

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – SP  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E  
APLICADA

BRUNA CRISTINA BERTOL

Expressão da molécula HLA-G e polimorfismos da região codificadora do gene *HLA-G* em pacientes infectados pelo vírus da hepatite C (HCV) apresentando ou não a coinfeção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV)

Ribeirão Preto  
2016

BRUNA CRISTINA BERTOL

Expressão da molécula HLA-G e polimorfismos da região codificadora do gene *HLA-G* em pacientes infectados pelo vírus da hepatite C (HCV) apresentando ou não a coinfeção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Antônio Donadi

Ribeirão Preto  
2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE  
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA  
FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

### FICHA CATALOGRÁFICA

Bertol, Bruna Cristina

Expressão da molécula HLA-G e polimorfismos da região codificadora do gene *HLA-G* em pacientes infectados pelo vírus da hepatite C (HCV) apresentando ou não a coinfeção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) / Bruna Cristina Bertol; Orientador: Prof. Dr. Eduardo Antônio Donadi - Ribeirão Preto, 2016. 117f

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, 2016

1. HCV. 2. HIV. 3. Hepatite C crônica. 4. HLA-G.

**Nome:** BERTOL, Bruna Bertol

**Título:** Expressão da molécula HLA-G e polimorfismos da região codificadora do gene *HLA-G* em pacientes infectados pelo vírus da hepatite C (HCV) apresentando ou não a coinfeção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV)

Dissertação apresentada ao departamento de Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

### **Banca Examinadora**

Prof. Dr.: Eduardo Antônio Donadi

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FMRP-USP)

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Profa. Dra.: Janaína Cristiana de Oliveira Crispim Freitas

Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: Rodrigo Carvalho Santana

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FMRP-USP)

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Trabalho realizado no Laboratório multiusuário de Biologia Molecular do departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

# Dedicatória

---

Dedico este trabalho aos meus pais, **Gercino e Maria**, pelo amor incondicional e por me apoiarem em todas as minhas decisões, e à minha irmã **Priscila**, por me tornar uma pessoa melhor a cada dia. Amo vocês!

# **Agradecimientos**

---



Gostaria de agradecer primeiramente a minha família. Aos meus pais, **Gercino e Maria**, pela minha vida, por tanto amor, carinho e dedicação. Por terem me dado forças para superar mais esse desafio da minha vida. Vocês são meu alicerce, minha fortaleza. A minha irmã gêmea **Priscila**, por ser minha melhor amiga e companheira da vida inteira. Sou imensamente grata por poder compartilhar tudo e por ter a certeza de que sempre poderei contar com ela, afinal, “nossos destinos foram traçados na maternidade”. Ao meu namorado **Guilherme**, faltam palavras capazes de expressar minha gratidão. Só posso dizer obrigada pelo tempo gasto me ajudando a escrever essa dissertação, me ajudando com as análises, me ajudando SEMPRE. Obrigada por ser a pessoa que faz a vida parecer mais simples e menos estressante, por ser meu companheiro e me motivar sempre que desanimo, e acima de tudo, por cuidar tanto de mim. Também gostaria de dizer meu muito obrigada aos meus **tios, primos e sogros (Seu Jorge e Dona Lioni)** que sempre me apoiaram e vibraram com cada conquista minha nessa trajetória.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Eduardo Antônio Donadi**, pela oportunidade e aprendizado, por todos os ensinamentos valiosos, pelo voto de confiança e, principalmente, por ser um exemplo de pesquisador e ser humano. Espero ter correspondido as expectativas em mim depositadas.

A **prof. Dra. Ana de Lourdes Candolo Martinelli** por disponibilizar as amostras biológicas de seu biorrepositório para este trabalho. Ao **Prof. Dr. Erick da Cruz Castelli** e ao **Prof. Dr. Celso Teixeira Mendes Junior**, pelo auxílio prestado nas análises do estudo e pela disposição em ajudar na resolução dos problemas que surgiram pelo caminho. A **prof. Dra. Leandra Náira Zambelli Ramalho**, por disponibilizar seu laboratório para a realização das reações de imunistoquímica e pela leitura das lâminas.

Gostaria de agradecer meus colegas de laboratório, independentemente do tempo de convivência, pelo compartilhamento de experiências e momentos de descontração, são eles: **Fabício, Cristhianna, Paulin, Ibrahim, Bibiana, Cinthia, Natália, Thaís, Aline, Juliana, Cláudia, Cássia, Bruno e Priscila**. Dentre eles, dois agradecimentos mais que especiais: Ao **Dr. Fabrício César Dias**, pela solicitude em me ensinar praticamente tudo o que aprendi no laboratório, por confiar em mim, por me ajudar em qualquer coisa que precisasse. Sem você não chegaria até aqui! À **Dra. Cristhianna Viesti Advincula Collares**, por me dar tanto suporte, por sempre estar disponível em me ajudar e por me incentivar nos momentos difíceis. Aos dois, agradeço acima de tudo, pela amizade! Agradeço também as técnicas no laboratório, **Flávia e Sandra**, pelo auxílio na bancada e pela ajuda constante.

Aos membros da banca, **Profa. Dra. Janaína Cristiana de Oliveira Crispim Freitas e Prof. Dr. Rodrigo Carvalho Santana**, pela disponibilidade e oportunidade em discutir ciência.

Aos **amigos de Joinville-SC**, sejam eles de infância, de graduação, etc. Apesar da distância, obrigada pela amizade, por todos os bons momentos e por compreender minha ausência constante. Aos **amigos de Ribeirão Preto-SP**, em especial aos amigos que fiz na Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, são eles: **Pedro, Amanda, Naira, Davi, Josiane, Luna, Leandro, Mouzarlem, Ítala, Rafaela**, etc. Obrigada pela amizade sincera, pelo apoio e pela troca de experiências acadêmicas e de vida, GATOS!

Agradeço de maneira geral aos **alunos e membros do Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada**, pelo aprendizado e pela dedicação em manter o nível de excelência do curso, em especial a secretária do programa **Ana Cristine Silva Ferreira**, por sempre estar disposta em me ajudar e por demonstrar tanto carinho por mim. Espero que saiba que a recíproca é totalmente verdadeira!

Ao **laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Joinville (UNIVILLE)**, pelo conhecimento adquirido e pelas oportunidades que tive na época, durante meu período de iniciação científica, e principalmente ao meu orientador **Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França**, por me incentivar a dar os primeiros passos na vida acadêmica.

Por último, gostaria de agradecer às **agências de fomento**. A CAPES que forneceu minha bolsa de mestrado e às outras que financiam os projetos do laboratório e possibilitam o desenvolvimento da pesquisa brasileira.

À todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para que meu trabalho pudesse ser concluído, meu muito obrigada!

“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena acreditar nos sonhos que se tem, ou que seus planos nunca vão dar certo, ou que você nunca vai ser alguém... Quem acredita sempre alcança”!

Mais uma vez - Renato Russo

## RESUMO

BERTOL, B. C. **Expressão da molécula HLA-G e polimorfismos da região codificadora do gene *HLA-G* em pacientes infectados pelo vírus da hepatite C (HCV) apresentando ou não a coinfeção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV)**. 2016. 117f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

A hepatite C, causada pelo vírus da hepatite C (HCV), afeta milhões de pessoas no mundo. A transmissão do HCV é semelhante ao HIV, justificando a alta taxa de prevalência da coinfeção. Pacientes coinfectados HCV/HIV apresentam maior taxa de progressão da fibrose hepática e da mortalidade, em comparação aos pacientes monoinfectados com HCV. Assim, o estudo de genes e/ou moléculas que controlam a resposta imune é pertinente. No presente estudo, avaliamos o papel do antígeno leucocitário humano G (HLA-G), molécula com reconhecida atividade imunomoduladora, capaz de inibir a ativação das células T e a atividade citotóxica das células *Natural Killers* (NK) e linfócitos T CD8<sup>+</sup>, além de induzir a formação células T reguladoras. Nós investigamos 216 pacientes monoinfectados pelo HCV, 135 pacientes coinfectados HCV-HIV e 152 indivíduos não infectados. A variabilidade do gene *HLA-G* foi avaliada por sequenciamento de Sanger e a expressão hepática da molécula por imunistoquímica. A expressão de HLA-G foi observada somente no tecido hepático dos pacientes, principalmente nos hepatócitos. O aumento de expressão de HLA-G foi associado com avanço da fibrose e da atividade necroinflamatória no fígado de ambos os grupos de pacientes. Idade igual ou superior a 40 anos e a cor de pele não-branca também foram associados com aumento da expressão hepática da molécula nos pacientes HCV. Outros fatores do hospedeiro analisados como gênero e genótipo do HCV não foram associados com o nível de expressão de HLA-G no fígado. A frequência do alelo *HLA-G\*01:01:01:01* estava aumentada nos pacientes HCV e do alelo *G\*01:05N* diminuída nos pacientes coinfectados HCV-HIV, porém, não houveram associações significantes entre a variabilidade genética de *HLA-G* e a expressão hepática de HLA-G. O presente estudo contribui para a ampliar os conhecimentos acerca da participação da molécula HLA-G na hepatite C crônica, associado ou não com infecção pelo HIV.

Palavras-chave: HCV, HIV, hepatite C crônica, HLA-G

## ABSTRACT

BERTOL, B. C. **Expression of HLA-G molecule and coding region polymorphisms of *HLA-G* gene in hepatitis C virus (HCV) infected patients presenting or not human immunodeficiency virus (HIV) coinfection.** 2016. 117f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Hepatitis C, caused by the hepatitis C virus (HCV), affects millions of people worldwide. The transmission of HCV is similar to HIV, which explains the high prevalence of coinfection. HCV-HIV coinfecting patients have higher rate of liver fibrosis progression and mortality when compared to HCV mono-infected patients. Thus, the study of genes and/or molecules that control the immune response is relevant. In the present study, we evaluated the role of human leukocyte antigen G (HLA-G), a molecule known by its immunomodulatory activity, which is capable to inhibit T cell activation and cytotoxic activity of natural killer (NK) cells and CD8<sup>+</sup> T cells, in addition to inducing the formation of regulatory T cells. We studied 216 HCV patients, 135 HIV-HCV coinfecting patients and 152 uninfected individual. The variability of the *HLA-G* gene was evaluated by Sanger sequencing and the hepatic expression of the molecule by immunohistochemistry. The HLA-G expression was observed only in liver tissue of patients, mainly in hepatocytes. The increased HLA-G expression was associated with increased liver fibrosis and necroinflammatory activity in both groups of patients. The age greater than or equal to 40 years and the non-white skin color were also associated with increased hepatic expression of the molecule in the HCV patients. Other host factors analyzed as gender and HCV genotype were not associated with the level of HLA-G expression in the liver. The frequency of *HLA-G*\*01:01:01:01 allele was increased in HCV patients and *G*\*01:05N decreased in HCV-HIV coinfecting patients, however, there was no significant association between the genetic variability of *HLA-G* and HLA-G liver expression. The present study contributes to expand the knowledge regarding the participation of HLA-G in chronic C hepatitis, associated or not with the HIV infection.

Key-words: HCV, HIV, chronic hepatitis C, HLA-G

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** História natural da hepatite C e sua variabilidade interindividual (LAUER; WALKER, 2001). ..... 26
- Figura 2.** A infecção pelo HIV prejudica a resposta imune contra o HCV e está associada à aceleração da fibrose hepática (CHEN; FEENEY; CHUNG, 2014). ..... 35
- Figura 3.** Organização e localização do complexo HLA no cromossomo 6 humano (KLEIN; SATO, 2000). ..... 37
- Figura 4.** A edição alternativa do transcrito primário do gene *HLA-G* resulta em 7 isoformas diferentes da molécula. Éxon (E), peptídeo líder (L), domínio transmembrânico (Tm), domínio citoplasmático (Cyt). As linhas vermelhas indicam a presença de códon de parada de transcrição em regiões intrônicas (GONZÁLEZ et al., 2012). ..... 39
- Figura 5.** Sítios de variabilidade observados entre o éxon 1 e o éxon 4 da região codificadora do gene *HLA-G*. \*Alelos que apresentam frequência mundial acima de 1%. Aminoácidos: A, Alanina; S, Serina; F, Fenilalanina; Y, Tirosina; T, Treonina; M, Metionina; Q, Glutamina; R, Arginina; E, Ácido glutâmico; P, Prolina; H, Histidina; G, Glicina; D, Ácido aspártico; V, Valina; C, Cisteína; L, Leucina; I, Isoleucina; W, Triptofano. Δ, deleção (DIAS et al., 2015). ..... 43
- Figura 6.** Nomenclatura padronizada do gene *HLA-G* de acordo com o *WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System*. ..... 44
- Figura 7.** *Amplicons* obtidos na primeira (A) e segunda (B) amplificação da região codificadora do gene *HLA-G*. CN = Controle negativo (Água ultrapura). M = Marcador de peso molecular (O'GeneRuler™ 1kb DNA ladder Plus, Fermentas, Thermo Scientific®). 57
- Figura 8.** Cromatograma obtido a partir do sequenciamento direto de um *amplicon* da PCR 1 com o *primer* SEKHGInt2.F, no qual são evidenciados os SNPs +685G/A, +706C/T, +726G/A, +727C/T e +738G/T. No cromatograma em questão tem-se os genótipos +685AA, +706CT, +726GG, +727CC e +738GG. Código IUPAC: R = G ou A; Y = T ou C; K = G ou T. ..... 59
- Figura 9.** Imunoistoquímica para a molécula HLA-G. Tecido hepático normal - Ausência de marcação para HLA-G (Painéis A - aumento 10x e B - aumento 40x). Tecido hepático infectado com HCV. A marcação para HLA-G aparece em marrom (Painéis C - aumento 10x e D - aumento 40x). ..... 63
- Figura 10.** Imunoistoquímica para a molécula HLA-G em biópsias hepáticas de pacientes HCV estratificados em diferentes graus de fibrose hepática. A e B: F1 - Leve marcação para o HLA-G (1+). C e D: F2 - Expressão moderada de HLA-G (2+). E e F: F3 - Expressão difusa e intensa de HLA-G (3+). G e H: F4 - Expressão intensa e difusa de HLA-G (3+). Classificação METAVIR (F1: Fibrose leve, F2: Fibrose moderada, F3: Fibrose grave, F4: Cirrose) (BEDOSSA et al., 1994). A, C, E e G: Aumento de 10x. B, D, F e H: Aumento de 40x. .... 67

**Figura 11.** Imunorreatividade para HLA-G em biópsias hepáticas de pacientes HCV e coinfectados HCV-HIV estratificados de acordo com o grau de fibrose hepática. Classificação METAVIR (F1: Fibrose leve, F2: Fibrose moderada, F3: Fibrose grave, F4: Cirrose) (BEDOSSA et al., 1994). Comparações realizadas por meio do teste exato de Fisher. \*Valores estatisticamente significativos ( $P \leq 0,05$ ). ..... 68

**Figura 12.** Imunorreatividade para HLA-G em biópsias hepáticas de pacientes HCV e coinfectados HCV-HIV estratificados de acordo com a atividade necroinflamatória. Classificação METAVIR (A0: Sem atividade necroinflamatória, A1: Atividade leve, A2: Atividade moderada, A3: Atividade grave) (BEDOSSA et al., 1994). Comparações realizadas por meio do teste exato de Fisher. \*Valores estatisticamente significativos ( $P \leq 0,05$ ). ..... 68

**Figura 13.** Desequilíbrio de ligação (LD) entre os 56 sítios polimórficos do gene *HLA-G*. Áreas em vermelho escuro indicam forte LD ( $LOD \geq 2$  e  $D' = 1$ ), tons de rosa indicam LD moderado ( $LOD \geq 2$  e  $D' < 1$ ), azul indica LD fraco ( $LOD < 2$  e  $D' = 1$ ) e branco indica que não há LD ( $LOD < 2$  e  $D' < 1$ ). Os números indicam o valor  $D'$  expresso em percentagem e os quadrados vazios representam  $D'$  igual a 1 (Dados obtidos usando o software Haploview® 4.2). ..... 70

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classificação histopatológica METAVIR do grau de atividade necroinflamatória e fibrose hepática.....	27
<b>Tabela 2.</b> <i>Primers</i> definidos para amplificação da região codificadora do gene <i>HLA-G</i> . .....	55
<b>Tabela 3.</b> <i>Primers</i> definidos para o sequenciamento da região codificadora do gene <i>HLA-G</i> . .....	58
<b>Tabela 4.</b> Características demográficas dos indivíduos controles e clínicas/demográficas/histológicas dos pacientes infectados pelo HCV e coinfectados HCV-HIV .....	62
<b>Tabela 5.</b> Expressão de HLA-G em biópsias hepáticas de pacientes HCV e coinfectados HCV-HIV.....	64
<b>Tabela 6.</b> Expressão de HLA-G em biópsias hepáticas de pacientes infectados pelo HCV, estratificados de acordo com variáveis clínico-demográficas e histológicas.....	65
<b>Tabela 7.</b> Expressão de HLA-G em biópsias hepáticas de pacientes coinfectados HCV-HIV, estratificados de acordo com variáveis clínico-demográficas e histológicas.....	66
<b>Tabela 8.</b> Frequência dos alelos <i>HLA-G</i> encontrados nos indivíduos incluídos no estudo. ...	72
<b>Tabela 9.</b> Frequência dos grupos de alelos <i>HLA-G</i> encontrados nos indivíduos incluídos no estudo. ....	73
<b>Tabela 10.</b> Distribuição dos alelos <i>HLA-G</i> nos pacientes HCV, coinfectados HCV-HIV e indivíduos controles.....	74
<b>Tabela 11.</b> Distribuição dos grupos de alelos <i>HLA-G</i> nos pacientes HCV, coinfectados HCV-HIV e indivíduos controles.....	75
<b>Tabela 12.</b> Associação entre a expressão hepática de HLA-G e os alelos do gene <i>HLA-G</i> nos pacientes HCV. ....	77
<b>Tabela 13.</b> Associação entre a expressão hepática de HLA-G e os alelos do gene <i>HLA-G</i> nos pacientes coinfectados HCV-HIV.....	78
<b>Tabela 14.</b> Associação entre a expressão hepática de HLA-G e os alelos do gene <i>HLA-G</i> ao comparar pacientes HCV com pacientes coinfectados HCV-HIV. ....	79
<b>Tabela 15.</b> Frequência dos diplótipos do gene <i>HLA-G</i> nos pacientes HCV e nos pacientes coinfectados HCV-HIV. ....	81
<b>Tabela 16.</b> Associação entre a expressão hepática de HLA-G e os diplótipos do gene <i>HLA-G</i> nos pacientes HCV.....	82



<b>Tabela 17.</b> Associação entre a expressão hepática de HLA-G e os diplótipos do gene <i>HLA-G</i> nos pacientes coinfectados HCV-HIV.....	83
<b>Tabela 18.</b> Associação entre a expressão hepática de HLA-G e os diplótipos do gene <i>HLA-G</i> ao comparar pacientes HCV com pacientes coinfectados HCV-HIV.....	84
<b>Tabela 19.</b> Associação entre a expressão hepática de HLA-G e os grupos de alelos do gene <i>HLA-G</i> nos pacientes HCV.....	86
<b>Tabela 20.</b> Associação entre a expressão hepática de HLA-G e os grupos de alelos do gene <i>HLA-G</i> nos pacientes coinfectados HCV-HIV.....	87
<b>Tabela 21.</b> Associação entre a expressão hepática de HLA-G e os grupos de alelos do gene <i>HLA-G</i> ao comparar pacientes HCV com pacientes coinfectados HCV-HIV.....	88
<b>Tabela 22.</b> Frequência dos diplótipos do gene <i>HLA-G</i> formados por grupos de alelos nos pacientes HCV e nos pacientes coinfectados HCV-HIV.....	89
<b>Tabela 23.</b> Associação entre a expressão hepática de HLA-G e os diplótipos do gene <i>HLA-G</i> formados por grupos de alelos nos pacientes HCV.....	90
<b>Tabela 24.</b> Associação entre a expressão hepática de HLA-G e os diplótipos do gene <i>HLA-G</i> formados por grupos de alelos nos pacientes coinfectados HCV-HIV.....	91
<b>Tabela 25.</b> Associação entre a expressão hepática de HLA-G e os diplótipos do gene <i>HLA-G</i> formados por grupos de alelos, ao comparar pacientes HCV com pacientes coinfectados HCV-HIV.....	92

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**β2m** - Beta-2-microglobulina

**3'UTR** - Região 3' não traduzida do gene (*3' untranslated region*)

**5'URR** - Região promotora 5' (*5' upstream regulatory region*)

**A** - Adenina

**AIDS** - Síndrome da imunodeficiência adquirida (*Acquired immune deficiency syndrome*)

**ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**APC** - Células apresentadoras de antígeno (*Antigen-presenting cells*)

**BLAST®** - Basic Local Alignment Search Tool

**C** - Citosina

**CCR5** - CC receptor de quimiocina tipo 5 (*CC chemokine receptor type 5*)

**CD** - Células dendríticas

**CHC** - Carcinoma hepatocelular (*Hepatocellular carcinoma*)

**CMV** - Citomegalovírus

**CTL** - Linfócitos T citotóxicos (*Cytotoxic T lymphocytes*)

**CTLA-4** - Antígeno 4 associado com linfócito T citotóxico (*Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*)

**CXCR4** - CXC receptor de quimiocina tipo 4 (*CXC chemokine receptor type 4*)

**DAA** - Antivirais de ação direta (*Direct-acting antiviral*)

**ESLD** - Estágio final de doença hepática (*End-stage liver disease*)

**FasL** - ligante Fas

**FMRP** - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

**G** - Guanina

**GALT** - Tecido linfoide associado ao intestino (*Gut associated lymphoid tissue*)

**HAART** - Terapia antirretroviral altamente ativa (*Highly active antiretroviral therapy*)

**HBV** - Vírus da hepatite B (*Hepatitis B virus*)

**HC** - Hospital das Clínicas

**HCV** - Vírus da hepatite C (*Hepatitis C virus*)

**HIV** - Vírus da imunodeficiência humana (*Human immunodeficiency virus*)

**HLA** - Antígeno leucocitário humano (*Human leukocyte antigen*)

**HSC** - Células estreladas hepáticas (*Hepatic stellate cells*)

**IC** - Intervalo de confiança

**IFN** - Interferon

**Ig** - Imunoglobulinas

**ILT** - Transcrito tipo imunoglobulina (*Immunoglobulin-like transcript*)

**IMGT** - *ImMunoGeneTics information system*

**IRF** - Fator de resposta ao interferon (*Interferon regulatory factor*)

**ISG** - Genes estimulados por interferon (*IFN-stimulated genes*)

**IUPAC** - União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)

**KIR** - Receptor tipo imunoglobulina de células assassinas (*Killer cell immunoglobulin-like receptors*)

**LD** - Desequilíbrio de ligação (*Linkage disequilibrium*)

**LOD** - *log of the likelihood odds ratio*

**LPS** - Lipopolissacarídeo

**MHC** - Complexo principal de histocompatibilidade (*Major histocompatibility complex*)

**mRNA** - RNA mensageiro

**miRNA** - Micro RNA

**NK** - Assassinas naturais (*Natural killers*)

**OR** - *Odds Ratio*

**Pb** - Pares de bases

**PCR** - Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction*)

**PD-1** - Receptor de morte programada-1 (*Programmed cell death protein 1*)

**PegIFN- $\alpha$ -2a/2b** - Interferon peguilado- $\alpha$  2a/2b

**PI** - Inibidores de protease (*Protease inhibitors*)

**PRR** - Receptores de reconhecimento de padrões (*Pattern recognition receptors*)

**RABV** - Vírus da raiva (*Rabies virus*)

**RBV** - Ribavirina

**RIG-I** - Proteína indutível por ácido retinóico I (*Retinoic-acid-inducible protein 1*)

**RVS** - Resposta virológica sustentada (*Sustained virological response*)

**sHLA-G** - HLA-G solúvel

**SINAN** - Sistema de Investigação de Agravos de Notificação

**SNP** - Polimorfismo de Nucleotídeo Único (*Single Nucleotide Polymorphism*)

**T** - Timina

**TCLE** - Termo de consentimento livre e esclarecido

**TCR** - Receptor de células T (*T cell receptor*)

**TGF- $\beta$**  - Fator transformador de crescimento beta (*Transforming growth factor beta*)

**TLR** - Receptores do tipo *toll* (*Toll-like receptors*)

**Tr1** - células T reguladoras do tipo 1

**TRAIL** - Ligante de apoptose relacionado ao TNF (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*)

**USP** - Universidade de São Paulo

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>23</b>
<b>1.1</b>	<b>Infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) .....</b>	<b>24</b>
1.1.1	O agente viral e epidemiologia .....	24
1.1.2	Vias de Transmissão .....	24
1.1.3	História natural da infecção .....	25
1.1.4	Resposta imune contra o HCV e mecanismos de evasão viral .....	27
1.1.5	Tratamento e vacinação .....	30
<b>1.2</b>	<b>Infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) .....</b>	<b>31</b>
1.2.1	O agente viral e epidemiologia .....	31
1.2.2	Vias de transmissão.....	31
1.2.3	História natural da infecção .....	32
1.2.4	Resposta imune contra o HIV e mecanismos de evasão viral.....	32
1.2.5	Tratamento e vacinação .....	33
<b>1.3</b>	<b>Coinfecção HIV/HCV.....</b>	<b>34</b>
1.3.1	Epidemiologia .....	34
1.3.2	Impacto do HIV na história natural da hepatite C .....	34
<b>1.4</b>	<b>Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC).....</b>	<b>36</b>
1.4.1	Antígeno Leucocitário Humano G (HLA-G).....	37
1.4.1.1	O gene e a molécula .....	37
1.4.1.2	Funções imunotolerantes da molécula HLA-G .....	40
1.4.1.3	Nomenclatura e polimorfismos do gene <i>HLA-G</i> .....	41
1.4.1.4	HLA-G e infecção pelo vírus da hepatite C .....	45
<b>2</b>	<b>Justificativa.....</b>	<b>47</b>
<b>3</b>	<b>Objetivos .....</b>	<b>49</b>
3.1	Objetivo geral .....	50
3.2	Objetivos específicos.....	50
<b>4</b>	<b>Materiais e Métodos.....</b>	<b>51</b>
4.1	Considerações Éticas .....	52
4.2	Casuística .....	52
4.3	Expressão proteica de HLA-G em biópsias hepáticas .....	53
4.4	Tipificação do gene <i>HLA-G</i> .....	54
4.4.1	Reação em Cadeia da Polimerase 1 (PCR 1) .....	55
4.4.2	Reação em Cadeia da Polimerase 2 (PCR 2) .....	55

4.4.3	Análise dos produtos de amplificação .....	56
4.4.4	Purificação e diluição dos produtos amplificados.....	57
4.4.5	Reação de sequenciamento .....	57
4.4.6	Precipitação dos fragmentos sequenciados .....	58
4.4.7	Sequenciamento .....	58
<b>4.5</b>	<b>Tratamento dos dados e análises estatísticas .....</b>	<b>59</b>
<b>5</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>61</b>
<b>5.1</b>	<b>Características demográficas e clínicas.....</b>	<b>62</b>
<b>5.2</b>	<b>Expressão hepática da molécula HLA-G .....</b>	<b>62</b>
<b>5.3</b>	<b>Associação entre a expressão hepática de HLA-G e variáveis clínico-demográficas e histológicas .....</b>	<b>64</b>
<b>5.4</b>	<b>Variabilidade do gene <i>HLA-G</i> em pacientes e indivíduos controles .....</b>	<b>69</b>
<b>5.5</b>	<b>Associação entre a expressão hepática de HLA-G e variabilidade do gene <i>HLA-G</i> ....</b>	<b>76</b>
<b>6</b>	<b>Discussão .....</b>	<b>93</b>
<b>7</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>102</b>
<b>8</b>	<b>Referências bibliográficas .....</b>	<b>104</b>
<b>9</b>	<b>Anexos .....</b>	<b>115</b>

# 1 Introdução

---

## 1.1 Infecção pelo vírus da hepatite C (HCV)

### 1.1.1 O agente viral e epidemiologia

A hepatite C é doença infecciosa causada pelo vírus da hepatite C (*Hepatitis C vírus - HCV*), um RNA vírus de cadeia simples, envelopado e pertencente à família *Flaviviridae* (WHO, 2015). Inicialmente denominada hepatite não A não B, a hepatite C foi elucidada apenas em 1989, com a identificação de seu agente etiológico (CHOO et al., 1989). Análises filogenéticas revelam a existência de sete grandes agrupamentos filogenéticos do HCV, correspondentes aos genótipos 1-7 que são ainda subdivididos em subtipos a, b, c, etc. (SMITH et al., 2014).

Anualmente, 3-4 milhões de pessoas são infectadas pelo HCV no mundo. Estima-se que cerca de 130-150 milhões tenham a infecção na forma crônica e que 350.000 a 500.000 pessoas morram a cada ano de doenças hepáticas relacionadas ao HCV (WHO, 2015). No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde (BRASIL, 2012), define-se como caso confirmado de hepatite C o indivíduo que preencha as condições de caso suspeito e que apresente anti-HCV reagente e HCV-RNA detectável. Assim, foram notificados no Sistema de Investigação de Agravos de Notificação (SINAN), no período de 1999 a 2011, 82.041 casos confirmados de hepatite C no país, encontrando-se a maioria nas regiões Sudeste (67,3%) e Sul (22,3%) do Brasil.

O genótipo 1 é o mais prevalente mundialmente, compreendendo cerca de 80 milhões de casos, seguido do genótipo 3, com cerca de 50 milhões de indivíduos infectados (MESSINA et al., 2015). No Brasil, os genótipos mais encontrados são 1, 2 e 3, predominando o genótipo 1, seguido do genótipo 3 (CAMPIOTTO et al., 2005).

### 1.1.2 Vias de Transmissão

A transmissão do HCV é primariamente via parenteral através de exposição a sangue contaminado. O risco de infecção ocorre principalmente com o compartilhamento de equipamento para uso de drogas intravenosas, colocação de *piercings* e/ou tatuagens.



Globalmente, a prevalência de hepatite C é de 67% dentre usuários de drogas injetáveis. Considera-se ainda como formas de transmissão do vírus: transfusão de sangue antes de 1992; transplante de órgãos sólidos de doador infectado, hemodiálise, uso de drogas intranasais e exposição ocupacional (WHO, 2015).

