	Pacientes N (%) N = 151	Controles N (%) N = 134	p ^b	OR [IC95%]	OR ajustado ^c [IC95%]
*07	27 (8,9)	15 (5,6)	0,15		
*07:02	23 (7,6)	12 (4,5)	0,16		
*07:05	3 (1,0)	1 (0,4)			
*07:09	0 (0,0)	1 (0,4)			
*07:72	1 (0,3)	0 (0,0)			
*07:137	0 (0,0)	1 (0,4)			
*08	14 (4,6)	12 (4,5)	1,00		
*08:01	14 (4,6)	12 (4,5)	1,00		
*13	3 (1,0)	6 (2,2)			
*13:02	3 (1,0)	6 (2,2)			
*14	14 (4,6)	16 (6,0)	0,57		
*14:01	5 (1,7)	1 (0,4)			
*14:02	8 (2,7)	15 (5,6)	0,09		
*14:03	1 (0,3)	0 (0,0)			
*15	24 (8,0)	21 (7,8)	1,00		
*15:01	5 (1,7)	6 (2,2)			
*15:03	5 (1,7)	3 (1,1)			
*15:04	4 (1,3)	6 (2,2)			
*15:07	2 (0,7)	0 (0,0)			
*15:08	1 (0,3)	2 (0,8)			
*15:10	1 (0,3)	0 (0,0)			
*15:16	2 (0,7)	2 (0,8)			
*15:17	1 (0,3)	0 (0,0)			
*15:20	3 (1,0)	2 (0,8)			
*18	13 (4,3)	9 (3,4)	0,67		
*18:01	13 (4,3)	9 (3,4)	0,67		
*27	15 (5,0)	9 (3,4)	0,41		
*27:02	3 (1,0)	1 (0,4)			
*27:03	0 (0,0)	1 (0,4)			
*27:05	12 (4,0)	5 (1,9)	0,22		
*27:07	0 (0,0)	2 (0,8)			
*35	33 (10,9)	32 (11,9)	0,79		
*35:01	13 (4,3)	13 (4,9)	0,84		
*35:02	0 (0,0)	5 (1,9)			
*35:03	9 (3,0)	2 (0,8)	0,07		

Alelos	Pacientes N (%^a) N = 151	Controles N (%^a) N = 134	p^b	OR [IC95%]	OR ajustado^c [IC95%]
*35:04	3 (1,0)	3 (1,1)			
*35:05	2 (0,7)	3 (1,1)			
*35:06	0 (0,0)	1 (0,4)			
*35:08	2 (0,7)	2 (0,8)			
*35:11	1 (0,3)	0 (0,0)			
*35:20	2 (0,7)	2 (0,8)			
*35:43	1 (0,3)	0 (0,0)			
*35:178	0 (0,0)	1 (0,4)			
*37	4 (1,3)	1 (0,4)			
*37:01	4 (1,3)	1 (0,4)			
*38	7 (2,3)	4 (1,5)			
*38:01	7 (2,3)	4 (1,5)			
39	6 (2,0)	14 (5,2)	0,04	0,37 [0,14-0,97]	0,48 [0,15-1,53]
*39:01	4 (1,3)	5 (1,9)			
*39:03	0 (0,0)	1 (0,4)			
*39:05	0 (0,0)	4 (1,5)			
*39:06	1 (0,3)	2 (0,8)			
*39:09	0 (0,0)	1 (0,4)			
*39:13	1 (0,3)	1 (0,4)			
*40	21 (7,0)	12 (4,5)	0,22		
*40:01	6 (2,0)	6 (2,2)			
*40:02	10 (3,3)	6 (2,2)	0,61		
*40:04	1 (0,3)	0 (0,0)			
*40:11	1 (0,3)	0 (0,0)			
*40:16	1 (0,3)	0 (0,0)			
*40:64	1 (0,3)	0 (0,0)			
*40:129	1 (0,3)	0 (0,0)			
*41	4 (1,3)	4 (1,5)			
*41:01	3 (1,0)	3 (1,1)			
*41:02	1 (0,3)	1 (0,4)			
*42	2 (0,7)	1 (0,4)			
*42:01	2 (0,7)	1 (0,4)			
*44	25 (8,3)	22 (8,2)	1,00		
*44:02	14 (4,6)	7 (2,6)	0,27		
*44:03	10 (3,3)	13 (4,9)	0,40		
*44:04	0 (0,0)	1 (0,4)			
*44:05	1 (0,3)	1 (0,4)			

Alelos	Pacientes N (% ^a) N = 151	Controles N (% ^a) N = 134	p ^b	OR [IC95%]	OR ajustado ^c [IC95%]
*45	6 (2,0)	6 (2,2)			
*45:01	6 (2,0)	6 (2,2)			
*47	0 (0,0)	1 (0,4)			
*47:01	0 (0,0)	1 (0,4)			
*48	8 (2,7)	3 (1,1)			
*48:01	2 (0,7)	0 (0,0)			
*48:02	5 (1,7)	3 (1,1)			
*48:03	1 (0,3)	0 (0,0)			
*49	3 (1,0)	3 (1,1)			
*49:01	3 (1,0)	3 (1,1)			
*50	10 (3,3)	8 (3,0)	1,00		
*50:01	8 (2,7)	7 (2,6)			
*50:02	2 (0,7)	1 (0,4)			
*51	35 (11,6)	24 (9,0)	0,34		
*51:01	34 (11,3)	24 (9,0)	0,41		
*51:08	1 (0,3)	0 (0,0)			
*52	4 (1,3)	9 (3,4)	0,16		
*52:01	4 (1,3)	9 (3,4)	0,16		
*53	5 (1,7)	10 (3,7)	0,19		
*53:01	5 (1,7)	10 (3,7)	0,19		
*55	4 (1,3)	3 (1,1)			
*55:01	4 (1,3)	2 (0,8)			
*55:38	0 (0,0)	1 (0,4)			
*56	0 (0,0)	2 (0,8)			
*56:01	0 (0,0)	1 (0,4)			
*56:27	0 (0,0)	1 (0,4)			
*57	7 (2,3)	8 (3,0)	0,79		
*57:01	6 (2,0)	5 (1,9)			
*57:02	1 (0,3)	0 (0,0)			
*57:03	0 (0,0)	3 (1,1)			
*58	7 (2,3)	9 (3,4)	0,46		
*58:01	5 (1,7)	7 (2,6)			
*58:02	2 (0,7)	2 (0,8)			
*73	0 (0,0)	1 (0,4)			
*73:01	0 (0,0)	1 (0,4)			
*78	0 (0,0)	1 (0,4)			
*78:01	0 (0,0)	1 (0,4)			

Alelos	Pacientes N (% ^a) N = 151	Controles N (% ^a) N = 134	p ^b	OR [IC95%]	OR ajustado ^c [IC95%]
*81	1 (0,3)	2 (0,8)			
*81:01	1 (0,3)	2 (0,8)			
Total (N _a)	302	268			

FONTE: O autor (2020)

As análises de associação foram realizadas apenas entre os alelos cujas frequências eram maiores ou iguais a 3%, em pelo menos um dos grupos.

^aOs números entre parênteses são as frequências alélicas, dadas em porcentagem (%)

^bValor de p calculado pelo teste exato de Fisher bicaudal. *Significância estatística (valor de p).

^cOR ajustado: cálculo do *odds ratio* com base em regressão logística ajustado por: cor autodeclarada, idade da primeira relação sexual, uso de contraceptivo oral, presença do alelo *HLA-DRB1*13:01* e presença dos aminoácidos histidina e tirosina na posição 13 do *pocket 4* de *HLA-DRB1*

N_i: número de indivíduos

N_a: número de alelos

Além da comparação entre casos e controles, também foram verificadas as frequências dos alelos de *HLA-B* e indivíduos com positividade de HPV. Foram utilizados 47 indivíduos positivos para um ou mais tipos de HR-HPV e 70 negativos para HR-HPV, todos oriundos originalmente do grupo controle. Dezessete indivíduos não foram incluídos nesta análise por falta de informação sobre a presença de HPV. As frequências genotípicas não foram diferentes das esperadas em Equilíbrio de Hardy-Weinberg em HPV⁺ (p = 0,11), contudo sofreram desvio no grupo HPV⁻ (p = 0,004). Foram observados 62 alelos de *HLA-B*, sendo o *B*51:01* o mais frequente tanto em indivíduos HPV⁺ (9,6%) quanto HPV⁻ (10%). Os alelos *B*07:05*, **14:01*, **35:08*, **39:03*, **42:01*, **44:04*, **44:05*, **49:01* e **55:38* foram observados apenas em indivíduos HPV⁺, todos com frequências menores que 3%. Em contrapartida, os alelos *B*07:09*, **07:137*, **15:08*, **15:20*, **27:02*, **27:03*, **27:05*, **27:07*, **35:04*, **35:05*, **35:06*, **35:178*, **37:01*, **39:09*, **39:13*, **41:01*, **47:01*, **50:02*, **56:01*, **56:27*, **58:02*, **78:01* e **81:01* foram vistos apenas em HPV⁻.

TABELA 4 - FREQUENCIA DOS ALELOS DE *HLA-B* NOS CONTROLES DE ACORDO COM O STATUS DE HPV

Alelo	HR-HPV ⁺ N (% ^a)	HR-HPV ⁻ N (% ^a)
	N = 47	N = 70
*07:02	3 (3,2)	8 (5,7)
*07:05	1 (1,1)	0 (0,0)
*07:09	0 (0,0)	1 (0,7)
*07:137	0 (0,0)	1 (0,7)
*08:01	5 (5,3)	6 (4,3)
*13:02	1 (1,1)	4 (2,9)
*14:01	1 (1,1)	0 (0,0)
*14:02	7 (7,4)	5 (3,6)
*15:01	3 (3,2)	2 (1,4)
*15:03	1 (1,1)	1 (0,7)
*15:04	1 (1,1)	5 (3,6)
*15:08	0 (0,0)	2 (1,4)
*15:16	1 (1,1)	1 (0,7)
*15:20	0 (0,0)	2 (1,4)
*18:01	3 (3,2)	4 (2,9)
*27:02	0 (0,0)	1 (0,7)
*27:03	0 (0,0)	1 (0,7)
*27:05	0 (0,0)	4 (2,9)
*27:07	0 (0,0)	2 (1,4)
*35:01	3 (3,2)	6 (4,3)
*35:02	2 (2,1)	3 (2,1)
*35:03	1 (1,1)	1 (0,7)
*35:04	0 (0,0)	3 (2,1)
*35:05	0 (0,0)	3 (2,1)
*35:06	0 (0,0)	1 (0,7)
*35:08	2 (2,1)	0 (0,0)
*35:178	0 (0,0)	1 (0,7)
*37:01	0 (0,0)	1 (0,7)
*38:01	3 (3,2)	1 (0,7)
*39:01	1 (1,1)	3 (2,1)
*39:03	1 (1,1)	0 (0,0)
*39:05	1 (1,1)	3 (2,1)
*39:06	1 (1,1)	1 (0,7)
*39:09	0 (0,0)	1 (0,7)
*39:13	0 (0,0)	1 (0,7)
*40:01	4 (4,3)	1 (0,7)
*40:02	1 (1,1)	5 (3,6)

Alelo	HR-HPV ⁺ N (% ^a)	HR-HPV ⁻ N (% ^a)
	N = 47	N = 70
*41:01	0 (0,0)	1 (0,7)
*42:01	1 (1,1)	0 (0,0)
*44:02	2 (2,1)	5 (3,6)
*44:03	8 (8,5)	4 (2,9)
*44:04	1 (1,1)	0 (0,0)
*44:05	1 (1,1)	0 (0,0)
*45:01	2 (2,1)	4 (2,9)
*47:01	0 (0,0)	1 (0,7)
*48:02	1 (1,1)	2 (1,4)
*49:01	2 (2,1)	0 (0,0)
*50:01	3 (3,2)	3 (2,1)
*50:02	0 (0,0)	1 (0,7)
*51:01	9 (9,6)	14 (10,0)
*52:01	3 (3,2)	5 (3,6)
*53:01	6 (6,4)	3 (2,1)
*55:01	1 (1,1)	1 (0,7)
*55:38	1 (1,1)	0 (0,0)
*56:01	0 (0,0)	1 (0,7)
*56:27	0 (0,0)	1 (0,7)
*57:01	2 (2,1)	2 (1,4)
*57:03	1 (1,1)	1 (0,7)
*58:01	3 (3,2)	3 (2,1)
*58:02	0 (0,0)	1 (0,7)
*78:01	0 (0,0)	1 (0,7)
*81:01	0 (0,0)	1 (0,7)
Total	94 (100)	140 (100)

FONTE: O autor (2020)

^aOs números entre parênteses são as frequências alélicas, dadas em porcentagem (%)

6.2.1 Resíduos de aminoácidos na posição 156 da cadeia polipeptídica de HLA-B

Foram identificados os resíduos de aminoácidos presentes na posição 156 da cadeia polipeptídica de HLA-B em 169 pacientes e 152 controles. Não foi utilizado o número total de indivíduos da amostra devido a falhas na técnica de genotipagem. Os grupos foram testados para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg e tanto controles ($p = 0,27$) quanto pacientes ($p = 0,53$) encontram-se em equilíbrio. Foram encontrados os aminoácidos leucina (Leu), aspartato (Asp), triptofano (Trp) e arginina (Arg) nesta posição, estando estes tanto em homozigose quanto em heterozigose. O aminoácido mais frequente em ambos os grupos foi a leucina, (91,7% dos pacientes e 95,4% controles) (tabela 5). Foram realizadas análises de associação levando em consideração a presença ou ausência dos aminoácidos encontrados na posição 156 de HLA-B, como pode ser visto na tabela 5. Não foram encontradas associações entre a presença destes aminoácidos e NIC II/III.

TABELA 5 - ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS ENCONTRADOS 156ª POSIÇÃO DE HLA-B E NIC II/III

Aminoácidos	Pacientes N (% ^a)	Controles N (% ^a)	p ^b
	N = 169	N = 152	
Leucina	155 (91,7)	145 (95,4)	0,26
Aspartato	47 (27,8)	36 (23,7)	0,44
Triptofano	20 (11,8)	18 (11,8)	1,00
Arginina	28 (16,6)	17 (11,2)	0,20

FONTE: O autor (2020)

^aOs números entre parênteses são as frequências de indivíduos homo- ou heterozigotos, dadas em porcentagem (%). As frequências ultrapassam 100%, uma vez que cada indivíduo pode ser portador de um ou dois aminoácidos.

^bValor de p calculado com o teste exato de Fisher bicaudal

Adicionalmente à análise de presença e ausência, foram feitas análises de associação levando em consideração as diferentes combinações de aminoácidos encontradas em ambos os grupos. As combinações triptofano/triptofano e triptofano/arginina foram observadas apenas em pacientes, ambas em baixa frequência (0,6% e 1,8%, respectivamente). Não foram encontradas associações das diferentes combinações de aminoácidos vistas na posição 156 de HLA-B e NIC II/III (tabela 6).

TABELA 6 - ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE GENOTIPOS DA 156ª POSIÇÃO DE HLA-B E NIC II/III

Aminoácido	Pacientes N (% ^a)	Controles N (% ^a)	p ^b
	N = 169	N = 152	
Leu/Leu	80 (47,3)	83 (54,6)	0,22
Leu/Asp	39 (23,1)	31 (20,4)	0,59
Leu/Trp	14 (8,3)	17 (11,2)	0,45
Leu/Arg	22 (13,0)	14 (9,2)	0,29
Asp/Asp	5 (3,0)	3 (2,0)	0,73
Asp/Trp	2 (1,2)	1 (0,7)	
Asp/Arg	1 (0,6)	1 (0,7)	
Trp/Trp	1 (0,6)	0 (0,0)	
Trp/Arg	3 (1,8)	0 (0,0)	
Arg/Arg	2 (1,2)	2 (1,3)	
Total	169 (100)	152 (100)	

FONTE: O autor (2020)

As análises de associação foram realizadas apenas entre os genótipos cujas frequências são maiores ou iguais a 2% em pelo menos um dos grupos.

^aOs números entre parênteses são as frequências genotípicas, dadas em porcentagem (%)

^bValor de p calculado pelo teste exato de Fisher bicaudal.

6.3 GENE *HLA-DRB1*

Os dados aqui apresentados resultam da comparação da distribuição de alelos *HLA-DRB1* entre pacientes com NIC II/III e controles sem lesões. Do total de 184 pacientes e 174 controles incluídos neste estudo, foram genotipados para *HLA-DRB1* em alta resolução 154 casos e 145 controles. Não foi utilizado o número total de indivíduos da amostra devido a falhas na técnica de genotipagem. Além disso, apresentamos, a título de comparação, os alelos de *HLA-DRB1* reunidos em 13 grupos, de acordo com sua linhagem alélica (tabela 7). Vale ressaltar que a análise em baixa resolução foi realizada anteriormente por De França (2012).

As frequências genotípicas não foram diferentes daquelas esperadas em equilíbrio de Hardy-Weinberg, tanto em baixa (apêndice 3) quanto alta resolução (apêndice 4), em controles ($p = 0,61$ e $p = 0,29$; respectivamente) e pacientes ($p = 0,94$ e $p = 0,42$; respectivamente).