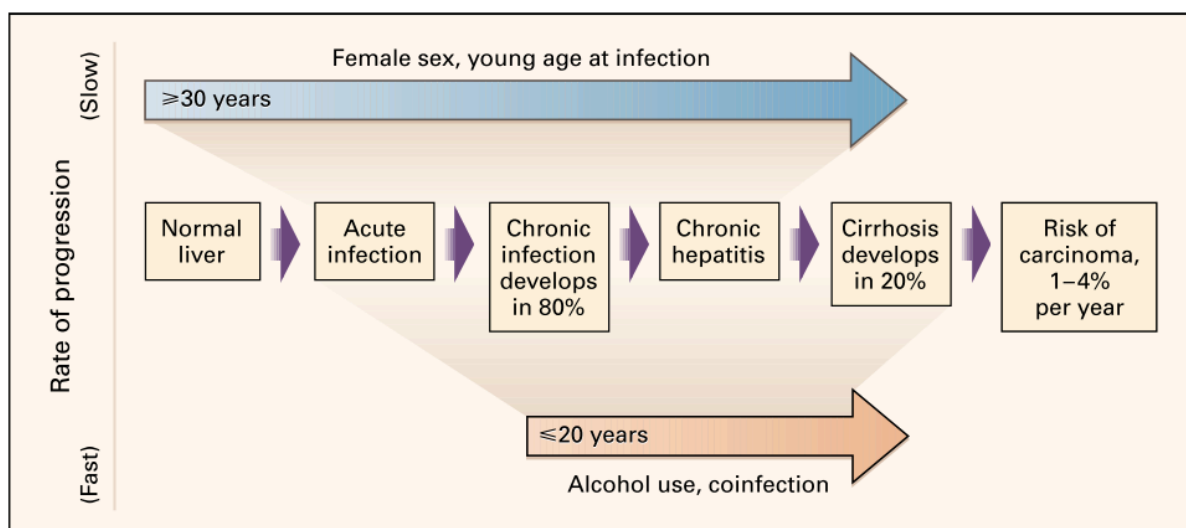
A transmissão sexual é pouco frequente e ocorre principalmente em pessoas que apresentam prática sexual de risco (com múltiplos parceiros e sem utilização de preservativo). Além disso, a coinfeção com algum agente sexualmente transmissível, como o vírus da imunodeficiência humana (*Human Immunodeficiency Virus* – HIV), por exemplo, facilita a transmissão sexual do HCV (CHAN, 2014; CHEN; MORGAN, 2006; KRETZER et al., 2014; WHO, 2014). O risco de transmissão vertical é baixo, estimado em 4 a 8% entre mães sem infecção com HIV, entretanto, essa estimativa atinge 17 a 25% considerando mães infectadas com HIV (WHO, 2014).

### 1.1.3 História natural da infecção

A história natural da infecção pelo HCV é de evolução silenciosa: a doença é frequentemente diagnosticada décadas depois da infecção, na sua fase crônica, constituindo grave problema de saúde pública mundial. Em 55% a 85% dos casos, na ausência de tratamento, a doença torna-se crônica; em média, 20% evoluem para cirrose, com risco anual de 1% a 4% de desenvolver carcinoma hepatocelular (*hepatocellular carcinoma* - CHC) (**Figura 1**) (LAUER; WALKER, 2001; SEEFF, 2002). A infecção pelo HCV constitui a principal indicação de transplante hepático no mundo (LAUER; WALKER, 2001). Sem tratamento antiviral e/ou transplante hepático, deterioração da função hepática pode ocorrer, conduzindo ao estágio final de doença hepática (*End-Stage Liver Disease* - ESLD) e morte (CHAN, 2014).

O HCV raramente causa infecção aguda sintomática. Os sintomas são inespecíficos e a infecção dificilmente é diagnosticada nessa fase (CHEN; MORGAN, 2006). Muitos fatores do hospedeiro parecem influenciar fortemente a persistência crônica do HCV (**Figura 1**): idade superior a 25 anos no momento da infecção; gênero masculino; descendência afroamericana, coinfeção com o vírus da hepatite B (*hepatites B vírus* - HBV) ou HIV; fatores genéticos, incluindo determinados alelos dos Antígenos Leucocitários Humanos

(*Human Leukocyte Antigen* - HLA) (ASSELAH et al., 2007; HONG et al., 2005) e os polimorfismos próximos ao gene *IL28B* (RAUCH et al., 2010; THOMAS et al., 2009), dentre outros.



**Figura 1.** História natural da hepatite C e sua variabilidade interindividual (LAUER; WALKER, 2001).

Uma vez instalada a hepatite C crônica, tem-se o início do desenvolvimento da fibrose hepática, sequela que leva à distorção da arquitetura do fígado e disfunção hepática (MARCELLIN; ASSELAH; BOYER, 2002). A taxa de progressão da fibrose hepática é altamente variável dentre os pacientes infectados. O consumo de álcool (>30g/dia para homens, >20g/dia para mulheres) é importante fator de risco na progressão da hepatite C crônica para cirrose e HCC. Outros fatores do hospedeiro para a progressão da fibrose hepática incluem: idade mais avançada no momento da infecção (superior a 40 anos), gênero masculino, atividade necroinflamatória do fígado, coinfeção com o HBV e/ou HIV, comorbidades como obesidade e imunossupressão, dentre outros (CHEN; MORGAN, 2006; SEEFF, 2002; WESTBROOK; DUSHEIKO, 2014).

A avaliação histológica do fígado por meio de biópsia é uma etapa essencial na avaliação e manejo de pacientes com doença hepática e tem sido considerado como componente integral do arsenal diagnóstico (ROCKEY et al., 2009). Através da biópsia, faz-se não somente o estadiamento do dano hepático (fibrose), mas também a identificação do grau de atividade necroinflamatória no fígado. Existem diversos sistemas de classificação no estadiamento das hepatites crônicas, porém, um critério comumente utilizado no Brasil é a

classificação METAVIR (**Tabela 1**) (BEDOSSA; POYNARD, 1996; BEDOSSA et al., 1994).

**Tabela 1.** Classificação histopatológica METAVIR do grau de atividade necroinflamatória e fibrose hepática.

<b>Atividade necroinflamatória</b>	
Ausente	A0
Atividade leve	A1
Atividade moderada	A2
Atividade grave	A3
<b>Fibrose</b>	
Ausente	F0
Leve (Fibrose portal sem septos)	F1
Moderada (Fibrose portal com raros septos)	F2
Grave (Fibrose portal com muitos septos sem cirrose)	F3
Cirrose	F4

#### 1.1.4 Resposta imune contra o HCV e mecanismos de evasão viral

A resposta imune inata é a primeira linha de defesa do hospedeiro contra patógenos virais e é responsável por informar e direcionar a resposta imune adaptativa (DUSTIN; CASHMAN; LAIDLAW, 2014). A infecção pelo HCV é iniciada quando o vírus infecta hepatócitos e o RNA viral é detectado por receptores de reconhecimento de padrões (*Pattern recognition receptors* - PRR) tais como o receptores do tipo *toll* (*toll-like receptor* - TLR) e o receptor citosólico proteína indutível por ácido retinóico I (*retinoic-acid-inducible protein 1* - RIG-I), desencadeando a resposta imune inata. Ambas as vias dos receptores TLR e RIG-I culminam na ativação do fator nuclear *kappa* B (*factor nuclear kappa B* - NF- $\kappa$ B), fatores de resposta ao interferon (*interferon regulatory factor* - IRF) -3 e IFR-7 que induzem a transcrição nuclear de genes que codificam interferons (IFN) do tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ) e IFN do tipo III (IFN- $\lambda$ 1, - $\lambda$ 2 e - $\lambda$ 3, também denominados interleucina 29 (IL29), IL28A e IL28B, respectivamente) (HEIM; THIMME, 2014).

Uma vez sintetizados, os IFNs atuam sobre seus receptores e são essenciais para a indução de estado antiviral nas células infectadas e em células vizinhas. Os IFNs induzem a ativação transcricional de centenas de genes conhecidos como genes estimulados por

interferon (*IFN-stimulated genes* - ISG) que limitam a replicação do HCV e a propagação célula-a-célula do vírus (ABDEL-HAKEEM; SHOUKRY, 2014; HEIM; THIMME, 2014). Os IFNs são também responsáveis pela ativação e regulação de componentes celulares da imunidade inata, tais como as células assassinas naturais (*natural killers* - NK) (STETSON; MEDZHITOV, 2006).

As células NK são uma das primeiras e mais importantes linhas de defesa da resposta imune inata celular contra o HCV e exercem importante papel no controle da infecção (HEIM; THIMME, 2014). Os efeitos antivirais ocorrem por meio da secreção de moléculas citotóxicas (perforinas/granzimas), indução de apoptose da célula-alvo por meio da expressão do ligante de apoptose relacionado ao TNF (*TNF-related apoptosis-inducing ligand* – TRAIL) e secreção de outro tipo de IFN, o IFN tipo II (IFN- $\gamma$ ) (ABDEL-HAKEEM; SHOUKRY, 2014).

Células dendríticas (CD) são igualmente importantes na resposta imune inata contra o HCV. Existem dois principais tipos de CD, as mieloides e as plasmocitoides. As CD mieloides são as principais células apresentadoras de antígeno (*antigen-presenting cells* - APC) que unem a imunidade inata e adaptativa e são principalmente associadas com processamento e apresentação de antígenos. As CD plasmocitoides detectam a presença de infecções virais e são as principais células da imunidade inata a produzirem IFN do tipo I e do tipo III (ABDEL-HAKEEM; SHOUKRY, 2014).

Apesar do papel da imunidade inata, é consenso geral que a eliminação do HCV é associada com forte e sustentada resposta de linfócitos T citotóxicos (*cytotoxic T lymphocytes* – CTL) CD8<sup>+</sup> e linfócitos T CD4<sup>+</sup> auxiliares contra múltiplos epítomos do vírus, resposta que aparece tardiamente dentre 6-8 semanas após a infecção primária pelo HCV, apesar dos altos níveis de viremia (HEIM; THIMME, 2014; LARRUBIA et al., 2014).

A função efetora dos CTL CD8<sup>+</sup> consiste na citólise da célula infectada pela liberação de moléculas citotóxicas como perforina/granzima e pela produção adicional de citocinas que auxiliam na eliminação do vírus, como IFN tipo II (KOZIEL, 2005). A resposta dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> é crítica para a geração e manutenção da resposta imune antiviral, principalmente o subtipo de linfócitos T CD4<sup>+</sup> Th1, uma vez que tais células secretam citocinas e auxiliam na ativação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> HCV-específicos. Apesar de evidências claras do papel da resposta imune adaptativa celular na eliminação do HCV, a contribuição da resposta imune humoral na infecção aguda e eliminação espontânea do HCV ainda é controversa (CASHMAN; MARSDEN; DUSTIN, 2014).

É a falha da resposta imune inata e adaptativa em erradicar o HCV que resulta no desenvolvimento de infecção crônica, a partir da qual significativa proporção de pacientes desenvolve cirrose e HCC (KOZIEL, 2005). O mecanismo pelo qual o HCV persiste na maioria dos casos ainda é incerto, mas ocorre apesar da resposta de CTL CD8<sup>+</sup> e linfócitos T CD4<sup>+</sup> auxiliares HCV-específicos no sangue periférico e fígado, o que sugere que essa resposta é, na maior parte, inefetiva (KOZIEL, 2005). A indução de IFN endógeno no fígado aparentemente tem pouca eficácia antiviral e o HCV acaba persistindo por décadas apesar da intensa expressão dos ISGs (HEIM; THIMME, 2014).

Diversos mecanismos de evasão do HCV que culminam na instalação da hepatite C crônica vêm sendo evidenciados ao longo dos últimos anos, o que sugere que existem diferentes maneiras pelas quais o vírus interfere na eficácia da resposta imune antiviral (KOZIEL, 2005). O HCV pode interferir com a sinalização dos IFNs, inibir função de células NK, desregular função de CD e causar exaustão de CTL CD8<sup>+</sup> e linfócitos T CD4<sup>+</sup> auxiliares por meio da indução da alta expressão de receptores inibidores como o receptor de morte programada-1 (*Programmed cell death protein 1* - PD-1) e o antígeno 4 associado com linfócito T citotóxico (*Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4* - CTLA-4) (KOZIEL, 2005; LARRUBIA et al., 2014).

O HCV também é capaz de regular vias pró-apoptóticas para induzir deleção de linfócitos T HCV-específicos (LARRUBIA et al., 2014). Células T reguladoras com propriedades imunossupressoras podem ser induzidas e agir bloqueando a resposta de linfócitos T HCV-específicos, secretando citocinas imunoreguladoras como IL-10 e fator transformador de crescimento beta (*transforming growth factor beta* - TGF-β) que prejudicam a resposta de linfócitos T (ABDEL-HAKEEM; SHOUKRY, 2014; KOZIEL, 2005).

O desenvolvimento de mutações em epítomos restritos à molécula de MHC de classe I que são alvos de CTL CD8<sup>+</sup>, em função da grande capacidade mutagênica do vírus, são associados com persistência viral e representam importante mecanismo de evasão imune usada pelo vírus (ABDEL-HAKEEM; SHOUKRY, 2014).

### 1.1.5 Tratamento e vacinação

O objetivo principal do tratamento é a erradicação do vírus. Até 2011, o tratamento padrão da hepatite C crônica consistia do uso concomitante de Interferon Peguilado- $\alpha$  2a/2b (PegIFN- $\alpha$ -2a/2b) e Ribavirina (RBV), entretanto, a eficácia era limitada, pois apenas 45-55% dos pacientes tratados alcançavam a resposta virológica sustentada (*Sustained virological Response* - RVS) quando infectados com o genótipo 1 do vírus (GARCÍA et al., 2011).

Grande progresso foi atingido nos últimos anos acerca do desenvolvimento de novas terapias contra o HCV, como os agentes antivirais de ação direta (*direct-acting antiviral* - DAA) de primeira geração, em 2011, também chamados de inibidores de protease (*protease inhibitors* - PI) Boceprevir e Telaprevir, aprovados para o tratamento de pacientes com o genótipo 1 do HCV (BACON et al., 2011; JACOBSON et al., 2011; MCHUTCHISON et al., 2010; POORDAD et al., 2011). Mais recentemente, em 2013, foram aprovados os DAA de segunda geração: Sofosbuvir (análogo nucleotídeo inibidor da polimerase NS5B do HCV), Simeprevir (inibidor de protease) ou Daclatasvir (inibidor do complexo de replicação NS5A) (KOHLI et al., 2014; LAWITZ et al., 2014; MANNIS et al., 2014; PEARLMAN; EHLEBEN; PERRYS, 2015; STAHEMEYER; ROSSOL; KRAUTH, 2015; SULKOWSKI et al., 2014; ZEUZEM et al., 2014). Todos foram incorporados ao mercado brasileiro com aprovação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o que permitiu aumento considerável nas taxas de cura da infecção.

Apesar disso, uma vacina profilática eficaz contra o vírus, a maneira mais custo-efetiva de controle de doenças infecciosas, ainda é indisponível. Uma vacina profilática para a hepatite C precisaria induzir imunidade tal capaz de prevenir a infecção contra 7 genótipos do HCV, genética e antigenicamente distintos entre si que circulam no mundo todo (DRUMMER, 2014).

## 1.2 Infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV)

### 1.2.1 O agente viral e epidemiologia

O HIV é um retrovírus pertencente à família *Retroviridae* e o agente etiológico da síndrome da imunodeficiência adquirida (*Acquired Immune Deficiency Syndrome* - AIDS). O vírus foi primeiramente isolado e identificado em 1983, no Instituto Pasteur, em Paris - França (WHO, 2016). Existem até o momento 2 tipos de HIV descritos: HIV tipo 1 (HIV-1) e HIV tipo 2 (HIV-2). O HIV-1 é mais prevalente e patogênico que HIV-2, e é responsável pela grande maioria das infecções (DEEKS et al., 2015). Uma característica do HIV é o seu alto grau de variabilidade em função da grande capacidade mutagênica do vírus, na ordem de uma mutação em cada evento de replicação. Essa grande variabilidade do vírus é o principal desafio para o desenvolvimento de vacina preventiva eficaz (DEEKS et al., 2015).

Desde o começo da epidemia, quase 78 milhões de pessoas foram infectadas com o HIV e cerca de 39 milhões morreram em decorrência das complicações associadas à AIDS. Globalmente, 35 milhões de pessoas viviam com HIV até o final de 2013. Estima-se que cerca de 0,8% dos adultos entre 15-49 anos no mundo estejam infectados com HIV (WHO, 2016). No Brasil, foram notificados no SINAN, de 2007 até junho de 2015, 93.260 casos de infecção pelo HIV, principalmente nas regiões Sudeste (58,1%) e Sul (20,8%) (BRASIL, 2015).

### 1.2.2 Vias de transmissão

Similar à transmissão do HCV, a exposição parenteral a sangue contaminado por meio do uso de drogas intravenosas e/ou por múltiplas transfusões de sangue tem sido considerados como um dos principais meios de transmissão do HIV (ROTMAN; LIANG, 2009). Adicionalmente, a transmissão sexual é igualmente importante, além da transmissão de mãe para filho, durante a gestação, nascimento ou aleitamento materno (WHO, 2016).

### 1.2.3 História natural da infecção

O principal alvo do HIV são linfócitos T CD4<sup>+</sup> ativados via molécula CD4 e receptores de quimiocinas - CCR5 ou CXCR4. Outras células que expressam tais moléculas podem também ser infectadas, incluindo linfócitos T CD4<sup>+</sup> virgens, monócitos, macrófagos e CD (MAARTENS; CELUM; LEWIN, 2014). Após o estabelecimento da infecção nos tecidos de mucosa, dentro de dias o vírus se propaga para os órgãos linfoides. Cerca de 10 dias após a infecção, o vírus é detectado no sangue e continua a se replicar ao longo das próximas semanas, atingindo pico em 30 dias de infecção, período em que os anticorpos anti-HIV se tornam detectáveis. O sistema imune controla parcialmente a infecção e a replicação viral permanece relativamente estável, frequentemente por anos. Essa fase da infecção é chamada de período de latência, e é caracterizada por perda progressiva de linfócitos T CD4<sup>+</sup> nos órgãos linfoides e pela ausência de vírus detectável no plasma.

Após muitos anos, tem-se o estabelecimento de profunda imunodeficiência e inflamação crônica, tornando o indivíduo altamente susceptível à infecções oportunistas e/ou complicações oncológicas, o que caracteriza a AIDS. Tipicamente, os pacientes infectados progridem para a morte em período maior de 10 anos na ausência de tratamento, no entanto, alguns progridem rapidamente e em alguns casos raros, progridem muito lentamente ou não evoluem para AIDS (DEEKS et al., 2015; MAARTENS; CELUM; LEWIN, 2014).

### 1.2.4 Resposta imune contra o HIV e mecanismos de evasão viral

O HIV induz as respostas imunes inata e adaptativa do hospedeiro de forma similar ao HCV. Na resposta imune inata, tem-se a ativação de CD plasmocitoides, mieloides e células NK. As CD plasmocitoides secretam IFN tipo I e as CD mieloides capturam as partículas virais nos tecidos de mucosa e os transportam aos linfonodos drenantes, apresentando-o aos linfócitos T, desencadeando a resposta imune adaptativa celular (CTL e linfócitos T CD4<sup>+</sup> auxiliares) e humoral (produção de anticorpos). Ambos as células NK da resposta imune inata e os CTL da resposta imune adaptativa agem eliminando células infectadas pelo HIV por meio da secreção de moléculas citotóxicas e/ou indução de apoptose por expressão de TRAIL, além de secretar IFN tipo II. Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> auxiliares são importantes para a



maturação de linfócitos B na produção de anticorpos e para a manutenção de CTL. Os anticorpos que se ligam às partículas virais livres têm o potencial de neutralizá-las (MCMICHAEL; DORRELL, 2009).

Muitos mecanismos estão associados com a falha da resposta imune do hospedeiro em eliminar e/ou conter a infecção pelo HIV. O HIV é um vírus que estabelece infecção latente em linfócitos T CD4<sup>+</sup> auxiliares, de forma que as proteínas virais não são processadas e apresentadas aos CTL e, portanto, as células infectadas não são destruídas pelo sistema imune (MCMICHAEL; DORRELL, 2009). Os anticorpos produzidos em resposta ao HIV que neutralizam a partícula viral são produzidos por cerca de 20% dos pacientes. Entretanto, mutações rapidamente emergem e tais cepas virais passam a não serem mais reconhecidas pelos anticorpos neutralizantes que foram produzidos em resposta às cepas originais (MAARTENS; CELUM; LEWIN, 2014; MCMICHAEL; DORRELL, 2009).

Em quase todos os indivíduos infectados, tem-se o surgimento de exaustão progressiva de linfócitos T HIV-específicos, em função da alta expressão de receptores inibidores como PD-1 em tais células, o que leva conseqüentemente à perda das funções efectoras (MAARTENS; CELUM; LEWIN, 2014). Além disso, o escape viral à resposta de CTL pode ocorrer virtualmente em qualquer estágio da infecção. Variações em um único aminoácido que compõe os epítopos reconhecidos por CTL podem ser suficientes para que as células infectadas com o vírus deixem de ser reconhecidas e eliminadas. A inibição da expressão de moléculas que apresentam antígenos, como as moléculas HLA de classe I nas células infectadas, também é um mecanismo de escape do HIV (MCMICHAEL; DORRELL, 2009).

### 1.2.5 Tratamento e vacinação

Não existe cura para a infecção pelo HIV. Entretanto, a história natural da infecção vem sendo alterada consideravelmente pela disponibilidade de terapia antirretroviral altamente ativa (*Highly active antiretroviral therapy* - HAART) capaz de controlar a replicação do vírus e permitir que o sistema imune dos pacientes se fortaleça e recupere a capacidade de combater infecções. Na HAART, o HIV pode ser suprimido pela combinação de três ou mais drogas antirretrovirais (WHO, 2016), diminuindo a carga viral e recuperando

os linfócitos T CD4<sup>+</sup> circulantes em proporção que varia de indivíduo para indivíduo. Entretanto, a recuperação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> do trato gastrointestinal é limitada. Com a redução do RNA viral e antígenos virais, o número de linfócitos T HIV-específicos decai enquanto que a resposta de anticorpos persiste em todos os pacientes (MAARTENS; CELUM; LEWIN, 2014).

O desenvolvimento de vacina efetiva e preventiva contra o HIV é ainda um grande desafio por inúmeras razões, mas principalmente pela grande diversidade genética do vírus (MAARTENS; CELUM; LEWIN, 2014).

## **1.3 Coinfecção HIV/HCV**

### **1.3.1 Epidemiologia**

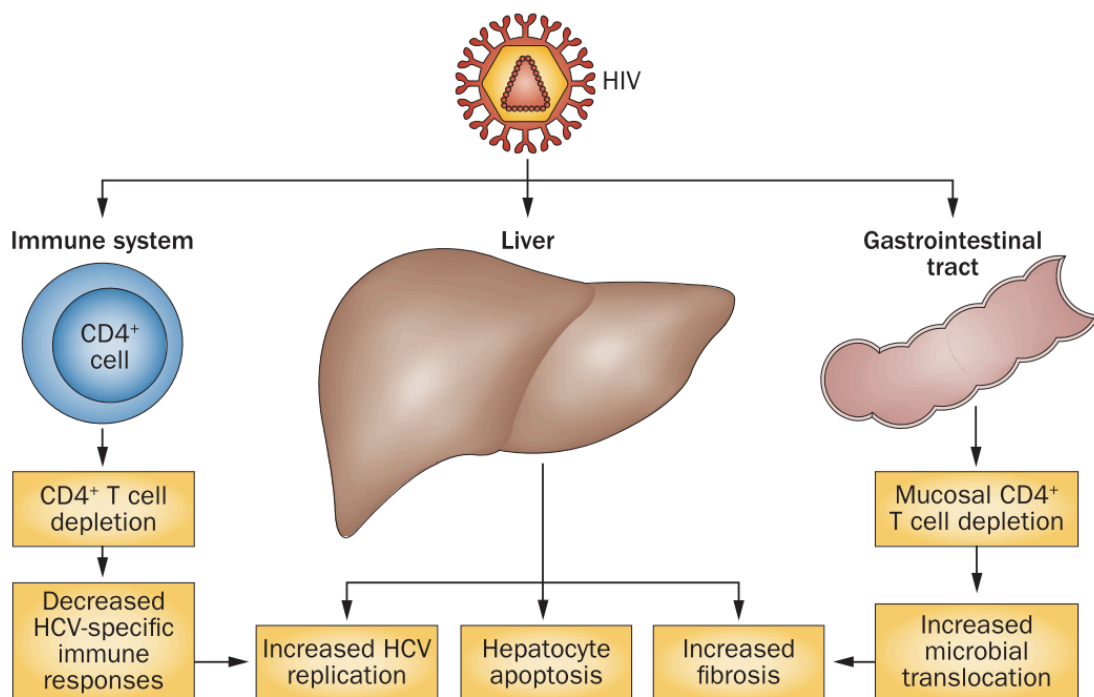
A prevalência da infecção pelo HIV dentre os infectados pelo HCV é alta, principalmente porque tais vírus possuem similar rota de transmissão (DI MARTINO et al., 2001). Estima-se que, globalmente, 2,3 milhões de indivíduos infectados com HCV sejam também portadores do HIV (WHO, 2016), dos quais, 1,3 milhões são pessoas usuárias de drogas injetáveis.

### **1.3.2 Impacto do HIV na história natural da hepatite C**

A coinfecção HCV-HIV é associada com maior mortalidade em comparação à monoinfecção de ambos os vírus (ROTMAN; LIANG, 2009), sendo marcada pelo impacto significativamente negativo do HIV no curso natural da infecção pelo HCV (KUEHLKAMP; SCHUELTER-TREVISOL, 2013). O HIV determina progressão mais rápida da fibrose hepática em indivíduos infectados pelo HCV, aumentando as taxas de viremia, diminuindo a probabilidade de alcance da RVS ao tratamento à base de IFN e aumentando em duas a três vezes o risco de desenvolvimento de cirrose e complicações associadas (BENHAMOU et al.,

1999; DI MARTINO et al., 2001; MARTIN-CARBONERO et al., 2009; SILVA; BARONE, 2006; THEIN et al., 2008).

O possível mecanismo que conduz ao aumento da replicação do HCV e aceleração da fibrose hepática observada nos pacientes coinfetados HCV-HIV é a supressão imune generalizada, resultante da perda de linfócitos T CD4<sup>+</sup> induzida pelo HIV (**Figura 2**) (ROTMAN; LIANG, 2009). A resposta imune celular contra o HCV desempenha papel essencial em prevenir a progressão da infecção aguda para cronicidade. Em pacientes com hepatite C aguda, essa resposta é consideravelmente diminuída, achado consistente com a maior taxa de progressão para cronicidade. Entretanto, em pacientes coinfetados com HIV, a resposta de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> parece ser ainda mais fraca, e não é restaurada mesmo quando as contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup> melhoram em resposta à HAART (ROTMAN; LIANG, 2009). Como consequência, a replicação do HCV nos hepatócitos é maior, favorecendo a progressão da doença.



**Figura 2.** A infecção pelo HIV prejudica a resposta imune contra o HCV e está associada à aceleração da fibrose hepática (CHEN; FEENEY; CHUNG, 2014).

Contudo, a supressão imunológica não explica completamente a rápida progressão da fibrose hepática em pacientes coinfetados HCV-HIV. Não existem evidências claras que o

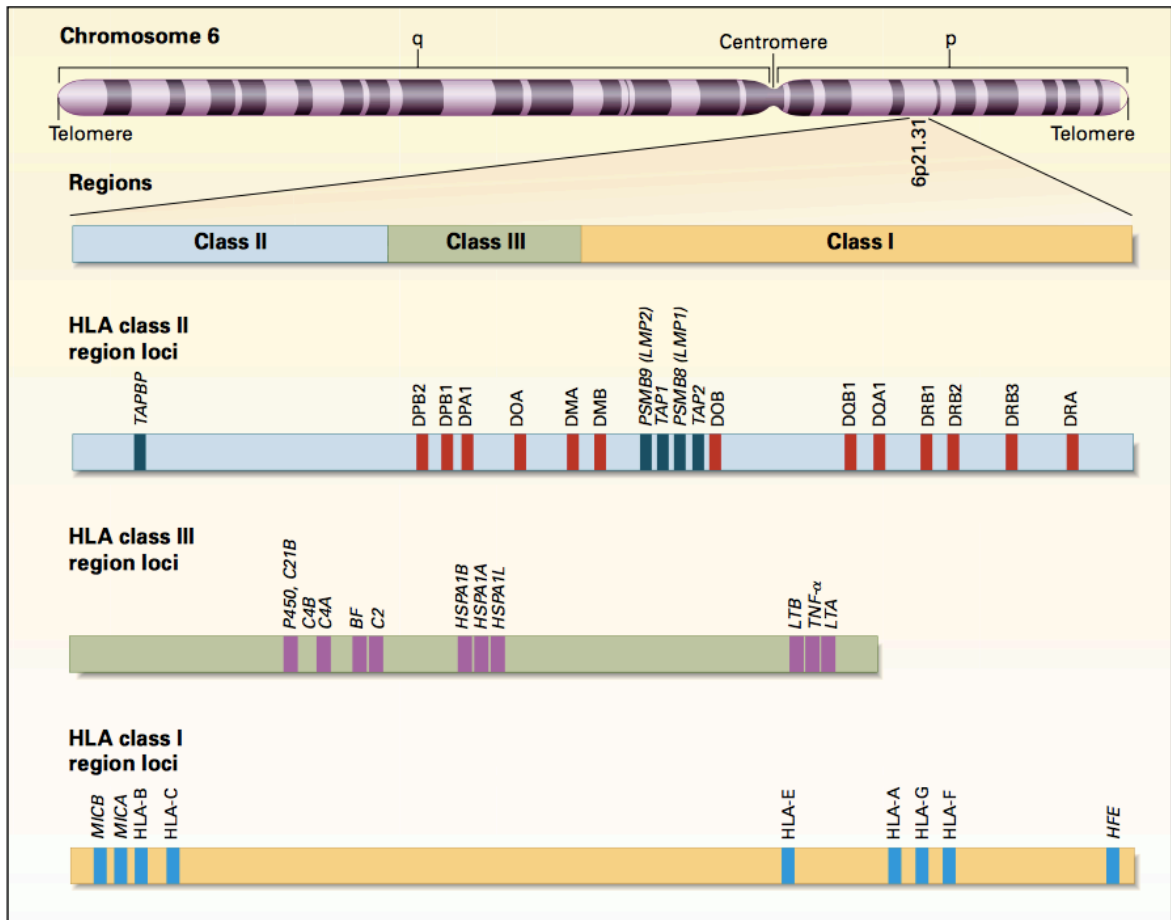
HIV infecta hepatócitos, uma vez que tais células não expressam CD4, mas pode influenciar o resultado da infecção pelo HCV pela exposição às proteínas virais circulantes, como a proteína de envelope viral gp120, capaz de agir sobre os hepatócitos e outras células do sistema imune por meio de sua interação com receptores de quimiocinas. A proteína gp120 induz apoptose de hepatócitos por meio do CXCR4 e pode induzir a expressão TGF- $\beta$  que é conhecido por ser pró-fibrótico (CHEN; FEENEY; CHUNG, 2014; ROTMAN; LIANG, 2009). Além disso, hepatócitos infectados com HCV expostos ao HIV apresentam aumento da expressão de TRAIL e receptores de morte celular 4 (*Death receptor 4* – DR4) e DR5 (CHEN; FEENEY; CHUNG, 2014).

A infecção pelo HIV em outras células hepáticas também pode auxiliar na progressão da doença em pacientes coinfectados. A infecção do HIV promove depleção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> do tecido linfoide associado ao intestino (*Gut Associated Lymphoid Tissue* - GALT) (**Figura 3**) o que pode aumentar a permeabilidade do intestino e, conseqüentemente, aumentar o conteúdo de lipopolissacarídeo (LPS) circulante, ativando cronicamente as células do sistema imunológico e as células estreladas hepáticas (*hepatic stellate cells* - HSC), as principais indutoras da deposição de colágeno e fibrogênese do fígado (CHEN; FEENEY; CHUNG, 2014; ROTMAN; LIANG, 2009). Em pacientes coinfectados HCV-HIV, os níveis de LPS são fortemente associados com o desenvolvimento de cirrose (CHEN; FEENEY; CHUNG, 2014).

#### 1.4 Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC)

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex* - MHC), na espécie humana, recebe a denominação sistema HLA (KLEIN; SATO, 2000) (**Figura 3**). Esses genes codificam moléculas importantes na indução ou regulação da resposta imune (HOWELL; CARTER; CLARK, 2010). São agrupados em classe I, II e III, de acordo com as suas localizações no braço curto do cromossomo 6 (6p21.3) (DONADI, 2000; HOWELL; CARTER; CLARK, 2010) e são classificados em clássicos e não-clássicos, de acordo com suas funções biológicas. As moléculas de classe I clássicas (HLA-A, -B e -C) estão envolvidas na apresentação de peptídeos aos linfócitos T, ao passo que as não clássicas

de classe I (HLA-E, -F e -G) estão, primordialmente, associadas com modulação da resposta imune, sendo a molécula HLA-G a mais bem estudada (DONADI et al., 2011).



**Figura 3.** Organização e localização do complexo HLA no cromossomo 6 humano (KLEIN; SATO, 2000).

### 1.4.1 Antígeno Leucocitário Humano G (HLA-G)

#### 1.4.1.1 O gene e a molécula

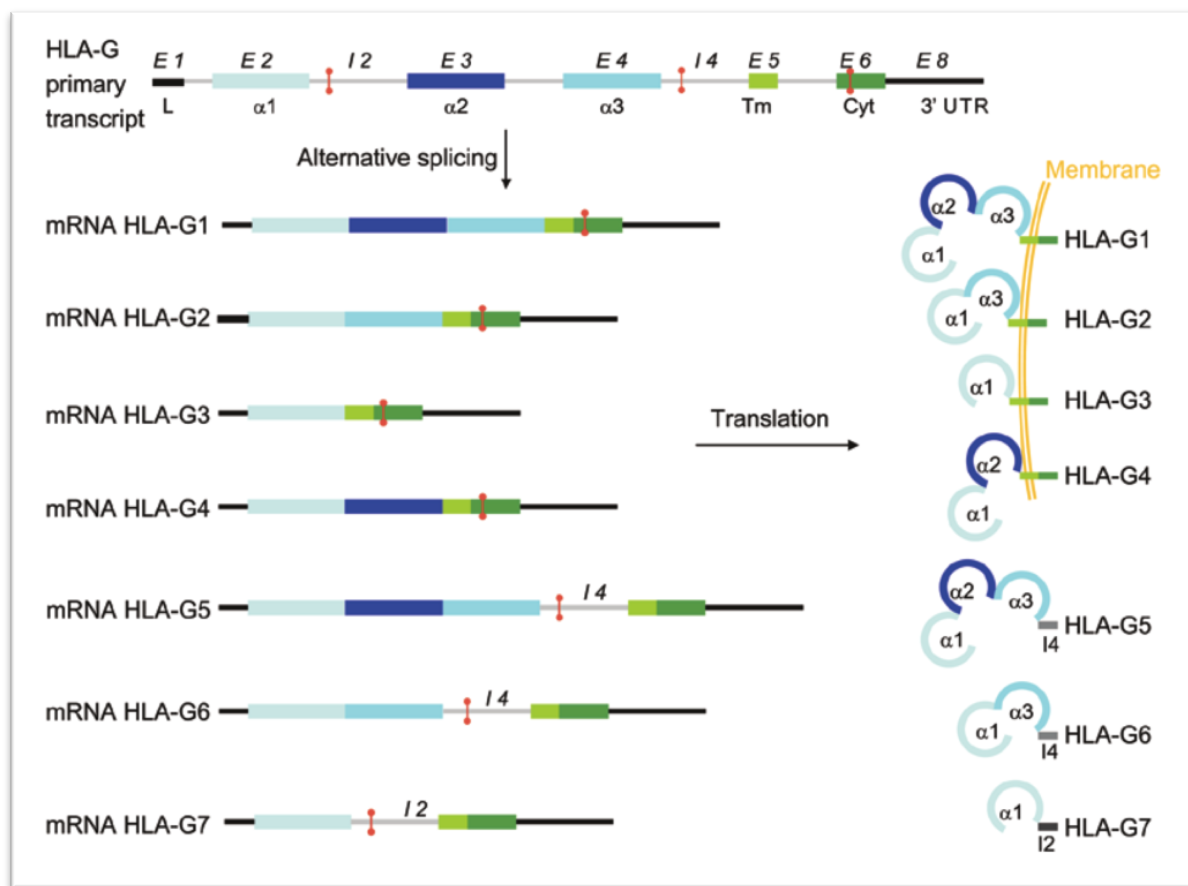
O HLA-G foi descrita primeiramente por Geraghty e colaboradores, em 1987 (GERAGHTY; KOLLER; ORR, 1987). Apesar de a molécula HLA-G compartilhar similaridades estruturais com as moléculas HLA de classe I clássicas, diferenças importantes podem ser destacadas. Os genes *HLA* de classe I clássicos são altamente polimórficos e

amplamente expressos, ao passo que o gene *HLA-G* é pouco polimórfico e a sua expressão fisiológica é restrita a determinados tecidos, sendo a molécula expressa principalmente por trofoblastos na interface materno-fetal (KOVATS et al., 1990), o que sugere papel importante na tolerância materna.

Além da sua expressão em trofoblastos, a expressão fisiológica do HLA-G é detectada em tecidos imunoprivilegiados de adultos, tais como o timo (LEFEBVRE et al., 2000), córnea (LE DISCORDE et al., 2003) e precursores eritroides e endoteliais (MENIER et al., 2004). A Molécula HLA-G solúvel (sHLA-G) é detectável no soro/plasma e é produzida, principalmente, por monócitos (REBMANN et al., 2003). A expressão não fisiológica do HLA-G pode ocorrer em doenças inflamatórias, virais, cânceres e transplantes (CURIGLIANO et al., 2013; GONZÁLEZ et al., 2012).

A edição alternativa do transcrito primário do *HLA-G* somado à associação diferencial com beta-2-microglobulina ( $\beta 2m$ ) gera pelo menos sete isoformas proteicas, das quais, quatro são ligadas às membranas celulares (HLA-G1, -G2, -G3, -G4) e três são solúveis devida à falta de domínio transmembrânico (HLA-G5, -G6 e -G7) (**Figura 4**) (DONADI et al., 2011). Tais isoformas se diferenciam ainda pelo número de domínios globulares e pela presença ou ausência de sequências intrônicas. As isoformas HLA-G1 de membrana e HLA-G5 possuem estrutura extracelular idêntica às moléculas HLA clássicas de classe I, isto é, uma cadeia pesada formada por três domínios, ligada de forma não covalente à molécula  $\beta 2m$  e um peptídeo, embora tais isoformas possam ser encontradas como cadeias pesadas livres (CAROSELLA et al., 2015).

Os três domínios  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$  são codificados pelos éxons 2, 3 e 4 respectivamente. O domínio transmembrânico é codificado pelo éxon 5, e a cauda citoplasmática curta é codificada pelo éxon 6. Além disso, o éxon 1 codifica o peptídeo líder, o éxon 7 não é transcrito e o éxon 8 corresponde à região 3' não traduzida do gene (3' *untranslated region* - 3'UTR) (**Figura 4**) (GONZÁLEZ et al., 2012).



**Figura 4.** A edição alternativa do transcrito primário do gene *HLA-G* resulta em 7 isoformas diferentes da molécula. Éxon (E), peptídeo líder (L), domínio transmembrânico (Tm), domínio citoplasmático (Cyt). As linhas vermelhas indicam a presença de códon de parada de transcrição em regiões intrônicas (GONZÁLEZ et al., 2012).

Além disso, a proteína HLA-G possui resíduos de cisteína, um no domínio  $\alpha 1$  (Cys42) e outro no domínio  $\alpha 2$  (Cys147), que permitem a formação de pontes dissulfeto intermoleculares dando origem à moléculas diméricas ou triméricas, permitindo a ligação aos seus receptores específicos com maior afinidade e menor taxa de dissociação (BOYSON et al., 2002; GONZÁLEZ et al., 2012; SHIROISHI et al., 2006).

A molécula HLA-G também difere em relação às moléculas HLA de classe I clássicas no que diz respeito à ligação aos seus receptores. Apesar de a molécula HLA-G não engajar com o receptor de células T (TCR), liga-se a receptores leucocitários inibidores para exercer suas funções (GONZÁLEZ et al., 2012), como os receptores transcrito tipo imunoglobulina 2 (*immunoglobulin-like transcript 2* – *ILT-2*) (LILRB1/CD85j) e *ILT-4* (LILRB2/CD85d) e receptor tipo imunoglobulina de células assassinas 2DL4 (*Killer Cell Immunoglobulin-like*

*Receptors* - KIR2DL4) (CD158d), que são diferencialmente expressos em células imunes (ALEGRE et al., 2014).

Enquanto o receptor ILT2 é expresso por células NK, linfócitos, CD e macrófagos, o receptor ILT4 é restrito às células mieloides – monócitos, macrófagos e CD. Ambos os receptores são capazes de interagir com outras moléculas HLA clássicas, entretanto, a afinidade com a molécula HLA-G é superior (DONADI et al., 2011). O receptor KIR2DL4, por outro lado, é expresso em todos os tipos de células NK (FAURE; LONG, 2002; RAJAGOPALAN; LONG, 1999) e em alguns linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Diferente dos receptores ILT4 e ILT2, a molécula HLA-G é o único ligante do receptor KIR2DL4 (GONZÁLEZ et al., 2012).

#### 1.4.1.2 Funções imunotolerantes da molécula HLA-G

Diferente das moléculas HLA de classe I clássicas que exercem importante papel na indução de resposta imune adaptativa, mediante apresentação de peptídeos antigênicos aos linfócitos T, a molécula HLA-G tem sido identificada como mediador chave na tolerância imunológica, induzindo estímulo inibitório sobre diferentes células do sistema imune (CAROSELLA; DAUSSET; ROUAS-FREISS, 1999). A apresentação de peptídeos antigênicos aos linfócitos T não parece ser função importante da molécula HLA-G, uma vez que a mesma apresenta uma fenda de ligação à peptídeos pouco polimórfica e repertório de peptídeos limitado (CASTELLI et al., 2014a; DONADI et al., 2011). Em contrapartida, a mesma é capaz de exercer suas funções de inibição imunológica diretamente através da inibição/bloqueio de células efectoras ou de forma indireta através da geração de células reguladoras (GONZÁLEZ et al., 2012).

Dentre as funções imunossupressoras diretas, destaca-se a capacidade da molécula HLA-G de inibir as respostas aloproliferativas de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e inibir a atividade citotóxica/proliferação de CTL CD8<sup>+</sup> e células NK, protegendo a célula-alvo da citotoxicidade (CURIGLIANO et al., 2013; GONZÁLEZ et al., 2012; LE GAL et al., 1999; PAZMANY et al., 1996; ROUAS-FREISS et al., 1997). A molécula HLA-G ainda inibe a função e maturação de APCs (CURIGLIANO et al., 2013; GONZÁLEZ et al., 2012; HORUZSKO et al., 2001; LIANG; HORUZSKO, 2003). A interação de sHLA-G com a



molécula CD8 sem envolvimento de TCR desencadeia apoptose de CTL e células NK que expressam CD8<sup>+</sup> pela indução da expressão de ligante Fas (FasL) (CONTINI et al., 2003; PUPPO et al., 2002). A isoforma HLA-G-5 inibe a proliferação, diferenciação e produção de imunoglobulinas por linfócitos B (NAJI et al., 2014).

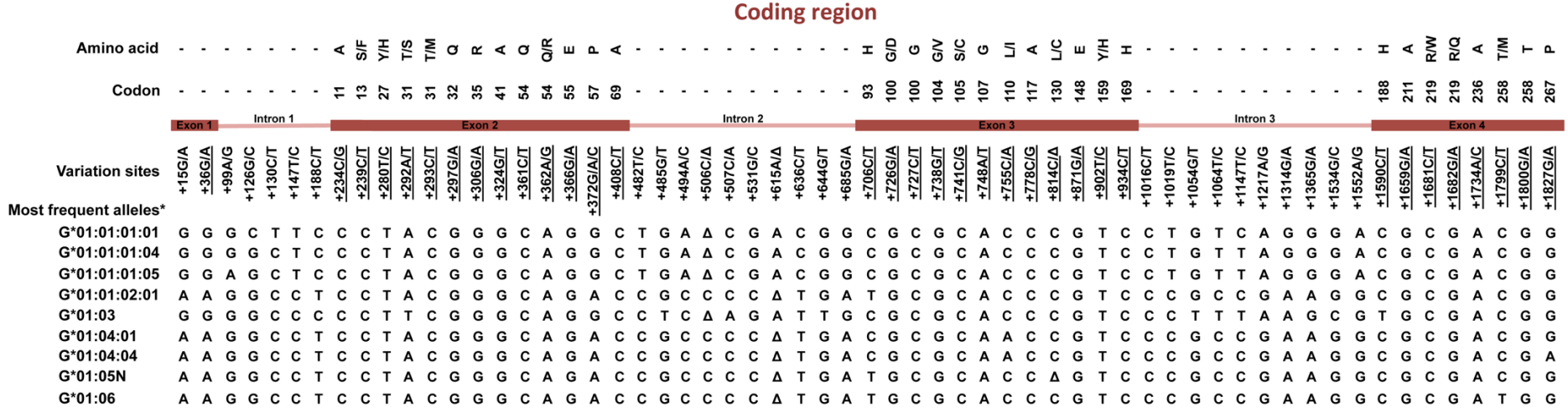
A molécula HLA-G possui funções tolerogênicas indiretas por meio da geração de células T reguladoras, células capazes de inibir outras células T (CURIGLIANO et al., 2013; GONZÁLEZ et al., 2012). APCs como CD que expressam IL-10 e HLA-G podem não apenas induzir anergia e perda da capacidade responsiva de linfócitos T frente à estimulação antigênica, como também induzir a diferenciação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> *naïve* em células T reguladoras, contribuindo para a supressão da resposta imune (GREGORI et al., 2010; LEMAOULT; ROUAS-FREISS; CAROSELLA, 2005; LEMAOULT et al., 2004; RISTICH et al., 2005). Uma vez formadas, células T reguladoras induzidas por HLA-G se tornam independentes de tal molécula para a execução de suas funções, motivo pelo qual tal função da molécula HLA-G é conhecida como mecanismo de supressão imune de longo prazo (LEMAOULT et al., 2007). Células T e NK ativadas também podem se comportar como células supressoras depois de receber membranas celulares contendo HLA-G durante o contato intercelular, um mecanismo conhecido como trogocitose (CAUMARTIN et al., 2007; LEMAOULT et al., 2007).

Em função de suas propriedades imunotolerantes, a expressão não-fisiológica da molécula HLA-G tem sido associada com tolerância imunológica (doenças inflamatórias, autoimunes e transplantes) e escape imune (doenças infecciosas e tumorais) (AMODIO; SALES DE ALBUQUERQUE; GREGORI, 2014).

#### 1.4.1.3 Nomenclatura e polimorfismos do gene *HLA-G*

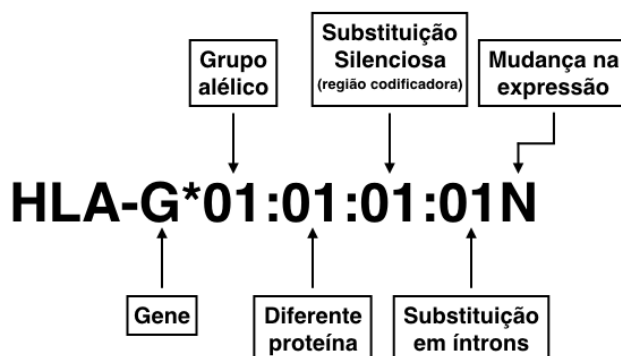
O gene *HLA-G* é dividido em região codificadora e regiões reguladoras. As regiões reguladoras do gene, tais como a região promotora 5' (*5' upstream regulatory region - 5'URR*) e a 3'UTR são compostas por importantes polimorfismos capazes de alterar a afinidade do gene por fatores de transcrição e microRNAs (miRNAs), respectivamente (CASTELLI et al., 2011; DONADI et al., 2011). Em contraste aos genes HLA clássicos, a região codificadora do gene *HLA-G* exibe poucos sítios polimórficos quando observados em

populações mundiais. Análises baseadas nas sequências nucleotídicas do projeto *1000Genomes* (CASTELLI et al., 2014b) revelaram a presença de 81 sítios polimórficos na região codificadora, contudo, esses estão localizados principalmente em regiões intrônicas ou em regiões exônicas como modificações sinônimas. Nas regiões exônicas, os polimorfismos do gene *HLA-G* se distribuem ao longo dos domínios  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$  (**Figura 5**), ao passo que nos genes HLA clássicos, o elevado número de polimorfismos se concentra principalmente nas regiões que codificam a fenda de ligação aos peptídeos, isto é, domínios  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  (CASTELLI et al., 2014b; DONADI et al., 2011).



**Figura 5.** Sítios de variabilidade observados entre o éxon 1 e o éxon 4 da região codificadora do gene *HLA-G*. \*Alelos que apresentam frequência mundial acima de 1%. Aminoácidos: A, Alanina; S, Serina; F, Fenilalanina; Y, Tirosina; T, Treonina; M, Metionina; Q, Glutamina; R, Arginina; E, Ácido glutâmico; P, Prolina; H, Histidina; G, Glicina; D, Ácido aspártico; V, Valina; C, Cisteína; L, Leucina; I, Isoleucina; W, Triptofano. Δ, deleção (DIAS et al., 2015).

A nomenclatura oficial dos diferentes alelos do gene *HLA-G* segue a padronização apresentada pelo *WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System* ([www.hla.alleles.org/](http://www.hla.alleles.org/)) (TORRES; MORAES, 2011). De acordo com tal padronização, a nomenclatura dos alelos pode ser composta de quatro, seis ou oito dígitos (**Figura 6**).



**Figura 6.** Nomenclatura padronizada do gene *HLA-G* de acordo com o *WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System*.

Os dois primeiros dígitos referem-se à família do alelo, e o terceiro e o quarto dígitos referem-se à existência de modificações nucleotídicas não sinônimas, que modifica a sequência de aminoácidos da proteína codificada (ex: *HLA-G\*01:01* e *HLA-G\*01:02*). Já os alelos que possuem variações silenciosas (sinônimas) na sequência codificadora, são diferenciados pela presença do quinto e sexto dígitos (ex: *HLA-G\*01:04:01* e *HLA-G\*01:04:04*). O sétimo e oitavo dígitos são utilizados para distinguir sequências nucleotídicas observadas em regiões intrônicas (ex: *HLA-G\*01:01:01:04* e *HLA-G\*01:01:01:05*). É possível a presença de uma letra ao final, que denota mudança no padrão de expressão do gene, como a letra N, que indica ausência de expressão (ex: *HLA-G\*01:05N*) (DONADI et al., 2011; TORRES; MORAES, 2011).

Até o momento, 51 alelos do gene *HLA-G* foram oficialmente reconhecidos pelo IMGT/HLA (*International ImMunoGeneTics Information System*®, disponível em <http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/> versão 3.24.0 liberada dia 15/04/16). Desses 51 alelos, são reconhecidas 19 proteínas funcionais diferentes e duas proteínas truncadas, entretanto, apenas 10 alelos possuem frequência mundial maior que 1%, que são os alelos *HLA-G\*01:01:01:01*, *G\*01:01:01:04*, *G\*01:01:01:05*, *G\*01:01:02:01*, *G\*01:01:03:03*, *G\*01:03:01:02*, *G\*01:04:01*, *G\*01:04:04*, *G\*01:06* e *G\*01:05N*. Um outro alelo frequentemente encontrado

ainda não reconhecido oficialmente pelo IMGT/HLA é similar ao alelo HLA-G\*01:01:01:01 mas possui uma substituição nucleotídica na posição +2412 (CASTELLI et al., 2014b). A partir desses 11 alelos, 5 proteínas diferentes são codificadas, 4 funcionais (G\*01:01, G\*01:03, G\*01:04, G\*01:06) e uma truncada (G\*01:05N) (CASTELLI et al., 2011, 2014b).

As sequências exônicas do gene *HLA-G* codificam resíduos importantes para a dimerização da molécula, produção de isoformas, interação com seus receptores e exercício de suas funções efetoras (CASTELLI et al., 2014a). Com isso, sítios polimórficos não-sinônimos nos éxons 2 e 4, que codificam os domínios  $\alpha 1$  e  $\alpha 3$  da molécula HLA-G, respectivamente, podem influenciar a interação da molécula com seus receptores. Portanto, polimorfismos na região codificadora podem produzir mudanças conformacionais na molécula HLA-G, que, por sua vez, poderão impactar diretamente nas características e funções biológicas de modulação da resposta imune da mesma (DONADI et al., 2011).

Adicionalmente, pouco se sabe a cerca do impacto dos alelos *HLA-G* na magnitude da expressão da molécula. Especula-se a possibilidade de que regiões intrônicas e exônicas do gene possam regular a expressão da molécula por mecanismos pré-transcricionais (afinidade por fatores de transcrição e elementos regulatórios) ou pós-transcricionais (edição alternativa), entretanto, esse aspecto ainda não foi estudado (CASTELLI et al., 2014a).

#### 1.4.1.4 HLA-G e infecção pelo vírus da hepatite C

Até o presente momento, estudos que investiguem o papel da molécula e/ou do gene *HLA-G* na hepatite C são escassos, e por vezes, controversos. Um estudo demonstrou aumento de sHLA-G em pacientes com hepatite C crônica, quando comparados a indivíduos controles. Tal aumento foi ainda acompanhado de elevação dos níveis de IL-10 e IFN- $\gamma$ . (WENG et al., 2011). Em outro estudo, os níveis de expressão do RNA mensageiro (mRNA) do *HLA-G* e *IL-10*, assim como sHLA-G, estavam elevados em pacientes com hepatite C crônica que responderam ao tratamento com PegIFN- $\alpha$ -2a e RBV, em comparação com pacientes não responsivos, sugerindo importante papel da molécula na resposta ao tratamento anti-HCV (KHORRAMI et al., 2015).

A expressão da molécula em biópsias de fígado infectados com HCV já foi demonstrada. Um estudo demonstrou expressão hepática de HLA-G em pacientes com

hepatite C nos estágios mais leves da doença, em comparação aos estágios moderado e grave (DE OLIVEIRA CRISPIM et al., 2012). No entanto, em outro trabalho, verificou-se expressão de HLA-G em biópsias de pacientes infectados pelo HCV, principalmente próximas à áreas de fibrose hepática (AMIOT et al., 2014).

Em relação aos polimorfismos do gene *HLA-G*, existem estudos que investigaram o papel de sítios polimórficos da 3'UTR na susceptibilidade à infecção pelo HCV em pacientes brasileiros com anemia falciforme (CORDERO et al., 2009), e susceptibilidade à infecção pelo HIV e ambos os vírus em pacientes brasileiros e italianos (DA SILVA et al., 2014). No entanto, até o presente momento, são escassos os estudos abordando a região codificadora e os diferentes alelos do gene *HLA-G* na infecção pelo HCV, em pacientes coinfectados ou não com HIV.

## **2 Justificativa**

---

Os vírus têm desenvolvido estratégias para evadir da resposta imune do hospedeiro, inibindo a expressão de moléculas HLA de classe I para impedir a lise por CTL e/ou induzindo a expressão da molécula HLA-G, protegendo as células infectadas da ação de CTL e células NK (CATAMO et al., 2014). A característica imunossupressora da molécula HLA-G tem sido utilizada para entender os mecanismos de modulação da resposta imune em diversas situações, incluindo infecções virais (CAROSELLA et al., 2015; DIAS et al., 2015; DONADI et al., 2011).

Não existem, até o momento, estudos avaliando a associação entre a molécula HLA-G e a região codificante do gene. Além disso, não existem estudos avaliando o possível envolvimento do HIV na magnitude da expressão hepática de HLA-G em pacientes infectados pelo HCV. Este é o primeiro trabalho avaliando a expressão hepática da molécula HLA-G não só em pacientes infectados pelo HCV, mas também pacientes coinfetados com HIV, a fim de detectar possível associação da expressão da molécula com variáveis clínico-demográficas e histológicas, bem como, com a diversidade genética do gene *HLA-G*.

As hipóteses levantadas neste trabalho são: i) a molécula HLA-G é expressa no fígado de pacientes acometidos pelo HCV que apresentam maior dano hepático e que apresentam fatores clínico-demográficos e histológicos associados ao pior prognóstico da doença; ii) na coinfeção HCV-HIV, a expressão hepática de HLA-G está aumentada, sendo que esse mecanismo adicional pelo qual o HIV impacta negativamente na história natural da infecção pelo HCV, acelerando as taxas de fibrose no fígado e iii) alelos *HLA-G* estão associados com expressão diferencial da molécula HLA-G no fígado.



## **3 Objetivos**

---

### 3.1 Objetivo geral

Investigar a participação do HLA-G no curso da hepatite C crônica, por meio da determinação do nível de expressão hepática da molécula e a variabilidade do gene *HLA-G* em pacientes com hepatite C coinfectados ou não com HIV.

### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar e comparar a magnitude da expressão hepática da molécula HLA-G em pacientes HCV e pacientes coinfectados HCV-HIV.
- Investigar possíveis associações entre a magnitude da expressão hepática da molécula nos dois grupos de pacientes com variáveis clínico-demográficas e histológicas, incluindo: idade, gênero, cor de pele, grau de fibrose hepática, atividade necroinflamatória no fígado e genótipo do HCV.
- Determinar e comparar a variabilidade da região codificadora do gene *HLA-G* em pacientes HCV, pacientes coinfectados HCV-HIV e indivíduos não infectados (controle).
- Investigar possíveis associações entre a magnitude de expressão hepática da molécula nos dois grupos de pacientes com os diferentes alelos do gene *HLA-G* encontrados.

## **4 Materiais e Métodos**

---

## 4.1 Considerações Éticas

Este estudo é parte do projeto intitulado "Influência da expressão da molécula imunoreguladora HLA-G na infecção pelo vírus da hepatite C e na coinfeção com o vírus da imunodeficiência humana" coordenado pelo Prof. Dr. Eduardo Antônio Donadi, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP) em 12 de maio de 2014 (Processo HCRP nº6102/2013) (**ANEXO I**).

## 4.2 Casuística

O estudo foi realizado utilizando amostras biológicas (biópsias de fígado e DNA) de uma coorte de 351 pacientes com hepatite C crônica, sendo 216 mono infectados e 135 coinfectados com HIV. As biópsias de fígado foram provenientes do acervo do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Os DNAs foram provenientes de um biorrepositório do Departamento de Clínica Médica da Divisão de Gastroenterologia do HC-FMRP-USP, sob responsabilidade da Profa. Dra. Ana de Lourdes Candolo Martinelli, localizado no laboratório multiusuário de Biologia Molecular (protocolo 3416/2003, aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP-USP) (**ANEXO II**). Por este motivo, o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para o presente estudo foi dispensado uma vez que se trata de estudo retrospectivo no qual, tanto os DNAs quanto as biópsias hepáticas utilizadas, já possuem consentimento prévio para o biorrepositório. Paralelamente, foram utilizadas dez biópsias hepáticas obtidas de necrópsia de doadores de órgãos sólidos, não infectados por HIV ou HCV, que faleceram decorrência de morte violenta. Ainda, foram utilizadas 152 amostras de DNA de indivíduos doadores de sangue, selecionados aleatoriamente e obtidos no Hemocentro de Ribeirão Preto-SP, que também apresentam resultados sorológicos negativos para as infecções por HCV e HIV.

A infecção pelo HCV, HIV ou ambos foi avaliada pela presença de anticorpos anti-HCV e anti-HIV no plasma, sendo confirmada por reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR). Esses pacientes foram seguidos ou estão em

acompanhamento no Ambulatório de Hepatites do HC-FMRP-USP. A rotina de acompanhamento clínico desses pacientes prevê a determinação da carga viral no plasma periodicamente e tipificação molecular dos vírus.

Foram selecionadas amostras biológicas de pacientes incluídos na faixa etária entre 18 e 60 anos, independente de gênero, raça, classe social e crença religiosa. A infecção pelo vírus da hepatite B foi considerada como critério de exclusão. Os dados demográficos, clínicos e laboratoriais dos pacientes foram obtidos através de informações registradas nos prontuários médicos do HC-FMRP-USP.

### 4.3 Expressão proteica de HLA-G em biópsias hepáticas

A avaliação da expressão hepática da molécula HLA-G foi realizada em espécimes de fígado incluídos em blocos de parafina, utilizando a técnica de imunistoquímica. As reações foram realizadas no laboratório de Patologia Celular, coordenado pelos docentes Dr. Fernando Silva Ramalho e Dra. Leandra Náira Zambelli Ramalho, do Departamento de Patologia da FMRP-USP. Cortes de quatro micrômetros de espessura foram feitos nos tecidos parafinados e montados em lâminas pré-tratadas com Poli L-lisina.

As lâminas foram submetidas a banhos consecutivos de xilol e álcool (Synth-Diadema, SP) para a completa desparafinização e posterior hidratação. Para a recuperação antigênica, os cortes foram imersos em solução de citrato 10mM (pH 6,0) e submetidos à fervura em panela a vapor, durante 40 minutos a 95°C.

Posteriormente, seguia-se o bloqueio da peroxidase endógena, tratando as lâminas com dois banhos consecutivos de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol (v/v), por 30 minutos, à temperatura ambiente. Para o bloqueio de reações inespecíficas, as lâminas foram lavadas em PBS por três vezes, 5 minutos cada lavagem, e incubadas em solução PBS e leite desnatado 1% (leite Mólico, Nestlé), por 40 minutos.