A linhagem alélica *HLA-DRB1*11* foi a mais frequente entre os controles (15,2%) e *HLA-DRB1*04* entre os pacientes (15,3%). Entretanto, não foram observadas associações com as diferentes linhagens alélicas e NIC II/III (tabela 7). Foram identificados 58 alelos de *HLA-DRB1* nos grupos investigados visualizados em alta resolução, sendo o alelo *DRB1*07:01* o mais frequente tanto em pacientes (13%) quanto em controles (11,7%). Os alelos *DRB1*01:22*, **03:15*, **03:18*, **04:08*, **04:10*, **07:15*, **08:03*, **11:08*, **13:109*, **15:42* e **15:87* foram observados, exclusivamente, em pacientes; enquanto os alelos *DRB1*03:53*, **03:57*, **04:20*, **04:110*, **07:05*, **09:15*, **11:02*, **11:91*, **11:128*, **14:07*, **14:39* e **15:22* foram vistos apenas em controles, todos com frequências inferiores a 2%. Foi encontrada uma associação negativa do alelo *DRB1*13:01* com NIC II/III ($p = 0,02$; OR = 0,43 [IC 95% = 0,21-0,90], que se manteve após o ajuste por regressão logística ($p = 0,006$; OR = 0,32; [IC 95% = 0,14-0,72]) (tabela 8), sugerindo um efeito protetor deste alelo frente a doença. Não foram verificadas outras associações significantes entre os alelos *HLA-DRB1* e NIC II/III.

TABELA 7 - ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE ALELOS DE *HLA-DRB1* E NIC II/III

Alelos	Pacientes N (% ^a) N = 154	Controles N (% ^a) N = 145	p ^b	OR [IC95%]	OR ajustado [IC95%]
*01	25 (8,1)	24 (8,3)	1,00		
*01:01	17 (5,5)	13 (4,5)	0,34		
*01:02	4 (1,3)	9 (3,1)	0,16		
*01:03	3 (1,0)	2 (0,7)			
*01:22	1 (0,3)	0 (0,0)			
*03	22 (7,1)	27 (9,3)	0,37		
*03:01	18 (5,8)	22 (7,6)	0,42		
*03:02	2 (0,7)	3 (1,0)			
*03:15	1 (0,3)	0 (0,0)			
*03:18	1 (0,3)	0 (0,0)			
*03:53	0 (0,0)	1 (0,3)			
*03:57	0 (0,0)	1 (0,3)			
*04	47 (15,3)	32 (11,0)	0,15		
*04:01	10 (3,3)	3 (1,0)	0,09		
*04:02	2 (0,7)	2 (0,7)			
*04:03	5 (1,6)	2 (0,7)			
*04:04	9 (2,9)	8 (2,8)			
*04:05	6 (2,0)	7 (2,4)			
*04:06	1 (0,3)	1 (0,3)			
*04:07	1 (0,3)	2 (0,7)			
*04:08	5 (1,6)	0 (0,0)			
*04:10	1 (0,3)	0 (0,0)			
*04:11	7 (2,3)	5 (1,7)			
*04:20	0 (0,0)	1 (0,3)			
*04:110	0 (0,0)	1 (0,3)			
*07	41 (13,3)	35 (12,1)	0,72		
*07:01	40 (13,0)	34 (11,7)	0,71		
*07:05	0 (0,0)	1 (0,3)			
*07:15	1 (0,3)	0 (0,0)			
*08	21 (6,8)	19 (6,6)	1,00		
*08:01	5 (1,6)	5 (1,7)			
*08:02	4 (1,3)	6 (2,1)			
*08:03	3 (1,0)	0 (0,0)			
*08:04	3 (1,0)	3 (1,0)			
*08:07	6 (2,0)	5 (1,7)			
*09	10 (3,3)	4 (1,4)	0,17		
*09:01	10 (3,3)	3 (1,0)	0,09		
*09:15	0 (0,0)	1 (0,3)			
*10	6 (2,0)	6 (2,1)	1,00		
*10:01	6 (2,0)	6 (2,0)	1,00		
*11	35 (11,4)	44 (15,2)	0,19		
*11:01	24 (7,8)	26 (9,0)	0,66		

Alelos	Pacientes N (% ^a) N = 154	Controles N (% ^a) N = 145	p ^b	OR [IC95%]	OR ajustado [IC95%]
*11:02	0 (0,0)	4 (1,4)			
*11:03	3 (1,0)	2 (0,7)			
*11:04	7 (2,3)	10 (3,5)	0,46		
*11:08	1 (0,3)	0 (0,0)			
*11:91	0 (0,0)	1 (0,3)			
*11:128	0 (0,0)	1 (0,3)			
*12	1 (0,3)	3 (1,0)			
*12:01	1 (0,3)	3 (1,0)			
*13	31 (10,1)	42 (14,5)	0,11		
13:01	11 (3,6)	23 (7,9)	0,02	0,43 [0,21-0,90]	0,32 [0,14-0,72]
*13:02	17 (5,5)	16 (5,5)	1,00		
*13:03	1 (0,3)	1 (0,3)			
*13:05	1 (0,3)	2 (0,7)			
*13:109	1 (0,3)	0 (0,0)			
*14	12 (3,9)	12 (4,1)	1,00		
*14:01	10 (3,3)	7 (2,4)	0,63		
*14:02	2 (0,7)	3 (1,0)			
*14:07	0 (0,0)	1 (0,3)			
*14:39	0 (0,0)	1 (0,3)			
*15	38 (12,3)	27 (9,3)	0,24		
*15:01	22 (7,1)	11 (3,8)	0,08		
*15:02	3 (1,0)	5 (1,7)			
*15:03	11 (3,6)	10 (3,5)	1,00		
*15:22	0 (0,0)	1 (0,3)			
*15:42	1 (0,3)	0 (0,0)			
*15:87	1 (0,3)	0 (0,0)			
*16	19 (6,2)	15 (5,2)	0,72		
*16:01	5 (1,6)	9 (3,1)			
*16:02	14 (4,6)	6 (2,1)	0,11		
Total	308 (100)	290 (100)			

FONTE: O autor (2020)

As análises de associação foram realizadas apenas entre os alelos cujas frequências são maiores ou iguais a 3%, em pelo menos um dos grupos.

^aOs números entre parênteses são as frequências alélicas, dadas em porcentagem (%)

^bValor de p calculado pelo teste exato de Fisher bicaudal. *Significância estatística

^cOR ajustado: cálculo do *odds ratio* com base em regressão logística ajustado por: cor autodeclarada, idade da primeira relação sexual, uso de contraceptivo oral, presença do alelo *HLA-DRB1*13:01* e presença dos aminoácidos histidina e tirosina na posição 13 do *pocket 4* de HLA-DRB1

Além da comparação entre casos e controles, também foi testada a associação entre alelos de *HLA-DRB1* e positividade de HPV nos controles. As frequências genotípicas de *HLA-DRB1* não foram diferentes das esperadas em EHW no grupo HPV⁺ (p = 0,33) e HPV⁻ (p = 0,31). Não foram encontradas associações significantes entre os alelos de *HLA-DRB1* e a infecção viral (tabela 8).

TABELA 8 - ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE ALELOS DE *HLA-DRB1* E NIC II/III

Alelo	HPV ⁺ N (% ^a) N = 55	HPV ⁻ N (% ^a) N = 74	p ^a
*01:01	6 (5,5)	6 (4,1)	0,77
*01:02	4 (3,6)	3 (2,0)	0,46
*01:03	0 (0,0)	1 (0,7)	
*03:01	10 (9,1)	8 (5,4)	0,32
*03:02	2 (1,8)	0 (0,0)	
*03:53	1 (0,9)	0 (0,0)	
*03:57	0 (0,0)	1 (0,7)	
*04:01	1 (0,9)	2 (1,4)	
*04:02	1 (0,9)	0 (0,0)	
*04:03	0 (0,0)	2 (1,4)	
*04:04	5 (4,5)	3 (2,0)	0,29
*04:05	2 (1,8)	4 (2,7)	
*04:07	1 (0,9)	1 (0,7)	
*04:11	3 (2,7)	2 (1,4)	
*04:20	0 (0,0)	1 (0,7)	
*04:110	0 (0,0)	1 (0,7)	
*07:01	15 (13,6)	13 (8,8)	0,23
*07:05	0 (0,0)	1 (0,7)	
*08:01	2 (1,8)	3 (2,0)	
*08:02	0 (0,0)	5 (3,4)	
*08:04	2 (1,8)	1 (0,7)	
*08:07	1 (0,9)	4 (2,7)	
*09:01	1 (0,9)	2 (1,4)	
*09:15	0 (0,0)	1 (0,7)	
*10:01	2 (1,8)	4 (2,7)	
*11:01	13 (11,8)	12 (8,1)	0,40
*11:02	1 (0,9)	3 (2,0)	
*11:03	0 (0,0)	1 (0,7)	

Alelo	HPV ⁺ N (% ^a) N = 55	HPV ⁻ N (% ^a) N = 74	p ^a
*11:04	3 (2,7)	7 (4,7)	0,52
*11:91	0 (0,0)	1 (0,7)	
*11:128	0 (0,0)	1 (0,7)	
*12:01	0 (0,0)	3 (2,0)	
*13:01	9 (8,2)	14 (9,5)	0,83
*13:02	4 (3,6)	8 (5,4)	0,57
*13:03	1 (0,9)	0 (0,0)	
*14:01	3 (2,7)	3 (2,0)	
*14:02	0 (0,0)	3 (2,0)	
*14:07	1 (0,9)	0 (0,0)	0,36
*14:39	1 (0,9)	0 (0,0)	
*15:01	3 (2,7)	8 (5,4)	
*15:02	2 (1,8)	2 (1,4)	
*15:03	5 (4,5)	3 (2,0)	0,29
*15:22	0 (0,0)	1 (0,7)	
*16:01	3 (2,7)	6 (4,1)	0,74
*16:02	2 (1,8)	3 (2,0)	
Total	110 (100)	148 (100)	

FONTE: O autor (2020)

As análises de associação foram realizadas apenas entre os alelos cujas frequências são maiores ou iguais a 3%, em pelo menos um dos grupos.

^aOs números entre parênteses são as frequências alélicas, dadas em porcentagem (%)

^bValor de p calculado pelo teste exato de Fisher bicaudal. *Significância estatística

6.3.1 Aminoácidos na 13^a posição da cadeia polipeptídica de HLA-DRB1

Foram determinados os aminoácidos presentes no 13^o códon do gene *HLA-DRB1* de 161 indivíduos dentre os 184 pacientes, e de 151 indivíduos do total de 174 controles. Não foi utilizado o número total de indivíduos da amostra devido a falhas na técnica de genotipagem. Foi testado o EHW e tanto pacientes quanto controles encontram-se em equilíbrio ($p = 0,07$ e $p = 0,29$; respectivamente). Foram observados os aminoácidos arginina (arg), fenilalanina (phe), glicina (gly), histidina (his), serina (ser) e tirosina, sendo o aminoácido serina o mais frequente, tanto em pacientes (54,7%), quando em controles (67,6%).

Foi encontrada uma associação positiva entre a combinação dos aminoácidos histidina e tirosina na 13^a posição de HLA-DRB1 com NIC II/III ($p = 0,03$; OR = 3,97 [IC 95% = 1,10-14,37]), sugerindo susceptibilidade aumentada dos portadores deste genótipo. Na análise por regressão logística foi verificada uma tendência para associação desta variável ($p = 0,05$; OR = 2,86 [IC 95% = 0,99-15,01]) (tabela 9). Em contrapartida, foi verificada uma associação inversa entre o aminoácido serina nesta posição e NIC II/III, tanto em homozigose ($p = 0,04$; OR = 0,49 [IC 95% = 0,25-0,97]) (tabela 8), quanto com uma única cópia ($p = 0,02$; OR = 0,58 [IC 95% = 0,37-0,92] (tabela 9). Em ambos os casos, a associação não se manteve após o tratamento por regressão logística ($p = 0,6$; OR = 0,79 [IC 95% = 0,32-1,95]; $p = 0,36$; OR = 0,74 [IC 95% = 0,39-1,41]; respectivamente).

TABELA 8 - ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE GENOTIPOS DA POSIÇÃO 13 DE HLA-DRB1 COM NIC II/III

Aminoácidos	Pacientes N (% ^a) N= 161	Controles N (% ^a) N= 151	p ^b	OR [IC95%]	OR ajustado ^c [IC95%]
Arg/Arg	1 (0,6)	1 (0,7)			
Arg/Phe	10 (6,2)	3 (2,0)	0,09		
Arg/Gly	2 (1,2)	4 (2,7)	0,44		
Arg/His	11 (6,8)	7 (4,6)	0,47		
Arg/Ser	26 (16,2)	21 (13,9)	0,64		
Arg/Tyr	8 (5,0)	5 (3,3)	0,58		
Phe/Phe	5 (3,1)	1 (0,7)	0,22		
Gly/Phe	4 (2,5)	8 (5,3)	0,25		
Gly/Tyr	4 (2,5)	2 (1,3)	0,69		
Gly/Gly	0 (0,0)	1 (0,7)			
His/Phe	7 (4,4)	2 (1,3)	0,18		
His/Gly	2 (1,2)	2 (1,3)			
His/His	3 (1,9)	3 (2,0)	1,00		
His/Tyr	12 (7,5)	3 (2,0)	0,03*	3,97 [1,10-14,37]	3,87 [0,99-15,01]
Ser/Phe	11 (6,8)	18 (11,9)	0,17		
Ser/Gly	12 (7,5)	7 (4,6)	0,35		
Ser/His	11 (6,8)	13 (8,6)	0,68		
Ser/Ser	15 (9,3)	26 (17,2)	0,04*	0,49 [0,25-0,97]	0,79 [0,32-1,95]
Ser/Tyr	13 (8,1)	17 (11,3)	0,44		
Tyr/Tyr	2 (1,2)	3 (2,0)	0,68		
Tyr/Phe	2 (1,2)	4 (2,7)	0,44		
Total	161 (100)	151 (100)			

FONTE: O autor (2020)

As análises de associação foram realizadas apenas entre os genótipos cujas frequências são maiores ou iguais a 2% em pelo menos um dos grupos.

^aOs números entre parênteses são as frequências genotípicas, dadas em porcentagem (%)

^bValor de p calculado pelo teste exato de Fisher bicaudal. *Significância estatística.

^cOR ajustado: cálculo do *odds ratio* com base em regressão logística ajustado por: cor autodeclarada, idade da primeira relação sexual, uso de contraceptivo oral, presença do alelo *HLA-DRB1*13:01* e presença dos aminoácidos histidina e tirosina na posição 13 do *pocket 4* de HLA-DRB1

TABELA 9: ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE OS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS PRESENTES NA POSIÇÃO 13 DE HLA-DRB1 E NIC II/III

Aminoácidos	Pacientes N (%) ^a	Controles N (%) ^a	p ^b	OR [IC95%]	Valor ajustado ^c [IC95%]
	N = 161	N = 151			
Arginina	58 (36,0)	41 (27,2)	0,11		
Fenilalanina	39 (24,2)	36 (23,8)	1,00		
Glicina	24 (14,9)	24 (15,9)	0,88		
Histidina	46 (28,6)	30 (19,9)	0,09		
Serina	88 (54,7)	102 (67,5)	0,02*	0,58 [0,37-0,92]	0,74 [0,39-1,41]
Tirosina	41 (25,5)	34 (22,5)	0,60		

FONTE: O autor (2020)

^aOs números entre parênteses são as frequências de indivíduos homo- ou heterozigotos para os aminoácidos, dadas em porcentagem (%). As frequências ultrapassam 100%, uma vez que cada indivíduo pode ser portador de um ou dois aminoácidos.

^bValor de p calculado pelo teste exato de Fisher bicaudal. *Significância estatística

^cOR ajustado: cálculo do *odds ratio* com base em regressão logística ajustado por: cor autodeclarada, idade da primeira relação sexual, uso de contraceptivo oral, presença do alelo *HLA-DRB1*13:01* e presença dos aminoácidos histidina e tirosina na posição 13 do *pocket 4* de HLA-DRB1

Com base no resultado encontrado para o aminoácido serina e NIC II/III, foi feita a análise de associação entre esse resíduo de aminoácido, presente na posição 13 de HLA-DRB1, e a presença da infecção viral por HPV. Foi observado que, dentre os 56 indivíduos HPV⁺, 39 apresentaram o resíduo serina (69,6%), enquanto no grupo HPV⁻, 53 indivíduos de um total de 79 apresentaram esse aminoácido (67,1%). A diferença encontrada entre os grupos não foi significativa ($p = 0,85$).

6.3.2 Aminoácidos na posição 71 da cadeia polipeptídica de HLA-DRB1

Foram identificados os aminoácidos presentes na posição 71 de *HLA-DRB1* em 159 indivíduos, do total de 184 pacientes. Já nos controles, foram identificados os aminoácidos em 148 indivíduos, do total de 174. Não foi utilizado o número total de indivíduos da amostra devido a falhas na técnica de genotipagem. As frequências genotípicas dos pacientes e controles (apêndice 5) foram testados para o equilíbrio de Hardy-Weinberg e não se encontram em do equilíbrio, sendo $p = 0,000$ para ambos os grupos. Foram observados os aminoácidos alanina (Ala), arginina (Arg), glutamato (Glu), lisina (Lys) e treonina

(Thr), sendo a arginina o mais frequente tanto em pacientes (77,99%), quanto em controles (76,35%) (tabela 10). Devido ao fato de os grupos não estarem em EHW, não foi possível realizar as análises de associação.

TABELA 10 - FREQUÊNCIA DE INDIVÍDUOS EM HOMO- OU HETEROZIGOSE PARA OS AMINOÁCIDOS PRESENTES NA POSIÇÃO 71 DE HLA-DRB1.

Aminoácidos	Pacientes N (% ^a)	Controles N (% ^a)
	N = 159	N = 148
Alanina	41 (25,8)	31 (20,9)
Arginina	124 (78,0)	113 (76,4)
Glutamato	38 (23,9)	45 (30,4)
Lisina	30 (18,9)	29 (19,6)
Treonina	1 (0,6)	3 (2,0)

FONTE: O autor (2020)

^aOs números entre parênteses são as frequências de indivíduos homo- ou heterozigotos para os aminoácidos, dadas em porcentagem (%). As frequências ultrapassam 100%, uma vez que cada indivíduo pode ser portador de um ou dois aminoácidos.

7. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como um de seus objetivos investigar variantes alélicas dos genes *HLA-B* e *HLA-DRB1* em pacientes com neoplasia intraepitelial cervical e controles sem lesão. Adicionalmente, também foram investigados a associação entre resíduos de aminoácidos presentes na posição 156 da cadeia polipeptídica de *HLA-B* e 13 e 71 de *HLA-DRB1* e NIC II/III. As amostras utilizadas foram previamente coletadas (DE FRANÇA, 2012) e disponibilizadas pelo LIGH/UFPR para reanálise. Todos os indivíduos responderam ao questionário epidemiológico (anexo 3), e foram testados quanto à presença de infecção por HR-HPV. O grupo controle realizou o exame citológico Papanicolaou e os casos, biopsia cervical a partir de cirurgia de alta frequência (CAF). Foram detectados HR-HPV em 62 indivíduos do grupo controle, ou seja, mulheres infectadas pelo HPV, mas com o exame citológico normal. Este dado mostra que este grupo é bem representativo da população sem doença, uma vez que a infecção por HR-HPV não é o único fator necessário para o desenvolvimento de NIC e CCU (LUHN et al., 2015). O hábito de fumar e o uso de anticoncepcional já foram previamente associados com NICII/III, como no trabalho de Xu et al. (2018), onde demonstraram que o amplo consumo de tabaco, bem como a duração do uso e o número de cigarros/dia se mostraram associados com NIC II/III ($p = 0,008$; $p = 0,033$ e $p < 0,001$; respectivamente). Fumantes têm um risco aumentado de apresentar NIC II/III quando comparados aos que nunca fumaram ($p = 0,02$; OR = 1,43 [IC 95% = 1,14-1,80]) (XU et al., 2018). Os mesmos autores também verificaram que o amplo uso de hormônio contraceptivo está associado com NIC II/III, principalmente em mulheres com mais de 15 anos de uso ($p = 0,04$; OR = 1,82; [IC 95% = 1,22-2,72]). Os mecanismos que levam a associação entre o uso de contraceptivo hormonal e o aumento no risco de NICs ainda não estão totalmente claros. Evidências epidemiológicas sugerem que o uso de contraceptivos hormonais leva a promoção da infecção persistente por HPV (BODILY; LAIMINS, 2012; MARKS et al., 2011), o que pode levar a progressão de lesões à carcinoma de colo de útero, contudo não aumenta o risco de novas infecções por HPV (MARKS et al., 2011). Adicionalmente, estudos prévios mostraram a relação entre a exposição à

hormônios e mudanças biológicas consistentes com progressão de lesões cervicais, em modelo animal. Foi demonstrado que o aparelho reprodutor de ratas transgênicas com expressão de HPV16 apresentam um possível mecanismo sinérgico entre os oncogenes de HPV16 e a exposição crônica à estrógeno (ARBEIT; HOWLEYT; HANAHAN, 1996; ELSON et al., 2000).

Fatores genéticos também influenciam no desenvolvimento de NIC e CCU. Para verificar possíveis associações com os genes *HLA-B* e *HLA-DRB1* e NIC II/III, foram utilizados dados de genotipagem por PCR-SSOP disponíveis no LIGH. Estes foram analisados tanto em baixa quanto em alta resolução. O grupo alélico *HLA-B*39* foi associado com a menor susceptibilidade a NICII/III ($p = 0,04$, $OR = 0,37$, $[IC\ 95\% = 0,14-0,97]$). Entretanto, a associação não se manteve após o tratamento por regressão logística ($p = 0,2$; $OR = 0,48$; $[IC\ 95\% = 0,15-1,53]$), possivelmente devido ao baixo número amostral. Esse alelo foi recentemente descrito em uma meta-análise como associado à infecção por HPV16 ($p = 0,01$; $OR = 0,617$ $[IC\ 95\% = 0,426-0,894]$), contudo não foi mantida após a correção de Bonferroni ($p = 0,3$) (BHASKARAN; ARUNKUMAR, 2019). No presente trabalho não foi encontrada associação deste alelo com a infecção por HR-HPV, possivelmente devido à sua baixa representatividade em nosso grupo controle (HPV+: $N = 4/47$ e HPV-: $N = 9/70$). Contudo, uma vez que a infecção pelo HPV é uma causa necessária para o desenvolvimento de CCU (WALBOOMERS et al., 1999) e o HPV-16 é o tipo mais encontrado nos casos de CCU – cerca de 70% dos casos - (BAANDRUP et al., 2012), é possível que o alelo *HLA-B*39* realmente influencie tanto na infecção pelo HPV-16 quanto com NICs, causados por este tipo viral.

Os alelos do gene *HLA-DRB1* foram analisados tanto em baixa quanto em alta resolução, uma vez que em ambos os casos as frequências genotípicas encontram-se em EHW. Foi encontrada uma associação de *DRB1*13:01* com menor susceptibilidade a NIC II/III tanto na análise univariada ($p = 0,02$; $OR = 0,43$ $[IC\ 95\% = 0,21-0,90]$ quanto na regressão logística ($p = 0,006$; $OR = 0,32$; $[IC\ 95\% = 0,14-0,72]$). Este resultado corrobora com os encontrados em diversos outros estudos. *HLA-DRB1*13:01* foi associado com a menor susceptibilidade a lesões intraepiteliais escamosas de baixo (LSIL) ($OR = 0,6$ $[IC\ 95\% = 0,3-0,9]$) e

alto grau (HSIL) (OR = 0,4 [IC 95% = 0,2-0,7]), na população da Costa Rica (WANG et al., 2001). Leo e colaboradores (2018) observaram o risco reduzido de apresentar CCU em indivíduos portadores de *HLA-DRB1*13* ($p = 2,87 \times 10^{-8}$; OR = 0,62). Este estudo foi realizado com 2866 casos de CCU e 6762 controles, todos de populações de origem europeia (LEO et al., 2018). Adicionalmente, uma meta-análise realizada recentemente verificou uma associação negativa com *HLA-DRB1*13* ($p < 0,0001$; OR = 0,7 [IC 95% = 0,604-0,786]) e infecção por HPV-16 (BHASKARAN; ARUNKUMAR, 2019), demonstrando que há associação tanto com a infecção por HPV quanto com NIC e CCU.

Além das associações com as frequências alélicas, foi possível identificar os resíduos de aminoácidos presentes nas posições 156 da cadeia polipeptídica de HLA-B e 13 e 71 de HLA-DRB1. Com relação a posição 156 de HLA-B, os dados referentes as frequências encontram-se em EHW tanto em pacientes ($p = 0,53$) quanto em controles ($p = 0,27$). Foram identificados os aminoácidos leucina, arginina, aspartato e triptofano nesta posição. Estes aminoácidos diferem entre si com relação às propriedades bioquímicas. Aspartato e arginina são polares e hidrofílicos, contudo, aspartato apresenta carga negativa e arginina positiva. Leucina e triptofano não apresentam carga, são apolares e hidrofóbicos; contudo triptofano apresenta dois anéis aromáticos com a presença de um nitrogênio em um deles, o que o torna menos apolar e hidrofóbico (NELSON, COX; 2010). A posição 156 de HLA-B encontra-se no domínio $\alpha 2$ da região de ligação ao peptídeo (BADRINATH et al., 2012). Este resíduo de aminoácido encontra-se longe dos primeiros *pockets* que ancoram ao peptídeo antigênico (*pockets* B e F) (BURROWS et al., 2007), fazendo parte dos *pockets* D e E presentes na fenda de ligação ao peptídeo. Estes ligam as posições 3 e 7 do peptídeo antigênico. Este aminoácido também possui um importante papel da estrutura da molécula e influencia a conformação da fenda de ligação ao peptídeo (BADRINATH et al., 2012). No presente trabalho não foram encontradas associações entre estes aminoácidos e NIC II/III. Leo et al. (2018) verificaram que o alelo *HLA-B*15*, que foi associado com diminuição no risco de CCU, possui um triptofano nessa posição, enquanto os outros alelos de *HLA-B* apresentam arginina, leucina ou ácido aspártico. (LEO et al., 2018).

As posições 13 e 71 encontram-se no *pocket 4* da fenda de ligação ao peptídeo antigênico da molécula HLA-DRB1 e parecem influenciar o reconhecimento do peptídeo antigênico pela molécula (BROWN; LEO, 2019). Foi encontrada uma associação entre portadores da combinação dos aminoácidos histidina e tirosina na 13ª posição de HLA-DRB1 com NIC II/III ($p = 0,03$; OR = 3,97 [IC 95% = 1,10-14,37]). Houve uma tendência para associação após a regressão logística ($p = 0,04$; OR = 3,87 [IC 95% = 0,99-15,01]). Leo et al. (2018) verificaram que o genótipo histidina/arginina está associado com uma maior susceptibilidade a CCU ($p = 1,11 \times 10^{-16}$; OR = 1,37); enquanto no presente estudo a associação foi vista com o genótipo histidina/tirosina. Não foi verificada associação significativa apenas com o aminoácido histidina, apenas uma tendência de associação ($p = 0,09$). Desta forma, é possível que haja uma real interação apenas com o aminoácido histidina na posição 13 do *pocket 4* de HLA-DRB1 com NIC II/III e CCU, uma vez que foi o aminoácido encontrado em comum nos dois estudos. Para verificar esta hipótese, seria necessário, como perspectiva futura, aumentar o número de indivíduos genotipados para *HLA-DRB1* e, conseqüentemente, analisados para as posições de interesse.

Ainda com relação a posição 13 de HLA-DRB1, foi observada uma associação inversa entre o aminoácido serina e NIC II/III, tanto em homozigose ($p = 0,04$; OR = 0,49; [IC 95% = 0,25-0,97]), quanto em heterozigose ($p = 0,02$; OR = 0,58; [IC 95% = 0,37-0,92]). Contudo, as associações não se mantiveram após a regressão logística ($p = 0,61$; OR = 0,79; [IC 95% = 0,32-1,95] e $p = 0,36$; OR = 0,74 [IC 95% = 0,39-1,41]; respectivamente), provavelmente devido ao baixo número amostral utilizado. Os resultados encontrados na análise univariada são similares aos vistos por Leo et al. (2018), uma vez que nesse trabalho o aminoácido serina (posição 13) também foi associado com menor susceptibilidade ao CCU ($p = 5,14 \times 10^{-10}$; OR = 0,77). O aminoácido serina é o único descrito nessa posição com as seguintes propriedades: polar, hidrofílico e sem carga. Os demais aminoácidos são polares, hidrofílicos e com carga; ou apolares, hidrofóbicos e sem carga. Essas propriedades da serina, distintas das dos demais aminoácidos, podem levar a uma maior afinidade de peptídeos antigênicos de HPV com a fenda de ligação de HLA-DRB1. Com uma melhor apresentação do peptídeo antigênico do HPV ao sistema imunológico, este é

capaz de desenvolver uma resposta eficaz contra o vírus, protegendo do desenvolvimento de infecções persistentes, que possam evoluir para lesões. Entretanto, estudos subsequentes são necessários para determinar a relação entre essas associações com os aminoácidos e a habilidade da molécula HLA-DRB1 na apresentação de peptídeos de HPV.

Não foi possível realizar análises de associação entre os resíduos de aminoácidos presentes na posição 71 do *pocket* 4 de HLA-DRB1, pois tanto o grupo controle quanto os pacientes não se encontram em EHW ($p = 0,000^{***}$ em ambos os grupos). No trabalho de Leo et al., o aminoácido glutamato foi associado com a redução do risco de CCU e a alanina com o aumento do risco. No presente trabalho, foi verificada uma menor frequência de glutamato nos pacientes (23,9%), com relação aos controles (30,4%). Já a alanina foi vista em maior frequência em pacientes (25,8%) do que controles (20,9%). Para verificar se estes dados condizem com os achados de Leo et al. (2018), faz-se necessário encontrar o motivo pelo qual a amostragem não se encontra em EHW, bem como aumentar o número amostral.

Concluindo, os resultados encontrados nesse trabalho corroboram diversos estudos anteriores que indicam a influência do polimorfismo dos genes HLA na susceptibilidade ao CCU (MACIAG et al., 2000b; ZEHBE; MYTILINEOS; WIKSTRO, 2003; CHAN et al., 2006; BHATTACHARYA; SENGUPTA, 2007; SOUZA et al., 2008; DE ARAUJO SOUZA; SICHERO; MACIAG, 2009; LEO et al., 2018;). Estes dados suportam a importância das células T CD4⁺ na patogênese da NIC e CCU, uma vez que as moléculas HLA são determinantes para a apresentação eficaz de peptídeos antigênicos a essas células.

8. CONCLUSÕES

1. O alelo *HLA-B*39* foi inversamente associado a NIC II/III ($p = 0,04$; OR = 0,37 [IC 95% = 0,14-0,97]), sugerindo uma menor susceptibilidade de mulheres portadoras deste alelo a doença;
2. O alelo *HLA-DRB1*13:01* foi inversamente associado a NIC II/III ($p = 0,02$; OR = 0,43 [IC 95% = 0,21-0,90]), sugerindo uma menor susceptibilidade de mulheres portadoras deste alelo a doença;
3. O resíduo de aminoácido serina presente na posição 13 da cadeia polipeptídica de HLA-DRB1 foi inversamente associado a NIC II/III ($p = 0,02$; OR = 0,58 [IC 95% = 0,37-0,92]);
4. Foi observada uma associação entre o genótipo histidina/tirosina, na posição 13 de HLA-DRB1 e NIC II/III ($p = 0,03$; OR = 3,97 [IC95% = 1,1-14,37]), sugerindo maior susceptibilidade de mulheres portadoras deste alelo a doença.

REFERÊNCIAS

Allele frequency net 2015 update: new features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse drug reaction associations *Nucleic Acid Research* 2015 28:D784-8

ARBEIT, Jeffrey M.; HOWLEYT, Peter M.; HANAHAN, Douglas. Chronic estrogen-induced cervical and vaginal squamous carcinogenesis in human papillomavirus type 16 transgenic mice. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, [s. l.], v. 93, n. April, p. 2930–2935, 1996.

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 5ª edição. Artmed: Porto Alegre, 2010

ASHRAFI, G. Hossein et al. E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. **International Journal of Cancer**, [s. l.], v. 113, n. 2, p. 276–283, 2005.

ASTHANA, Smita; BUSA, Vishal; LABANI, Satyanarayana. Oral Contraceptives Use and Risk of Cervical Cancer – A Systematic Review & Meta-Analysis.

European Journal of Obstetrics and Gynecology, [s. l.], 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2020.02.014>>

BAANDRUP, L. et al. Gynecologic Oncology HPV16 is associated with younger age in women with cervical intraepithelial neoplasia grade 2 and 3 ☆. **Gynecologic Oncology**, [s. l.], v. 124, n. 2, p. 281–285, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2011.10.020>>

BADRINATH, Soumya et al. O riginal A rticles Position 156 influences the peptide repertoire and tapasin dependency of human leukocyte antigen B * 44 allotypes. **Haematologica**, [s. l.], v. 97, n. 1, p. 98–106, 2012.

BAXTER, Alan G.; JOHNSTON, Carolyn. Quantitative tests for human papillomavirus For personal use only . Not to be reproduced without permission of The Lancet . **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 355, p. 2179–2180, 2000.

BHASKARAN, Muthumeenakshi; ARUNKUMAR, Ganeshprasad. Infection , Genetics and Evolution Ameta-analysis of association of Human Leukocyte Antigens A , B , C , DR and DQ with Human Papillomavirus 16 infection. **Infection, Genetics and Evolution**, [s. l.], v. 68, n. December 2018, p. 194–202, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.12.026>>

BHATTACHARYA, P.; SENGUPTA, S. Predisposition to HPV16 / 18-related cervical cancer because of proline homozygosity at codon 72 of p53 among Indian women is influenced by HLA-B * 07 and homozygosity of HLA-DQB1 * 03. **Tissue Antigens**, [s. l.], v. 70, n. 4, p. 283–293, 2007.

BODILY, J.; LAIMINS, L. Persistence of human papillomavirus infections: keys to malignant progression. **Trends Microbiol.**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 33–39, 2012.

BRAY, Freddie et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [s. l.], v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

Brasil. Ministério da Saúde. Informe técnico da ampliação da oferta das vacinas papilomavírus humano 6, 11, 16 e 18 (recombinante) – vacina HPV quadrivalente e meningocócica C (conjugada). In: Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças Transmissíveis. Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunização. Brasília: Ministério da Saúde, 2018

BROWN, Matthew A.; LEO, Paul J. Genetic susceptibility to cervical neoplasia. **Papillomavirus Research**, [s. l.], v. 7, n. February, p. 132–134, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pvr.2019.04.002>>

BURROWS, Jacqueline M. et al. Immunity to infection The impact of HLA-B micropolymorphism outside primary peptide anchor pockets on the CTL response to CMV. **Eur. J. Immunol**, [s. l.], v. 37, p. 946–953, 2007.

CHAN, Paul K. S. et al. HLA-B alleles , high-risk HPV infection and risk for cervical neoplasia in southern Chinese women. **Int. J. Cancer**, [s. l.], v. 118, n. 5, p. 1430–1435, 2006.

CHAN, Paul K. S. et al. Association Between HLA-DRB1 Polymorphism , High-Risk HPV Infection and Cervical Neoplasia in Southern Chinese. **J Med Virol**, [s. l.], v. 79, n. 7, p. 970–976, 2007.