As lâminas foram incubadas em temperatura ambiente e em câmara úmida *overnight*, com o anticorpo primário monoclonal anti-HLA-G HLA-MEM/G-02 (EXBIO Antibodies, Republica Tcheca), que reconhece todas as isoformas da molécula HLA-G, na diluição 1:50.

Após esse período, realizaram-se lavagens consecutivas e posterior incubação das lâminas com o anticorpo secundário do sistema de detecção REVEAL Biotin-Free System (Spring Bioscience, CA, USA) por 30 minutos à temperatura ambiente. Após lavagens consecutivas com PBS, procedeu-se à revelação da reação, utilizando-se o substrato revelador 3,3 diaminobenzidina (DAB) (Betazoid DAB Chromogen Kit – Biocare Medical, Concord, CA, USA) por 5 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, as reações foram interrompidas com água destilada e as lâminas coradas com Hematoxilina de Mayer por 60 segundos, à temperatura ambiente. Após serem lavadas com água destilada, as lâminas foram desidratadas em baterias de álcool e xilol, e montadas em Permount (Thermo Fisher Scientific, CA, USA).

Para controle positivo, foram utilizados cortes histológicos de citotrofoblasto humano do primeiro trimestre de gravidez (expressão constitutiva de HLA-G). Para controle do anticorpo secundário (controle negativo), foram utilizados cortes histológicos de trofoblasto humano, no qual o anticorpo primário (anti-HLA-G) foi substituído por PBS.

A leitura das reações foi realizada por meio da visualização microscópica pela prof. Dra. Leandra Náira Zambelli Ramalho. Quando presente, a expressão imunoistoquímica foi visualizada como uma marcação acastanhada. De acordo com a porcentagem de células marcadas, a imunorreatividade ao HLA-G foi estratificada em quatro categorias: marcação ausente (-); expressão leve, quando menos de 25% das células apresentavam positividade para a molécula HLA-G (1+); expressão moderada, 25 a 50% das células expressando HLA-G (2+) e expressão forte, quando mais de 50% das células expressaram a proteína HLA-G (3+).

#### 4.4 Tipificação do gene *HLA-G*

Para a tipificação da região codificadora do gene *HLA-G*, são necessárias duas amplificações diferentes. A primeira amplificação (PCR 1) gera um fragmento de 1.976 pares de bases (pb) desde o nucleotídeo -28 até o nucleotídeo +1908, permitindo analisar 66 polimorfismos. A segunda amplificação (PCR 2) gera um produto de 2.007 pb, desde o nucleotídeo +1548 até o nucleotídeo +3511, permitindo detectar outros 14 polimorfismos da região codificadora.

#### 4.4.1 Reação em Cadeia da Polimerase 1 (PCR 1)

A amplificação foi padronizada em volume final de 30µL, contendo as seguintes concentrações finais: aproximadamente 200ng de DNA genômico, 0,15U de Taq DNA polimerase (0,5U/µL, Platinum® Taq DNA Polymerase, Invitrogen, São Paulo, Brasil), 6,0mM de dNTPs (GE, Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido), 0,3mM de MgCl<sub>2</sub> (25mM, Invitrogen®), 1X de tampão de PCR (PCR long buffer 10X, Invitrogen®), 12pmol de cada *primer* - HG01R e HG01F (**Tabela 2**) e quantidade suficiente de água ultrapura para completar o volume final de 30µL (CASTELLI et al., 2010). Foi acrescentado um tubo correspondente ao controle negativo, substituindo-se o DNA por água ultrapura.

**Tabela 2.** *Primers* definidos para amplificação da região codificadora do gene *HLA-G*.

	<i>Primers</i>	<b>Sequência</b>
<b>PCR 1</b>	HG01R	5' - CACCACCGACCCTGTTAAAG - 3'
	HG01F	5' - TAAAGTCCTCGCTACCCAC - 3'
<b>PCR 2</b>	HGUT.R1	5' - TCTTCTGATAACACAGGAACTTC - 3'
	HLGEX4A	5' - CCATGAGAGATGCAAAGTGCT - 3'

As amostras foram levadas ao termociclador - Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), submetendo o DNA genômico a uma pré-incubação (desnaturação inicial) por três minutos a 94°C, seguido por 32 ciclos incluindo três passos: desnaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento dos *primers* a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por dois minutos e 25 segundos, e por fim uma extensão final a 72°C por cinco minutos.

#### 4.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase 2 (PCR 2)

A amplificação foi padronizada em volume final de 25µL, contendo as seguintes concentrações finais: aproximadamente 200ng de DNA genômico, 0,15U de Taq DNA

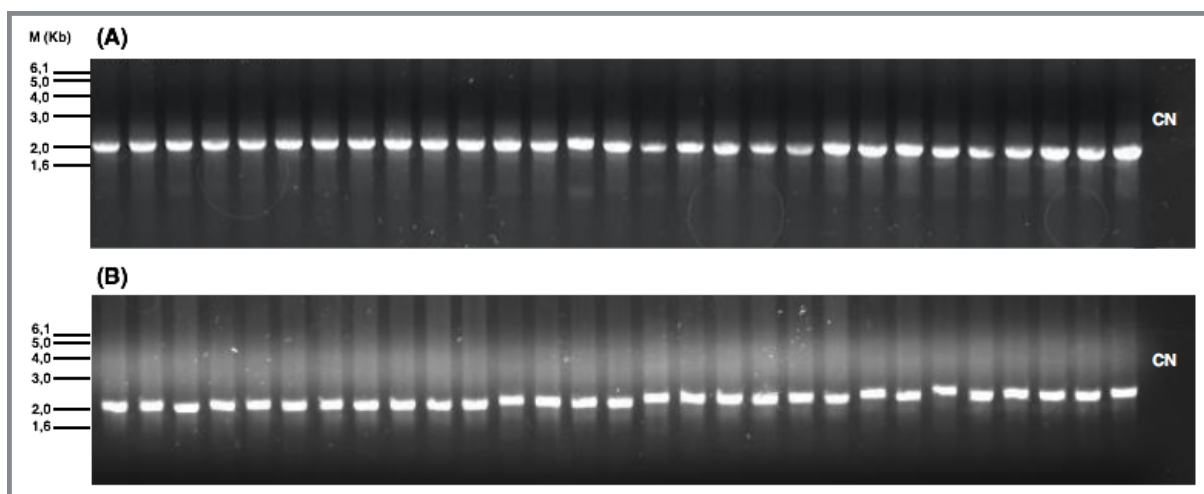
polimerase (0,5U/ $\mu$ L, Platinum®Taq DNA Polymerase, Invitrogen®), 5,0mM de dNTPs (GE, Healthcare), 1,5mM de MgCl<sub>2</sub> (50mM, Invitrogen®), 1X de tampão de PCR (Platinum® PCR buffer 10X, Invitrogen®); 12,5pmol de cada *primer* - HGUT.R1 e HLAGEX4A (**Tabela 2**) e quantidade suficiente de água ultrapura para completar o volume final de 25 $\mu$ L. Foi acrescentado um tubo correspondente ao controle negativo, substituindo-se o DNA por água ultrapura.

As amostras foram colocadas em termociclador - Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) e submetidas à desnaturação inicial a 94°C por três minutos e, em seguida, a 30 ciclos de: 95°C por 45 segundos, 57,5°C por 45 segundos e 72°C por dois minutos e 50 segundos; e um passo de extensão final a 72°C por sete minutos.

#### 4.4.3 Análise dos produtos de amplificação

Os produtos amplificados nas duas PCRs foram visualizados, utilizando eletroforese em gel de agarose 1%. Os geis foram feitos adicionando 100mL de tampão TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA) com 1g de agarose (UltraPure Agarose, Invitrogen®). Essa solução foi transferida para uma placa molde e, após a solidificação do gel, as placas foram encaixadas na cuba de eletroforese, contendo o mesmo tampão TAE 1X a temperatura ambiente. Cinco  $\mu$ L das amostras amplificadas foram aplicadas no gel e coradas com 1 $\mu$ L de corante fluorescente de ácidos nucleicos (GelRed® Nucleic Acid Gel Stain, Biotium Inc., CA, USA). No primeiro poço, foi colocado o padrão de peso molecular de 1000pb (O'GeneRuler™ 1kb DNA ladder Plus, Fermentas, Thermo Scientific®, MA, USA) para, posteriormente, ser comparado com as bandas amplificadas. A corrida eletroforética foi realizada durante uma hora e a fonte de eletroforese (Electrophoresis Power Supply – EPS 600, Biosciences, São Francisco, EUA) fixada na voltagem de 100V. O gel foi posteriormente exposto à luz ultravioleta em transiluminador e o registro foi digitalizado em sistema de fotodocumentação (EC3 Imaging System, UVP, USA) (**Figura 7**).





**Figura 7.** *Amplicons* obtidos na primeira (A) e segunda (B) amplificação da região codificadora do gene *HLA-G*. CN = Controle negativo (Água ultrapura). M = Marcador de peso molecular (O'GeneRuler™ 1kb DNA ladder Plus, Fermentas, Thermo Scientific®).

#### 4.4.4 Purificação e diluição dos produtos amplificados

Os produtos de amplificação foram purificados, adicionando-se 2 $\mu$ L do kit de exonucleases (Ilustra™, ExoStar 1-Step, GE Healthcare) a 5 $\mu$ L dos *amplicons* em tubos de 300 $\mu$ L. As amostras foram levadas ao termociclador e submetidas a um ciclo de 37°C por 15 minutos e um ciclo de 80°C por 15 minutos, seguidas de resfriamento a 4°C. Os produtos de amplificação purificados foram quantificados por espectrofotometria (sistema espectrofotométrico *NanoVue™* Plus) e diluídos em água ultrapura até atingir as concentrações de 40 ng/ $\mu$ L e 60 ng/ $\mu$ L, respectivamente, para os *amplicons* das PCRs 1 e 2.

#### 4.4.5 Reação de sequenciamento

Para o sequenciamento de toda a região codificadora do gene *HLA-G*, foram utilizados sete *primers* diferentes, quatro *primers* para os *amplicons* da PCR 1 e três para os *amplicons* obtidos na PCR 2 (**Tabela 3**). As reações de sequenciamento para cada um dos *primers* foram realizadas utilizando 1 $\mu$ L dos *amplicons* purificados e diluídos, acrescidos de 1 $\mu$ L do reagente Big Dye® (Terminator v3.1 0,25X, Applied Biosystems), 1,5 $\mu$ L do seu respectivo tampão (BigDye® Terminator Sequencing Buffer 5X, Applied Biosystems), 0,5 $\mu$ L de *primer*

e 6µl de água ultrapura, completando um volume final de 10µL em cada reação. As amostras foram levadas ao termociclador (Veriti 96-Well) e submetidas as seguintes condições térmicas: 1 ciclo de 96°C por 10 segundos e 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos, seguido de resfriamento até 4°C.

**Tabela 3.** *Primers* definidos para o sequenciamento da região codificadora do gene *HLA-G*.

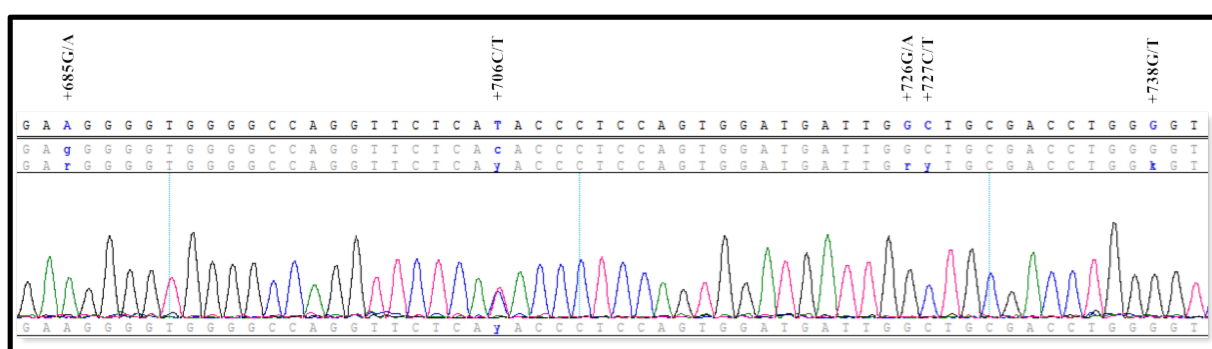
	<i>Primers</i>	Sequência
<b>PCR 1</b>	HG01R	5' - CACCACCGACCCTGTAAAG - 3'
	SEKHGInt2.F	5' - GGGAAGAGGAGACACGGA - 3'
	SEKInt3.R	5' - GGCCTCATAGTCAAAGACAGG - 3'
	HG01F	5' - TAAAGTCCTCGCTCACCCAC - 3'
<b>PCR 2</b>	HGE5F	5' - CCATGAGAGATGCAAAGTGCT - 3'
	HLAGEX4A	5' - CCATGAGAGATGCAAAGTGCT - 3'
	SEKEX6.F	5' - GATTGAAAAGGAGGGAGCT - 3'

#### 4.4.6 Precipitação dos fragmentos sequenciados

A precipitação dos produtos de sequenciamento foi feita adicionando aos 10µL de reação de sequenciamento, 20µL de etanol 100% gelado e 1µL de NaOAc 3M pH 4,5. Após homogeneização vigorosa, as amostras descansaram por 50 minutos a -20°C, sendo em seguida centrifugadas a 3.600 r.p.m durante 60 minutos (Centrifuge 5417C, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha). Posteriormente, desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se 50µL de etanol a 70% seguido de nova homogeneização e centrifugação a 3.600 r.p.m por 10 minutos. Uma vez desprezado o sobrenadante, realizou-se o processo de secagem em centrífuga à vácuo (Eppendorf Concentrator 5301, Hamburg, Alemanha) durante 10 minutos. Por fim, as amostras foram ressuspensas em formamida (Hi-Di™, Applied Biosystems).

#### 4.4.7 Sequenciamento

As amostras foram processadas em sequenciador automático ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) para a obtenção das sequências nucleotídicas visualizadas por meio de cromatogramas. As sequências dos cromatogramas de cada amostra foram então alinhadas com uma sequência genômica padrão e cada sítio de variação detectado foi anotado individualmente, usando o software Lasergene® SeqMan Pro™ 7.0 (DNASTAR, Inc., EUA) (Figura 8).



**Figura 8.** Cromatograma obtido a partir do sequenciamento direto de um *amplicon* da PCR 1 com o *primer* SEKHGInt2.F, no qual são evidenciados os SNPs +685G/A, +706C/T, +726G/A, +727C/T e +738G/T. No cromatograma em questão tem-se os genótipos +685AA, +706CT, +726GG, +727CC e +738GG. Código IUPAC: r = G ou A; y = T ou C; k = G ou T.

#### 4.5 Tratamento dos dados e análises estatísticas

Para avaliação da expressão hepática da molécula HLA-G pelo ensaio de imunoistoquímica, utilizou-se o programa GENEPOP 4.2 (RAYMOND; ROUSSET, 1995). Para as comparações quanto às categorias de expressão hepática da molécula HLA-G (0-1+, 2+ e 3+) nos dois grupos de pacientes, bem como, para associação de tal expressão com variáveis clínico-demográficas e histológicas, realizou-se o teste exato de Fisher, adotando  $\alpha=0,05$  como limite de significância. Considerando o número de comparações estatísticas ( $n$ ), a correção de Bonferroni foi utilizada para ajustar o nível de significância, resultando em  $\alpha_{\text{corrigido}} = 0,05/n$ , quando valores de  $P < 0,05$  foram obtidos.

Na análise da variabilidade do gene *HLA-G*, foram analisados os 81 sítios variantes distribuídos ao longo da região codificadora do gene *HLA-G* (CASTELLI et al., 2014). As

frequências alélicas e genotípicas foram estimadas utilizando-se o software ARLEQUIN 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). O mesmo programa foi empregado para verificar a aderência das frequências genotípicas observadas às proporções teóricas de Hardy-Weinberg, por meio do teste exato de Guo e Thompson (1992). A fim de analisar a probabilidade de segregação entre os diferentes sítios polimórficos, foi realizado o teste de desequilíbrio de ligação (*Linkage disequilibrium* - LD) entre os alelos que compõem tais polimorfismos, por meio do programa Haploview® 4.2 (BARRETT et al., 2005).

Dada a presença do LD entre os sítios polimórficos, foram inferidos haplótipos por meio do método baseado em coalescência, implementado com o software PHASE v2 (STEPHENS; SMITH; DONNELLY, 2001), uma vez que a fase gamética é desconhecida. Para essa análise, foram considerados apenas os haplótipos cuja probabilidade foi maior ou igual a 85%. As inferências que não atingiram esse valor foram excluídas. Os haplótipos inferidos foram submetidos ao teste exato de diferença populacional baseado nas frequências haplotípicas entre os grupos, usando o programa ARLEQUIN 3.5.

A conversão dos haplótipos em alelos do gene *HLA-G* foi realizada manualmente e, posteriormente, confirmada por meio de alinhamento com as sequências dos alelos *HLA-G* depositadas no banco de dados do IMGT/HLA (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>). O alinhamento foi realizado com o auxílio da ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST®), baseando-se nas variações que definem cada alelo *HLA-G*. As frequências dos alelos *HLA-G* foram comparadas entre pacientes e controles, utilizando o teste exato de Fisher e cálculo do *Odds Ratio* (OR) com intervalo de confiança de 95% (IC 95%), utilizando-se o software GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA, EUA). Adotou-se em todas as análises  $\alpha=0,05$  como nível de significância. Esta mesma análise foi realizada para determinar possíveis associações entre as categorias de expressão hepática da molécula e a diversidade genética do gene *HLA-G*. A correção de Bonferroni também foi utilizada em comparações múltiplas, para ajustar o nível de significância dos resultados.

## **5 Resultados**

---

## 5.1 Características demográficas e clínicas

As características clínico-demográficas e histológicas de cada grupo incluído no estudo estão apresentadas na **Tabela 4**.

**Tabela 4.** Características demográficas dos indivíduos controles e clínicas/demográficas/histológicas dos pacientes infectados pelo HCV e coinfectados HCV-HIV.

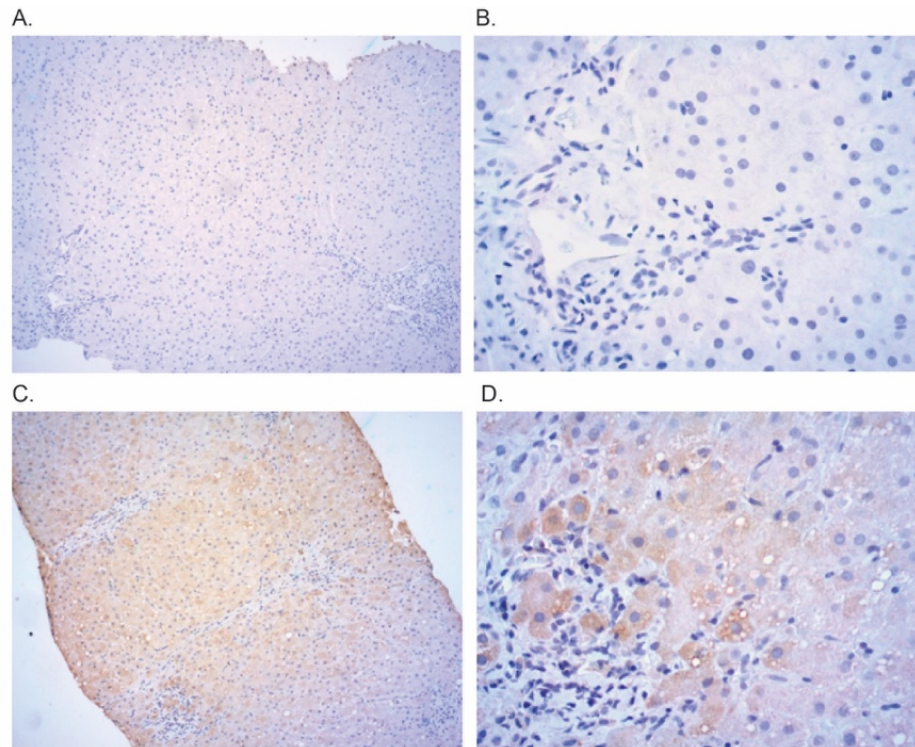
	HCV N = 216		HCV-HIV N = 135		CONTROLES N = 152	
	n	%	n	%	n	%
<b>Idade (Média em Anos ± Desvio Padrão)</b>	49,8±10,5		41,4±8,6		32,3±9,7	
<b>Gênero</b>						
Feminino	80	37,1	33	24,4	87	57,2
Masculino	136	62,9	102	75,6	65	42,8
<b>Cor de pele</b>						
Branco	179	82,9	99	73,3	115	75,6
Amarelo	2	0,9	0	0	1	0,7
Mulato	25	11,6	21	15,6	26	17,1
Negro	10	4,6	15	11,1	10	6,6
<b>Genótipo HCV</b>						
1	138	63,9	103	76,3	-	-
2	8	3,7	1	0,7	-	-
3	52	24,1	17	12,6	-	-
5	1	0,5	0	0,0	-	-
Desconhecido	17	7,8	14	10,4	-	-
<b>Fibrose hepática*</b>						
F1	60	27,8	64	47,4	-	-
F2	72	33,3	41	30,4	-	-
F3/F4	84	38,9	30	22,2	-	-
<b>Atividade necroinflamatória*</b>						
A0/A1	63	0,2917	54	40,0	-	-
A2	86	0,3981	62	45,9	-	-
A3	55	0,2546	19	14,1	-	-

\*Classificação METAVIR (F1: Fibrose leve, F2: Fibrose moderada, F3: Fibrose grave, F4: Cirrose; A0: Sem atividade necroinflamatória, A1: Atividade leve, A2: Atividade moderada, A3: Atividade grave) (BEDOSSA et al., 1994).

## 5.2 Expressão hepática da molécula HLA-G

A expressão hepática da molécula HLA-G foi determinada em 204 pacientes com hepatite C crônica e em 135 pacientes coinfectados HCV-HIV. A expressão de HLA-G não

foi observada nas amostras de tecido hepático normal, no entanto, foi detectada, em diferentes graus, nos tecidos dos pacientes incluídos no estudo (**Figura 9**).



**Figura 9.** Imunoistoquímica para a molécula HLA-G. Tecido hepático normal - Ausência de marcação para HLA-G (Painéis A - aumento 10x e B - aumento 40x). Tecido hepático infectado com HCV. A marcação para HLA-G aparece em marrom (Painéis C - aumento 10x e D - aumento 40x).

No grupo de pacientes infectados pelo HCV, 44,1% não expressou HLA-G ou apresentou marcação leve (0-1+), 37,8% expressou de forma moderada (2+) e 18,1% apresentou forte expressão (3+) de HLA-G nas biópsias hepáticas. No grupo de pacientes coinfectados HCV-HIV, houve expressão leve de HLA-G ou ausência de expressão em 51,8% dos indivíduos, 35,6% expressou moderadamente (2+) e 12,6% expressou fortemente (3+) HLA-G. Não houve diferença significativa entre os dois grupos quanto à magnitude de expressão hepática da molécula HLA-G ( $P = 0,2745$ ) (**Tabela 5**).

**Tabela 5.** Expressão de HLA-G em biópsias hepáticas de pacientes HCV e coinfectados HCV-HIV.

	Expressão hepática de HLA-G						<i>P</i>
	0-1+ *		2+ **		3+ ***		
	n	%	n	%	n	%	
<b>HCV (n = 204)</b>	90	44,1	77	37,8	37	18,1	0,2745
<b>HCV-HIV (n = 135)</b>	70	51,8	48	35,6	17	12,6	

\* (0-1+) expressão ausente ou leve (menos de 25% das células marcadas para HLA-G); \*\* (2+) expressão moderada (25-50% das células marcadas) e \*\*\* (3+) forte expressão (mais de 50% das células marcadas). Comparação realizada por meio do teste exato de Fisher. A comparação não mostrou valor significativo ( $P \leq 0,05$ ).

### 5.3 Associação entre a expressão hepática de HLA-G e variáveis clínico-demográficas e histológicas

Para verificar a influência da expressão de HLA-G na infecção pelo HCV e na coinfeção HCV-HIV, a sua marcação no fígado foi associada com parâmetros clínico-demográficos e histológicos como: gênero, idade, cor de pele, genótipo do HCV, grau de fibrose hepática e atividade necroinflamatória no fígado (**Tabelas 6 e 7**).



**Tabela 6.** Expressão de HLA-G em biópsias hepáticas de pacientes infectados pelo HCV, estratificados de acordo com variáveis clínico-demográficas e histológicas

Pacientes HCV (n = 204)								
Variáveis clínico-demográficas e histológicas		Expressão hepática de HLA-G						P
		0-1+ *		2+ **		3+ ***		
		n	%	n	%	n	%	
<b>Gênero</b>	Feminino (n = 77)	39	50,6	23	29,9	15	19,5	0,1887
	Masculino (n = 127)	51	40,2	54	42,5	22	17,3	
<b>Idade</b>	<40 anos (n = 34)	23	67,6	8	23,5	3	8,9	<b>0,0121</b>
	≥40 anos (n = 170)	67	39,4	69	40,6	34	20,0	
<b>Cor de pele</b>	Branco (n = 167)	82	49,1	59	35,3	26	15,6	<b>0,0050*</b>
	Não-brancos (n = 25)	8	32,0	18	72,0	11	44,0	
<b>Genótipo HCV</b>	1 (n = 128)	52	40,6	53	41,4	23	18,0	0,3943
	Não-1 (n = 61)	30	49,2	19	31,1	12	19,7	
<b>Fibrose<sup>†</sup></b>	F1 (n = 60)	46	76,7	14	23,3	0	0,0	<b>&lt;0,0001*</b>
	F2 (n = 72)	42	58,3	26	36,1	4	5,6	
	F3/F4 (n = 72)	2	2,8	37	51,4	33	45,8	
<b>Atividade necroinflamatória<sup>†</sup></b>	A0/A1 (n = 63)	60	95,2	3	4,8	0	0,0	<b>&lt;0,0001*</b>
	A2 (n = 86)	30	34,9	55	64,0	1	1,1	
	A3 (n = 55)	0	0,0	19	34,5	36	65,5	

\* (0-1+) expressão ausente ou leve (menos de 25% das células marcadas para HLA-G); \*\* (2+) expressão moderada (25-50% das células marcadas) e \*\*\* (3+) forte expressão (mais de 50% das células marcadas).

<sup>†</sup>Classificação METAVIR (F1: Fibrose leve, F2: Fibrose moderada, F3: Fibrose grave, F4: Cirrose, A0: Sem atividade necroinflamatória, A1: Atividade leve, A2: Atividade moderada, A3: Atividade grave) (BEDOSSA et al., 1994).

Comparações realizadas por meio do teste exato de Fisher. Valores estatisticamente significativos com nível de significância de 5% destacados em negrito ( $P \leq 0,05$ ). \*Valores estatisticamente significativos ao nível de 5% após a correção de Bonferroni destacados em negrito ( $\alpha_{\text{corrigido}} = 0,05/6$ ;  $P = 0,0083$ ).

**Tabela 7.** Expressão de HLA-G em biópsias hepáticas de pacientes coinfectados HCV-HIV, estratificados de acordo com variáveis clínico-demográficas e histológicas.

Pacientes HCV-HIV (n = 135)								
Variáveis clínico-demográficas e histológicas		Expressão hepática de HLA-G						P
		0-1+*		2+**		3+***		
		n	%	n	%	n	%	
<b>Gênero</b>	Feminino (n = 33)	20	60,6	11	33,3	2	6,1	0,3610
	Masculino (n = 102)	50	49,0	37	36,3	15	14,7	
<b>Idade</b>	<40 anos (n = 53)	28	52,8	18	34,0	7	13,2	0,9400
	≥40 anos (n = 82)	42	51,2	30	36,6	10	12,2	
<b>Cor de pele</b>	Branco (n = 99)	52	52,5	34	34,4	13	13,1	0,8574
	Não-brancos (n = 36)	18	50,0	14	38,9	4	11,1	
<b>Genótipo HCV</b>	1 (n = 103)	57	55,3	36	35,0	10	9,7	0,3086
	Não-1 (n = 18)	8	44,5	6	33,3	4	22,2	
<b>Fibrose<sup>†</sup></b>	F1 (n = 64)	56	87,5	8	12,5	0	0,0	<0,0001*
	F2 (n = 41)	11	26,8	28	68,3	2	4,9	
	F3/F4 (n = 30)	3	10,0	12	40,0	15	50,0	
<b>Atividade necroinflamatória<sup>†</sup></b>	A0/A1 (n = 54)	52	96,3	2	3,7	0	0,0	<0,0001*
	A2 (n = 62)	18	29,0	41	66,1	3	4,9	
	A3 (n = 19)	0	0,0	5	26,3	14	73,7	

\* (0-1+) expressão ausente ou leve (menos de 25% das células marcadas para HLA-G); \*\* (2+) expressão moderada (25-50% das células marcadas) e \*\*\* (3+) forte expressão (mais de 50% das células marcadas).

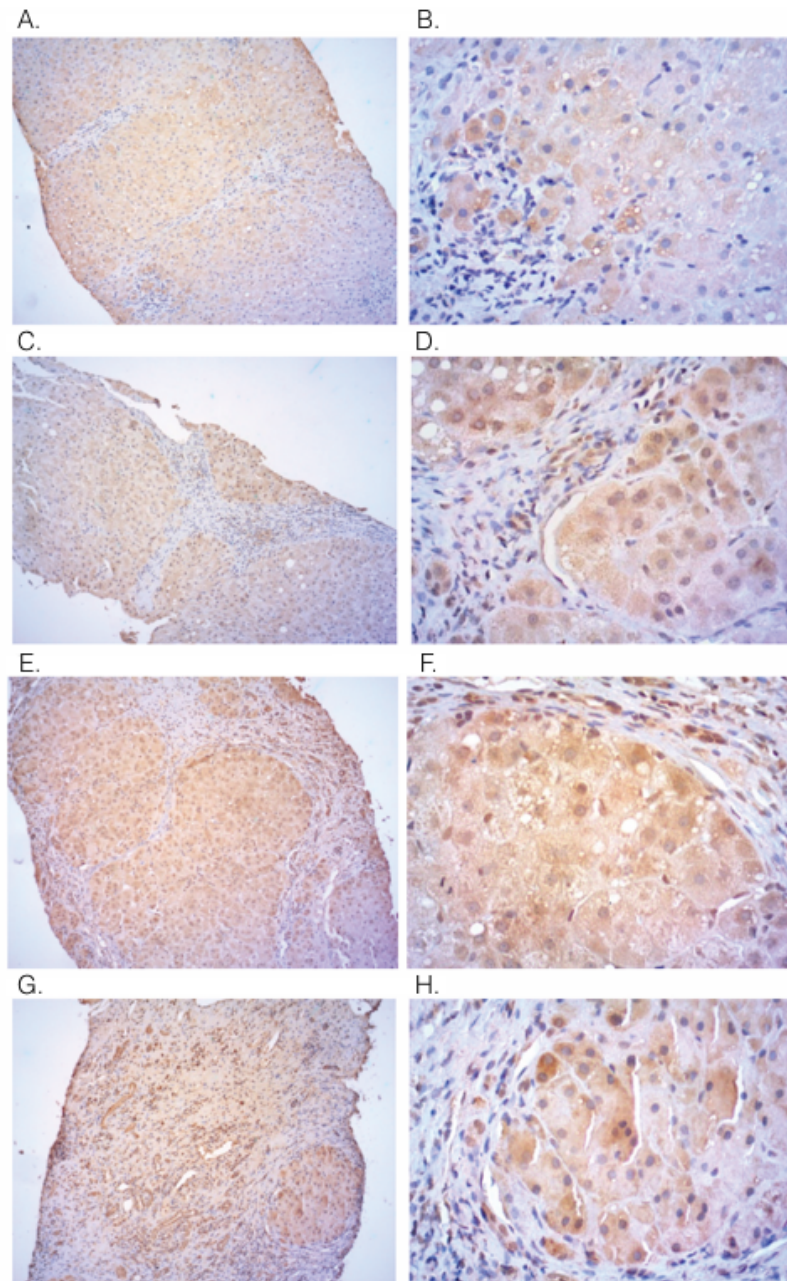
<sup>†</sup>Classificação METAVIR (F1: Fibrose leve, F2: Fibrose moderada, F3: Fibrose grave, F4: Cirrose, A0: Sem atividade necroinflamatória, A1: Atividade leve, A2: Atividade moderada, A3: Atividade grave) (BEDOSSA et al., 1994).

Comparações realizadas por meio do teste exato de Fisher. Valores estatisticamente significativos com nível de significância de 5% destacados em negrito ( $P \leq 0,05$ ). \*Valores estatisticamente significativos ao nível de 5% após a correção de Bonferroni destacados em negrito ( $\alpha_{\text{corrigido}} = 0,05/6$ ;  $P = 0,0083$ ).

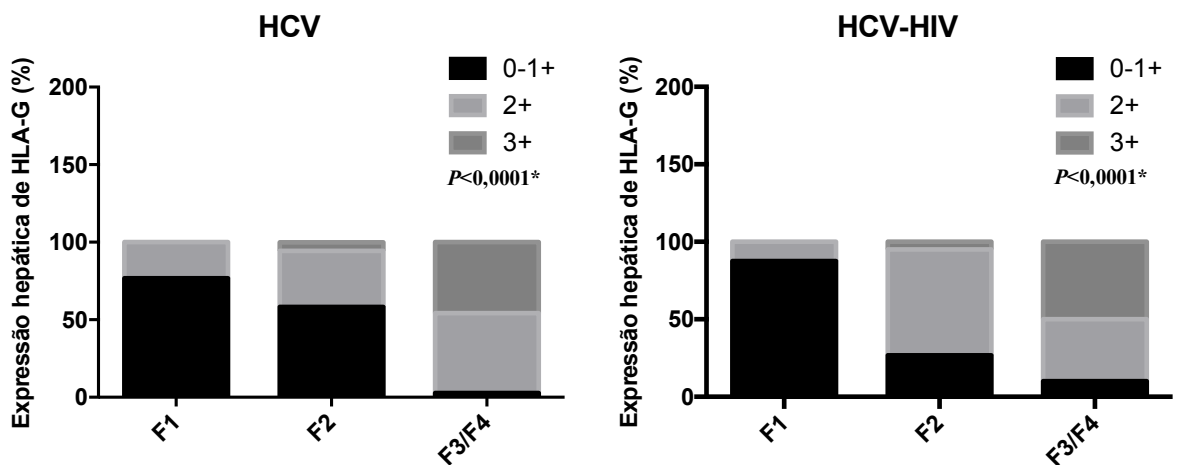
Nos pacientes mono infectados pelo HCV, a expressão da molécula HLA-G foi significativamente maior naqueles com idade igual ou superior a 40 anos ( $P = 0,0121$ ), quando comparados aos pacientes abaixo dos 40 anos (**Tabela 6**), no entanto, quando a conservadora correção de Bonferroni foi considerada, tal associação deixou de ser significativa. A expressão da molécula foi menor nos indivíduos brancos em comparação aos indivíduos não-brancos (**Tabela 6**), atingindo significância mesmo após a correção ( $P = 0,0050$ ). Tais associações não foram encontradas nos pacientes coinfectados HCV-HIV (**Tabela 7**).

Em relação às características histológicas, a **figura 10** ilustra a marcação da molécula HLA-G em biópsias de pacientes infectados pelo HCV com diferentes graus de fibrose hepática. A marcação ocorreu principalmente em hepatócitos à nível de citoplasma. Verificou-se aumento da expressão da molécula HLA-G no fígado conforme o aumento do

grau de fibrose hepática, tanto nos pacientes mono infectados pelo HCV ( $P < 0,0001$ ) (Tabela 6) quanto nos co infectados HCV-HIV ( $P < 0,0001$ ) (Tabela 7, figura 11) mesmo após a correção de Bonferroni.

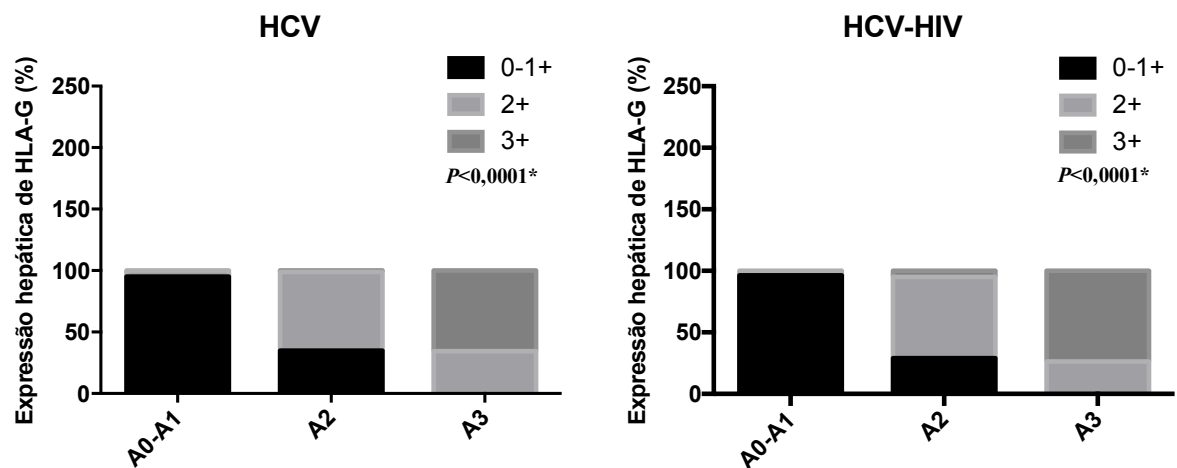


**Figura 10.** Imunoistoquímica para a molécula HLA-G em biópsias hepáticas de pacientes HCV estratificados em diferentes graus de fibrose hepática. A e B: F1 - Leve marcação para o HLA-G (1+). C e D: F2 - Expressão moderada de HLA-G (2+). E e F: F3 - Expressão difusa e intensa de HLA-G (3+). G e H: F4 - Expressão intensa e difusa de HLA-G (3+). Classificação METAVIR (F1: Fibrose leve, F2: Fibrose moderada, F3: Fibrose grave, F4: Cirrose) (BEDOSSA et al., 1994). A, C, E e G: Aumento de 10x. B, D, F e H: Aumento de 40x.



**Figura 11.** Imunorreatividade para HLA-G em biópsias hepáticas de pacientes HCV e coinfectados HCV-HIV estratificados de acordo com o grau de fibrose hepática. Classificação METAVIR (F1: Fibrose leve, F2: Fibrose moderada, F3: Fibrose grave, F4: Cirrose) (BEDOSSA et al., 1994). Comparações realizadas por meio do teste exato de Fisher. \*Valores estatisticamente significativos ( $P \leq 0,05$ ).

O nível de expressão da molécula no fígado também foi significativamente maior conforme o aumento da atividade necroinflamatória no fígado nos pacientes HCV ( $P < 0,0001$ ) (Tabela 6), assim como nos pacientes coinfectados HCV-HIV ( $P < 0,0001$ ), mesmo considerando valores de  $P$  corrigidos (Tabela 7, figura 12).



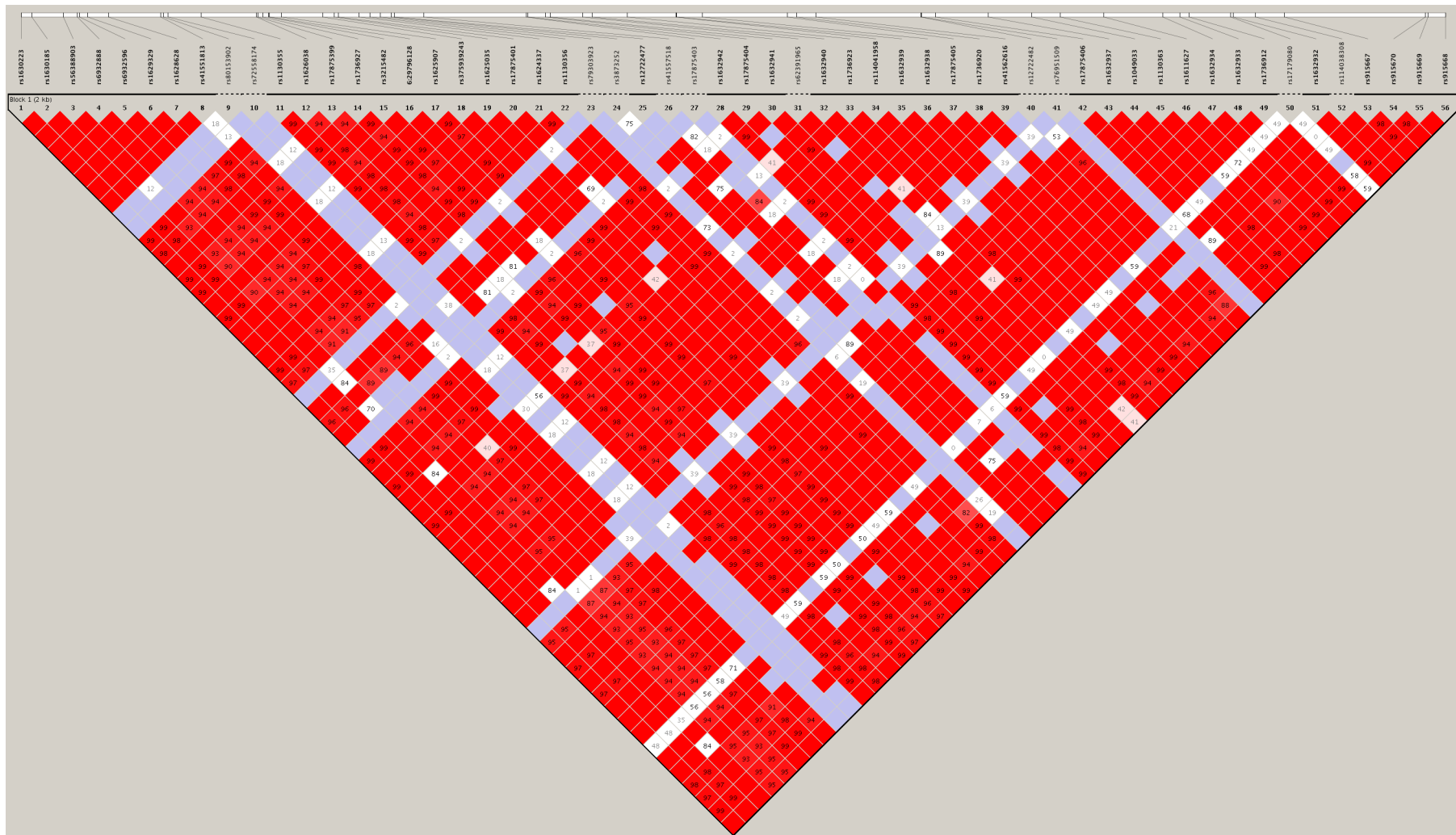
**Figura 12.** Imunorreatividade para HLA-G em biópsias hepáticas de pacientes HCV e coinfectados HCV-HIV estratificados de acordo com a atividade necroinflamatória. Classificação METAVIR (A0: Sem atividade necroinflamatória, A1: Atividade leve, A2: Atividade moderada, A3: Atividade grave) (BEDOSSA et al., 1994). Comparações realizadas por meio do teste exato de Fisher. \*Valores estatisticamente significativos ( $P \leq 0,05$ ).

Em ambos os grupos de pacientes HCV e coinfectados HCV-HIV, não foram observadas associações significativas entre a expressão de HLA-G no fígado com o gênero dos pacientes e genótipo 1 do HCV.

#### 5.4 Variabilidade do gene *HLA-G* em pacientes e indivíduos controles

Para avaliar a variabilidade do gene *HLA-G*, foram analisados 202 pacientes infectados com HCV, 109 pacientes coinfectados HCV-HIV e 152 indivíduos controles, para fins de comparação com os grupos de pacientes.

Foram analisados 81 sítios polimórficos distribuídos ao longo da região codificadora do gene *HLA-G*, dos quais 25 mostraram-se invariáveis e 56 variáveis. Quanto à probabilidade de aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg em cada população estudada, encontrou-se desequilíbrio apenas no grupo coinfectado HCV-HIV, nos polimorfismos de nucleotídeo único (*Single nucleotide polymorphism* - SNP) +126G/C ( $P=0,01252 \pm 0,00011$ ), +130C/T ( $P=0,01241 \pm 0,00011$ ) e +1147T/C ( $P=0,01964 \pm 0,00015$ ). A **Figura 13** mostra o padrão de LD obtido dos 56 sítios polimórficos e indica forte LD entre os pares de polimorfismos avaliados. Isso significa que seus alelos segregam de forma não aleatória e justifica a inferência de haplótipos.



**Figura 13.** Desequilíbrio de ligação (LD) entre os 56 sítios polimórficos do gene *HLA-G*. Áreas em vermelho escuro indicam forte LD ( $LOD \geq 2$  e  $D' = 1$ ), tons de rosa indicam LD moderado ( $LOD \geq 2$  e  $D' < 1$ ), azul indica LD fraco ( $LOD < 2$  e  $D' = 1$ ) e branco indica que não há LD ( $LOD < 2$  e  $D' < 1$ ). Os números indicam o valor  $D'$  expresso em percentagem e os quadrados vazios representam  $D'$  igual a 1 (Dados obtidos usando o software Haploview® 4.2).

A inferência de haplótipos foi realizada com base nos 56 sítios de variabilidade observados na população do presente estudo. O teste exato de diferenciação populacional, baseado nas frequências haplotípicas dos pacientes HCV, coinfectados HCV-HIV e indivíduos controle, mostrou diferenças significantes na distribuição dos haplótipos entre o grupo HCV e grupo controle ( $P=0.00664 \pm 0.0020$ ) e entre o grupo HCV e grupo coinfectado HCV-HIV ( $P=0.04316 \pm 0.0049$ ).

Os haplótipos foram convertidos em alelos *HLA-G*, baseando-se nos dados do IMGT/HLA. Em toda a nossa casuística, incluindo indivíduos controles e pacientes, foram identificados 40 alelos diferentes, no entanto, dos 40 alelos, apenas 12 apresentaram frequência acima de 1% (**Tabela 8**). Os diferentes alelos *HLA-G* identificados também foram agrupados de acordo com a proteína HLA-G codificada. Sendo assim, foram formados cinco grupos de alelos *HLA-G*:  $G^*01:01$ ,  $G^*01:03$ ,  $G^*01:04$ ,  $G^*01:05N$  e  $G^*01:06$  (**Tabela 9**).

Tabela 8. Frequência dos alelos *HLA-G* encontrados nos indivíduos incluídos no estudo.

	Alelos <i>HLA-G</i>	n	freq.
1	<i>G*01:01:01:01</i>	207	0,2235
2	<i>G*01:01:02:01</i>	143	0,1544
3	<i>G*01:01:01:05</i>	104	0,1123
4	<i>G*01:04:01</i>	85	0,0918
5	<i>G*01:03:01:02</i>	80	0,0864
6	<i>G*01:04:04</i>	66	0,0713
7	<i>G*01:01:01:04</i>	49	0,0529
8	<i>G*01:01:03:03</i>	45	0,0486
9	<i>G*01:06</i>	42	0,0454
10	<i>G*01:05N</i>	23	0,0248
11	<i>G*01:01:01:01(+2412A)**</i>	14	0,0151
12	<i>G*01:01:02:01(+2018C, +2519A, +2798G)**</i>	12	0,0130
13	<i>G*01:01:14-compatível</i>	7	0,0076
14	<i>G*01:01:02:02</i>	6	0,0065
15	<i>G*01:01:01:06</i>	5	0,0054
16	<i>G*01:04:01(+755C, +2412A)**</i>	4	0,0043
17	<i>G*01:01:19-compatível</i>	4	0,0043
18	<i>G*01:01:17-compatível</i>	4	0,0043
19	<i>G*01:04:05-compatível</i>	3	0,0032
20	<i>G*01:01:01:01(+126G, +130C, +2412A)**</i>	2	0,0022
21	<i>G*01:01:02:01(+15G, +36G, +126C, +130T, +147T, +188C)**</i>	2	0,0022
22	<i>G*01:01:01:01(+1019C)**</i>	1	0,0011
23	<i>G*01:06(+2018C, +2798G)**</i>	1	0,0011
24	<i>G*01:03:01:02(+292A)**</i>	1	0,0011
25	<i>G*01:01:12(+324G, +636C, +685G)**</i>	1	0,0011
26	<i>G*01:05N(+482T, +494A, +1019T, +1217A)**</i>	1	0,0011
27	<i>G*01:01:02:01(+372G, +482T, +1064T)**</i>	1	0,0011
28	<i>G*01:01:01:01(+636T)**</i>	1	0,0011
29	<i>G*01:01:02:01(+2519A)**</i>	1	0,0011
30	<i>G*01:06(+706C)**</i>	1	0,0011
31	<i>G*01:06(+2804G)**</i>	1	0,0011
32	<i>G*01:03:01:02(+2804G)**</i>	1	0,0011
33	<i>G*01:03:01:02(+644G)**</i>	1	0,0011
34	<i>G*01:01:02:01(+727T)**</i>	1	0,0011
35	<i>G*01:03:01:02(+482T, +494A)**</i>	1	0,0011
36	<i>G*01:01:01:04(+1147C)**</i>	1	0,0011
37	<i>G*01:01:01:01(+482C, +494C, +505nodelC, +531C)**</i>	1	0,0011
38	<i>G*01:04:01(+15G, +36G, +126C, +130T, +147T, +188C)**</i>	1	0,0011
39	<i>G*01:01:02:01(+15G, +36G, +126C, +130T, +147T, +188C, +324G)**</i>	1	0,0011
40	<i>G*01:04:04(+15G, +36G, +126C, +130T, +147T, +188C)**</i>	1	0,0011
	<b>TOTAL</b>	<b>926</b>	<b>1,0000</b>

G: Guanina; C: citosina; A: Adenina; T: Timina. \*\* Alelos ainda não descritos na literatura ou não oficialmente reconhecidos pelo banco de dados do IMGT/HLA, que foram assim designados conforme semelhança com alelos já descritos. O sufixo “-compatível” é utilizado para designar alelos oficialmente reconhecidos que ainda não possuem sequências completas no banco de dados do IMGT/HLA.



**Tabela 9.** Frequência dos grupos de alelos *HLA-G* encontrados nos indivíduos incluídos no estudo.

	Grupos de alelos <i>HLA-G</i>	n	freq.
1	<i>G*01:01</i>	613	0,6620
2	<i>G*01:03</i>	83	0,0896
3	<i>G*01:04</i>	156	0,1685
4	<i>G*01:05N</i>	24	0,0259
5	<i>G*01:06</i>	45	0,0486
6	Outros <sup>†</sup>	5	0,0054
	<b>TOTAL</b>	<b>926</b>	<b>1,0000</b>

Os alelos não oficialmente reconhecidos que apresentam sítios polimórficos sinônimos e/ou em regiões intrônicas foram incluídos no agrupamento. <sup>†</sup>Alelos ainda não oficialmente reconhecidos que não puderem ser agrupados por possuírem sítios polimórficos não-sinônimos.

Comparou-se a distribuição dos 11 alelos *HLA-G* mais frequentes no presente estudo, entre os pacientes HCV, pacientes coinfectados HCV-HIV e grupo controle (**Tabela 10**). A distribuição do alelo *G\*01:01:01:01* foi significativamente maior nos pacientes HCV (OR=1,5842, IC 95%=1,0792-2,3395,  $P=0,0173$ ) em relação ao grupo controle. No grupo de pacientes coinfectados HCV-HIV, o alelo *G\*01:05N* mostrou-se menos frequente em tal grupo em comparação ao grupo controle (OR=0,2072, IC 95%=0,0225-0,9322,  $P=0,0309$ ). Na comparação do grupo HCV com o grupo coinfectado HCV-HIV, o alelo *G\*01:01:01:04* mostrou-se mais prevalente no grupo coinfectado HCV-HIV (OR=0,4244, IC 95%=0,1897-0,9371,  $P=0,0210$ ). Entretanto, se a conservadora correção de Bonferroni para múltiplos testes for levada em consideração, tais diferenças perdem significância estatística.

A distribuição dos grupos de alelos *HLA-G* também foi verificada entre os pacientes HCV, pacientes coinfectados HCV-HIV e grupo controle (**Tabela 11**). A distribuição do grupo alélico *G\*01:01* foi significativamente maior nos pacientes HCV (OR=1,433, IC 95%=1,048-1,959,  $P=0,0253$ ) em relação ao grupo controle, o que não ocorre se a correção de Bonferroni for levada em consideração. O grupo alélico *G\*01:05N* mostrou-se menos frequente no grupo de pacientes coinfectados HCV-HIV em comparação ao grupo controle, no entanto, sem significância estatística (OR=0,3123, IC 95%=0,08789-1,110,  $P=0,0719$ ).

Tabela 10. Distribuição dos alelos *HLA-G* nos pacientes HCV, coinfectados HCV-HIV e indivíduos controles.

Alelos <i>HLA-G</i>	Grupos						Comparações					
	Controles n = 152		Pacientes HCV n = 202		Pacientes HCV-HIV n = 109		Controles vs. HCV		Controles vs. HCV-HIV		HCV vs. HCV-HIV	
	n	freq.	n	freq.	n	freq.	OR (IC 95%)	P	OR (IC 95%)	P	OR (IC 95%)	P
<b>G*01:01:01:01</b>	54	0,1776	103	0,2550	50	0,2294	1,5842 (1,0792-2,3395)	<b>0,0173</b>	1,3778 (0,8732-2,1697)	0,1502	1,1500 (0,7807-1,693)	0,4963
<b>G*01:01:02:01</b>	45	0,1480	71	0,1757	27	0,1239	1,2271 (0,8022-1,8894)	0,3565	0,8136 (0,4677-1,3953)	0,4436	1,4825 (0,9189-2,392)	0,1317
<b>G*01:01:01:05</b>	38	0,1250	43	0,1064	23	0,1055	0,8337 (0,5106-1,3656)	0,4751	0,8256 (0,4540-1,4753)	0,5809	1,0100 (0,5911-1,725)	1,0000
<b>G*01:04:01</b>	24	0,0789	44	0,1089	17	0,0780	1,4259 (0,8249-2,5132)	0,1989	0,9867 (0,4839-1,9716)	1,0000	1,4450 (0,8044-2,596)	0,2587
<b>G*01:03:01:02</b>	28	0,0921	28	0,0693	24	0,1101	0,7340 (0,4091-1,3176)	0,3248	1,2194 (0,6546-2,2542)	0,5541	0,6002 (0,3397-1,067)	0,0946
<b>G*01:04:04</b>	27	0,0888	24	0,0594	15	0,0688	0,6479 (0,3498-1,1941)	0,1438	0,7580 (0,3650-1,5223)	0,5144	0,8547 (0,4385-1,666)	0,7292
<b>G*01:01:01:04</b>	18	0,0592	14	0,0347	17	0,0780	0,5703 (0,2581-1,2374)	0,1439	1,3438 (0,6334-2,8367)	0,4784	0,4244 (0,2050-0,8787)	<b>0,0210</b>
<b>G*01:01:03:03</b>	13	0,0428	21	0,0520	11	0,0505	1,2273 (0,5753-2,7147)	0,5996	1,1895 (0,4721-2,9400)	0,6780	1,0320 (0,4879-2,182)	1,0000
<b>G*01:06</b>	18	0,0592	15	0,0371	9	0,0413	0,6126 (0,2824-1,3126)	0,2073	0,6842 (0,2654-1,6437)	0,4262	0,8954 (0,3852-2,082)	0,8288
<b>G*01:05N</b>	13	0,0428	8	0,0198	2	0,0092	0,4522 (0,1604-1,1961)	0,1151	0,2072 (0,0225-0,9322)	<b>0,0309</b>	2,1820 (0,4591-10,37)	0,5066
<b>G*01:01:01:01(+2412A)</b>	4	0,0132	7	0,0173	3	0,0138	1,3224 (0,3324-6,2151)	0,7654	1,0465 (0,1517-6,2535)	1,0000	1,2640 (0,3234-4,938)	1,0000
<b>Outros<sup>†</sup></b>	22	0,0724	26	0,0644	20	0,0917	-	-	-	-	-	-
<b>Total (2n)</b>	304	1,0000	404	1,0000	218	1,0000	-	-	-	-	-	-

<sup>†</sup>Soma dos outros alelos identificados que possuem baixa ocorrência no presente estudo. Comparações realizadas por meio do teste exato de Fisher. OR: *Odds Ratio*, IC: Intervalo de confiança. Valores estatisticamente significativos com nível de significância de 5% destacados em negrito ( $P \leq 0,05$ ). Valores significantes ao nível de 5% não são encontrados após a correção de Bonferroni ( $\alpha_{\text{corrigido}} = 0,05/11$ ;  $P = 0,0045$ ).

**Tabela 11.** Distribuição dos grupos de alelos *HLA-G* nos pacientes HCV, coinfectados HCV-HIV e indivíduos controles.

Grupos de alelos <i>HLA-G</i>	Grupos						Comparações					
	Controles n = 152		Pacientes HCV n = 202		Pacientes HCV-HIV n = 109		Controles vs. HCV		Controles vs. HCV-HIV		HCV vs. HCV-HIV	
	n	freq.	n	freq.	n	freq.	OR (IC 95%)	P	OR (IC 95%)	P	OR (IC 95%)	P
<b>G*01:01</b>	186	0,6118	280	0,6931	147	0,6743	1,433 (1,048-1,959)	<b>0,0253</b>	1,313 (0,9115-1,893)	0,1660	0,9169 (0,6438-1,306)	0,6512
<b>G*01:04</b>	52	0,1711	69	0,1708	35	0,1606	0,9982 (0,6722-1,482)	1,0000	0,9269 (0,5799-1,482)	0,8121	0,9286 (0,5951-1,449)	0,8220
<b>G*01:03</b>	31	0,1020	28	0,0693	24	0,1101	0,6558 (0,3843-1,119)	0,1317	1,089 (0,6199-1,915)	0,7743	1,661 (0,9374-2,944)	0,0946
<b>G*01:06</b>	20	0,0658	16	0,0396	9	0,0413	0,5856 (0,2981-1,150)	0,1231	0,6115 (0,2729-1,370)	0,2511	1,044 (0,4535-2,404)	1,0000
<b>G*01:05N</b>	13	0,0428	8	0,0198	3	0,0138	0,4522 (0,1850-1,105)	0,1151	0,3123 (0,08789-1,110)	0,0719	0,6907 (0,1813-2,631)	0,7550
<b>Outros<sup>†</sup></b>	2	0,0066	3	0,0074	0	0,0000	-	-	-	-	-	-
<b>Total (2n)</b>	304	1,0000	404	1,0000	218	1,0000	-	-	-	-	-	-

<sup>†</sup>Alelos que não puderam ser classificados nos 5 grupos de alelos do gene *HLA-G*. Comparações realizadas por meio do teste exato de Fisher. OR: *Odds Ratio*, IC: Intervalo de confiança. Valores estatisticamente significativos com nível de significância de 5% destacados em negrito ( $P \leq 0,05$ ). Valores significantes ao nível de 5% não são encontrados após a correção de Bonferroni ( $\alpha_{\text{corrigido}} = 0,05/5$ ;  $P = 0,01$ ).

### 5.5 Associação entre a expressão hepática de HLA-G e variabilidade do gene *HLA-G*

Para analisar possíveis associações entre a expressão hepática de HLA-G com a sua diversidade genética, foram considerados os indivíduos que apresentavam ambos os dados de imunohistoquímica e de sequenciamento genético, portanto, 190 pacientes HCV e 109 pacientes HCV-HIV. Ao analisar os níveis de expressão da molécula HLA-G, em função dos alelos encontrados, dentro do grupo de pacientes infectados pelo HCV (**Tabela 12**) e pacientes coinfectados HCV-HIV (**Tabela 13**) nenhuma associação significativa foi encontrada.

Ao comparar pacientes HCV e coinfectados HCV-HIV (**Tabela 14**), verificou-se que na expressão moderada da molécula (2+), a distribuição do alelo *G\*01:04:01* foi maior no grupo de pacientes HCV em comparação ao grupo coinfectado HCV-HIV, mas sem diferença estatística (OR=3,3810; IC 95%=0,9622-11,8800;  $P=0,0530$ ).

Tabela 12. Associação entre a expressão hepática de HLA-G e os alelos do gene *HLA-G* nos pacientes HCV.