CHEN, Cheng-chieh et al. Predictive value of p16/Ki-67 immunocytochemistry for triage of women with abnormal Papanicolaou test in cervical cancer screening: a systematic review and meta-analysis. **Ann Saudi Med.**, [s. l.], v. 36, n. 4, p. 245–51, 2016.

CHOKUNONGA, E. et al. Trends in the incidence of cancer in the black population of Harare, Zimbabwe 1991-2010. **International Journal of Cancer**, [s. l.], v. 133, n. 3, p. 721–729, 2013.

CONSTANTINESCU, Ileana et al. The frequency of HLA alleles in the Romanian population. [s. l.], p. 167–178, 2016.

COX, J. Thomas; SCHIFFMAN, Mark; SOLOMON, Diane. Prospective follow-up suggests similar risk of subsequent cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 among women with cervical intraepithelial neoplasia grade 1 or negative colposcopy and directed biopsy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, [s. l.], v. 188, n. 6, p. 1406–1412, 2003.

CROSBIE, Emma J. et al. Human papillomavirus and cervical cancer. **The Lancet**, [s. l.], v. 382, n. 9895, p. 889–899, 2013. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60022-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60022-7)>

DE ARAUJO SOUZA, Patrícia Savio; SICHERO, Laura; MACIAG, Paulo Cesar. HPV variants and HLA polymorphisms: the role of variability on the risk of cervical cancer. **Future Oncology**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 359–370, 2009.

DELVES, Peter J.; ROITT, Ivan M. The Immune System: First of two parts. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 343, n. 1, p. 37–49, 2000.

DENDROU, Calliope A. et al. HLA variation and disease. **Nat Rev Immunol.**, [s. l.], v. 18, n. 5, p. 325–339, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nri.2017.143>>

DOCHEZ, Carine et al. HPV vaccines to prevent cervical cancer and genital warts: An update. **Vaccine**, [s. l.], v. 32, n. 14, p. 1595–1601, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.10.081>>

DOORBAR, John et al. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. **Vaccine**, [s. l.], v. 30, n. 5, p. F55–F70, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.06.083>>

DOORBAR, John et al. Human papillomavirus molecular biology and disease association. **Rev Med Virol**, [s. l.], v. 25, n. Suppl. 1, p. 2–23, 2016.

DE FRANÇA, P. P. **Carcinoma cervical e suas lesões precursoras: fatores epidemiológicos e o papel dos genes *MICA*, *NKG2D*, *HLA-B* e *HLA-DRB1* na oncogênese do câncer.** 2012. 206f. Tese de doutorado em genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

ELSON, David A. et al. Sensitivity of the cervical transformation zone to estrogen-induced squamous carcinogenesis. **Cancer Research**, [s. l.], v. 60, n. 5, p. 1267–1275, 2000.

GALLAGHER, K. E.; LAMONTAGNE, D. S.; WATSON-JONES, D. Status of HPV vaccine introduction and barriers to country uptake. **Vaccine**, [s. l.], v. 36, n. 32, p. 4761–4767, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.02.003>>

GEORGOPOULOS, Nikolaos T.; PRO, Joanne L.; BLAIR, G. Eric. Transcriptional regulation of the major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chain , TAP1 and LMP2 genes by the human papillomavirus (HPV) type 6b , 16 and 18 E7 oncoproteins. **Oncogene**, [s. l.], v. 19, p. 4930–4935, 2000.

GILLIO-TOS, Anna et al. Case – control study of HLA-G promoter methylation status , HPV infection and cervical neoplasia in Curitiba , Brazil: a pilot analysis. **BMC Cancer**, [s. l.], v. 12, n. 618, p. 1–10, 2012.

HASIM, Ayshamgul et al. Post-Transcriptional and Epigenetic Regulation of Antigen Processing Machinery (APM) Components and HLA-I in Cervical Cancers from Uighur Women. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 9, 2012.

Howlader, N., Noone, AM., Krapcho, M., et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975–2013. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2016

HU, Jian Ming et al. Human leukocyte antigen-DRB1 * 1501 and DQB1 * 0602 alleles are cervical cancer protective factors among Uighur and Han people in Xinjiang , China. **Int J Clin Exp Pathol.**, [s. l.], v. 7, n. 9, p. 6165–6171, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estimativa de câncer no Brasil, Rio de Janeiro, 2020

International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. IARC

monographs on the identification of carcinogenic hazards to humans. Acesso em 07/06/2020. Disponível em: <https://monographs.iarc.fr/list-of-classifications/>

JONES, E. Yvonne et al. MHC class II proteins and disease: A structural perspective. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 271–282, 2006.

KLEIN, Jan; SATO, Akie. The HLA System: First of Two Parts. **The New England journal of medicine**, [s. l.], v. 343, n. 10, p. 102–709, 2000.

LEO, Paul J. et al. Defining the genetic susceptibility to cervical neoplasia — A genome-wide association study. **PLOS Genetics**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 1–20, 2018.

LEONE, Patrizia et al. MHC class I antigen processing and presenting machinery: Organization, function, and defects in tumor cells. **Journal of the National Cancer Institute**, [s. l.], v. 105, n. 16, p. 1172–1187, 2013.

LOPEZ, Melissa S. et al. Cervical cancer prevention and treatment in Latin America. [s. l.], v. 115, n. 5, p. 615–618, 2018.

LUHN, Patricia et al. The role of co-factors in the progression from human papillomavirus infection to cervical cancer. **Gynecol Oncol**, [s. l.], v. 128, n. 2, p. 265–270, 2015.

MACIAG, Paulo C. et al. Major Histocompatibility Complex Class II Polymorphisms and Risk of Cervical Cancer and Human Papillomavirus Infection in Brazilian Women 1. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, [s. l.], v. 9, n. November, p. 1183–1191, 2000. a.

MACIAG, Paulo C. .. et al. Major Histocompatibility Complex Class II Polymorphisms and Risk of Cervical Cancer and Human Papillomavirus Infection in Brazilian Women1. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, [s. l.], v. 9, p. 1183–1191, 2000. b.

MARKS, Morgan et al. Combined oral contraceptive use increases HPV persistence but not new HPV detection in a cohort of women from Thailand. **Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 204, n. 10, p. 1505–1513, 2011.

MCBRIDE, Alison A. Mechanisms and strategies of papillomavirus replication. **Biological Chemistry**, [s. l.], v. 398, n. 8, p. 919–927, 2017.

MEDZHITOV, Ruslan. TOLL-LIKE RECEPTORS AND INNATE IMMUNITY. [s. l.], v. 1, n. November, 2001.

MIRANDA, P. M. et al. Human papillomavirus infection in Brazilian women with normal cervical cytology. **Genetics and Molecular Research**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 1752–1761, 2012.

MIRKOVIC, Jelena et al. Carcinogenic HPV infection in the cervical squamo-columnar junction. **J Pathol.**, [s. l.], v. 236, n. 3, p. 265–271, 2016.

MUÑOZ, Nubia et al. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. **The New England journal of medicine**, [s. l.], v. 348, p. 518–527, 2003. a.

MUÑOZ, Nubia et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus

types associated with cervical cancer. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 348, n. 6, p. 518–527, 2003. b.

MURPHY, K. **Imunobiologia de Janeway**. 8ª edição. Artemed: Porto Alegre, 2014

NELSON, D.L.; COX, M.C. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 5th edition. W.H. Freeman and Company: New York, 2008.

OJESINA, Akinyemi I. et al. Landscape of genomic alterations in cervical carcinomas. **Nature**, [s. l.], v. 506, p. 371–375, 2014.

PAASO, Anna et al. From HPV Infection to Lesion Progression : The Role of HLA Alleles and Host Immunity. **Acta Cytologica**, [s. l.], 2019.

RAMA, Cristina Helena et al. Prevalence of genital HPV infection among women screened for cervical cancer. **Revista de Saude Publica**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 123–130, 2008.

REINSON, Tormi et al. The Cell Cycle Timing of Human Papillomavirus DNA Replication. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 7, p. 1–16, 2015.

RELLE, Manfred; SCHWARTING, Andreas. Role of MHC-Linked Susceptibility Genes in the Pathogenesis of Human and Role of MHC-Linked Susceptibility Genes in the Pathogenesis of Human and Murine Lupus. [s. l.], n. June 2012, 2014.

RODEN, Richard B. S.; STERN, Peter L. Opportunities and challenges for human papillomavirus vaccination in cancer. **Nat Rev Cancer**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 240–254, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2018.13>>

RODGERS, John R.; COOK, Richard G. MHC CLASS IB MOLECULES BRIDGE INNATE AND ACQUIRED IMMUNITY. [s. l.], v. 5, n. June, p. 459–471, 2005.

SAFAEIAN, Mahboobeh et al. Human leukocyte antigen class I and II alleles and cervical adenocarcinoma. **Frontiers in Oncologr**, [s. l.], v. 4, n. June, p. 1–8, 2014.

SÁNCHEZ-SILES, Mariano et al. Prevalence of human papillomavirus in the saliva of sexually active women with cervical intraepithelial neoplasias. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 195–204, 2020.

SANJOSE, S. De et al. Worldwide burden of cervical cancer in 2008. **Annals of Oncology**, [s. l.], v. 22, p. 2675–2686, 2011.

SARRI, Constantina A. et al. Amino acid signatures in the HLA class II peptide-binding region associated with protection / susceptibility to the severe West Nile Virus disease. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 13, n. 10, p. 1–20, 2018.

SCHIFFMAN, Mark et al. Carcinogenic human papillomavirus infection. **Nat Rev Dis Primers**, [s. l.], v. 2, p. 1–20, 2016.

SOUZA, Patricia S. De Araujo et al. Interaction between polymorphisms of the Human Leukocyte Antigen and HPV-16 Variants on the risk of invasive cervical cancer. [s. l.], v. 9, p. 1–9, 2008.

STEINBACH, Alina; RIEMER, Angelika B. Immune evasion mechanisms of human papillomavirus : An update. **International Journal of Cancer**, [s. l.], v. 229, p. 224–229, 2018.

TCGA. Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer The Cancer Genome Atlas Research Network *. **Nature**, [s. l.], v. 543, n. 7645, p. 378–384, 2017. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5354998/pdf/nihms843846.pdf>>

The MyMOL Molecular Graphics System, Version 1.74, Schödinger, LLC.

TROWSDALE, John; KNIGHT, Julian C. Major Histocompatibility Complex Genomics and Human Disease. **Annu Rev Genomics Hum Genet.**, [s. l.], v. 14, n. 67, p. 301–323, 2013.

VILLIERS, Ethel-michele De. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. **Virology**, [s. l.], v. 445, p. 2–10, 2013.

WALBOOMERS, Jan M. M. et al. Human Papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **J. Pathol**, [s. l.], v. 189, n. 1, p. 12–19, 1999.

WANG, Sophia S. et al. Human Leukocyte Antigen Class I and II Alleles and Risk of Cervical Neoplasia : Results from a Population-Based Study in Costa Rica. **The Journal of infectious diseases**, [s. l.], v. 184, p. 1310–1314, 2001.

WHO. **Comprehensive Cervical Cancer Control: a guide to essential practice** World Health Organization, , 2014.

XU, Huilan et al. Hormonal contraceptive use and smoking as risk factors for high-grade cervical intraepithelial neoplasia in unvaccinated women aged 30 – 44 years : A case-control study in New South Wales , Australia. **Cancer Epidemiology**, [s. l.], v. 55, n. July, p. 162–169, 2018. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1016/j.canep.2018.05.013>>

ZEHBE, Ingeborg; MYTILINEOS, Joannis; WIKSTRO, Ingrid. Association Between Human Papillomavirus 16 E6 Variants and Human Leukocyte Antigen Class I Polymorphism in Cervical Cancer of Swedish Women. **Hum Immunol.**, [s. l.], v. 64, n. 5, p. 538–42, 2003.

APÊNDICE 1 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE HLA-B EM BAIXA RESOLUÇÃO EM PACIENTES E CONTROLES

TABELA 11: FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS EM BAIXA RESOLUÇÃO DOS ALELOS DE HLA-B, EM PACIENTES E CONTROLES

GENÓTIPO	PACIENTES (N = 151)	CONTROLES (N = 134)
	N (%)	N (%)
B*07/ B*07	2 (1,3)	2 (1,5)
B*07/B*08	1 (0,7)	0 (0,0)
B*07/B*14	1 (0,7)	0 (0,0)
B*07/B*15	4 (2,6)	0 (0,0)
B*07/B*18	1 (0,7)	0 (0,0)
B*07/B*27	3 (2,0)	0 (0,0)
B*07/B*35	4 (2,6)	3 (2,2)
B*07/B*38	2 (1,3)	0 (0,0)
B*07/B*39	0 (0,0)	3 (2,2)
B*07/B*40	1 (0,7)	0 (0,0)
B*07/B*41	1 (0,7)	0 (0,0)
B*07/B*44	1 (0,7)	1 (0,8)
B*07/B*48	1 (0,7)	0 (0,0)
B*07/B*49	1 (0,7)	0 (0,0)
B*07/B*51	1 (0,7)	0 (0,0)
B*07/B*53	0 (0,0)	1 (0,8)
B*07/B*55	0 (0,0)	1 (0,8)
B*07/B*57	0 (0,0)	1 (0,8)
B*07/B*81	1 (0,7)	0 (0,0)
B*08/B*27	1 (0,7)	0 (0,0)
B*08/B*35	0 (0,0)	3 (2,2)
B*08/B*37	1 (0,7)	0 (0,0)
B*08/B*38	0 (0,0)	1 (0,8)
B*08/B*39	1 (0,7)	1 (0,8)
B*08/B*40	2 (1,3)	0 (0,0)
B*08/B*44	0 (0,0)	3 (2,2)
B*08/B*45	2 (1,3)	1 (0,8)

B*08/B*50	1 (0,7)	0 (0,0)
B*08/B*51	3 (2,0)	2 (1,5)
B*08/B*55	1 (0,7)	0 (0,0)
B*08/B*57	1 (0,7)	1 (0,8)
B*13/B*15	1 (0,7)	0 (0,0)
B*13/B*35	0 (0,0)	1 (0,8)
B*13/B*39	0 (0,0)	1 (0,8)
B*13/B*44	2 (1,3)	0 (0,0)
B*13/B*52	0 (0,0)	2 (1,5)
B*13/B*56	0 (0,0)	1 (0,8)
B*13/B*73	0 (0,0)	1 (0,8)
B*14/B*14	0 (0,0)	1 (0,8)
B*14/B*15	1 (0,7)	0 (0,0)
B*14/B*18	1 (0,7)	1 (0,8)
B*14/B*35	2 (1,3)	3 (2,2)
B*14/B*39	1 (0,7)	1 (0,8)
B*14/B*40	0 (0,0)	3 (2,2)
B*14/B*41	1 (0,7)	0 (0,0)
B*14/B*42	1 (0,7)	0 (0,0)
B*14/B*44	0 (0,0)	2 (1,5)
B*14/B*51	2 (1,3)	0 (0,0)
B*14/B*51	1 (0,7)	2 (1,5)
B*14/B*57	2 (1,3)	0 (0,0)
B*14/B*58	0 (0,0)	2 (1,5)
B*15/B*15	0 (0,0)	1 (0,8)
B*15/B*18	2 (1,3)	0 (0,0)
B*15/B*27	3 (2,0)	2 (1,5)
B*15/B*35	1 (0,7)	3 (2,2)
B*15/B*39	1 (0,7)	2 (1,5)
B*15/B*40	1 (0,7)	1 (0,8)
B*15/B*41	1 (0,7)	1 (0,8)
B*15/B*44	1 (0,7)	0 (0,0)
B*15/B*45	1 (0,7)	1 (0,8)
B*15/B*47	0 (0,0)	1 (0,8)

B*15/B*48	1 (0,7)	1 (0,8)
B*15/B*50	2 (1,3)	1 (0,8)
B*15/B*51	0 (0,0)	3 (2,2)
B*15/B*53	1 (0,7)	1 (0,8)
B*15/B*55	0 (0,0)	1 (0,8)
B*15/B*57	1 (0,7)	1 (0,8)
B*15/B*58	2 (1,3)	0 (0,0)
B*18/B*35	2 (1,3)	0 (0,0)
B*18/B*41	0 (0,0)	1 (0,8)
B*18/B*44	2 (1,3)	1 (0,8)
B*18/B*48	1 (0,7)	0 (0,0)
B*18/B*49	0 (0,0)	1 (0,8)
B*18/B*51	3 (2,0)	2 (1,5)
B*18/B*52	0 (0,0)	2 (1,5)
B*18/B*55	1 (0,7)	0 (0,0)
B*18/B*58	0 (0,0)	1 (0,8)
B*27/B*07	0 (0,0)	1 (0,8)
B*27/B*35	2 (1,3)	0 (0,0)
B*27/B*40	2 (1,3)	0 (0,0)
B*27/B*44	1 (0,7)	1 (0,8)
B*27/B*51	3 (2,0)	1 (0,8)
B*27/B*52	0 (0,0)	1 (0,8)
B*27/B*53	0 (0,0)	1 (0,8)
B*27/B*58	0 (0,0)	2 (1,5)
B*35/B*35	2 (1,3)	2 (1,5)
B*35/B*38	1 (0,7)	2 (1,5)
B*35/B*39	1 (0,7)	1 (0,8)
B*35/B*40	1 (0,7)	1 (0,8)
B*35/B*41	1 (0,7)	1 (0,8)
B*35/B*44	2 (1,3)	4 (3,0)
B*35/B*48	1 (0,7)	1 (0,8)
B*35/B*50	3 (2,0)	2 (1,5)
B*35/B*51	6 (4,0)	1 (0,8)
B*35/B*53	0 (0,0)	1 (0,8)