	Pacientes HCV (n = 190)											
	Expressão hepática de HLA-G						Comparações					
	0-1+ (n = 85)		2+ (n = 72)		3+ (n = 33)		0-1+ vs. 2+		0-1+ vs. 3+		2+ vs. 3+	
Alelos <i>HLA-G</i>	n	freq.	n	freq.	n	freq.	OR (IC 95%)	P	OR (IC 95%)	P	OR (IC 95%)	P
<b>G*01:01:01:01</b>	47	0,2765	36	0,2500	12	0,1818	1,1460 (0,6916-1,9000)	0,6101	1,7200 (0,8452-3,4980)	0,1797	1,5000 (0,7224-3,1150)	0,2948
<b>G*01:01:02:01</b>	30	0,1765	21	0,1458	14	0,2121	1,2550 (0,6832-2,3060)	0,5398	0,7959 (0,3913-1,6190)	0,5774	0,6341 (0,2995-1,3430)	0,2376
<b>G*01:01:01:05</b>	14	0,0824	20	0,1389	6	0,0909	0,5564 (0,2701-1,1460)	0,1442	0,8974 (0,3295-2,4440)	0,7992	1,6130 (0,6156-4,2260)	0,3754
<b>G*01:04:01</b>	18	0,1059	18	0,1250	8	0,1212	0,8289 (0,4138-1,6610)	0,5997	0,8586 (0,3539-2,0830)	0,8172	1,0360 (0,4257-2,5200)	1,000
<b>G*01:03:01:02</b>	13	0,0765	7	0,0486	6	0,0909	1,6210 (0,6285-4,1790)	0,3604	0,8280 (0,3009-2,279)	0,7905	0,5109 (0,1647-1,5850)	0,2358
<b>G*01:04:04</b>	7	0,0412	10	0,0694	6	0,0909	0,5755 (0,2132-1,5530)	0,3213	0,4294 (0,1387-1,3300)	0,1991	0,7463 (0,2593-2,1480)	0,5842
<b>G*01:01:01:04</b>	7	0,0412	4	0,0278	3	0,0455	1,5030 (0,4309-5,2430)	0,5574	0,9018 (0,2260-3,5980)	1,0000	0,6000 (0,1304-2,7610)	0,6806
<b>G*01:01:03:03</b>	12	0,0706	5	0,0347	2	0,0303	2,1110 (0,7256-6,1440)	0,2126	2,4300 (0,5288-11,1700)	0,3602	1,1510 (0,2174-6,0950)	1,0000
<b>G*01:06</b>	6	0,0353	6	0,0417	2	0,0303	0,8415 (0,2653-2,6690)	0,7771	1,1710 (0,2302-5,9550)	1,0000	1,3910 (0,2732-7,0860)	1,0000
<b>G*01:05N</b>	2	0,0118	5	0,0347	0	0,0000	0,3310 (0,0632-1,7330)	0,2536	1,9730 (0,0934-41,6800)	1,0000	5,2440 (0,2855-96,3000)	0,3283
<b>G*01:01:01:01(+2412A)</b>	3	0,0176	4	0,0278	0	0,0000	0,6287 (0,1383-2,8580)	0,7068	2,7790 (0,1415-54,5800)	0,5617	4,2600 (0,2259-80,3400)	0,3110
<b>Outros<sup>†</sup></b>	11	0,0647	8	0,0556	7	0,1061	-	-	-	-	-	-
<b>Total (2n)</b>	170	1,0000	144	1,0000	66	1,0000	-	-	-	-	-	-

<sup>†</sup>Soma dos outros alelos identificados que possuem baixa ocorrência no presente estudo. \* (0-1+) expressão ausente ou leve (menos de 25% das células marcadas para HLA-G); \*\* (2+) expressão moderada (entre 25 e 50% das células marcadas) e \*\*\* (3+) forte expressão (mais de 50% das células marcadas). Comparações realizadas por meio do teste exato de Fisher. OR: *Odds Ratio*, IC: Intervalo de confiança. As comparações não mostraram valores significantes ( $P \leq 0,05$ ).

Tabela 13. Associação entre a expressão hepática de HLA-G e os alelos do gene *HLA-G* nos pacientes coinfectados HCV-HIV.

Alelos <i>HLA-G</i>	Pacientes HCV-HIV (n = 109)											
	Expressão hepática de HLA-G						Comparações					
	0-1+ <sup>*</sup> (n = 62)		2+ <sup>**</sup> (n = 37)		3+ <sup>***</sup> (n = 10)		0-1+ vs. 2+		0-1+ vs. 3+		2+ vs. 3+	
	n	freq.	n	freq.	n	freq.	OR (IC 95%)	P	OR (IC 95%)	P	OR (IC 95%)	P
<b>G*01:01:01:01</b>	30	0,2419	17	0,2297	3	0,1500	1,0700 (0,5421-2,1120)	1,0000	1,8090 (0,4955-6,6010)	0,5666	1,6900 (0,4417-6,4670)	0,5495
<b>G*01:01:02:01</b>	14	0,1129	8	0,1081	5	0,2500	1,0500 (0,4181-2,6370)	1,0000	0,3818 (0,1203-1,2120)	0,1449	0,3636 (0,1041-1,2700)	0,1410
<b>G*01:01:01:05</b>	10	0,0806	9	0,1216	4	0,2000	0,6335 (0,2448-1,6400)	0,4549	0,3509 (0,0983-1,2520)	0,1076	0,5538 (0,1511-2,0300)	0,4645
<b>G*01:04:01</b>	13	0,1048	3	0,0405	1	0,0500	2,7720 (0,7626-10,0700)	0,1760	2,225 (0,2747-18,0200)	0,6927	0,8028 (0,07892-8,1600)	1,0000
<b>G*01:03:01:02</b>	14	0,1129	8	0,1081	2	0,1000	1,0500 (0,4181-2,6370)	1,0000	1,1450 (0,2399-5,4700)	1,0000	1,0910 (0,2126-5,5970)	1,0000
<b>G*01:04:04</b>	8	0,0645	5	0,0676	2	0,1000	0,9517 (0,2993-3,0260)	1,0000	0,6207 (0,1219-3,1600)	0,6302	0,6522 (0,1167-3,6430)	0,6380
<b>G*01:01:01:04</b>	9	0,0726	6	0,0811	2	0,1000	0,8870 (0,3024-2,6010)	1,0000	0,7043 (0,1406-3,5280)	0,6509	0,7941 (0,1476-4,2730)	0,6767
<b>G*01:01:03:03</b>	7	0,0565	4	0,0541	0	0,0000	1,0470 (0,2958-3,7060)	1,0000	2,617 (0,1438-47,6400)	0,5935	2,6170 (0,1351-50,6800)	0,5749
<b>G*01:06</b>	5	0,0403	4	0,0541	0	0,0000	0,7353 (0,1910-2,8300)	0,7299	1,8870 (0,1004-35,4600)	1,0000	2,617 (0,1351-50,6800)	0,5749
<b>G*01:05N</b>	2	0,0161	0	0,0000	0	0,0000	3,0410 (0,1439-64,2600)	0,5295	0,8367 (0,03873-18,0800)	1,0000	0,2752 (0,0053-14,3100)	1,0000
<b>G*01:01:01:01(+2412A)</b>	1	0,0081	2	0,0270	0	0,0000	0,2927 (0,0261-3,2870)	0,5571	0,4980 (0,0196-12,6600)	1,0000	1,4140 (0,06521-30,6500)	1,0000
<b>Outros<sup>†</sup></b>	11	0,0887	8	0,1081	1	0,0500	-	-	-	-	-	-
<b>Total (2n)</b>	124	1,0000	74	1,0000	20	1,0000	-	-	-	-	-	-

<sup>†</sup>Soma dos outros alelos identificados que possuem baixa ocorrência no presente estudo. \* (0-1+) expressão ausente ou leve (menos de 25% das células marcadas para HLA-G); \*\* (2+) expressão moderada (entre 25 e 50% das células marcadas) e \*\*\* (3+) forte expressão (mais de 50% das células marcadas). Comparações realizadas por meio do teste exato de Fisher. OR: *Odds Ratio*, IC: Intervalo de confiança. As comparações não mostraram valores significantes ( $P \leq 0,05$ ).

Tabela 14. Associação entre a expressão hepática de HLA-G e os alelos do gene *HLA-G* ao comparar pacientes HCV com pacientes coinfectados HCV-HIV.

Alelos <i>HLA-G</i>	Expressão hepática de HLA-G																	
	0-1+ *						2+ **						3+ ***					
	HCV (n = 85)		HCV-HIV (n = 62)		HCV vs. HCV-HIV		HCV (n = 72)		HCV-HIV (n = 37)		HCV vs. HCV-HIV		HCV (n = 33)		HCV-HIV (n = 10)		HCV vs. HCV-HIV	
n	freq.	n	freq.	OR (IC 95%)	P	n	freq.	n	freq.	OR (IC 95%)	P	n	freq.	n	freq.	OR (IC 95%)	P	
<b>G*01:01:01:01</b>	47	0,2765	30	0,2419	1,1970 (0,7040-2,036)	0,5913	36	0,2500	17	0,2297	1,1180 (0,5775-2,163)	0,8678	12	0,1818	3	0,1500	1,2590 (0,3175-4,995)	1,0000
<b>G*01:01:02:01</b>	30	0,1765	14	0,1129	1,6840 (0,8513-3,330)	0,1401	21	0,1458	8	0,1081	1,4090 (0,5915-3,354)	0,5303	14	0,2121	5	0,2500	0,8077 (0,2502-2,607)	0,7619
<b>G*01:01:01:05</b>	14	0,0824	10	0,0806	1,0230 (0,4386-2,386)	1,0000	20	0,1389	9	0,1216	1,1650 (0,5018-2,704)	0,8345	6	0,0909	4	0,2000	0,4000 (0,1006-1,591)	0,2320
<b>G*01:04:01</b>	18	0,1059	13	0,1048	1,0110 (0,4755-2,150)	1,0000	18	0,1250	3	0,0405	3,3810 (0,9622-11,8800)	0,0530	8	0,1212	1	0,0500	2,6210 (0,3074-22,34)	0,6782
<b>G*01:03:01:02</b>	13	0,0765	14	0,1129	0,6506 (0,2942-1,438)	0,3113	7	0,0486	8	0,1081	0,4215 (0,1466-1,212)	0,1547	6	0,0909	2	0,1000	0,9000 (0,1669-4,854)	1,0000
<b>G*01:04:04</b>	7	0,0412	8	0,0645	0,6227 (0,2196-1,766)	0,4263	10	0,0694	5	0,0676	1,0300 (0,3386-3,132)	1,0000	6	0,0909	2	0,1000	0,9000 (0,1669-4,854)	1,0000
<b>G*01:01:01:04</b>	7	0,0412	9	0,0726	0,5487 (0,1986-1,516)	0,3002	4	0,0278	6	0,0811	0,3238 (0,08841-1,186)	0,0923	3	0,0455	2	0,1000	0,4286 (0,06640-2,766)	0,3295
<b>G*01:01:03:03</b>	12	0,0706	7	0,0565	1,2480 (0,4764-3,268)	0,8110	5	0,0347	4	0,0541	0,6295 (0,1638-2,419)	0,4924	2	0,0303	0	0,0000	1,5890 (0,07322-34,49)	1,0000
<b>G*01:06</b>	6	0,0353	5	0,0403	0,8707 (0,2596-2,921)	1,0000	6	0,0417	4	0,0541	0,7609 (0,2078-2,786)	0,7371	2	0,0303	0	0,0000	1,5890 (0,07322-34,49)	1,0000
<b>G*01:05N</b>	2	0,0118	2	0,0161	0,7262 (0,1008-5,230)	1,0000	5	0,0347	0	0,0000	5,8750 (0,3202-107,8)	0,1692	0	0,0000	0	0,0000	0,3083 (0,005923-16,04)	1,0000
<b>G*01:01:01:01(+2412A)</b>	3	0,0176	1	0,0081	2,2100 (0,2270-21,510)	0,6408	4	0,0278	2	0,0270	1,0290 (0,1839-5,752)	1,0000	0	0,0000	0	0,0000	0,3083 (0,005923-16,04)	1,0000
<b>Outros<sup>†</sup></b>	11	0,0647	11	0,0887	-	-	8	0,0556	8	0,1081	-	-	7	0,1061	1	0,0500	-	-
<b>Total (2n)</b>	170	1,0000	124	1,0000	-	-	144	1,0000	74	1,0000	-	-	66	1,0000	20	1,0000	-	-

<sup>†</sup>Soma dos outros alelos identificados que possuem baixa ocorrência no presente estudo. \* (0-1+) expressão ausente ou leve (menos de 25% das células marcadas para HLA-G); \*\* (2+) expressão moderada (entre 25 e 50% das células marcadas) e \*\*\* (3+) forte expressão (mais de 50% das células marcadas). Comparações realizadas por meio do teste exato de Fisher. OR: Odds Ratio, IC: Intervalo de confiança. As comparações não mostraram valores significantes ( $P \leq 0,05$ ).

Com o intuito de investigar a possível influência dos 2 alelos *HLA-G* de cada indivíduo sobre a magnitude da expressão de HLA-G no fígado, comparou-se a expressão da molécula em função dos genótipos de alelos (diplótipos). No total, foram encontrados 47 diplótipos diferentes formados pelos 11 alelos *HLA-G* mais frequentes (**Tabela 15**). Em função do elevado número de diplótipos diferentes encontrados, foram analisados apenas os diplótipos que apresentavam mais de 5 ocorrências em cada um dos grupos de pacientes.

Nenhuma associação significativa foi encontrada em relação à expressão da molécula e os diplótipos do gene *HLA-G*, nos pacientes HCV (**Tabela 16**), coinfectados HCV-HIV (**Tabela 17**) e na comparação do grupo HCV com os coinfectados HCV-HIV (**Tabela 18**).



**Tabela 15.** Frequência dos diplótipos do gene *HLA-G* nos pacientes HCV e nos pacientes coinfectados HCV-HIV.

	Diplótipos <i>HLA-G</i>		Pacientes HCV (n = 190)		Pacientes HCV-HIV (n = 109)	
	Alelo 1	Alelo 2	n	Freq.	n	Freq.
1	G*01:01:02:01	G*01:01:01:01	21	0,1105	6	0,0550
2	G*01:01:01:01	G*01:01:01:01	10	0,0526	8	0,0734
3	G*01:01:01:01	G*01:01:01:05	7	0,0368	8	0,0734
4	G*01:04:01	G*01:01:01:01	11	0,0579	3	0,0275
5	G*01:03:01:02	G*01:01:01:01	9	0,0474	5	0,0459
6	G*01:01:02:01	G*01:04:01	8	0,0421	4	0,0367
7	G*01:01:02:01	G*01:01:01:05	8	0,0421	3	0,0275
8	G*01:01:02:01	G*01:04:04	7	0,0368	1	0,0092
9	G*01:04:01	G*01:01:01:05	7	0,0368	1	0,0092
10	G*01:01:02:01	G*01:03:01:02	4	0,0211	3	0,0275
11	G*01:04:01	G*01:01:03:03	3	0,0158	3	0,0275
12	G*01:04:01	G*01:04:04	3	0,0158	3	0,0275
13	G*01:04:04	G*01:01:01:01	5	0,0263	0	0,0000
14	G*01:01:02:01	G*01:06	4	0,0211	1	0,0092
15	G*01:01:01:05	G*01:01:01:05	4	0,0211	1	0,0092
16	G*01:01:02:01	G*01:01:02:01	4	0,0211	1	0,0092
17	G*01:01:03:03	G*01:01:01:01	4	0,0211	1	0,0092
18	G*01:04:01	G*01:01:01:04	4	0,0211	1	0,0092
19	G*01:01:01:04	G*01:01:01:01	2	0,0105	3	0,0275
20	G*01:06	G*01:01:01:04	2	0,0105	3	0,0275
21	G*01:05N	G*01:01:01:01	4	0,0211	0	0,0000
22	G*01:01:03:03	G*01:01:01:05	2	0,0105	2	0,0183
23	G*01:01:02:01	G*01:01:03:03	2	0,0105	2	0,0183
24	G*01:06	G*01:04:04	2	0,0105	2	0,0183
25	G*01:01:02:01	G*01:01:01:04	0	0,0000	4	0,0367
26	G*01:06	G*01:01:01:01	3	0,0158	0	0,0000
27	G*01:01:01:01	G*01:01:01:01(+2412)	2	0,0105	1	0,0092
28	G*01:01:03:03	G*01:03:01:02	2	0,0105	1	0,0092
29	G*01:04:04	G*01:01:01:05	2	0,0105	1	0,0092
30	G*01:05N	G*01:04:01	2	0,0105	1	0,0092
31	G*01:04:04	G*01:01:01:04	1	0,0053	2	0,0183
32	G*01:04:04	G*01:01:03:03	1	0,0053	2	0,0183
33	G*01:04:04	G*01:03:01:02	0	0,0000	3	0,0275
34	G*01:04:01	G*01:04:01	2	0,0105	0	0,0000
35	G*01:03:01:02	G*01:01:01:04	2	0,0105	0	0,0000
36	G*01:01:01:01(+2412)	G*01:01:01:05	1	0,0053	1	0,0092
37	G*01:01:01:04	G*01:01:01:05	1	0,0053	1	0,0092
38	G*01:03:01:02	G*01:01:01:05	1	0,0053	1	0,0092
39	G*01:04:01	G*01:03:01:02	1	0,0053	1	0,0092
40	G*01:03:01:02	G*01:03:01:02	1	0,0053	1	0,0092
41	G*01:04:04	G*01:01:01:01(+2412)	1	0,0053	1	0,0092
42	G*01:06	G*01:03:01:02	0	0,0000	2	0,0183
43	G*01:01:02:01	G*01:05N	1	0,0053	0	0,0000
44	G*01:01:03:03	G*01:01:01:04	1	0,0053	0	0,0000
45	G*01:01:03:03	G*01:01:03:03	1	0,0053	0	0,0000
46	G*01:03:01:02	G*01:01:01:01(+2412)	1	0,0053	0	0,0000
47	G*01:05N	G*01:03:01:02	0	0,0000	1	0,0092
48	Outros <sup>†</sup>		26	0,1368	20	0,1835
	<b>Total</b>		<b>190</b>	<b>1,0000</b>	<b>109</b>	<b>1,0000</b>

Na tabela são mostradas individualmente as frequências dos diplótipos formados pelos 11 alelos *HLA-G* mais frequentes. <sup>†</sup>Diplótipos formados por 1 ou 2 alelos que não são os 11 alelos *HLA-G* mais frequentes do presente estudo.

Tabela 16. Associação entre a expressão hepática de HLA-G e os diplótipos do gene *HLA-G* nos pacientes HCV.

	Pacientes HCV (n = 190)											
	Expressão hepática de HLA-G					Comparações						
	0-1+ <sup>*</sup> (n = 85)		2+ <sup>**</sup> (n = 72)		3+ <sup>***</sup> (n = 33)		0-1+ vs. 2+		0-1+ vs. 3+		2+ vs. 3+	
diplótipos <i>HLA-G</i>	n	freq.	n	freq.	n	freq.	OR (IC 95%)	P	OR (IC 95%)	P	OR (IC 95%)	P
<b>G*01:01:02:01 G*01:01:01:01</b>	10	0,1176	7	0,0972	4	0,1212	1,2380 (0,4457-3,439)	0,7988	0,9667 (0,2807-3,329)	1,0000	0,7808 (0,2118-2,8780)	0,7379
<b>G*01:04:01 G*01:01:01:01</b>	4	0,0471	5	0,0694	2	0,0606	0,6617 (0,1708-2,564)	0,7331	0,7654 (0,1333-4,394)	0,6715	1,157 (0,2125-6,298)	1,0000
<b>G*01:01:01:01 G*01:01:01:01</b>	5	0,0588	4	0,0556	1	0,0303	1,063 (0,2743-4,116)	1,0000	2,000 (0,2246-17,81)	1,0000	1,882 (0,2020-17,54)	1,0000
<b>G*01:03:01:02 G*01:01:01:01</b>	4	0,0471	3	0,0417	2	0,0606	1,136 (0,2456-5,253)	1,0000	0,7654 (0,1333-4,394)	0,6715	0,6739 (0,1071-4,240)	0,6484
<b>G*01:01:02:01 G*01:01:01:05</b>	2	0,0235	4	0,0556	2	0,0606	0,4096 (0,007278-2,306)	0,414	0,3735 (0,05037-2,769)	0,3114	0,9118 (0,1584-5,248)	1,0000
<b>G*01:01:02:01 G*01:04:01</b>	2	0,0235	5	0,0694	1	0,0303	0,3228 (0,06069-1,718)	0,2483	0,771 (0,06751-8,807)	1,0000	2,388 (0,2677-21,31)	0,6625
<b>G*01:01:01:01 G*01:01:01:05</b>	4	0,0471	3	0,0417	0	0,0000	1,136 (0,2456-5,253)	1,000	3,699 (0,1936-70,68)	0,5753	3,374 (0,1693-67,26)	0,5500
<b>G*01:01:02:01 G*01:04:04</b>	3	0,0353	2	0,0278	2	0,0606	1,2800 (0,2079-7,886)	1,0000	0,5671 (0,09035-3,559)	0,6181	0,4429 (0,05960-3,291)	0,5883
<b>G*01:04:01 G*01:01:01:05</b>	3	0,0353	3	0,0417	1	0,0303	0,8415 (0,1645-4,305)	1,0000	1,171 (0,1173-11,68)	1,0000	1,391 (0,1392-13,91)	1,0000
<b>G*01:04:04 G*01:01:01:01</b>	3	0,0353	2	0,0278	0	0,0000	1,2800 (0,2079-7,886)	1,0000	2,842 (0,1428-56,58)	0,5586	2,376 (0,1109-50,92)	1,0000
<b>Outros<sup>†</sup></b>	45	0,5294	34	0,4722	18	0,5455	-	-	-	-	-	-
<b>Total</b>	85	1,0000	72	1,0000	33	1,0000	-	-	-	-	-	-

<sup>\*</sup>(0-1+) expressão ausente ou leve (menos de 25% das células marcadas para HLA-G); <sup>\*\*</sup>(2+) expressão moderada (entre 25 e 50% das células marcadas) e <sup>\*\*\*</sup>(3+) forte expressão (mais de 50% das células marcadas). Nesta análise considerou-se apenas os diplótipos que apresentavam acima de 5 ocorrências no grupo de pacientes HCV. <sup>†</sup>Soma dos outros diplótipos identificados que possuem ocorrência individual menor que 5. Comparações realizadas por meio do teste exato de Fisher. OR: *Odds Ratio*, IC: Intervalo de confiança. As comparações não mostraram valores significantes ( $P \leq 0,05$ ).

**Tabela 17.** Associação entre a expressão hepática de HLA-G e os diplótipos do gene *HLA-G* nos pacientes coinfectados HCV-HIV.

	Pacientes HCV-HIV (n = 109)											
	Expressão hepática de HLA-G						Comparações					
	0-1+ <sup>*</sup> (n = 62)		2+ <sup>**</sup> (n = 37)		3+ <sup>***</sup> (n = 10)		0-1+ vs. 2+		0-1+ vs. 3+		2+ vs. 3+	
Diplótipos <i>HLA-G</i>	n	freq.	n	freq.	n	freq.	OR (IC 95%)	P	OR (IC 95%)	P	OR (IC 95%)	P
<b>G*01:01:01:01 G*01:01:01:01</b>	5	0,0806	3	0,0811	0	0,0000	0,9942 (0,2233-4,426)	1,0000	2,009 (0,1031-39,14)	1,0000	2,130 (0,1016-44,69)	1,0000
<b>G*01:01:01:01 G*01:01:01:05</b>	3	0,0484	4	0,1081	1	0,1000	0,4195 (0,08843-1,990)	0,4194	0,4576 (0,04278-4,895)	0,4578	1,091 (0,1080-11,02)	1,0000
<b>G*01:01:02:01 G*01:01:01:01</b>	4	0,0645	1	0,0270	1	0,1000	2,483 (0,2667-23,11)	0,6478	0,6207 (0,06213-6,201)	0,5375	0,2500 (0,01422-4,397)	0,3839
<b>G*01:03:01:02 G*01:01:01:01</b>	3	0,0484	1	0,0270	1	0,1000	1,831 (0,1833-18,28)	1,0000	0,4576 (0,04278-4,895)	0,4578	0,2500 (0,01422-4,397)	0,3839
<b>Outros<sup>†</sup></b>	47	0,7581	28	0,7568	7	0,7000	-	-	-	-	-	-
<b>Total</b>	62	1,0000	37	1,0000	10	1,0000	-	-	-	-	-	-

<sup>\*</sup>(0-1+) expressão ausente ou leve (menos de 25% das células marcadas para HLA-G); <sup>\*\*</sup>(2+) expressão moderada (entre 25 e 50% das células marcadas) e <sup>\*\*\*</sup>(3+) forte expressão (mais de 50% das células marcadas). Nesta análise considerou-se apenas os diplótipos que apresentavam acima de 5 ocorrências no grupo de pacientes HCV-HIV. <sup>†</sup>Soma dos outros diplótipos identificados que possuem ocorrência individual menor que 5. Comparações realizadas por meio do teste exato de Fisher. OR: *Odds Ratio*, IC: Intervalo de confiança. As comparações não mostraram valores significantes ( $P \leq 0,05$ ).

**Tabela 18.** Associação entre a expressão hepática de HLA-G e os diplótipos do gene *HLA-G* ao comparar pacientes HCV com pacientes coinfectados HCV-HIV.

Diplótipos <i>HLA-G</i>	Expressão hepática de HLA-G																	
	0-1+ *				2+ **				3+ ***									
	HCV (n = 85)		HCV-HIV (n = 62)		HCV vs. HCV-HIV		HCV (n = 72)		HCV-HIV (n = 37)		HCV vs. HCV-HIV		HCV (n = 33)		HCV-HIV (n = 10)		HCV vs. HCV-HIV	
n	freq.	n	freq.	OR (IC 95%)	P	n	freq.	n	freq.	OR (IC 95%)	P	n	freq.	n	freq.	OR (IC 95%)	P	
<b>G*01:01:02:01 G*01:01:01:01</b>	10	0,1176	4	0,0645	1,9333 (0,5769-6,480)	0,3957	7	0,0972	1	0,0270	3,877 (0,4584-32,79)	0,2611	4	0,1212	1	0,1000	1,241 (0,1225-12,58)	1,0000
<b>G*01:04:01 G*01:01:01:01</b>	4	0,0471	1	0,0161	3,012 (0,3282-27,65)	0,3974	5	0,0694	2	0,0541	1,306 (0,2409-7,081)	1,0000	2	0,0606	0	0,0000	1,667 (0,0738-37,61)	1,0000
<b>G*01:01:01:01 G*01:01:01:01</b>	5	0,0588	5	0,0806	0,7125 (0,1970-2,577)	0,7431	4	0,0556	3	0,0811	0,6667 (0,1411-3,150)	0,6873	1	0,0303	0	0,0000	0,9692 (0,03661-25,66)	1,0000
<b>G*01:03:01:02 G*01:01:01:01</b>	4	0,0471	3	0,0484	0,9712 (0,2094-4,505)	1,0000	3	0,0417	1	0,0270	1,565 (0,1570-15,60)	1,0000	2	0,0606	1	0,1000	0,5806 (0,04704-7,168)	0,5579
<b>G*01:01:02:01 G*01:01:01:05</b>	2	0,0235	1	0,0161	1,4700 (0,1302-16,59)	1,0000	4	0,0556	1	0,0270	2,118 (0,2280-19,67)	0,6600	2	0,0606	1	0,1000	0,5806 (0,04704-7,168)	0,5579
<b>G*01:01:02:01 G*01:04:01</b>	2	0,0235	3	0,0484	0,4739 (0,0767-2,926)	0,6502	5	0,0694	0	0,0000	6,111 (0,3286-113,7)	0,1642	1	0,0303	1	0,1000	0,2813 (0,01596-4,958)	0,4153
<b>G*01:01:01:01 G*01:01:01:05</b>	4	0,0471	3	0,0484	0,9712 (0,2094-4,505)	1,0000	3	0,0417	4	0,1081	0,3587 (0,07585-1,696)	0,225	0	0,0000	1	0,1000	0,0945 (0,0035-2,516)	0,2326
<b>G*01:01:02:01 G*01:04:04</b>	3	0,0353	0	0,0000	5,303 (0,2688-104,6)	0,2633	2	0,0278	0	0,0000	2,6600 (0,1243-56,88)	0,5474	2	0,0606	1	0,1000	0,5806 (0,04704-7,168)	0,5579
<b>G*01:04:01 G*01:01:01:05</b>	3	0,0353	0	0,0000	5,303 (0,2688-104,6)	0,2633	3	0,0417	1	0,0270	1,565 (0,1570-15,60)	1,0000	1	0,0303	0	0,0000	0,9692 (0,03661-25,66)	1,0000
<b>G*01:04:04 G*01:01:01:01</b>	3	0,0353	0	0,0000	5,303 (0,2688-104,6)	0,2633	2	0,0278	0	0,0000	2,6600 (0,1243-56,88)	0,5474	0	0,0000	0	0,0000	0,3134 (0,00584-16,80)	1,0000
<b>Outros<sup>†</sup></b>	45	0,5294	42	0,6774	-	-	34	0,4722	24	0,6486	-	-	18	0,5455	4	0,4000	-	-
<b>Total</b>	85	1,0000	62	1,0000	-	-	72	1,0000	37	1,0000	-	-	33	1,0000	10	1,0000	-	-

\* (0-1+) expressão ausente ou leve (menos de 25% das células marcadas para HLA-G); \*\* (2+) expressão moderada (entre 25 e 50% das células marcadas) e \*\*\* (3+) forte expressão (mais de 50% das células marcadas). Nesta análise considerou-se apenas os diplótipos que apresentavam acima de 5 ocorrências no grupo de pacientes HCV. † Soma dos outros diplótipos identificados que possuem ocorrência individual menor que 5. Comparações realizadas por meio do teste exato de Fisher. OR: *Odds Ratio*, IC: Intervalo de confiança. As comparações não mostraram valores significantes ( $P \leq 0,05$ ).

A possível influência da diversidade genética do gene *HLA-G* sobre a magnitude da expressão de HLA no fígado também foi investigada no que diz respeito aos alelos *HLA-G* que codificam a mesma proteína. Ao analisar os níveis de expressão hepática de HLA-G, em função dos 5 grupos de alelos, nenhuma associação significativa foi encontrada no grupo de pacientes HCV (**Tabela 19**), pacientes coinfectados HCV-HIV (**Tabela 20**) e na comparação pacientes HCV vs. pacientes coinfectados HCV-HIV (**Tabela 21**).

Para as análises de associação entre os diplótipos formados pelos 5 grupos de alelos *HLA-G* e os níveis de expressão da molécula, foram encontrados 12 diplótipos diferentes (**Tabela 22**), no entanto, foram analisados apenas os diplótipos que apresentavam mais de 5 ocorrências em cada um dos grupos de pacientes. Nenhuma associação significativa foi encontrada em relação à expressão da molécula no fígado nos pacientes avaliados (**Tabelas 23, 24 e 25**).

**Tabela 19.** Associação entre a expressão hepática de HLA-G e os grupos de alelos do gene *HLA-G* nos pacientes HCV.

	Pacientes HCV (n = 190)											
	Expressão hepática de HLA-G						Comparações					
	0-1+* (n = 85)		2+** (n = 72)		3+*** (n = 33)		0-1+ vs. 2+		0-1+ vs. 3+		2+ vs. 3+	
Grupos de alelos <i>HLA-G</i>	n	freq.	n	freq.	n	freq.	OR (IC 95%)	P	OR (IC 95%)	P	OR (IC 95%)	P
<b>G*01:01</b>	122	0,7176	96	0,6667	43	0,6515	1,271 (0,7853-2,056)	0,3896	1,359 (0,7411-2,494)	0,3448	1,070 (0,5791-1,976)	0,8756
<b>G*01:04</b>	25	0,1471	28	0,1944	15	0,2273	0,7143 (0,3951-1,291)	0,2917	0,5862 (0,2866-1,199)	0,1754	0,8207 (0,4041-1,667)	0,5851
<b>G*01:03</b>	13	0,0765	7	0,0486	6	0,0909	1,621 (0,6285-4,179)	0,3604	0,828 (0,3009-2,279)	0,7905	0,5109 (0,1647-1,585)	0,2358
<b>G*01:06</b>	6	0,0353	7	0,0486	2	0,0303	0,716 (0,2350-2,181)	0,5822	1,171 (0,2302-5,955)	1,0000	1,635 (0,3302-8,095)	0,7228
<b>G*01:05N</b>	2	0,0118	5	0,0347	0	0,0000	0,331 (0,06321-1,733)	0,2536	1,973 (0,09342-41,68)	1,0000	5,244 (0,2855-96,30)	0,3283
<b>Outros†</b>	2	0,0118	1	0,0069	0	0,0000	-	-	-	-	-	-
<b>Total (2n)</b>	170	1,0000	144	1,0000	66	1,0000	-	-	-	-	-	-

†Soma dos alelos que não puderam ser classificados nos 5 grupos de alelos do gene *HLA-G*. \* (0-1+) expressão ausente ou leve (menos de 25% das células marcadas para HLA-G); \*\* (2+) expressão moderada (entre 25 e 50% das células marcadas) e \*\*\* (3+) forte expressão (mais de 50% das células marcadas). Comparações realizadas por meio do teste exato de Fisher. OR: *Odds Ratio*, IC: Intervalo de confiança. As comparações não mostraram valores significantes ( $P \leq 0,05$ ).

**Tabela 20.** Associação entre a expressão hepática de HLA-G e os grupos de alelos do gene *HLA-G* nos pacientes coinfectados HCV-HIV.

	Pacientes HCV-HIV (n = 109)											
	Expressão hepática de HLA-G						Comparações					
	0-1+ * (n = 62)		2+ ** (n = 37)		3+ *** (n = 10)		0-1+ vs. 2+		0-1+ vs. 3+		2+ vs. 3+	
Grupos de alelos <i>HLA-G</i>	n	freq.	n	freq.	n	freq.	OR (IC 95%)	P	OR (IC 95%)	P	OR (IC 95%)	P
<b>G*01:01</b>	81	0,6532	52	0,7027	14	0,7000	0,797 (0,4284-1,483)	0,5329	0,8073 (0,2895-2,251)	0,8021	1,013 (0,3444-2,979)	1,0000
<b>G*01:04</b>	22	0,1774	9	0,1216	4	0,2000	1,558 (0,6753-3,593)	0,3208	0,8627 (0,2628-2,833)	0,7602	0,5538 (0,1511-2,030)	0,4645
<b>G*01:03</b>	14	0,1129	8	0,1081	2	0,1000	1,0500 (0,4181-2,637)	1,0000	1,1450 (0,2399-5,470)	1,0000	1,091 (0,2126-5,597)	1,0000
<b>G*01:06</b>	5	0,0403	4	0,0541	0	0,0000	0,7353 (0,1910-2,830)	0,7299	1,887 (0,1004-35,46)	1,0000	2,617 (0,1351-50,68)	0,5749
<b>G*01:05N</b>	2	0,0161	1	0,0135	0	0,0000	1,197 (0,1066-13,44)	1,0000	0,8367 (0,03873-18,08)	1,0000	0,8367 (0,03281-21,34)	1,0000
<b>Total (2n)</b>	124	1,0000	74	1,0000	20	1,0000	-	-	-	-	-	-

\* (0-1+) expressão ausente ou leve (menos de 25% das células marcadas para HLA-G); \*\* (2+) expressão moderada (entre 25 e 50% das células marcadas) e \*\*\* (3+) forte expressão (mais de 50% das células marcadas). Comparações realizadas por meio do teste exato de Fisher. OR: *Odds Ratio*, IC: Intervalo de confiança. As comparações não mostraram valores significantes ( $P \leq 0,05$ ).

**Tabela 21.** Associação entre a expressão hepática de HLA-G e os grupos de alelos do gene *HLA-G* ao comparar pacientes HCV com pacientes coinfectados HCV-HIV.

Grupos de alelos <i>HLA-G</i>	Expressão hepática de HLA-G																	
	0-1+ *						2+ **						3+ ***					
	HCV (n = 85)		HCV-HIV (n = 62)		HCV vs. HCV-HIV		HCV (n = 72)		HCV-HIV (n = 37)		HCV vs. HCV-HIV		HCV (n = 33)		HCV-HIV (n = 10)		HCV vs. HCV-HIV	
n	freq.	n	freq.	OR (IC 95%)	P	n	freq.	n	freq.	OR (IC 95%)	P	n	freq.	n	freq.	OR (IC 95%)	P	
<b>G*01:01</b>	122	0,7176	81	0,6532	1,349 (0,8197-2,221)	0,2523	96	0,6667	52	0,7027	0,8462 (0,4610-1,553)	0,6474	43	0,6515	14	0,7000	0,8012 (0,2714-2,365)	0,7911
<b>G*01:04</b>	25	0,1471	22	0,1774	0,7994 (0,4272-1,496)	0,5212	28	0,1944	9	0,1216	1,743 (0,7753-3,920)	0,1890	15	0,2273	4	0,2000	1,176 (0,3411-4,057)	1,0000
<b>G*01:03</b>	13	0,0765	14	0,1129	0,6506 (0,2942-1,438)	0,3113	7	0,0486	8	0,1081	0,4215 (0,1466-1,212)	0,1547	6	0,0909	2	0,1000	0,9 (0,1669-4,854)	1,0000
<b>G*01:06</b>	6	0,0353	5	0,0403	0,8707 (0,2596-2,921)	1,0000	7	0,0486	4	0,0541	0,8942 (0,2531-3,159)	1,0000	2	0,0303	0	0,0000	1,589 (0,07322-34,49)	1,0000
<b>G*01:05N</b>	2	0,0118	2	0,0161	0,7262 (0,1008-5,230)	1,0000	5	0,0347	1	0,0135	2,626 (0,3010-22,91)	0,6664	0	0,0000	0	0,0000	0,3083 (0,005923-16,04)	1,0000
<b>Outros<sup>†</sup></b>	2	0,0118	0	0,0000	-	-	1	0,0069	0	0,0000	-	-	0	0,0000	0	0,0000	-	-
<b>Total (2n)</b>	170	1,0000	124	1,0000	-	-	144	1,0000	74	1,0000	-	-	66	1,0000	20	1,0000	-	-

<sup>†</sup>Soma dos alelos que não puderam ser classificados nos 5 grupos de alelos do gene *HLA-G*. \* (0-1+) expressão ausente ou leve (menos de 25% das células marcadas para HLA-G); \*\* (2+) expressão moderada (entre 25 e 50% das células marcadas) e \*\*\* (3+) forte expressão (mais de 50% das células marcadas). Comparações realizadas por meio do teste exato de Fisher. OR: *Odds Ratio*, IC: Intervalo de confiança. As comparações não mostraram valores significantes ( $P \leq 0,05$ ).



**Tabela 22.** Frequência dos diplótipos do gene *HLA-G* formados por grupos de alelos nos pacientes HCV e nos pacientes coinfectados HCV-HIV.

	Diplótipos de grupos de alelos <i>HLA-G</i>		Pacientes HCV (n = 190)		Pacientes HCV-HIV (n = 109)	
	Alelo 1	Alelo 2	n	Freq.	N	Freq.
1	G*01:01	G*01:01	82	0,4316	53	0,4862
2	G*01:01	G*01:04	53	0,2789	21	0,1927
3	G*01:01	G*01:03	23	0,1211	14	0,1284
4	G*01:01	G*01:06	13	0,0684	5	0,0459
5	G*01:04	G*01:04	5	0,0263	3	0,0275
6	G*01:01	G*01:05N	5	0,0263	1	0,0092
7	G*01:03	G*01:04	1	0,0053	5	0,0459
8	G*01:04	G*01:06	2	0,0105	2	0,0183
9	G*01:04	G*01:05N	2	0,0105	1	0,0092
10	G*01:03	G*01:03	1	0,0053	1	0,0092
11	G*01:03	G*01:06	0	0,0000	2	0,0183
12	G*01:03	G*01:05N	0	0,0000	1	0,0092
13	Outros <sup>†</sup>		3	0,0158	0	0,0000
	<b>Total</b>		<b>190</b>	<b>1,0000</b>	<b>109</b>	<b>1,0000</b>

<sup>†</sup>Diplótipos formados por alelos que não puderam ser classificados nos 5 grupos de alelos do gene *HLA-G* por apresentarem sítios polimórficos não-sinônimos.

**Tabela 23.** Associação entre a expressão hepática de HLA-G e os diplótipos do gene *HLA-G* formados por grupos de alelos nos pacientes HCV.

	Pacientes HCV (n = 190)											
	Expressão hepática de HLA-G						Comparações					
	0-1+ * (n = 85)		2+ ** (n = 72)		3+ *** (n = 33)		0-1+ vs. 2+		0-1+ vs. 3+		2+ vs. 3+	
Diplótipos de grupos de alelos <i>HLA-G</i>	n	Freq.	n	Freq.	n	Freq.	OR (IC 95%)	P	OR (IC 95%)	P	OR (IC 95%)	P
<b>G*01:01 G*01:01</b>	41	0,4824	29	0,4028	12	0,3636	1,414 (0,7457-2,681)	0,3314	1,708 (0,7451-3,917)	0,2222	1,208 (0,5150-2,835)	0,8296
<b>G*01:01 G*01:04</b>	19	0,2235	23	0,3194	11	0,3333	0,6196 (0,3035-1,265)	0,2074	1,684 (0,6938-4,088)	0,2509	1,043 (0,4336-2,511)	1,0000
<b>G*01:01 G*01:03</b>	12	0,1412	5	0,0694	6	0,1818	2,231 (0,7456-6,676)	0,198	0,7606 (0,2594-2,230)	0,5842	0,3409 (0,09585-1,212)	0,0988
<b>G*01:01 G*01:06</b>	6	0,0706	5	0,0694	2	0,0606	1,029 (0,3001-3,525)	1,0000	1,208 (0,2310-6,315)	1,0000	1,174 (0,2156-6,395)	1,0000
<b>G*01:01 G*01:05N</b>	1	0,0118	4	0,0556	0	0,0000	0,2043 (0,02229-1,872)	0,1815	1,218 (0,04836-30,69)	1,0000	4,467 (0,2334-85,48)	0,3045
<b>G*01:04 G*01:04</b>	2	0,0235	1	0,0139	2	0,0606	1,728 (0,1533-19,48)	1,0000	0,3827 (0,05160-2,838)	0,3199	0,2214 (0,01934-2,535)	0,2358
<b>Outros†</b>	4	0,0470	5	0,0695	0	0,0000	-	-	-	-	-	-
<b>Total</b>	85	1,0000	72	1,0000	33	1,0000	-	-	-	-	-	-

†Soma dos outros diplótipos identificados que possuem ocorrência individual menor que 5. \* (0-1+) expressão ausente ou leve (menos de 25% das células marcadas para HLA-G); \*\* (2+) expressão moderada (entre 25 e 50% das células marcadas) e \*\*\* (3+) forte expressão (mais de 50% das células marcadas). Comparações realizadas por meio do teste exato de Fisher. OR: *Odds Ratio*, IC: Intervalo de confiança. As comparações não mostraram valores significantes ( $P \leq 0,05$ ).

**Tabela 24.** Associação entre a expressão hepática de HLA-G e os diplótipos do gene *HLA-G* formados por grupos de alelos nos pacientes coinfectados HCV-HIV.

	Pacientes HCV-HIV (n = 109)											
	Expressão hepática de HLA-G						Comparações					
	0-1+ <sup>*</sup> (n = 62)		2+ <sup>**</sup> (n = 37)		3+ <sup>***</sup> (n = 10)		0-1+ vs. 2+		0-1+ vs. 3+		2+ vs. 3+	
Diplótipos de grupos de alelos <i>HLA-G</i>	n	Freq.	N	Freq.	N	Freq.	OR (IC 95%)	P	OR (IC 95%)	P	OR (IC 95%)	P
<b>G*01:01 G*01:01</b>	30	0,4839	18	0,4865	5	0,5000	0,9896 (0,4381-2,235)	1,0000	0,9375 (0,2464-3,567)	1,0000	0,9474 (0,2342-3,832)	1,0000
<b>G*01:01 G*01:04</b>	11	0,1774	7	0,1892	3	0,3000	0,9244 (0,3236-2,641)	1,0000	0,5033 (0,1121-2,259)	0,3967	0,5444 (0,1118-2,652)	0,4242
<b>G*01:01 G*01:03</b>	7	0,1129	6	0,1622	1	0,1000	0,6576 (0,2028-2,132)	0,5452	1,145 (0,1255-10,45)	1,0000	1,742 (0,1847-16,43)	1,0000
<b>G*01:01 G*01:06</b>	3	0,0484	2	0,0541	0	0,0000	0,8898 (0,1416-5,591)	1,0000	1,235 (0,05934-25,71)	1,0000	1,479 (0,06568-33,30)	1,0000
<b>G*01:03 G*01:04</b>	3	0,0484	1	0,0270	1	0,1000	1,831 (0,1833-18,28)	1,0000	0,4576 (0,04278-4,895)	0,4578	0,25 (0,01422-4,397)	0,3839
<b>Outros<sup>†</sup></b>	8	0,1290	3	0,0810	0	0,0000	-	-	-	-	-	-
<b>Total</b>	62	1,0000	37	1,0000	10	1,0000	-	-	-	-	-	-

<sup>†</sup>Soma dos outros diplótipos identificados que possuem ocorrência individual menor que 5. <sup>\*</sup>(0-1+) expressão ausente ou leve (menos de 25% das células marcadas para HLA-G); <sup>\*\*</sup>(2+) expressão moderada (entre 25 e 50% das células marcadas) e <sup>\*\*\*</sup>(3+) forte expressão (mais de 50% das células marcadas). Comparações realizadas por meio do teste exato de Fisher. OR: *Odds Ratio*, IC: Intervalo de confiança. As comparações não mostraram valores significantes ( $P \leq 0,05$ ).

**Tabela 25.** Associação entre a expressão hepática de HLA-G e os diplótipos do gene *HLA-G* formados por grupos de alelos, ao comparar pacientes HCV com pacientes coinfectados HCV-HIV.

Diplótipos de grupos de alelos <i>HLA-G</i>	Expressão hepática de HLA-G																	
	0-1+ *						2+ **						3+ ***					
	HCV (n = 83)		HCV-HIV (n = 62)		HCV vs. HCV-HIV		HCV (n = 71)		HCV-HIV (n = 37)		HCV vs. HCV-HIV		HCV (n = 33)		HCV-HIV (n = 10)		HCV vs. HCV-HIV	
n	freq.	n	freq.	OR (IC 95%)	P	n	freq.	n	freq.	OR (IC 95%)	P	n	freq.	n	freq.	OR (IC 95%)	P	
<b>G*01:01 G*01:01</b>	41	0,4940	30	0,4839	1,041 (0,5391-2,011)	1,0000	29	0,4085	18	0,4865	0,7288 (0,3275-1,622)	0,5401	12	0,3636	5	0,5000	0,5714 (0,1370-2,384)	0,4809
<b>G*01:01 G*01:04</b>	19	0,2289	11	0,1774	1,376 (0,6008-3,153)	0,5362	23	0,3239	7	0,1892	2,054 (0,7852-5,371)	0,1764	11	0,3333	3	0,3000	1,167 (0,2515-5,411)	1,0000
<b>G*01:01 G*01:03</b>	12	0,1446	7	0,1129	1,328 (0,4902-3,598)	0,6274	5	0,0704	6	0,1622	0,3914 (0,1109-1,382)	0,181	6	0,1818	1	0,1000	2,0000 (0,2112-18,94)	1,0000
<b>G*01:01 G*01:06</b>	6	0,0723	3	0,0484	1,532 (0,3678-6,385)	0,7328	5	0,0704	2	0,0541	1,326 (0,2445-7,190)	1,0000	2	0,0606	0	0,0000	1,667 (0,07386-37,61)	1,0000
<b>G*01:01 G*01:05N</b>	1	0,0120	0	0,0000	2,273 (0,09097-56,78)	1,0000	4	0,0563	1	0,0270	2,149 (0,2313-19,97)	0,6585	0	0,0000	0	0,0000	0,3134 (0,005847-16,80)	1,0000
<b>G*01:04 G*01:04</b>	2	0,0241	3	0,0484	0,4856 (0,07861-2,999)	0,6512	1	0,0141	0	0,0000	1,596 (0,06339-40,17)	1,0000	2	0,0606	0	0,0000	1,667 (0,07386-37,61)	1,0000
<b>Outros<sup>†</sup></b>	2	0,0241	8	0,1290	-	-	4	0,0564	3	0,0810	-	-	0	0,0000	1	0,1000	-	-
<b>Total</b>	83	1,0000	62	1,0000	-	-	71	1,0000	37	1,0000	-	-	33	1,0000	10	1,0000	-	-

<sup>†</sup>Soma dos outros diplótipos identificados que possuem ocorrência individual menor que 5. \* (0-1+) expressão ausente ou leve (menos de 25% das células marcadas para HLA-G); \*\* (2+) expressão moderada (entre 25 e 50% das células marcadas) e \*\*\* (3+) forte expressão (mais de 50% das células marcadas). Comparações realizadas por meio do teste exato de Fisher. OR: *Odds Ratio*, IC: Intervalo de confiança. As comparações não mostraram valores significantes ( $P \leq 0,05$ ).

## **6 Discussão**

---

A infecção pelo HCV possui grande taxa de cronificação, elevando o risco de desenvolvimento de complicações graves, como cirrose e HCC (PASSOS, 2006). Adicionalmente, as taxas de progressão da fibrose hepática variam enormemente de indivíduo para indivíduo e é significativamente influenciada pela coinfeção com HIV. Dessa forma, nos últimos anos, inúmeros estudos têm focado na identificação de fatores associados ao prognóstico da hepatite C crônica e a progressão do dano hepático.

Desde a primeira descrição da expressão da molécula HLA-G em condições patológicas, sua associação com doenças infecciosas virais tem sido intensamente estudada. Embora o RNA mensageiro (mRNA) do gene *HLA-G* seja detectado em tecido hepático histologicamente normal (ONNO et al., 1994), a molécula HLA-G não é encontrada. No entanto, a molécula passa a ser detectada no fígado infectado pelo HCV como evidenciado por estudos prévios que avaliaram somente pacientes mono infectados pelo HCV (AMIOT et al., 2014; DE OLIVEIRA CRISPIM et al., 2012) ou somente coinfectados HCV-HIV (VILAR, 2014). Algumas conclusões de tais estudos ficaram prejudicadas pelo pequeno número de pacientes, principalmente, após a estratificação de grupos de acordo com variáveis clínicas e histopatológicas. Assim, o presente estudo se propôs a ampliar o número de pacientes e avaliar tanto indivíduos mono infectados pelo HCV quanto os coinfectados com HIV.

Demonstrou-se no presente trabalho, que a molécula HLA-G está expressa no fígado de pacientes infectados pelo HCV e coinfectados com HIV, por meio do uso do anticorpo MEM-G/2 (reconhece cadeia pesada livre de todas as isoformas de HLA-G), de forma similar aos estudos anteriores, que utilizaram diferentes anticorpos anti-HLA-G; isto é, anticorpos que detectam isoformas específicas (como o anticorpo 5a6G7 que detecta HLA-G5 e -6) ou conjuntos de isoformas solúveis e membranárias (como o anticorpo 4H84 e MEM-G/1) (AMIOT et al., 2014; DE OLIVEIRA CRISPIM et al., 2012; VILAR, 2014). Ainda, conforme observado em estudos anteriores, a expressão de HLA-G ocorreu, primordialmente, em hepatócitos de ambos os grupos de pacientes infectados pelo HCV e coinfectados HCV-HIV.

No presente trabalho, verificou-se maior expressão da molécula HLA-G conforme o avanço da fibrose hepática, tanto nos pacientes infectados pelo HCV, quanto nos pacientes coinfectados pelo HIV. Este resultado é de grande relevância, uma vez que a progressão da fibrose hepática determina o prognóstico final do paciente e, assim, a necessidade de intervenção terapêutica (MARCELLIN; ASSELAH; BOYER, 2002). Esse resultado é

consistente com os achados de Amiot e colaboradores (2014), que observaram maior número de células positivas para HLA-G em áreas de maior fibrose hepática, assim como os resultados de Vilar (2014). Embora a progressão da fibrose hepática seja um processo multifatorial, a associação entre fibrose hepática e expressão de HLA-G indica que tal molécula contribua para a progressão da doença, provavelmente por regular negativamente a resposta imune contra o HCV.

Diversos fatores podem estar implicados na indução de expressão da molécula HLA-G no fígado de pacientes acometidos pelo HCV. A infecção crônica pelo HCV é caracterizada por infiltrado inflamatório inespecífico, responsável pelo dano tecidual hepático (LARRUBIA et al., 2014). Mastócitos são encontrados no fígado e agem induzindo fibrose por estimularem a proliferação de HSC e, essas células, por sua vez, secretam TGF- $\beta$  (GRUBER et al., 1997). Essa é a principal citocina pró-fibrótica do organismo e sua expressão é aumentada no fígado de pacientes com hepatite C crônica (MARCELLIN; ASSELAH; BOYER, 2002). Além do TGF- $\beta$ , outras citocinas também são encontradas no fígado, como os IFNs do tipo I (IFN- $\alpha$  e - $\beta$ ) e IFN- $\gamma$  que são importantes para a resposta antiviral do hospedeiro. Já foi demonstrado no plasma de pacientes com HCV, elevada secreção de determinadas citocinas com atividade imunorreguladora, como a IL-10 (PIAZZOLLA et al., 2000). Essa citocina suprime resposta de células T no fígado de pacientes com HCV (ACCAPEZZATO et al., 2004) e o aumento dos seus níveis foi associado com progressão da hepatite C crônica (FLYNN et al., 2011). Sabe-se que a expressão da molécula HLA-G é altamente dependente de fatores do microambiente e as citocinas IL-10, IFN- $\alpha$  e TGF- $\beta$  estão associadas com aumento da expressão de HLA-G em diferentes tipos celulares (ABEDIANKENARI; GHASEMI; KIM, 2011; AMIOT; VU; SAMSON, 2014; GREGORI et al., 2010; MOREAU et al., 1999).

Corroborando o papel do HLA-G na cronicidade da infecção hepática viral, o aumento dos níveis de sHLA-G e IL-10 no sangue de pacientes com hepatite C crônica (WENG et al., 2011). Além disso, IL-10 induz a formação *in vitro* de CD produtoras de IL-10 (CD-10), caracterizadas pela secreção de altos níveis de IL-10, expressão da molécula HLA-G e do seu receptor ILT4 na superfície celular. DC-10 isoladas de sangue periférico ou geradas *in vitro* são potentes indutores de células T reguladoras do tipo 1 (Tr1), células que suprimem resposta imune *in vivo* e *in vitro* (GREGORI et al., 2010). O estudo de Amiot e colaboradores (2014) relata que mastócitos próximos às áreas de fibrose em biópsias de pacientes com HCV secretam quantidades elevadas de HLA-G, quando estimulados com IL-10 e IFN- $\alpha$ . Nesse contexto, assume-se que o microambiente hepático, incluindo citocinas que atuam na resposta

inflamatória (IL-10, IFN- $\alpha$ ) e fibrose (TGF- $\beta$ ), seja um dos responsáveis pela detecção da molécula HLA-G no fígado de pacientes com hepatite C crônica.

De forma inédita, verificou-se que a expressão de HLA-G foi associada significativamente não só com o grau de fibrose hepática, como também com a atividade necroinflamatória no fígado, tanto nos pacientes mono infectados pelo HCV quanto nos pacientes co infectados com HIV. Esses achados não foram demonstrados nos estudos anteriores, possivelmente, devido ao tamanho amostral reduzido. A atividade necroinflamatória é um processo dinâmico e flutuante ao longo do tempo. Segundo Marcellin e colaboradores (2002), existem razões para acreditar que o processo necroinflamatório é implicado no processo de fibrogênese, pois as HSC são ativadas ao redor das lesões inflamatórias. Assim, o grau de atividade necroinflamatória prediz piora da fibrose hepática. Esse resultado condiz com o fato de que diferentes citocinas produzidas durante a resposta imune contra o HCV sejam importantes indutoras da expressão da molécula HLA-G *in vitro* e *in vivo*. Com base nesses achados, a associação entre aumento da expressão da molécula HLA-G no fígado com o aumento da atividade necroinflamatória e com aumento da fibrose pode ter implicações na progressão crônica da doença e prognóstico.

Além dos fatores histológicos, a expressão hepática da molécula HLA-G também foi maior nos indivíduos infectados pelo HCV que apresentavam idade igual ou superior a 40 anos. É importante destacar que a idade é um fator independente, associado com maior taxa de progressão da fibrose (POYNARD; BEDOSSA; OPOLON, 1997). Estudos evidenciam que a taxa de progressão pode ser 300 vezes maior em pacientes afetados pela doença na sua sétima década de vida em comparação aqueles afetados na terceira década de vida (WESTBROOK; DUSHEIKO, 2014). No entanto, a influência da idade na expressão de HLA-G não foi observada na co infecção pelo HIV, cabendo ressaltar que o número de pacientes pertencentes a este grupo é bastante inferior ao grupo de pacientes infectados somente pelo HCV, o que pode ter prejudicado a obtenção de significância estatística.

Diferenças étnicas entre indivíduos infectados pelo HCV têm sido implicadas em diferenças nas taxas de cronificação da infecção e progressão da fibrose hepática, sendo a descendência afroamericana uma característica desfavorável neste contexto (CHEN; MORGAN, 2006). Observou-se que pacientes do grupo HCV com cor de pele branca expressam menos HLA-G no fígado quando comparados aos pacientes não-brancos (incluindo mulatos, negros e amarelos). A falta de associação entre cor de pele e expressão da molécula HLA-G no grupo de pacientes co infectados HCV-HIV pode ser resultado da



dificuldade em caracterizar etnicamente a população brasileira com base na cor da pele, em função do elevado grau de miscigenação da mesma.

Embora o gênero masculino seja considerado um importante fator de progressão da fibrose hepática (CHEN; MORGAN, 2006; MARCELLIN; ASSELAH; BOYER, 2002), aumentando em até 10 vezes a taxa de fibrose independentemente da idade (WESTBROOK; DUSHEIKO, 2014), não foi encontrada associação entre tal fator com a expressão de HLA-G. De forma similar, não houve associação entre a expressão de HLA-G e genótipo do HCV, cuja relação com progressão da fibrose hepática é ainda inconclusiva (BOCHUD et al., 2009; PROBST et al., 2011).

Sumariando, as variáveis observadas no presente trabalho associadas com aumento da expressão de HLA-G no fígado (atividade necroinflamatória avançada e fibrose hepática grave em ambos os grupos de pacientes HCV e coinfectados HCV-HIV; idade superior a 40 anos e cor de pele não-branca somente no grupo HCV) têm sido igualmente associadas com pior prognóstico clínico dos pacientes e desfechos menos favoráveis (CHEN; MORGAN, 2006; GHANY et al., 2003). Apesar de se desconhecer a razão biológica pela qual a molécula HLA-G é expressa no fígado infectado por vírus, nossos achados corroboram a hipótese de que a presença da molécula HLA-G em tecido hepático acometido pelo HCV seja prejudicial ao hospedeiro, em função de suas propriedades imunotolerantes. Além dos fatores relacionados ao microambiente inflamatório no fígado, como TGF- $\beta$ , IL-10 e IFN, implicados na indução da expressão de HLA-G, não podemos excluir a possibilidade de o HCV induzir diretamente a expressão da molécula HLA-G em hepatócitos. Estudos já demonstraram a capacidade de alguns vírus, como o herpes simples, citomegalovírus (CMV), e o vírus da raiva (*Rabies virus* - RABV), em inibir a expressão de moléculas HLA de classe I clássicas, como forma de evadir da resposta de CTL (AHN et al., 1996; ORR et al., 2005) e/ou induzir a expressão da molécula HLA-G para evitar o reconhecimento por CTL e células NK, protegendo as células infectadas da resposta imune antiviral do hospedeiro (MÉGRET et al., 2007; ONNO et al., 2000). No entanto, tais achados ainda não foram demonstrados para o HCV.

Este é o primeiro estudo que compara em um mesmo relato a expressão da molécula HLA-G entre pacientes infectados pelo HCV e pacientes coinfectados HCV-HIV. Diversas evidências encontradas na literatura sugerem que a infecção pelo HCV propicia microambiente adequado para a expressão de HLA-G (ACCAPEZZATO et al., 2004; MARCELLIN; ASSELAH; BOYER, 2002). Embora o HIV, aparentemente, não infecte

diretamente os hepatócitos, pode acarretar alterações hepáticas induzidas pela produção de TGF- $\beta$  via proteínas virais circulantes (CHEN; FEENEY; CHUNG, 2014). Além disso, estudos relatam que monócitos de pacientes infectados pelo HIV expressam HLA-G em suas membranas (LOZANO et al., 2002) e produzem IL-10 (NAVIKAS et al., 1995). Portanto, esperar-se-ia que a coinfeção pelo HIV pudesse incrementar a expressão de HLA-G, achado não observado neste estudo. Logo, considerando que i) a magnitude de expressão da molécula HLA-G não diferiu significativamente entre os pacientes monoinfectados e coinfectados pelo HIV e ii) a associação da maior expressão da molécula HLA-G com maior atividade necroinflamatória no fígado e fibrose hepática nos pacientes infectados pelo HCV e coinfectados HCV-HIV foi similar, podemos sugerir que, aparentemente, o HIV não amplifica a expressão da molécula HLA-G induzida pelo HCV no fígado. No entanto, outros fatores como o tratamento prévio dos pacientes coinfectados HCV-HIV com medicamentos antirretrovirais não foram analisados e, portanto, configurando-se como limitação do presente estudo.

Além dos fatores acima citados, nos últimos anos, numerosos estudos buscaram demonstrar a existência de fatores genéticos do hospedeiro que influenciam a infecção pelo HCV. Nesse contexto, a maioria dos estudos tem focado no papel de genes do MHC.

Os alelos *DQBI\*03:01* e *DRBI\*11:01* são considerados protetores contra o desenvolvimento da hepatite C crônica, estando associados com maior capacidade do hospedeiro em eliminar espontaneamente o vírus (HONG et al., 2005), e ainda, o grupo de alelos *DRBI\*11* está associado com proteção contra o desenvolvimento de doença hepática avançada (TILLMANN et al., 2001). Além dos genes de histocompatibilidade de classe II, o grupo de alelos *HLA-B\*27* apresenta forte associação com eliminação do HCV (NEUMANN-HAEFELIN et al., 2006), exercendo também papel protetor na infecção pelo HIV, acarretando menor progressão da doença, menor carga viral, atraso no declínio do número de CD4<sup>+</sup> e do aparecimento de sintomas (DEN UYL; VAN DER HORST-BRUIJNSMA; VAN AGTMAEL, 2004).