B*35/B*57	0 (0,0)	1 (0,8)
B*35/B*58	1 (0,7)	0 (0,0)
B*37/B*35	1 (0,7)	0 (0,0)
B*37/B*40	1 (0,7)	0 (0,0)
B*37/B*45	0 (0,0)	1 (0,8)
B*37/B*50	1 (0,7)	0 (0,0)
B*38/B*55	1 (0,7)	1 (0,8)
B*38/B*57	1 (0,7)	0 (0,0)
B*38/B*58	2 (1,3)	0 (0,0)
B*39/B*40	1 (0,7)	0 (0,0)
B*39/B*44	1 (0,7)	0 (0,0)
B*39/B*45	0 (0,0)	1 (0,8)
B*39/B*51	0 (0,0)	2 (1,5)
B*39/B*52	0 (0,0)	1 (0,8)
B*39/B*56	0 (0,0)	1 (0,8)
B*40/B*40	1 (0,7)	1 (0,8)
B*40/B*44	1 (0,7)	1 (0,8)
B*40/B*49	1 (0,7)	0 (0,0)
B*40/B*50	1 (0,7)	0 (0,0)
B*40/B*51	5 (3,3)	0 (0,0)
B*40/B*52	1 (0,7)	2 (1,5)
B*40/B*57	1 (0,7)	1 (0,8)
B*40/B*58	0 (0,0)	1 (0,8)
B*41/B*50	0 (0,0)	1 (0,8)
B*42/B*53	1 (0,7)	1 (0,8)
B*44/ B*44	4 (2,6)	2 (1,5)
B*44/ B*45	1 (0,7)	0 (0,0)
B*44/B*50	0 (0,0)	2 (1,5)
B*44/B*51	4 (2,6)	1 (0,8)
B*44/B*52	1 (0,7)	0 (0,0)
B*44/B*53	0 (0,0)	1 (0,8)
B*44/B*57	0 (0,0)	1 (0,8)
B*45/B*50	1 (0,7)	0 (0,0)
B*45/B*51	0 (0,0)	2 (1,5)

B*45/B*53	1 (0,7)	0 (0,0)
B*48/B*51	2 (1,3)	1 (0,8)
B*48/B*58	2 (1,3)	0 (0,0)
B*49/B*51	1 (0,7)	1 (0,8)
B*49/B*58	0 (0,0)	1 (0,8)
B*50/B*51	0 (0,0)	2 (1,5)
B*50/B*53	1 (0,7)	0 (0,0)
B*51/B*14	1 (0,7)	0 (0,0)
B*51/B*51	1 (0,7)	0 (0,0)
B*51/B*52	0 (0,0)	1 (0,8)
B*51/B*55	1 (0,7)	0 (0,0)
B*51/B*57	1 (0,7)	0 (0,0)
B*51/B*58	0 (0,0)	1 (0,8)
B*51/B*78	0 (0,0)	1 (0,8)
B*51/B*81	0 (0,0)	1 (0,8)
B*52/B*53	1 (0,7)	0 (0,0)
B*53/B*53	0 (0,0)	1 (0,8)
B*53/B*57	0 (0,0)	2 (1,5)
B*58/B*81	0 (0,0)	1 (0,8)
Total	151	134 (100)

APÊNDICE 2 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE *HLA-B* EM ALTA RESOLUÇÃO EM PACIENTES E CONTROLES

TABELA 12: FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS EM ALTA RESOLUÇÃO DOS ALELOS DE *HLA-B*, EM PACIENTES E CONTROLES

GENÓTIPO	PACIENTES (N = 151)	CONTROLES (N = 134)
	N (%)	N (%)
B*07:02/B*07:05	2 (1,3)	1 (0,8)
B*07:02/B*07:137	0 (0,0)	1 (0,8)
B*07:02/B*08:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*07:02/B*14:02	1 (0,7)	0 (0,0)
B*07:02/B*15:03	1 (0,7)	0 (0,0)
B*07:02/B*15:04	1 (0,7)	0 (0,0)
B*07:02/B*15:07	2 (1,3)	0 (0,0)
B*07:02/B*18:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*07:02/B*27:02	1 (0,7)	0 (0,0)
B*07:02/B*27:05	2 (1,3)	0 (0,0)
B*07:02/B*35:01	1 (0,7)	2 (1,5)
B*07:02/B*35:03	2 (1,3)	1 (0,8)
B*07:02/B*38:01	2 (1,3)	0 (0,0)
B*07:02/B*39:05	0 (0,0)	2 (1,5)
B*07:02/B*40:02	1 (0,7)	0 (0,0)
B*07:02/B*41:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*07:02/B*44:02	0 (0,0)	1 (0,8)
B*07:02/B*44:03	1 (0,7)	0 (0,0)
B*07:02/B*48:02	1 (0,7)	0 (0,0)
B*07:02/B*51:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*07:02/B*53:01	0 (0,0)	1 (0,8)
B*07:02/B*55:01	0 (0,0)	1 (0,8)
B*07:02/B*57:01	0 (0,0)	1 (0,8)
B*07:02/B*81:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*07:05/B*49:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*07:09/B*39:13	0 (0,0)	1 (0,8)
B*07:72/B*35:04	1 (0,7)	0 (0,0)

B*08:01/B*27:05	1 (0,7)	0 (0,0)
B*08:01/B*35:01	0 (0,0)	2 (1,5)
B*08:01/B*35:04	0 (0,0)	1 (0,8)
B*08:01/B*37:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*08:01/B*38:01	0 (0,0)	1 (0,8)
B*08:01/B*39:01	0 (0,0)	1 (0,8)
B*08:01/B*39:13	1 (0,7)	0 (0,0)
B*08:01/B*40:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*08:01/B*40:02	1 (0,7)	0 (0,0)
B*08:01/B*44:02	0 (0,0)	1 (0,8)
B*08:01/B*44:03	0 (0,0)	2 (1,5)
B*08:01/B*45:01	2 (1,3)	1 (0,8)
B*08:01/B*50:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*08:01/B*51:01	3 (2,0)	2 (1,5)
B*08:01/B*55:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*08:01/B*57:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*08:01/B*57:03	0 (0,0)	1 (0,8)
B*13:02/B*15:10	1 (0,7)	0 (0,0)
B*13:02/B*35:08	0 (0,0)	1 (0,8)
B*13:02/B*39:05	0 (0,0)	1 (0,8)
B*13:02/B*44:02	1 (0,7)	0 (0,0)
B*13:02/B*44:03	1 (0,7)	0 (0,0)
B*13:02/B*52:01	0 (0,0)	2 (1,5)
B*13:02/B*56:01	0 (0,0)	1 (0,8)
B*13:02/B*73:01	0 (0,0)	1 (0,8)
B*14:01/B*15:04	1 (0,7)	0 (0,0)
B*14:01/B*41:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*14:01/B*42:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*14:01/B*44:03	0 (0,0)	1 (0,8)
B*14:01/B*51:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*14:01/B*57:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*14:02/ B*14:02	0 (0,0)	1 (0,8)
B*14:02/B*18:01	1 (0,7)	1 (0,8)
B*14:02/B*35:01	2 (1,3)	0 (0,0)

B*14:02/B*35:03	0 (0,0)	1 (0,8)
B*14:02/B*35:178	0 (0,0)	1 (0,8)
B*14:02/B*35:20	0 (0,0)	1 (0,8)
B*14:02/B*39:01	1 (0,7)	1 (0,8)
B*14:02/B*40:02	0 (0,0)	3 (2,2)
B*14:02/B*44:03	0 (0,0)	1 (0,8)
B*14:02/B*51:01	1 (0,7)	2 (1,5)
B*14:02/B*52:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*14:02/B*57:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*14:02/B*58:01	0 (0,0)	2 (1,5)
B*15:01/B*15:03	0 (0,0)	1 (0,8)
B*15:01/B*18:01	2 (1,3)	0 (0,0)
B*15:01/B*39:01	0 (0,0)	1 (0,8)
B*15:01/B*39:03	0 (0,0)	1 (0,8)
B*15:01/B*40:01	0 (0,0)	1 (0,8)
B*15:01/B*50:02	1 (0,7)	0 (0,0)
B*15:01/B*51:01	0 (0,0)	1 (0,8)
B*15:01/B*53:01	1 (0,7)	1 (0,8)
B*15:01/B*57:02	1 (0,7)	0 (0,0)
B*15:03/B*27:02	1 (0,7)	0 (0,0)
B*15:03/B*39:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*15:03/B*40:02	1 (0,7)	0 (0,0)
B*15:03/B*41:02	0 (0,0)	1 (0,8)
B*15:03/B*45:01	0 (0,0)	1 (0,8)
B*15:03/B*58:02	1 (0,7)	0 (0,0)
B*15:04/B*27:05	1 (0,7)	0 (0,0)
B*15:04/B*35:05	0 (0,0)	3 (2,2)
B*15:04/B*38:02	0 (0,0)	1 (0,8)
B*15:04/B*50:01	0 (0,0)	1 (0,8)
B*15:04/B*50:02	1 (0,7)	0 (0,0)
B*15:04/B*55:01	0 (0,0)	1 (0,8)
B*15:08/B*41:02	1 (0,7)	0 (0,0)
B*15:08/B*47:01	0 (0,0)	1 (0,8)
B*15:08/B*27:05	0 (0,0)	1 (0,8)

B*15:16/B*44:03	1 (0,7)	0 (0,0)
B*15:16/B*45:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*15:16/B*57:03	0 (0,0)	1 (0,8)
B*15:16/B*51:01	0 (0,0)	1 (0,8)
B*15:17/B*27:05	1 (0,7)	0 (0,0)
B*15:20/B*51:01	0 (0,0)	1 (0,8)
B*15:20/B*27:03	0 (0,0)	1 (0,8)
B*15:20/B*35:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*15:20/B*48:03	1 (0,7)	0 (0,0)
B*15:20/B*58:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*18:01/B*35:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*18:01/B*35:03	1 (0,7)	0 (0,0)
B*18:01/B*41:01	0 (0,0)	1 (0,8)
B*18:01/B*44:02	2 (1,3)	1 (0,8)
B*18:01/B*48:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*18:01/B*49:01	0 (0,0)	1 (0,8)
B*18:01/B*51:01	3 (2,0)	2 (1,5)
B*18:01/B*52:01	0 (0,0)	2 (1,5)
B*18:01/B*55:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*18:01/B*58:01	0 (0,0)	1 (0,8)
B*27:02/B*07:02	0 (0,0)	1 (0,8)
B*27:02/B*51:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*27:05/B*35:03	2 (1,3)	0 (0,0)
B*27:05/B*40:02	2 (1,3)	0 (0,0)
B*27:05/B*44:02	1 (0,7)	0 (0,0)
B*27:05/B*51:01	2 (1,3)	1 (0,8)
B*27:05/B*52:01	0 (0,0)	1 (0,8)
B*27:05/B*58:01	0 (0,0)	2 (1,5)
B*27:07/B*44:03	0 (0,0)	1 (0,8)
B*27:07/B*53:01	0 (0,0)	1 (0,8)
B*35:01/B*35:04	0 (0,0)	1 (0,8)
B*35:01/B*35:20	1 (0,7)	1 (0,8)
B*35:01/B*38:01	0 (0,0)	2 (1,5)
B*35:01/B*39:01	1 (0,7)	0 (0,0)

B*35:01/B*39:06	0 (0,0)	1 (0,8)
B*35:01/B*40:01	0 (0,0)	1 (0,8)
B*35:01/B*44:02	0 (0,0)	1 (0,8)
B*35:01/B*44:03	1 (0,7)	0 (0,0)
B*35:01/B*50:01	3 (2,0)	1 (0,8)
B*35:01/B*51:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*35:01/B*57:01	0 (0,0)	1 (0,8)
B*35:01/B*58:02	1 (0,7)	0 (0,0)
B*35:02/B*44:02	0 (0,0)	1 (0,8)
B*35:02/B*44:03	0 (0,0)	1 (0,8)
B*35:02/B*44:04	0 (0,0)	1 (0,8)
B*35:02/B*50:02	0 (0,0)	1 (0,8)
B*35:02/B*51:01	0 (0,0)	1 (0,8)
B*35:03/B*38:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*35:03/B*40:04	1 (0,7)	0 (0,0)
B*35:03/B*48:02	1 (0,7)	0 (0,0)
B*35:03/B*51:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*35:04/B*41:01	1 (0,7)	1 (0,8)
B*35:04/B*51:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*35:05/B*44:05	1 (0,7)	0 (0,0)
B*35:05/B*51:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*35:06/B*48:02	0 (0,0)	1 (0,8)
B*35:08/B*51:01	2 (1,3)	0 (0,0)
B*35:08/B*53:01	0 (0,0)	1 (0,8)
B*35:11/B*35:43	1 (0,7)	0 (0,0)
B*37:01/B*35:20	1 (0,7)	0 (0,0)
B*37:01/B*40:64	1 (0,7)	0 (0,0)
B*37:01/B*45:01	0 (0,0)	1 (0,8)
B*37:01/B*50:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*38:01/B*55:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*38:01/B*55:38	0 (0,0)	1 (0,8)
B*38:01/B*57:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*38:01/B*58:01	2 (1,3)	0 (0,0)
B*39:01/B*40:01	1 (0,7)	0 (0,0)

B*39:01/B*51:01	0 (0,0)	1 (0,8)
B*39:01/B*56:27	0 (0,0)	1 (0,8)
B*39:05/B*52:01	0 (0,0)	1 (0,8)
B*39:06/B*44:02	1 (0,7)	0 (0,0)
B*39:06/B*51:01	0 (0,0)	1 (0,8)
B*39:09/B*45:01	0 (0,0)	1 (0,8)
B*40:01/B*40:01	0 (0,0)	1 (0,8)
B*40:01/B*40:11	1 (0,7)	0 (0,0)
B*40:01/B*51:01	2 (1,3)	0 (0,0)
B*40:01/B*57:01	1 (0,7)	1 (0,8)
B*40:01/B*52:01	0 (0,0)	1 (0,8)
B*40:02/B*44:02	1 (0,7)	0 (0,0)
B*40:02/B*44:03	0 (0,0)	1 (0,8)
B*40:02/B*49:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*40:02/B*50:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*40:02/B*51:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*40:02/B*52:01	1 (0,7)	1 (0,8)
B*40:02/B*58:02	0 (0,0)	1 (0,8)
B*40:16/B*51:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*40:129/B*51:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*41:01/B*50:01	0 (0,0)	1 (0,8)
B*42:01/B*53:01	1 (0,7)	1 (0,8)
B*44:02/B*44:02	1 (0,7)	0 (0,0)
B*44:02/B*44:03	3 (2,0)	2 (1,5)
B*44:02/B*51:01	2 (1,3)	0 (0,0)
B*44:02/B*52:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*44:03/B*45:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*44:03/B*50:01	0 (0,0)	2 (1,5)
B*44:03/B*51:01	2 (1,3)	0 (0,0)
B*44:03/B*53:01	0 (0,0)	1 (0,8)
B*44:03/B*47:01	0 (0,0)	1 (0,8)
B*44:05/B*51:01	0 (0,0)	1 (0,8)
B*45:01/B*50:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*45:01/B*51:01	0 (0,0)	2 (1,5)

B*45:01/B*53:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*48:01/B*51:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*48:02/B*51:01	1 (0,7)	1 (0,8)
B*48:02/B*58:01	2 (1,3)	0 (0,0)
B*49:01/B*51:01	1 (0,7)	1 (0,8)
B*49:01/B*58:01	0 (0,0)	1 (0,8)
B*50:01/B*51:01	0 (0,0)	2 (1,5)
B*50:01/B*53:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*51:01/B*14:03	1 (0,7)	0 (0,0)
B*51:01/B*51:08	1 (0,7)	0 (0,0)
B*51:01/B*52:01	0 (0,0)	1 (0,8)
B*51:01/B*55:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*51:01/B*57:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*51:01/B*58:01	0 (0,0)	1 (0,8)
B*51:01/B*78:01	0 (0,0)	1 (0,8)
B*51:01/B*81:01	0 (0,0)	1 (0,8)
B*52:01/B*53:01	1 (0,7)	0 (0,0)
B*53:01/B*53:01	0 (0,0)	1 (0,8)
B*53:01/B*57:01	0 (0,0)	1 (0,8)
B*53:01/B*57:03	0 (0,0)	1 (0,8)
B*58:02/B*81:01	0 (0,0)	1 (0,8)
Total	151 (100)	134 (100)

APÊNDICE 3 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE VARIANTES ALÉLICAS DE *HLA-DRB1* EM BAIXA RESOLUÇÃO

TABELA 13: FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS EM BAIXA RESOLUÇÃO DOS ALELOS DE *HLA-DRB1*, EM PACIENTES E CONTROLES

GENÓTIPO	PACIENTES (N = 154)	CONTROLES (N = 145)
	N (%)	N (%)
DRB1*01/DRB1*01	2 (1,3)	1 (0,7)
DRB1*01/DRB1*03	1 (0,7)	4 (2,8)
DRB1*01/DRB1*04	4 (2,6)	1 (0,7)
DRB1*01/DRB1*07	2 (1,3)	3 (2,1)
DRB1*01/DRB1*08	3 (1,9)	5 (3,4)
DRB1*01/DRB1*09	2 (1,3)	0 (0,0)
DRB1*01/DRB1*10	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*01/DRB1*11	4 (2,6)	2 (1,4)
DRB1*01/DRB1*13	0 (0,0)	6 (4,1)
DRB1*01/DRB1*14	1 (0,7)	1 (0,7)
DRB1*01/DRB1*15	2 (1,3)	0 (0,0)
DRB1*01/DRB1*16	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*03/ DRB1*03	2 (1,3)	2 (1,4)
DRB1*03/DRB1*04	3 (1,9)	2 (1,4)
DRB1*03/DRB1*07	4 (2,6)	3 (2,1)
DRB1*03/DRB1*08	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*03/DRB1*11	1 (0,7)	4 (2,8)
DRB1*03/DRB1*13	3 (1,9)	2 (1,4)
DRB1*03/DRB1*14	0 (0,0)	2 (1,4)
DRB1*03/DRB1*15	2 (1,3)	3 (2,1)
DRB1*03/DRB1*16	2 (1,3)	2 (1,4)
DRB1*04/ DRB1*04	3 (1,9)	3 (2,1)
DRB1*04/DRB1*07	11 (7,1)	3 (2,1)
DRB1*04/DRB1*08	2 (1,3)	2 (1,4)
DRB1*04/DRB1*09	2 (1,3)	0 (0,0)
DRB1*04/DRB1*10	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*04/DRB1*11	3 (1,9)	5 (3,4)

DRB1*04/DRB1*13	3 (1,9)	5 (3,4)
DRB1*04/DRB1*14	2 (1,3)	1 (0,7)
DRB1*04/DRB1*15	6 (3,9)	4 (2,8)
DRB1*04/DRB1*16	3 (1,9)	3 (2,1)
DRB1*07/ DRB1*07	2 (1,3)	3 (2,1)
DRB1*07/DRB1*08	3 (1,9)	2 (1,4)
DRB1*07/DRB1*10	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*07/DRB1*11	4 (2,6)	6 (4,1)
DRB1*07/DRB1*12	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*07/DRB1*13	1 (0,7)	6 (4,1)
DRB1*07/DRB1*14	3 (1,9)	0 (0,0)
DRB1*07/DRB1*15	6 (3,9)	2 (1,4)
DRB1*07/DRB1*16	2 (1,3)	3 (2,1)
DRB1*08/ DRB1*03	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*08/ DRB1*08	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*08/ DRB1*09	1 (0,7)	1 (0,7)
DRB1*08/DRB1*10	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*08/DRB1*11	2 (1,3)	2 (1,4)
DRB1*08/DRB1*13	5 (3,2)	1 (0,7)
DRB1*08/DRB1*14	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*08/DRB1*15	2 (1,3)	2 (1,4)
DRB1*08/DRB1*16	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*09/DRB1*11	2 (1,3)	2 (1,4)
DRB1*09/DRB1*13	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*09/DRB1*15	2 (1,3)	0 (0,0)
DRB1*09/DRB1*16	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*10/DRB1*13	1 (0,7)	1 (0,7)
DRB1*10/DRB1*14	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*10/DRB1*15	2 (1,3)	1 (0,7)
DRB1*10/DRB1*16	1 (0,7)	1 (0,7)
DRB1*11/DRB1*03	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*11/ DRB1*11	3 (1,9)	2 (1,4)
DRB1*11/DRB1*12	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*11/DRB1*13	3 (1,9)	5 (3,4)

DRB1*11/DRB1*14	1 (0,7)	2 (1,4)
DRB1*11/DRB1*15	6 (3,9)	8 (5,5)
DRB1*11/DRB1*16	3 (1,9)	2 (1,4)
DRB1*12/DRB1*13	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*12/DRB1*15	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*13/ DRB1*13	2 (1,3)	5 (3,4)
DRB1*13/DRB1*14	1 (0,7)	1 (0,7)
DRB1*13/DRB1*15	6 (3,9)	4 (2,8)
DRB1*13/DRB1*16	3 (1,9)	0 (0,0)
DRB1*14/ DRB1*14	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*14/ DRB1*15	1 (0,7)	1 (0,7)
DRB1*14/ DRB1*16	2 (1,3)	1 (0,7)
DRB1*15/DRB1*04	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*15/DRB1*15	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*15/DRB1*16	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*16/DRB1*16	1 (0,7)	0 (0,0)
Total	154 (100)	145 (100)

APÊNDICE 4 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE VARIANTES ALÉLICAS DE HLA-DRB1 EM ALTA RESOLUÇÃO

TABELA 14: FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS EM ALTA RESOLUÇÃO DOS ALELOS DE *HLA-DRB1*, EM PACIENTES E CONTROLES

GENÓTIPO	PACIENTES (N = 154)	CONTROLES (N = 145)
	N (%)	N (%)
DRB1*01:01/ DRB1*01:01	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*01:01/DRB1*01:03	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*01:01/DRB1*03:01	1 (0,7)	4 (2,8)
DRB1*01:01/DRB1*04:01	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*01:01/DRB1*04:02	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*01:01/DRB1*04:04	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*01:01/DRB1*04:05	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*01:01/DRB1*04:08	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*01:01/DRB1*07:01	1 (0,7)	1 (0,7)
DRB1*01:01/DRB1*08:01	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*01:01/DRB1*08:02	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*01:01/DRB1*08:07	0 (0,0)	2 (1,4)
DRB1*01:01/DRB1*11:01	4 (2,6)	0 (0,0)
DRB1*01:01/DRB1*11:02	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*01:01/DRB1*13:01	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*01:01/DRB1*14:01	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*01:01/DRB1*14:02	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*01:01/DRB1*15:01	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*01:01/DRB1*15:03	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*01:01/DRB1*16:02	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*01:02/DRB1*07:01	1 (0,7)	1 (0,7)
DRB1*01:02/DRB1*08:02	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*01:02/DRB1*08:07	1 (0,7)	1 (0,7)
DRB1*01:02/DRB1*09:01	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*01:02/DRB1*10:01	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*01:02/DRB1*11:01	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*01:02/DRB1*13:01	0 (0,0)	4 (2,8)
DRB1*01:02/DRB1*13:02	0 (0,0)	1 (0,7)

DRB1*01:03/DRB1*07:01	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*01:03/DRB1*09:01	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*01:03/DRB1*08:07	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*01:03/DRB1*01:22	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*03:01/ DRB1*03:01	1 (0,7)	2 (1,4)
DRB1*03:01/DRB1*03:15	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*03:01/DRB1*04:01	1 (0,7)	2 (1,4)
DRB1*03:01/DRB1*04:04	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*03:01/DRB1*07:01	4 (2,6)	2 (1,4)
DRB1*03:01/DRB1*08:02	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*03:01/DRB1*11:01	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*03:01/DRB1*11:04	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*03:01/DRB1*11:08	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*03:01/DRB1*13:01	2 (1,3)	0 (0,0)
DRB1*03:01/DRB1*13:02	1 (0,7)	1 (0,7)
DRB1*03:01/DRB1*13:05	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*03:01/DRB1*14:39	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*03:01/DRB1*15:01	1 (0,7)	1 (0,7)
DRB1*03:01/DRB1*15:03	0 (0,0)	2 (1,4)
DRB1*03:01/DRB1*16:01	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*03:01/DRB1*16:02	2 (1,3)	0 (0,0)
DRB1*03:02/DRB1*04:11	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*03:02/DRB1*11:01	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*03:02/DRB1*11:03	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*03:02/DRB1*15:01	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*03:02/DRB1*16:01	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*03:53/DRB1*07:01	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*03:57/DRB1*14:02	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*04:01/DRB1*04:11	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*04:01/DRB1*07:01	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*04:01/DRB1*07:15	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*04:01/DRB1*09:01	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*04:01/DRB1*11:01	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*04:01/DRB1*13:01	0 (0,0)	1 (0,7)

DRB1*04:01/DRB1*14:01	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*04:01/DRB1*15:02	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*04:02/DRB1*07:01	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*04:02/DRB1*09:01	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*04:02/DRB1*14:01	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*04:03/DRB1*07:01	2 (1,3)	0 (0,0)
DRB1*04:03/DRB1*08:04	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*04:03/DRB1*11:04	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*04:03/DRB1*15:01	2 (1,3)	1 (0,7)
DRB1*04:04/ DRB1*04:04	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*04:04/DRB1*04:11	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*04:04/DRB1*07:01	1 (0,7)	1 (0,7)
DRB1*04:04/DRB1*08:01	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*04:04/DRB1*08:04	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*04:04/DRB1*11:01	0 (0,0)	2 (1,4)
DRB1*04:04/DRB1*11:04	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*04:04/DRB1*13:01	1 (0,7)	1 (0,7)
DRB1*04:04/DRB1*15:01	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*04:04/DRB1*15:02	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*04:04/DRB1*16:01	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*04:05/DRB1*04:11	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*04:05/DRB1*07:01	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*04:05/DRB1*08:02	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*04:05/DRB1*11:01	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*04:05/DRB1*13:01	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*04:05/DRB1*13:02	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*04:05/DRB1*14:01	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*04:05/DRB1*15:01	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*04:05/DRB1*15:87	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*04:05/DRB1*16:01	1 (0,7)	2 (1,4)
DRB1*04:06/DRB1*15:02	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*04:06/DRB1*16:02	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*04:07/DRB1*04:20	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*04:07/DRB1*07:01	0 (0,0)	1 (0,7)

DRB1*04:07/DRB1*16:02	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*04:08/DRB1*04:11	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*04:08/DRB1*07:01	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*04:08/DRB1*13:02	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*04:08/DRB1*15:03	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*04:10/DRB1*07:01	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*04:11/DRB1*07:01	3 (1,9)	0 (0,0)
DRB1*04:11/DRB1*10:01	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*04:11/DRB1*11:01	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*04:11/DRB1*13:01	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*04:11/DRB1*13:02	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*04:110/DRB1*11:04	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*07:01/ DRB1*07:01	2 (1,3)	3 (2,1)
DRB1*07:01/DRB1*08:01	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*07:01/DRB1*08:02	2 (1,3)	0 (0,0)
DRB1*07:01/DRB1*08:07	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*07:01/DRB1*10:01	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*07:01/DRB1*11:01	1 (0,7)	4 (2,8)
DRB1*07:01/DRB1*11:03	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*07:01/DRB1*11:04	2 (1,3)	1 (0,7)
DRB1*07:01/DRB1*11:128	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*07:01/DRB1*12:01	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*07:01/DRB1*13:01	0 (0,0)	2 (1,4)
DRB1*07:01/DRB1*13:02	1 (0,7)	3 (2,1)
DRB1*07:01/DRB1*13:05	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*07:01/DRB1*14:01	3 (1,9)	0 (0,0)
DRB1*07:01/DRB1*15:01	5 (3,2)	1 (0,7)
DRB1*07:01/DRB1*15:03	1 (0,7)	1 (0,7)
DRB1*07:01/DRB1*16:01	1 (0,7)	2 (1,4)
DRB1*07:01/DRB1*16:02	1 (0,7)	1 (0,7)
DRB1*07:05/DRB1*08:07	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*08:01/DRB1*08:01	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*08:01/DRB1*09:01	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*08:01/DRB1*11:01	0 (0,0)	1 (0,7)

DRB1*08:01/DRB1*13:01	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*08:01/DRB1*13:02	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*08:01/DRB1*15:02	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*08:02/DRB1*10:01	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*08:02/DRB1*13:02	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*08:02/DRB1*14:01	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*08:02/DRB1*16:02	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*08:03/DRB1*11:01	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*08:03/DRB1*13:02	2 (1,3)	0 (0,0)
DRB1*08:04/DRB1*11:01	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*08:04/DRB1*13:02	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*08:04/DRB1*15:01	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*08:04/DRB1*15:03	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*08:07/DRB1*03:18	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*08:07/DRB1*09:15	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*08:07/DRB1*11:01	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*08:07/DRB1*15:03	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*09:01/DRB1*11:01	2 (1,3)	0 (0,0)
DRB1*09:01/DRB1*11:02	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*09:01/DRB1*11:04	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*09:01/DRB1*13:02	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*09:01/DRB1*15:01	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*09:01/DRB1*15:03	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*09:01/DRB1*16:02	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*10:01/DRB1*13:01	1 (0,7)	1 (0,7)
DRB1*10:01/DRB1*14:01	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*10:01/DRB1*15:01	1 (0,7)	1 (0,7)
DRB1*10:01/DRB1*15:03	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*10:01/DRB1*16:01	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*10:01/DRB1*16:02	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*11:01/DRB1*11:03	2 (1,3)	0 (0,0)
DRB1*11:01/DRB1*11:04	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*11:01/DRB1*13:01	0 (0,0)	3 (2,1)
DRB1*11:01/DRB1*13:02	1 (0,7)	0 (0,0)

DRB1*11:01/DRB1*13:109	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*11:01/DRB1*14:01	1 (0,7)	1 (0,7)
DRB1*11:01/DRB1*14:07	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*11:01/DRB1*15:01	4 (2,6)	3 (2,1)
DRB1*11:01/DRB1*15:02	0 (0,0)	2 (1,4)
DRB1*11:01/DRB1*15:03	1 (0,7)	1 (0,7)
DRB1*11:01/DRB1*16:01	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*11:01/DRB1*16:02	3 (1,9)	1 (0,7)
DRB1*11:02/DRB1*11:04	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*11:02/DRB1*15:01	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*11:03/DRB1*12:01	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*11:04/DRB1*03:01	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*11:04/DRB1*11:04	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*11:04/DRB1*13:01	1 (0,7)	1 (0,7)
DRB1*11:04/DRB1*15:01	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*11:04/DRB1*15:03	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*11:91/DRB1*13:02	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*12:01/DRB1*13:02	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*12:01/DRB1*15:03	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*13:01/DRB1*13:01	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*13:01/DRB1*13:02	0 (0,0)	2 (1,4)
DRB1*13:01/DRB1*13:03	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*13:01/DRB1*14:02	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*13:01/DRB1*15:03	2 (1,3)	2 (1,4)
DRB1*13:01/DRB1*15:22	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*13:01/DRB1*16:02	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*13:02/ DRB1*13:02	1 (0,7)	2 (1,4)
DRB1*13:02/DRB1*14:02	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*13:02/DRB1*15:01	1 (0,7)	1 (0,7)
DRB1*13:02/DRB1*15:02	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*13:02/DRB1*16:01	2 (1,3)	0 (0,0)
DRB1*13:03/DRB1*15:02	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*13:05/DRB1*15:01	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*14:01/DRB1*14:02	(0,0)	1 (0,7)

DRB1*14:01/DRB1*15:03	1 (0,7)	1 (0,7)
DRB1*14:01/DRB1*16:02	2 (1,3)	1 (0,7)
DRB1*15:01/DRB1*04:01	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*15:01/DRB1*15:42	1 (0,7)	0 (0,0)
DRB1*15:03/DRB1*16:02	0 (0,0)	1 (0,7)
DRB1*16:01/DRB1*16:02	1 (0,7)	0 (0,0)
Total	154 (100)	145 (100)

APÊNDICE 5 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DOS AMINOÁCIDOS ENCONTRADOS NA POSIÇÃO 71 DE HLA-DRB1

TABELA 15: FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS EM ALTA RESOLUÇÃO DOS ALELOS DE *HLA-DRB1*, EM PACIENTES E CONTROLES

GENÓTIPO	PACIENTES (N = 159)	CONTROLES (N = 148)
	N (%)	N (%)
Ala/Ala	6 (3,8)	2 (1,4)
Ala/Arg	23 (14,5)	17 (11,5)
Ala/Glu	5 (3,1)	5 (3,4)
Ala/Lys	6 (3,8)	4 (2,7)
Ala/Treo	1 (0,6)	3 (2,0)
Arg/Arg	64 (40,3)	55 (37,2)
Arg/Glu	24 (15,1)	27 (18,2)
Glu/Glu	6 (3,8)	10 (6,8)
Glu/Lys	3 (1,9)	3 (2,0)
Lys/Arg	13 (8,2)	14 (9,5)
Lys/Lys	8 (5,0)	8 (5,4)
Total	159	148 (100)

ANEXO 1 - APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Curitiba, 27 de outubro de 2009.

Patrícia Pinho de França
Pesquisadora Responsável

Prezada Pesquisadora,

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

a) Projeto reapresentado e sem restrições.

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

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

Atenciosamente,

Membros do CEP:

Ana Paula Hey - Enfermeira
Ana Cristina Miquez Ribeiro - Nutricionista
André Leite de Moraes - Médico
Arovaldo Donizetti de Abreu - Fisioterapeuta
Claice Nana Yamanouchi - Médica
Edenice de Oliveira Santana - Enfermeira
Fabrício Martinielli de Oliveira - Médico
Flávia Martignago - Nutricionista
Giovana Cristina S. Sylvestre - Enfermeira
Iolanda de Assis Galvão

Joy Gamen Longhi - Farmacêutica
Jordan Zanetti Silva - Médico
Jose Carlos Wiederkehr - Administrador de Empresas
Luiz Antonio Negrão Dias - Médico
Márcia Bobak - Enfermeira
Marina Lopes Carlos - Nutricionista
Ricardo Isaias Testoni - Enfermeiro
Rodrigo Leite de Moraes - Médico
Timóteo Borges de Campos - Membro de comunidade

ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

- a) Você está sendo convidado para participar da pesquisa intitulada “A investigação de polimorfismos genéticos 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 do trabalho presente é a investigação de certas características do sistema imune que são capazes de eliminar o vírus do papiloma humano (o HPV) na grande maioria das mulheres. O HPV é transmitido durante a relação sexual sem proteção e, na maioria das mulheres, o mesmo é eliminado pelo sistema imune. Entretanto, em algumas mulheres a infecção pelo HPV pode perdurar levando a alterações detectáveis pelo Exame de Papanicolaou, ou até mesmo ao câncer do colo do útero. A participação de mulheres livres de doença e infectadas pelo HPV é de grande importância para atingir um entendimento fundamental e possivelmente o desenvolvimento de métodos de diagnósticos novos, vacinas e novas drogas.
- c) Se você decidir participar desta pesquisa, além do Exame de Papanicolaou para o qual você foi referida a este Hospital, as suas células cervicais serão testadas para a presença do HPV. Além, você será convidada a doar 10mL de sangue a ser coletado com material estéril e a preencher um questionário breve.
- d) Você pode ser positiva para a infecção pelo HPV e ter o resultado do Exame de Papanicolaou normal. Se o seu resultado for positivo para HPV, será oferecido a você o gerenciamento de rotina e exames repetidos.

- e) Não há riscos para você além daqueles pertinentes a coleta rotineira de sangue.
- f) É seu direito ter toda informação referente à sua participação e os resultados de todos os exames realizados com as suas amostras a qualquer hora.
- g) A sua participação neste estudo é voluntária.
- h) O material relacionado à 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 enviada ao Laboratório de Epidemiologia Molecular da “*Università degli Studi di Torino*” (Itália) para a análise da infecção pelo HPV e o status de metilação do HLA-G.
- i) Não caberá qualquer custo a você quanto aos procedimentos e exames realizados nesta pesquisa.
- j) Pela sua participação neste estudo você não receberá qualquer pagamento.

k) Os pesquisadores responsáveis por este projeto são prof.^a Dr.^a Maria da Graça Bicalho, tel.: (41) 3361-1729 (laboratório), (41) 9973-5855 (celular), prof. Dr. Newton Sérgio de Carvalho (41) 3335-7474 e Dr. Carlos Alfonso Maestri (41) 3361-5000 e na Itália o prof. Franco Merletti (tel.: +39 011 633430606), Chefe da Unidade de Epidemiologia do Câncer, “*Università degli Studi di Torino*”.

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

Eu voluntariamente concordo em participar desta pesquisa.

_____	____/____/____	_____
Paciente/Controle Assinatura	Data	Pesquisador

ANEXO 3 – QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO**HPV, Câncer Cervical, Estudo do HLA-G**

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

Questionário para avaliação dos fatores de risco.

ID: Nome: _____

Data de nascimento: _____

RG/CPF: _____

1. Idade em que ocorreu a primeira relação sexual (anos) |_|_|
2. Número de parceiros sexuais desde o início da atividade sexual |_|_|
3. Uso de hormônios contraceptivos:
 - a) Faz uso de hormônios contraceptivos (presente) Sim |_| Não |_| Fez uso? _____ Qual (is): _____
 - b) Idade em que iniciou o uso |_|_|
 - c) Tempo de uso do anticoncepcional durante a vida |_|_|
4. Número de gestações |_|_|
 - a) Idade ao primeiro parto |_|_|
5. Escolaridade: () Ens. Fundam. Incomp. () Ens. Médio. Incomp. () Ens. Superior Incomp. () Ens. Fund. Comp. () Ens. Médio Comp. () Ens. Superior Comp.
6. Etnia: () Branco () Preto () Pardo () Asiático
7. Fumante
 - a) Sim |_|
 - b) Ex-fumante |_|
 - c) Nunca |_|
 - c.1) Fuma há quanto tempo? (anos) |_|_|

c.2) Cigarros/dia

b.1) Parou há quanto tempo? (anos)

b.2) Fumou por quanto tempo? (anos)

b.3) Cigarros/dia

8. Quando foi o último preventivo?

Mês ano

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

Não

10. Número de parceiros sexuais nos últimos 12 meses

11. Uso de preservativo nos últimos 12 meses:

i. Regular

ii. Ocasional

iii. Nunca

12. Usuária de DIU sim não

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

13. Antecedentes de DST

a. Temou teve alguma DST*?

Sim

Não

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

14. Cauterização:

a) Já teve alguma cauterização?

Não

Sim Colo Vagina Vulva Ânus

15. Quantas citologias oncóticas (preventivo) foram feitas durante a vida?

Entrevistador:

Data:

ANEXO 4 - ALELOS CONTEMPLADOS PELAS SONDAS QUE HIBRIDIZAM NO CÓDON 156 DE *HLA-B*

Sonda #036 (B474G-29): [111----D-S-117 + 154----A158] (arginina): B*07:17, B*07:22, B*07:55, B*07:100, B*08:11, B*08:49, B*08:70, B*08:71, B*13:10, B*13:26, B*14:03, B*15:07, B*15:45, B*15:68, B*15:126, B*15:147, B*15:207, B*18:13, B*18:30, B*18:74N, B*18:78, B*27:83, B*35:01, B*35:04, B*39:47, B*39:50, B*40:28, B*41:24, B*42:10, B*42:17, B*44:36, B*44:62, B*44:179, B*46:12, B*46:42, B*48:19, B*51:04, B*51:29, B*51:56, B*51:82, B*51:86, B*51:138, B*51:139, B*52:24, B*53:15, B*53:28.

Sonda #569 (B148): 153 157 (arginina): B*07:02, B*07:03, B*07:05, B*07:06, B*07:07, B*07:08, B*07:09, B*07:10, B*07:11, B*07:12, B*07:13, B*07:14, B*07:15, B*07:16, B*07:17, B*07:18, B*07:20, B*07:21, B*07:22, B*07:23, B*07:24, B*07:27, B*07:28, B*07:29, B*07:30, B*07:31, B*07:32, B*07:33, B*07:35, B*07:36, B*07:37, B*07:38, B*07:39, B*07:40, B*07:41, B*07:42, B*07:44, B*07:45, B*07:46, B*07:47, B*07:49N, B*07:50, B*07:51, B*07:52, B*07:53, B*07:54, B*07:56, B*07:57, B*07:58, B*07:59, B*07:60, B*07:61, B*07:62, B*07:63, B*07:64, B*07:65, B*07:67N, B*07:68, B*07:69, B*07:70, B*07:71, B*07:72, B*07:73, B*07:74, B*07:75, B*07:76, B*07:77, B*07:78, B*07:79, B*07:81, B*07:82, B*07:83, B*07:84, B*07:85, B*07:86, B*07:87, B*07:88, B*07:89, B*07:90, B*07:91, B*07:92, B*07:93, B*07:94, B*07:95, B*07:96, B*07:97, B*07:98, B*07:99, B*07:101, B*07:102, B*07:103, B*07:104, B*07:105, B*07:106, B*07:107, B*07:108, B*07:109, B*07:110, B*07:111N, B*07:112, B*07:113, B*07:114, B*07:115, B*07:116, B*07:117, B*07:118, B*07:119, B*07:120, B*07:121, B*07:122, B*07:123, B*07:125, B*07:126, B*07:127, B*07:128, B*07:129, B*07:130, B*07:132, B*07:133, B*07:134, B*07:135N, B*07:136, B*07:137, B*07:138, B*07:139, B*07:140, B*07:141, B*07:142, B*07:143, B*07:144, B*07:145, B*07:148, B*07:149, B*07:150, B*07:151, B*07:152, B*07:153, B*07:154, B*07:155, B*07:156, B*07:157, B*07:158, B*07:159, B*07:160, B*07:161N, B*07:162, B*07:163, B*07:165, B*07:166, B*07:167N, B*07:168, B*07:169, B*07:170, B*07:171, B*07:172, B*07:173, B*07:174, B*07:175, B*07:176, B*07:177, B*07:179, B*07:180, B*07:181N, B*07:182N, B*07:183, B*07:184, B*07:185, B*07:186, B*07:187,

B*07:188, B*07:189, B*07:190, B*07:191, B*07:192, B*07:193, B*07:194, B*07:195, B*07:196, B*07:197, B*07:198, B*08:20, B*08:40, B*08:79, B*13:18, B*14:03, B*15:47, B*15:49, B*15:65, B*15:84, B*15:99, B*15:221, B*15:237, B*18:13, B*18:21, B*18:30, B*27:45, B*35:08, B*35:18, B*35:45, B*35:61, B*35:66, B*35:80, B*35:99, B*35:100, B*35:105, B*35:142, B*35:156, B*35:158, B*35:164, B*35:172, B*35:174, B*35:176, B*35:187, B*35:192, B*35:206, B*35:225, B*35:229, B*35:232, B*37:07, B*39:08, B*39:11, B*39:33, B*40:15, B*40:16, B*40:23, B*40:32, B*40:98, B*40:128, B*40:161, B*40:198, B*44:04, B*44:28, B*44:56N, B*44:76, B*44:150, B*46:03, B*48:05, B*48:08, B*51:05, B*51:29, B*51:54, B*51:82, B*52:24, B*53:11, B*53:16, B*53:24, B*54:10, B*54:20, B*55:09, B*55:37, B*55:52, B*57:02, B*57:04, B*57:05, B*57:12, B*57:13, B*57:19, B*57:28N, B*57:30, B*57:42, B*57:63, B*58:22.

Sonda #061(B863G-7): [113-N-F-117 + 155---A158] (leucina): B*07:12, B*07:18, B*07:90, B*07:115, B*07:140, B*07:153, B*08:14, B*08:48, B*14:03, B*15:203, B*18:56, B*27:15, B*27:28, B*27:50, B*27:62, B*27:71, B*35:34, B*35:45, B*35:65Q, B*35:71, B*39:23, B*39:44, B*40:38, B*40:120, B*40:132, B*40:178, B*40:222, B*41:21, B*44:17, B*44:21, B*44:31, B*44:43, B*44:124, B*44:144, B*45:09, B*47:08, B*53:22, B*58:07.

**ANEXO 5 - ALELOS CONTEMPLADOS PELAS SONDAS QUE HIBRIDIZAM
NO CÓDON 13 DE *HLA-DRB1***

Sonda #041: (OLR4333): 9 -----16 (fenilalanina): DRB1*01:01, DRB1*01:02, DRB1*01:03, DRB1*01:04, DRB1*01:05, DRB1*01:06, DRB1*01:07, DRB1*01:08, DRB1*01:09, DRB1*01:10, DRB1*01:11, DRB1*01:12, DRB1*01:13, DRB1*01:14, DRB1*01:15, DRB1*01:16, DRB1*01:17, DRB1*01:18, DRB1*01:19, DRB1*01:20, DRB1*01:21, DRB1*01:23, DRB1*01:24, DRB1*01:25, DRB1*01:26, DRB1*01:27, DRB1*01:28, DRB1*01:29, DRB1*01:30, DRB1*01:31, DRB1*01:32, DRB1*01:34, DRB1*01:35, DRB1*01:36, DRB1*01:37, DRB1*01:38, DRB1*01:41, DRB1*01:42, DRB1*01:43, DRB1*01:44, DRB1*01:45.

Sonda #072 (OLR4020LT): 9EEV----16 (fenilalanina): DRB1*10:01, DRB1*10:02, DRB1*10:03, DRB1*10:04.

Sonda #065 (OLR4335): 9K-D----16 (fenilalanina): DRB1*09:01, DRB1*09:02, DRB1*09:03, DRB1*09:04, DRB1*09:05, DRB1*09:06, DRB1*09:08, DRB1*09:09, DRB1*09:10, DRB1*09:11, DRB1*09:13, DRB1*09:14, DRB1*09:15, DRB1*09:16, DRB1*09:17.

**ANEXO 6 - ALELOS CONTEMPLADOS PELAS SONDAS QUE HIBRIDIZAM
NA POSIÇÃO 71 DE *HLA-DRB1***

Sonda #011 (OLR4041LT): 65 ----D-71 (arginina): DRB1*01:23, DRB1*04:58, DRB1*08:13, DRB1*08:48, DRB1*11:08, DRB1*11:42, DRB1*11:57, DRB1*11:64, DRB1*12:12, DRB1*13:25, DRB1*13:56, DRB1*13:60, DRB1*13:119, DRB1*13:134, DRB1*14:03, DRB1*14:12, DRB1*14:40, DRB1*14:69, DRB1*14:74, DRB1*14:77, DRB1*14:84, DRB1*14:85, DRB1*14:98, DRB1*14:102, DRB1*14:115, DRB1*14:116, DRB1*16:02, DRB1*16:10, DRB1*16:11, DRB1*16:12, DRB1*16:14, DRB1*16:16, DRB1*16:17, DRB1*16:18, DRB1*16:19.

Sonda #018 (DR109G): [69-----73 + 84-----88] (arginina): DRB1*01:01, DRB1*01:05, DRB1*01:07, DRB1*01:08, DRB1*01:11, DRB1*01:13, DRB1*01:14, DRB1*01:17, DRB1*01:18, DRB1*01:19, DRB1*01:21, DRB1*01:22, DRB1*01:24, DRB1*01:25, DRB1*01:27, DRB1*01:28, DRB1*01:30, DRB1*01:31, DRB1*01:32, DRB1*01:33N, DRB1*01:37, DRB1*01:38, DRB1*01:40N, DRB1*01:41, DRB1*01:45, DRB1*04:05, DRB1*04:07, DRB1*04:17, DRB1*04:19, DRB1*04:20, DRB1*04:28, DRB1*04:29, DRB1*04:30, DRB1*04:31, DRB1*04:43, DRB1*04:45, DRB1*04:57, DRB1*04:61, DRB1*04:74, DRB1*04:77, DRB1*04:80, DRB1*04:83, DRB1*04:84, DRB1*04:87, DRB1*04:89, DRB1*04:90, DRB1*04:92, DRB1*04:102, DRB1*04:103, DRB1*04:104, DRB1*04:107, DRB1*10:04, DRB1*11:26, DRB1*13:86, DRB1*14:02, DRB1*14:09, DRB1*14:13, DRB1*14:30, DRB1*14:41, DRB1*14:47, DRB1*14:48, DRB1*14:49, DRB1*14:51, DRB1*14:89, DRB1*14:94, DRB1*14:119, DRB1*15:27, DRB1*15:34.

Sonda #019 (OLR4723): 70-----75 (arginina): DRB1*01:01, DRB1*01:02, DRB1*01:04, DRB1*01:05, DRB1*01:07, DRB1*01:08, DRB1*01:11, DRB1*01:13, DRB1*01:14, DRB1*01:18, DRB1*01:19, DRB1*01:20, DRB1*01:21, DRB1*01:22, DRB1*01:24, DRB1*01:25, DRB1*01:26, DRB1*01:27, DRB1*01:28, DRB1*01:30, DRB1*01:31, DRB1*01:32,

DRB1*01:33N, DRB1*01:34, DRB1*01:35, DRB1*01:36, DRB1*01:37,
 DRB1*01:38, DRB1*01:40N, DRB1*01:41, DRB1*01:43, DRB1*01:44,
 DRB1*01:45, DRB1*04:04, DRB1*04:05, DRB1*04:08, DRB1*04:10,
 DRB1*04:19, DRB1*04:23, DRB1*04:28, DRB1*04:29, DRB1*04:30,
 DRB1*04:40, DRB1*04:42, DRB1*04:43, DRB1*04:44, DRB1*04:45,
 DRB1*04:56, DRB1*04:57, DRB1*04:61, DRB1*04:68, DRB1*04:70,
 DRB1*04:77, DRB1*04:79, DRB1*04:80, DRB1*04:83, DRB1*04:84,
 DRB1*04:87, DRB1*04:89, DRB1*04:90, DRB1*04:104, DRB1*04:107,
 DRB1*10:04, DRB1*11:26, DRB1*11:34, DRB1*13:44, DRB1*13:86,
 DRB1*14:02, DRB1*14:06, DRB1*14:09, DRB1*14:13, DRB1*14:17,
 DRB1*14:20, DRB1*14:29, DRB1*14:30, DRB1*14:41, DRB1*14:47,
 DRB1*14:48, DRB1*14:49, DRB1*14:52, DRB1*14:80, DRB1*14:83,
 DRB1*14:94, DRB1*14:108, DRB1*14:119, DRB1*14:121, DRB1*15:27,
 DRB1*15:34, DRB1*15:54, DRB1*15:66.

Sonda #022 (DR235): 66----R-71 (arginina): DRB1*01:29, DRB1*04:24,
 DRB1*04:69, DRB1*04:78, DRB1*04:101, DRB1*09:04, DRB1*10:01,
 DRB1*10:02, DRB1*10:03, DRB1*11:13, DRB1*11:17, DRB1*11:52,
 DRB1*14:01, DRB1*14:04, DRB1*14:05, DRB1*14:07, DRB1*14:08,
 DRB1*14:10, DRB1*14:11, DRB1*14:14, DRB1*14:18, DRB1*14:23,
 DRB1*14:26, DRB1*14:28, DRB1*14:31, DRB1*14:32, DRB1*14:34,
 DRB1*14:35, DRB1*14:36, DRB1*14:38, DRB1*14:39, DRB1*14:42,
 DRB1*14:43, DRB1*14:44, DRB1*14:44, DRB1*14:50, DRB1*14:54,
 DRB1*14:55, DRB1*14:56, DRB1*14:58, DRB1*14:59, DRB1*14:60,
 DRB1*14:61, DRB1*14:62, DRB1*14:64, DRB1*14:65, DRB1*14:68,
 DRB1*14:70, DRB1*14:71, DRB1*14:72, DRB1*14:75, DRB1*14:81,
 DRB1*14:82, DRB1*14:86, DRB1*14:87, DRB1*14:88, DRB1*14:90,
 DRB1*14:91, DRB1*14:92N, DRB1*14:93, DRB1*14:95, DRB1*14:96,
 DRB1*14:97, DRB1*14:99, DRB1*14:100, DRB1*14:101, DRB1*14:103,
 DRB1*14:104, DRB1*14:110, DRB1*14:112, DRB1*14:113, DRB1*14:114,
 DRB1*14:117, DRB1*14:118.

Sonda #023 (OLR4043LT): 69-D----74 (arginina): DRB1*01:23, DRB1*04:47,
 DRB1*04:53, DRB1*04:82, DRB1*04:99, DRB1*08:25, DRB1*11:01,

DRB1*11:04, DRB1*11:19, DRB1*12:01, DRB1*12:02, DRB1*12:03,
 DRB1*12:04, DRB1*12:05, DRB1*12:06, DRB1*12:08, DRB1*12:09,
 DRB1*12:10, DRB1*12:11, DRB1*12:12, DRB1*12:13, DRB1*12:14,
 DRB1*12:15, DRB1*12:17, DRB1*12:18, DRB1*12:19, DRB1*12:20,
 DRB1*12:21, DRB1*12:22, DRB1*12:23, DRB1*12:24N, DRB1*12:25,
 DRB1*12:26, DRB1*12:27, DRB1*12:28, DRB1*12:29, DRB1*12:30,
 DRB1*12:31N, DRB1*12:32, DRB1*12:33, DRB1*12:34, DRB1*12:35,
 DRB1*13:26, DRB1*13:60, DRB1*13:77, DRB1*16:01, DRB1*16:02,
 DRB1*16:05, DRB1*16:07, DRB1*16:08, DRB1*16:09, DRB1*16:10,
 DRB1*16:11, DRB1*16:12, DRB1*16:13N, DRB1*16:14, DRB1*16:15,
 DRB1*16:16, DRB1*16:17, DRB1*16:19.

Sonda #029 (DR108G): [56-S---60 + 68-----72] (arginina): DRB1*04:05,
 DRB1*04:10, DRB1*04:11, DRB1*04:17, DRB1*04:28, DRB1*04:29,
 DRB1*04:30, DRB1*04:45, DRB1*04:48, DRB1*04:77, DRB1*04:80,
 DRB1*04:83, DRB1*04:84, DRB1*04:87, DRB1*04:89, DRB1*04:90,
 DRB1*04:91, DRB1*04:103, DRB1*04:104, DRB1*04:107, DRB1*04:116,
 DRB1*04:126, DRB1*04:131, DRB1*04:137, DRB1*04:147, DRB1*04:152,
 DRB1*14:13.

Sonda #047 (OLR4134): 66-I--D—72 (arginina): DRB1*04:12, DRB1*04:18,
 DRB1*04:53, DRB1*04:82, DRB1*04:86, DRB1*04:99, DRB1*08:03,
 DRB1*08:10, DRB1*08:12, DRB1*08:14, DRB1*08:15, DRB1*08:18,
 DRB1*08:19, DRB1*08:23, DRB1*08:25, DRB1*08:27, DRB1*08:29,
 DRB1*08:30, DRB1*08:32, DRB1*08:33, DRB1*08:34, DRB1*08:35,
 DRB1*08:36, DRB1*08:37, DRB1*08:38, DRB1*08:45, DRB1*08:46,
 DRB1*08:47, DRB1*08:49, DRB1*11:18, DRB1*11:19, DRB1*11:31, DRB1*11:45,
 DRB1*11:119, DRB1*12:01, DRB1*12:03, DRB1*12:04, DRB1*12:05,
 DRB1*12:06, DRB1*12:08, DRB1*12:09, DRB1*12:10, DRB1*12:11,
 DRB1*12:14, DRB1*12:17, DRB1*12:22, DRB1*12:24N, DRB1*12:25,
 DRB1*12:28, DRB1*12:29, DRB1*12:30, DRB1*12:34, DRB1*12:35,
 DRB1*13:06, DRB1*13:12, DRB1*13:13, DRB1*13:30, DRB1*13:58,
 DRB1*13:77, DRB1*13:82, DRB1*13:118, DRB1*14:63,

DRB1*14:67, DRB1*14:78, DRB1*15:17N, DRB1*15:21, DRB1*16:05,
DRB1*16:07.

Sonda #048 (OLR4045) 68-----73 (arginina): DRB1*01:01, DRB1*01:02,
DRB1*01:04, DRB1*01:05, DRB1*01:07, DRB1*01:08, DRB1*01:11,
DRB1*01:13, DRB1*01:14, DRB1*01:17, DRB1*01:18, DRB1*01:19,
DRB1*01:20, DRB1*01:21, DRB1*01:22, DRB1*01:24, DRB1*01:25,
DRB1*01:26, DRB1*01:27, DRB1*01:28, DRB1*01:30, DRB1*01:31,
DRB1*01:32, DRB1*01:33N, DRB1*01:34, DRB1*01:35, DRB1*01:37,
DRB1*01:38, DRB1*01:40N, DRB1*01:41, DRB1*01:43, DRB1*01:44,
DRB1*01:45, DRB1*04:03, DRB1*04:04, DRB1*04:05, DRB1*04:06,
DRB1*04:07, DRB1*04:08, DRB1*04:10, DRB1*04:11, DRB1*04:17,
DRB1*04:19, DRB1*04:20, DRB1*04:23, DRB1*04:27, DRB1*04:28,
DRB1*04:29, DRB1*04:30, DRB1*04:31, DRB1*04:39, DRB1*04:40,
DRB1*04:41, DRB1*04:42, DRB1*04:43, DRB1*04:44, DRB1*04:45,
DRB1*04:46, DRB1*04:49, DRB1*04:50, DRB1*04:51, DRB1*04:52,
DRB1*04:55, DRB1*04:56, DRB1*04:57, DRB1*04:59, DRB1*04:60,
DRB1*04:61, DRB1*04:68, DRB1*04:70, DRB1*04:71, DRB1*04:74,
DRB1*04:77, DRB1*04:79, DRB1*04:80, DRB1*04:83, DRB1*04:84,
DRB1*04:85, DRB1*04:87, DRB1*04:88, DRB1*04:89, DRB1*04:90,
DRB1*04:91, DRB1*04:92, DRB1*04:93, DRB1*04:94N, DRB1*04:95,
DRB1*04:96, DRB1*04:102, DRB1*04:103, DRB1*04:104, DRB1*04:107,
DRB1*10:04, DRB1*11:26, DRB1*11:34, DRB1*13:44, DRB1*13:86,
DRB1*14:02, DRB1*14:06, DRB1*14:09, DRB1*14:13, DRB1*14:17,
DRB1*14:20, DRB1*14:29, DRB1*14:30, DRB1*14:33, DRB1*14:41,
DRB1*14:47, DRB1*14:48, DRB1*14:49, DRB1*14:51, DRB1*14:52,
DRB1*14:80, DRB1*14:83, DRB1*14:89, DRB1*14:94, DRB1*14:106, DRB1*14:108,
DRB1*14:119, DRB1*14:121, DRB1*15:27, DRB1*15:34, DRB1*15:54,
DRB1*15:66.

Sonda #049 (OLR4088LT): 66-F--D—72 (arginina): DRB1*04:18, DRB1*04:25,
DRB1*04:55, DRB1*04:58, DRB1*08:04, DRB1*08:20, DRB1*08:28,
DRB1*13:18, DRB1*14:12, DRB1*14:15, DRB1*14:84.

Sonda #049 (DR112G): [55-----59 + 71---L74 + 86V (arginina): DRB1*04:18, DRB1*04:25, DRB1*04:55, DRB1*04:58, DRB1*08:04, DRB1*08:20, DRB1*08:28, DRB1*13:18, DRB1*14:12, DRB1*14:15.

Sonda #057 (OLR4043): 70D----74 (arginina): DRB1*04:15, DRB1*04:36, DRB1*08:05, DRB1*08:18, DRB1*08:24, DRB1*08:31, DRB1*08:41, DRB1*08:47, DRB1*11:01, DRB1*11:04, DRB1*11:05, DRB1*11:06, DRB1*11:08, DRB1*11:09, DRB1*11:10, DRB1*11:12, DRB1*11:15, DRB1*11:18, DRB1*11:19, DRB1*11:22, DRB1*11:24, DRB1*11:27, DRB1*11:27, DRB1*11:28, DRB1*11:29, DRB1*11:31, DRB1*11:33, DRB1*11:35, DRB1*11:37, DRB1*11:38, DRB1*11:39, DRB1*11:42, DRB1*11:43, DRB1*11:44, DRB1*11:46, DRB1*11:47, DRB1*11:49, DRB1*11:50, DRB1*11:56, DRB1*11:57, DRB1*11:58, DRB1*11:60, DRB1*11:61, DRB1*11:62, DRB1*11:66, DRB1*11:72, DRB1*11:74, DRB1*11:75, DRB1*11:77, DRB1*11:78, DRB1*11:80, DRB1*11:81, DRB1*11:83, DRB1*11:84, DRB1*11:87, DRB1*11:88, DRB1*11:90, DRB1*11:91, DRB1*11:92, DRB1*11:94, DRB1*11:95, DRB1*11:96, DRB1*11:97, DRB1*11:99, DRB1*11:100, DRB1*11:101, DRB1*11:102, DRB1*11:104, DRB1*11:106, DRB1*11:108, DRB1*11:109, DRB1*11:110, DRB1*11:111, DRB1*11:112, DRB1*11:113, DRB1*11:114, DRB1*11:115, DRB1*11:116, DRB1*11:117, DRB1*11:120, DRB1*11:121, DRB1*12:01, DRB1*12:02, DRB1*12:16, DRB1*13:05, DRB1*13:06, DRB1*13:07, DRB1*13:11, DRB1*13:12, DRB1*13:14, DRB1*13:14, DRB1*13:21, DRB1*13:25, DRB1*13:30, DRB1*13:42, DRB1*13:46, DRB1*13:49, DRB1*13:50, DRB1*13:56, DRB1*13:58, DRB1*13:62, DRB1*13:82, DRB1*13:100, DRB1*13:108, DRB1*13:118, DRB1*13:132, DRB1*13:134, DRB1*14:22, DRB1*14:25, DRB1*14:53, DRB1*14:69, DRB1*14:74, DRB1*14:105, DRB1*16:01.

Sonda #064 (OLR4088LT): 66-F--D—72 (arginina): DRB1*04:15, DRB1*04:25, DRB1*04:36, DRB1*04:47, DRB1*04:54, DRB1*08:01, DRB1*08:02, DRB1*08:04, DRB1*08:05, DRB1*08:06, DRB1*08:07, DRB1*08:08, DRB1*08:09, DRB1*08:11, DRB1*08:16, DRB1*08:17, DRB1*08:20, DRB1*08:21, DRB1*08:22, DRB1*08:24, DRB1*08:26, DRB1*08:28, DRB1*08:31, DRB1*08:39, DRB1*08:41, DRB1*08:42, DRB1*08:43, DRB1*08:44, DRB1*09:03, DRB1*11:01, DRB1*11:04, DRB1*11:05,

DRB1*11:06, DRB1*11:09, DRB1*11:10, DRB1*11:12, DRB1*11:15, DRB1*11:22, DRB1*11:23, DRB1*11:24, DRB1*11:25, DRB1*11:27, DRB1*11:28, DRB1*11:29, DRB1*11:32, DRB1*11:33, DRB1*11:35, DRB1*11:37, DRB1*11:38, DRB1*11:39, DRB1*11:43, DRB1*11:44, DRB1*11:46, DRB1*11:47, DRB1*11:49, DRB1*11:50, DRB1*11:51, DRB1*11:54, DRB1*11:56, DRB1*11:58, DRB1*11:60, DRB1*11:61, DRB1*11:62, DRB1*11:66, DRB1*11:67, DRB1*11:72, DRB1*11:74, DRB1*11:75, DRB1*11:77, DRB1*11:78, DRB1*11:80, DRB1*11:81, DRB1*11:83, DRB1*11:84, DRB1*11:87, DRB1*11:88, DRB1*11:90, DRB1*11:91, DRB1*11:92, DRB1*11:94, DRB1*11:95, DRB1*11:96, DRB1*11:97, DRB1*11:99, DRB1*11:100, DRB1*11:101, DRB1*11:102, DRB1*11:104, DRB1*11:106, DRB1*11:108, DRB1*11:109, DRB1*11:110, DRB1*11:112, DRB1*11:113, DRB1*11:114, DRB1*11:115, DRB1*11:116, DRB1*11:117, DRB1*11:120, DRB1*11:121, DRB1*12:02, DRB1*12:13, DRB1*12:15, DRB1*12:16, DRB1*12:18, DRB1*12:19, DRB1*12:20, DRB1*12:21, DRB1*12:23, DRB1*12:26, DRB1*12:27, DRB1*12:31N, DRB1*12:32, DRB1*12:33, DRB1*13:05, DRB1*13:07, DRB1*13:11, DRB1*13:14, DRB1*13:18, DRB1*13:21, DRB1*13:26, DRB1*13:42, DRB1*13:46, DRB1*13:47, DRB1*13:49, DRB1*13:50, DRB1*13:55, DRB1*13:62, DRB1*13:100, DRB1*13:108, DRB1*13:132, DRB1*14:15, DRB1*14:22, DRB1*14:25, DRB1*14:27, DRB1*14:53, DRB1*14:73, DRB1*14:105, DRB1*16:01, DRB1*16:04, DRB1*16:08, DRB1*16:09, DRB1*16:13N, DRB1*16:15.

Sonda #077 (DR118G): [56----59 + 70D---L74 + 84----87] (arginina):

DRB1*04:54, DRB1*08:02, DRB1*08:09, DRB1*08:13, DRB1*08:21, DRB1*08:30, DRB1*08:42, DRB1*08:44, DRB1*08:45, DRB1*13:47, DRB1*13:119, DRB1*13:158, DRB1*14:03, DRB1*14:27, DRB1*14:40, DRB1*14:67, DRB1*14:77, DRB1*14:98, DRB1*14:102, DRB1*14:115, DRB1*14:116, DRB1*14:135.

Sonda #080 (OLR4132): 70R---E74 (arginina):

DRB1*04:69, DRB1*04:78, DRB1*04:101, DRB1*09:01, DRB1*09:02, DRB1*09:04, DRB1*09:05, DRB1*09:06, DRB1*09:07, DRB1*09:08, DRB1*09:09, DRB1*09:10, DRB1*09:11, DRB1*09:12, DRB1*09:13, DRB1*09:14, DRB1*09:15, DRB1*09:16, DRB1*09:17, DRB1*11:17, DRB1*11:52, DRB1*11:89,

DRB1*14:01, DRB1*14:04, DRB1*14:05, DRB1*14:07, DRB1*14:08,
 DRB1*14:10, DRB1*14:11, DRB1*14:14, DRB1*14:18, DRB1*14:23,
 DRB1*14:23, DRB1*14:26, DRB1*14:28, DRB1*14:35, DRB1*14:36,
 DRB1*14:38, DRB1*14:39, DRB1*14:42, DRB1*14:43, DRB1*14:44,
 DRB1*14:45, DRB1*14:50, DRB1*14:54, DRB1*14:58, DRB1*14:59,
 DRB1*14:60, DRB1*14:61, DRB1*14:62, DRB1*14:64, DRB1*14:68,
 DRB1*14:70, DRB1*14:71, DRB1*14:72, DRB1*14:75, DRB1*14:82,
 DRB1*14:86, DRB1*14:87, DRB1*14:88, DRB1* DRB1*14:90, DRB1*14:91,
 DRB1*14:92N, DRB1*14:93, DRB1*14:95, DRB1*14:96, DRB1*14:97,
 DRB1*14:99, DRB1*14:101, DRB1*14:103, DRB1*14:110, DRB1*14:112,
 DRB1*14:113, DRB1*14:114, DRB1*14:117, DRB1*14:118, DRB1*14:120,
 DRB1*14:122.

Sonda #081 (DR332G): [68--R-71 + 76-----81] (arginina): DRB1*01:29,
 DRB1*04:24, DRB1*04:69, DRB1*04:78, DRB1*04:101, DRB1*09:05,
 DRB1*10:01, DRB1*10:02, DRB1*10:03, DRB1*11:89, DRB1*14:01,
 DRB1*14:05, DRB1*14:32, DRB1*14:44, DRB1*14:81, DRB1*14:136.

Sonda #085 (DR437-3): 67I-GD—72 (arginina): DRB1*01:04, DRB1*01:11,
 DRB1*01:35, DRB1*03:01, DRB1*03:02, DRB1*03:05, DRB1*03:13,
 DRB1*03:17, DRB1*03:24, DRB1*03:27, DRB1*03:35, DRB1*03:53,
 DRB1*03:81, DRB1*04:41, DRB1*04:44, DRB1*04:60, DRB1*04:72,
 DRB1*04:74, DRB1*04:77, DRB1*04:95, DRB1*04:102, DRB1*04:113,
 DRB1*04:131, DRB1*04:140, DRB1*07:04, DRB1*07:12, DRB1*08:07,
 DRB1*08:19, DRB1*08:27, DRB1*11:27, DRB1*11:84, DRB1*11:124,
 DRB1*11:136, DRB1*11:138, DRB1*12:07, DRB1*12:08, DRB1*12:22,
 DRB1*13:33, DRB1*13:61, DRB1*13:92, DRB1*13:94, DRB1*13:96,
 DRB1*13:102, DRB1*14:26, DRB1*14:38, DRB1*14:47, DRB1*14:50,
 DRB1*14:98, DRB1*14:121, DRB1*14:124, DRB1*14:127, DRB1*15:16,
 DRB1*15:24, DRB1*15:37, DRB1*15:57.

Sonda #032 (DR298G): [56-S---60 + 66-----71] (arginina): DRB1* 03:12,
 DRB1*04:05, DRB1*04:09, DRB1*04:10, DRB1*04:11, DRB1*04:17,
 DRB1*04:28, DRB1*04:29, DRB1*04:30, DRB1*04:45, DRB1*04:48,

DRB1*04:67, DRB1*04:77, DRB1*04:83, DRB1*04:84, DRB1*04:87,
DRB1*04:89, DRB1*04:90, DRB1*04:91, DRB1*04:103, DRB1*04:104,
DRB1*14:13.