No que diz respeito aos genes de classe I não clássicos, como o HLA-G, e a sua associação com a hepatite C, poucos estudos foram conduzidos até o momento. Em um estudo com mulheres grávidas infectadas pelo HCV, o alelo *G\*01:04:01* foi considerado fator de risco para a transmissão do vírus para seus filhos, ao passo que o alelo *G\*01:05N*, foi associado com proteção (MARTINETTI et al., 2006). Maior número de estudos são encontrados em relação aos alelos *HLA-G* e infecção pelo HIV. O alelo *G\*01:01:08* foi

associado com aumento do risco de infecção por HIV-1 em mulheres africanas, enquanto o alelo *G\*01:05N* foi associado com proteção (LAJOIE et al., 2006; MATTE et al., 2004). No entanto, esse mesmo alelo nulo foi associado com risco aumentado de infecção pelo HIV em uma população italiana (SEGAT et al., 2010). A transmissão do HIV também parece ser afetada por diferenças nos alelos *HLA-G*, de forma que mães portadoras do alelo *G\*01:03* transmitem menos o HIV para seus filhos durante o período perinatal (LUO et al., 2013).

Uma vez que brasileiros representam uma das mais heterogêneas populações no mundo, um alto nível de variabilidade do gene *HLA-G* era esperado no presente estudo. Dessa forma, foram encontrados 40 alelos *HLA-G* diferentes, dos quais 12 apresentaram frequências acima de 1%. Desses, 11 possuem frequência mínima mundial acima de 1%, conforme o estudo de Castelli e colaboradores (2014), e portanto, foram os alelos escolhidos para as análises de variabilidade do gene *HLA-G* entre pacientes e controles, assim como, para as análises envolvendo variabilidade do gene *HLA-G* com a magnitude de expressão da molécula *HLA-G* no fígado. Tais alelos juntos corresponderam a 92,6% de todos os alelos *HLA-G* encontrados no presente estudo. O alelo *G\*01:01:01:01(+2412A)* assim como outros 23 alelos encontrados ainda não foram oficialmente reconhecidos pelo banco de dados do IMGT/HLA. Outros seis alelos identificados que são oficialmente reconhecidos, apresentaram frequência abaixo de 1% (*G\*01:01:14*, *G\*01:01:02:02*, *G\*01:01:01:06*, *G\*01:01:19*, *G\*01:01:17* e *G\*01:04:05*).

No presente estudo, em comparação ao grupo controle, observou-se maior frequência do alelo *G\*01:01:01:01* (e do grupo alélico *G\*01:01*) no grupo de pacientes HCV. O alelo *G\*01:01:01:01* é o mais frequente no Brasil e em populações mundiais, e a região codificante desse alelo é usualmente associada com um haplótipo da região promotora nomeado de PROMO-010101a e com um haplótipo da região 3'UTR nomeado UTR-1 (CASTELLI et al., 2014b). Já foi demonstrado que a UTR-1 de gene *HLA-G* está associada com maior produção de *HLA-G* nas populações brasileira e francesa (MARTELLI-PALOMINO et al., 2013), assim como o haplótipo promotor 010101a numa população brasileira (DIAS et al., dados não publicados). Embora a frequência do alelo *G\*01:01:01:01* estivesse significativamente aumentado nos pacientes com HCV ( $f=0.2550$ ) em relação aos controles ( $f=0.1776$ ), a frequência desse alelo também estava aumentada nos pacientes coinfectados HCV-HIV ( $f=0.2294$ ), mas sem atingir significância estatística. Assim, além do microambiente inflamatório hepático, esses pacientes também possuem alelos associados com alta expressão de *HLA-G*.

O alelo nulo  $G^*01:05N$ , menos frequente no grupo de pacientes coinfectados HCV-HIV em comparação ao grupo controle, codifica molécula truncada em função da presença de um códon de parada no éxon 4 (CASTELLI et al., 2014b), o que impede com que as isoformas HLA-G1, -G4 e -G5 sejam transcritas e expressas (CAROSELLA et al., 2015). Tal alelo já foi associado com significativa redução dos níveis de sHLA-G (REBMANN et al., 2001) e a ausência dessas isoformas da molécula HLA-G está associada com a falta de supressão das atividades de células citotóxicas, incluindo CTL e NK e, conseqüentemente, com maior capacidade de resposta contra agentes virais. Embora a frequência do alelo  $G^*01:05N$  seja baixa na população controle ( $f=0.0428$ ), nos coinfectados HCV/HIV ( $f=0.0092$ ) e nos pacientes monoinfectados ( $f=0.0198$ ) a frequência foi ainda menor, porém, atingindo significância apenas para o grupo coinfectado. A baixa frequência do alelo nessas populações requereria número ainda maior de indivíduos para encontrar achados significantes. Finalmente, verificamos aumento significativo da frequência do alelo  $G^*01:01:01:04$  em pacientes coinfectados em relação aos monoinfectados. A estrutura molecular da proteína codificada por esse alelo é semelhante àquela codificada pelo alelo  $G^*01:01:01:01$ , diferindo apenas em substituições intrônicas. Embora a variabilidade genética em região intrônica possa estar associada com a regulação do gene, essa variabilidade ainda não foi estudada em relação à expressão da molécula e estudos posteriores necessitam ser realizados.

Para aprofundar o entendimento da interrelação da variabilidade na região codificadora do gene *HLA-G* com a expressão proteica, estratificamos as avaliações dos pacientes infectados pelo HCV e coinfectados HCV-HIV em três categorias: i) segundo os alelos *HLA-G* mais frequentemente observados em populações mundiais (CASTELLI et al., 2014b) e também nos pacientes desta casuística; ii) grupos de alelos segundo a proteína codificada, considerando que muitos alelos apresentam substituições sinônimas em regiões exônicas ou substituições intrônicas e iii) diplótipos formados pelos alelos ou grupos de alelos. Após todas as análises dessas estratificações, nenhum resultado significativo foi observado. Cabe salientar que, essas estratificações geram grupos pequenos em cada categoria e que posteriores estratificações segundo a magnitude de expressão de HLA-G subdividem ainda mais esses grupos. Assim, percebe-se que somente o estudo de grandes casuísticas poderia mostrar eventuais diferenças estatísticas.

Considerando que o alelo  $G^*01:01:01:01$  foi o mais frequentemente observado nos indivíduos monoinfectados por HCV ou nos coinfectados com HIV, podemos concluir que a

proteína expressa nos hepatócitos desses pacientes (G\*01:01) é também a mais comumente observada nas diversas populações, não havendo uma proteína especial que pudesse apresentar ação diferencial nas interações com seus receptores ILT-2, ILT-4 ou KIR2DL4. Assim, o achado principal deste estudo foi demonstrar que a magnitude de expressão da molécula HLA-G é um fator associado a atividade necroinflamatória e com o grau de fibrose hepática, em pacientes infectados pelo HCV e coinfectados com HIV, e não com uma proteína HLA-G em particular. Logo, tornam-se necessários estudos acerca das regiões reguladoras do gene *HLA-G*, incluindo a região 5'URR, onde agem fatores de transcrição, supostamente implicados na indução da expressão de HLA-G (regulação pré-transcricional). Em adição, o segmento 3'UTR do gene *HLA-G* é também importante na regulação pós-transcricional do gene, englobando fatores relacionados com a estabilidade do transcrito primário ou miRNAs específicos, cujas funções podem ser alteradas pela presença de sítios polimórficos nessa região. Esses estudos estão sendo realizados por nosso grupo e os resultados estão sendo analisados.

## **7 Conclusão**

---

Pacientes mono infectados pelo HCV ou co infectados pelo HIV apresentam aumento da expressão de HLA-G no fígado, estando tal expressão associada com fatores de pior prognóstico da hepatite C crônica, incluindo fibrose hepática e atividade necroinflamatória no fígado em ambos os grupos, assim como, idade igual ou superior a 40 anos e cor de pele não-branca nos pacientes HCV. A frequência do alelo *G\*01:01:01:01* esteve aumentada nos pacientes infectados pelo HCV, assim como a frequência do alelo *G\*01:05* diminuída nos pacientes co infectados HCV-HIV, no entanto, não houveram associações entre a variabilidade genética do gene *HLA-G* com a expressão hepática de HLA-G em biópias hepáticas. O presente estudo contribui para a ampliação de conhecimentos acerca da participação da molécula HLA-G na hepatite C crônica, em indivíduos co infectados ou não com HIV. O conhecimento do perfil de expressão da molécula HLA-G pode auxiliar na discriminação de pacientes infectados pelo HCV ou co infectados HCV-HIV com pior prognóstico e desfechos menos favoráveis. Outros estudos são necessários para avaliar a variabilidade genética de outros segmentos gênicos do *HLA-G* nesse contexto.

## **8 Referências bibliográficas**

---



- ABDEL-HAKEEM, M. S.; SHOUKRY, N. H. Protective immunity against hepatitis C: Many shades of gray. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. JUN, p. 1–19, 2014.
- ABEDIANKENARI, S.; GHASEMI, M.; KIM, Y. Human Leukocyte Antigen-G Expression on Dendritic Cells Induced by Transforming Growth Factor- $\beta$  1 and CD4 + T Cells Proliferation. **Iranian Biomedical Journal**, v. 15, n. April, p. 1–5, 2011.
- ACCAPEZZATO, D. et al. Hepatic expansion of a virus-specific regulatory CD8(+) T cell population in chronic hepatitis C virus infection. **The Journal of clinical investigation**, v. 113, n. 7, p. 963–72, 1 abr. 2004.
- AHN, K. et al. Human cytomegalovirus inhibits antigen presentation by a sequential multistep process. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 20, p. 10990–5, 1996.
- ALEGRE, E. et al. Some Basic Aspects of HLA-G Biology. p. 1–10, 2014.
- AMIOT, L. et al. Expression of HLA-G by mast cells is associated with hepatitis C virus-induced liver fibrosis. **Journal of Hepatology**, v. 60, n. 2, p. 245–252, 2014.
- AMIOT, L.; VU, N.; SAMSON, M. Immunomodulatory properties of HLA-G in infectious diseases. **Journal of Immunology Research**, p. 1–14, 2014.
- AMODIO, G.; SALES DE ALBUQUERQUE, R.; GREGORI, S. New insights into HLA-G mediated tolerance. **Tissue Antigens**, v. 84, n. 3, p. 255–263, 2014.
- ASSELAH, T. et al. Genetics, Genomics, and Proteomics: Implications for the Diagnosis and the Treatment of Chronic Hepatitis C. **Seminars in liver disease**, v. 1, n. 212, p. 13–27, 2007.
- BACON, B. R. et al. Boceprevir for Previously Treated Chronic HCV Genotype 1 Infection. **The New England journal of medicine**, v. 364, n. 13, p. 1207–1217, 2011.
- BARRETT, J. C. et al. Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**, v. 21, n. 2, p. 263–265, 2005.
- BEDOSSA, P. et al. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. **Hepatology**, v. 20, p. 15–20, 1994.
- BEDOSSA, P.; POYNARD, T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. **Hepatology**, v. 24, n. 2, p. 289–293, 1996.
- BENHAMOU, Y. et al. Liver fibrosis progression in human immunodeficiency virus and hepatitis C virus coinfecting patients. The Multivirc Group. **Hepatology**, v. 30, n. 4, p. 1054–1058, 1999.
- BOCHUD, P. Y. et al. Genotype 3 is associated with accelerated fibrosis progression in chronic hepatitis C. **Journal of Hepatology**, v. 51, n. 4, p. 655–666, 2009.
- BOYSON, J. E. et al. Disulfide bond-mediated dimerization of HLA-G on the cell surface.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 25, p. 16180–16185, 2002.
- BRASIL. Boletim Epidemiológico - Hepatites virais. **Ministério da Saúde**, v. 1, p. 172, 2012.
- BRASIL. Boletim Epidemiológico HIV/AIDS. **Ministério da Saúde**, p. 1–100, 2015.
- CAMPIOTTO, S. et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 38, n. 1, p. 41–9, 2005.
- CAROSELLA, E. D. et al. HLA-G: An Immune Checkpoint Molecule. **Advances in Immunology**, p. 33–144, 2015.
- CAROSELLA, E. D.; DAUSSET, J.; ROUAS-FREISS, N. Immunotolerant functions of HLA-G. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 55, n. 3, p. 327–333, 1999.
- CASHMAN, S. B.; MARSDEN, B. D.; DUSTIN, L. B. The Humoral Immune Response to HCV: Understanding is Key to Vaccine Development. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 1–10, 2014.
- CASTELLI, E. C. et al. The genetic structure of 3'untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes. **Genes and immunity**, v. 11, n. 2, p. 134–141, 2010.
- CASTELLI, E. C. et al. A comprehensive study of polymorphic sites along the HLA-G gene: implication for gene regulation and evolution. **Molecular biology and evolution**, v. 28, n. 11, p. 3069–86, 1 nov. 2011.
- CASTELLI, E. C. et al. Transcriptional and posttranscriptional regulations of the HLA-G gene. **Journal of Immunology Research**, n. 1-15, 2014a.
- CASTELLI, E. C. et al. Insights into HLA-G Genetics Provided by Worldwide Haplotype Diversity. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 1–27, 2014b.
- CATAMO, E. et al. Non-classical MHC-I human leukocyte antigen (HLA-G) in hepatotropic viral infections and in hepatocellular carcinoma. **Human Immunology**, v. 75, n. 12, p. 1225–1231, 2014.
- CAUMARTIN, J. et al. Trogocytosis-based generation of suppressive NK cells. **The EMBO journal**, v. 26, n. 5, p. 1423–1433, 2007.
- CHAN, J. Hepatitis C. **Disease-a-Month**, v. 60, n. 5, p. 201–212, 2014.
- CHEN, J. Y.; FEENEY, E. R.; CHUNG, R. T. HCV and HIV co-infection: mechanisms and management. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, v. 11, n. 6, p. 362–71, 2014.
- CHEN, S. L.; MORGAN, T. R. The Natural History of Hepatitis C Virus ( HCV ) Infection. **International Journal of Medical Sciences**, v. 3, n. 2, p. 47–52, 2006.

- CHOO, Q. L. et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, v. 244, n. 4902, p. 359–362, 1989.
- CONTINI, P. et al. Soluble HLA-A,-B,-C and -G molecules induce apoptosis in T and NK CD8+ cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation. **European Journal of Immunology**, v. 33, n. 1, p. 125–134, 2003.
- CORDERO, E. A A et al. HLA-G polymorphism influences the susceptibility to HCV infection in sickle cell disease patients. **Tissue Antigens**, v. 74, n. 4, p. 308–313, 2009.
- CURIGLIANO, G. et al. Molecular pathways: human leukocyte antigen G (HLA-G). **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 20, p. 5564–71, 2013.
- DA SILVA, G. K. et al. Influence of HLA-G polymorphisms in human immunodeficiency virus infection and hepatitis C virus co-infection in Brazilian and Italian individuals. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 21, p. 418–23, 2014.
- DE OLIVEIRA CRISPIM, J. C. et al. Upregulation of soluble and membrane-bound human leukocyte antigen G expression is primarily observed in the milder histopathological stages of chronic hepatitis C virus infection. **Human Immunology**, v. 73, n. 3, p. 258–262, 2012.
- DEEKS, S. G. et al. HIV infection. **Nature Reviews**, v. 1, p. 1–22, 2015.
- DEN UYL, D.; VAN DER HORST-BRUIJNSMA, I. E.; VAN AGTMAEL, M. Progression of HIV to AIDS: A protective role for HLA-B27? **AIDS Reviews**, v. 6, n. 2, p. 89–96, 2004.
- DI MARTINO, V. et al. The influence of human immunodeficiency virus coinfection on chronic hepatitis C in injection drug users: a long-term retrospective cohort study. **Hepatology**, v. 34, n. 6, p. 1193–9, dez. 2001.
- DIAS, F. C. et al. The Role of HLA-G Molecule and HLA-G Gene Polymorphisms in Tumors, Viral Hepatitis, and Parasitic Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 1–10, 2015.
- DONADI, E. A. Como Entender a Nomenclatura E Os Mecanismos De Associação Entre Os Antígenos E Os Alelos De. **Revista da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e do Hospital das Clínicas da FMRP**, v. 33, n. 1, p. 7–18, 2000.
- DONADI, E. A. et al. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 3, p. 369–395, 2011.
- DRUMMER, H. E. Challenges to the development of vaccines to hepatitis C virus that elicit neutralizing antibodies. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. JULY, p. 1–10, 2014.
- DUSTIN, L. B.; CASHMAN, S. B.; LAIDLAW, S. M. Immune control and failure in HCV infection-tipping the balance. **Journal of leukocyte biology**, v. 96, p. 1–14, 2014.

- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 564–567, 2010.
- FAURE, M.; LONG, E. O. KIR2DL4 (CD158d), an NK cell-activating receptor with inhibitory potential. **Journal of immunology**, v. 168, n. 12, p. 6208–6214, 2002.
- FLYNN, J. K. et al. Early IL-10 predominant responses are associated with progression to chronic hepatitis C virus infection in injecting drug users. **Journal of viral hepatitis**, v. 18, n. 8, p. 549–61, ago. 2011.
- GARCÍA, S. L. et al. Genética y tratamiento de la hepatitis C: ¿hacia un tratamiento personalizado? **Gastroenterología y hepatología**, v. 34, n. 5, p. 352–60, maio 2011.
- GERAGHTY, D. E.; KOLLER, B. H.; ORR, H. T. A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 24, p. 9145–9149, 1987.
- GHANY, M. G. et al. Progression of fibrosis in chronic hepatitis C. **Gastroenterology**, v. 124, n. 1, p. 97–104, 2003.
- GONZÁLEZ, Ñ. et al. The immunosuppressive molecule HLA-G and its clinical implications. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 49, n. 3, p. 63–84, 2012.
- GREGORI, S. et al. Differentiation of type 1 T regulatory cells ( Tr1 ) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10 – dependent ILT4 / HLA-G pathway. **Blood**, v. 116, n. 6, p. 935–944, 2010.
- GRUBER, B. L. et al. Human Mast Cells Activate Fibroblasts: Tryptase is a Fibrogenic Factor Stimulating Collagen Messenger Ribonucleic Acid Synthesis and Fibroblast Chemotaxis. **Journal of Immunology**, v. 158, n. 5, p. 2310–2317, 1997.
- HEIM, M. H.; THIMME, R. Innate and adaptive immune responses in HCV infections. **Journal of Hepatology Update: Hepatitis C**, v. 61, p. S14–S25, 2014.
- HONG, X. et al. Human leukocyte antigen class II DQB1\*0301, DRB1\*1101 alleles and spontaneous clearance of hepatitis C virus infection: a meta- analysis. **World journal of gastroenterology**, v. 11, n. 46, p. 7302–7307, 2005.
- HORUZSKO, A et al. Maturation of antigen-presenting cells is compromised in HLA-G transgenic mice. **International immunology**, v. 13, n. 3, p. 385–394, 2001.
- HOWELL, W. M.; CARTER, V.; CLARK, B. The HLA system: immunobiology, HLA typing, antibody screening and crossmatching techniques. **Journal of clinical pathology**, v. 63, n. 5, p. 387–390, 2010.

- JACOBSON, I. M. et al. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. **The New England journal of medicine**, v. 364, n. 25, p. 2405–16, 23 jun. 2011.
- KHORRAMI, S. et al. The relationship between HLA-G and viral loads in non-responder HCV-infected patients after combined therapy with IFN- $\alpha$ 2 $\alpha$  and ribavirin. **Human Immunology**, v. 76, n. 2-3, p. 181–186, 2015.
- KLEIN, J.; SATO, A. The HLA System: First of Two Parts. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 10, p. 0–7, 2000.
- KOHLI, A. et al. Treatment of hepatitis C. **JAMA**, v. 312, n. 6, p. 631–640, 2014.
- KOVATS, S. et al. A Class I Antigen, HLA-G, Expressed in Human Trophoblasts. **Science**, v. 248, p. 220–223, 1990.
- KOZIEL, M. J. Cellular immune responses against hepatitis C virus. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, p. S25–S31, 2005.
- KRETZER, I. F. et al. Hepatitis C worldwide and in Brazil: Silent epidemic - Data on disease including incidence, transmission, prevention, and treatment. **Scientific World Journal**, p. 1–10, 2014.
- KUEHLKAMP, V. M.; SCHUELTER-TREVISOL, F. Prevalence of human immunodeficiency virus/hepatitis C virus co-infection in Brazil and associated factors: A review. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 4, p. 455–463, 2013.
- LAJOIE, J. et al. Genetic variants in nonclassical major histocompatibility complex class I human leukocyte antigen (HLA)-E and HLA-G molecules are associated with susceptibility to heterosexual acquisition of HIV-1. **The Journal of infectious diseases**, v. 193, n. 2, p. 298–301, 2006.
- LARRUBIA, J. R. et al. Adaptive immune response during hepatitis C virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 13, p. 3418–3430, 2014.
- LAUER, G. M.; WALKER, B. D. Hepatitis C virus infection. **The New England journal of medicine**, v. 345, n. 1, p. 41–52, 2001.
- LAWITZ, E. et al. Simeprevir plus sofosbuvir, with or without ribavirin, to treat chronic infection with hepatitis C virus genotype 1 in non-responders to pegylated interferon and ribavirin and treatment-naïve patients: the COSMOS randomised study. **The Lancet**, v. 384, n. 9956, p. 1756–1765, 2014.
- LE DISCORDE, M. et al. Expression of HLA-G in Human Cornea, an Immune-Privileged Tissue. **Human Immunology**, v. 64, n. 11, p. 1039–1044, 2003.
- LE GAL, F. A. et al. HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. **International Immunology**, v. 11, n. 8, p. 1351–1356, 1999.

- LEFEBVRE, S. et al. Modulation of HLA-G expression in human thymic and amniotic epithelial cells. **Human Immunology**, v. 61, n. 11, p. 1095–1101, 2000.
- LEMAOULT, J. et al. HLA-G1-expressing antigen-presenting cells induce immunosuppressive CD4+ T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 18, p. 7064–7069, 2004.
- LEMAOULT, J. et al. Immune regulation by pretenders : cell-to-cell transfers of HLA-G make effector T cells act as regulatory cells Immune regulation by pretenders : cell-to-cell transfers of HLA-G make effector T cells act as regulatory cells. **Blood**, v. 109, n. 5, p. 2040–2048, 2007.
- LEMAOULT, J.; ROUAS-FREISS, N.; CAROSELLA, E. D. Immuno-tolerogenic functions of HLA-G : Relevance in transplantation and oncology. **Autoimmunity Reviews**, v. 4, p. 503–509, 2005.
- LIANG, S.; HORUZSKO, A. Mobilizing Dendritic Cells for Tolerance by Engagement of Immune Inhibitory Receptors for HLA-G. **Human Immunology**, v. 64, n. 11, p. 1025–1032, 2003.
- LOZANO, J. M. et al. Monocytes and T lymphocytes in HIV-1-positive patients express HLA-G molecule. **AIDS**, v. 16, n. 3, p. 347–351, 2002.
- LUO, M. et al. HLA-G and mother-child perinatal HIV transmission. **Human Immunology**, v. 74, n. 4, p. 459–463, 2013.
- MAARTENS, G.; CELUM, C.; LEWIN, S. R. HIV infection: Epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. **The Lancet**, v. 384, n. 9939, p. 258–271, 2014.
- MANNNS, M. et al. All-oral daclatasvir plus asunaprevir for hepatitis C virus genotype 1b: a multinational, phase 3, multicohort study. **The Lancet**, v. 384, p. 1597–1605, 2014.
- MARCELLIN, P.; ASSELAH, T.; BOYER, N. Fibrosis and disease progression in hepatitis C. **Hepatology**, v. 36, n. 5 I, p. 47–56, 2002.
- MARTELLI-PALOMINO, G. et al. Polymorphic Sites at the 3 Untranslated Region of the HLA-G Gene Are Associated with Differential hla-g Soluble Levels in the Brazilian and French Population. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. 1–10, 25 out. 2013.
- MARTIN-CARBONERO, L. et al. Liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C and persistently normal liver enzymes: Influence of HIV infection. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 16, n. 11, p. 790–795, 2009.
- MARTINETTI, M. et al. Hierarchy of baby-linked immunogenetic risk factors in the vertical transmission of hepatitis C virus. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 19, n. 2, p. 369–378, 2006.

- MATTE, C. et al. Functionally active HLA-G polymorphisms are associated with the risk of heterosexual HIV-1 infection in African women. **AIDS**, v. 18, n. 3, p. 427–431, 2004.
- MCHUTCHISON, J. G. et al. Telaprevir for previously treated chronic HCV infection. **The New England journal of medicine**, v. 362, n. 14, p. 1292–1303, 2010.
- MCMICHAEL, A.; DORRELL, L. The immune response to HIV. **Medicine**, v. 37, n. 7, p. 321–325, 2009.
- MÉGRET, F. et al. Modulation of HLA-G and HLA-E Expression in Human Neuronal Cells After Rabies Virus or Herpes Virus Simplex Type 1 Infections. **Human Immunology**, v. 68, n. 4, p. 294–302, 2007.
- MENIER, C. et al. Erythroblasts secrete the nonclassical HLA-G molecule from primitive to definitive hematopoiesis. **Blood**, v. 104, n. 10, p. 3153–3160, 2004.
- MESSINA, J. P. et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. **Hepatology**, n. Ec 21803, p. 77–87, 2015.
- MOREAU, P. et al. IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. **International Immunology**, v. 11, n. 5, p. 803–811, 1999.
- NAJI, A. et al. Binding of HLA-G to ITIM-bearing Ig-like transcript 2 receptor suppresses B cell responses. **Journal of immunology**, v. 192, n. 4, p. 1536–46, 2014.
- NAVIKAS, V. et al. Increased mRNA expression of IL-6, IL-10, TNF-alpha, and perforin in blood mononuclear cells in human HIV infection. **Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology**, v. 9, n. 5, p. 484–9, 15 ago. 1995.
- NEUMANN-HAEFELIN, C. et al. Dominant influence of an HLA-B27 restricted CD8+ T cell response in mediating HCV clearance and evolution. **Hepatology**, v. 43, n. 3, p. 563–572, 2006.
- ONNO, M. et al. The HLA-G gene is expressed at a low mRNA level in different human cells and tissues. **Human Immunology**, v. 41, n. 1, p. 79–86, 1994.
- ONNO, M. et al. Modulation of HLA-G antigens expression by human cytomegalovirus: specific induction in activated macrophages harboring human cytomegalovirus infection. **Journal of immunology**, v. 164, n. 12, p. 6426–6434, 2000.
- ORR, M. T. et al. Inhibition of MHC class I is a virulence factor in herpes simplex virus infection of mice. **PLoS Pathogens**, v. 1, n. 1, p. 0062–0071, 2005.
- PASSOS, A. D. C. Hepatite C : Aspectos Críticos De Uma Epidemia silenciosa. **Caderno de Saúde Pública**, v. 22, n. 8, p. 1761–1765, 2006.
- PAZMANY, L. et al. Protection from natural killer cell-mediated lysis by HLA-G expression on target cells. **Science**, v. 274, n. 5288, p. 792–795, 1996.

- PEARLMAN, B. L.; EHLEBEN, C.; PERRY, M. The Combination of Simeprevir and Sofosbuvir Is More Effective Than That of Peginterferon, Ribavirin, and Sofosbuvir for Patients With Hepatitis C–Related Child’s Class A Cirrhosis. **Gastroenterology**, v. 148, n. 4, p. 762–770, 2015.
- PIAZZOLLA, G. et al. Relationship between interferon-gamma, interleukin-10, and interleukin-12 production in chronic hepatitis C and in vitro effects of interferon-alpha. **Journal of clinical immunology**, v. 20, n. 1, p. 54–61, 2000.
- POORDAD, F. et al. Boceprevir for Untreated Chronic HCV Genotype 1 Infection. **The New England journal of medicine**, v. 364, n. 13, p. 1195–1206, 2011.
- POYNARD, T.; BEDOSSA, P.; OPOLON, P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. **The Lancet**, v. 349, p. 825–832, 1997.
- PROBST, A. et al. Role of Hepatitis C virus genotype 3 in liver fibrosis progression - A systematic review and meta-analysis. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 18, n. 11, p. 745–759, 2011.
- PUPPO, F. et al. Soluble HLA class I molecules/CD8 ligation trigger apoptosis of CD8+ cells by Fas/Fas-ligand interaction. **The Scientific World Journal**, v. 2, p. 421–423, 2002.
- RAJAGOPALAN, S.; LONG, E. O. A Human Histocompatibility Leukocyte Antigen (HLA)-G–specific Receptor Expressed on All Natural Killer Cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 189, n. 7, p. 1093–1099, 1999.
- RAUCH, A. et al. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. **Gastroenterology**, v. 138, n. 4, p. 1338–45, abr. 2010.
- RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. **The Journal of Heredity**, v. 86, n. 3, p. 248–249, 1995.
- REBMANN, V. et al. Association of soluble HLA-G plasma levels with HLA-G alleles. **Tissue Antigens**, v. 57, n. 1, p. 15–21, 2001.
- REBMANN, V. et al. Detection of HLA-G5 Secreting Cells. **Human Immunology**, v. 64, n. 11, p. 1017–1024, 2003.
- RISTICH, V. et al. Tolerization of dendritic cells by HLA-G. **European Journal of Immunology**, v. 35, n. 4, p. 1133–1142, 2005.
- ROCKEY, D. C. et al. Liver biopsy. **Hepatology**, v. 49, n. 3, p. 1017–1044, 2009.
- ROTMAN, Y.; LIANG, T. J. Coinfection with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus: virological, immunological, and clinical outcomes. **Journal of virology**, v. 83, n. 15, p. 7366–7374, 2009.



- ROUAS-FREISS, N. et al. The alpha1 domain of HLA-G1 and HLA-G2 inhibits cytotoxicity induced by natural killer cells: is HLA-G the public ligand for natural killer cell inhibitory receptors? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 10, p. 5249–5254, 1997.
- SEEFF, L. B. Natural history of chronic hepatitis C. **Hepatology**, v. 36, n. 5 Suppl 1, p. S35–46, nov. 2002.
- SEGAT, L. et al. HLA-G\*0105N allele is associated with augmented risk for HIV infection in white female patients. **AIDS**, v. 24, n. 12, p. 1961–1964, 2010.
- SHIROISHI, M. et al. Efficient leukocyte Ig-like receptor signaling and crystal structure of disulfide-linked HLA-G dimer. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 15, p. 10439–10447, 2006.
- SILVA, A. C. M.; BARONE, A. A. Fatores de risco para infecção pelo HIV em pacientes com o vírus da hepatite C Risk factors for HIV infection among patients infected with hepatitis C. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, n. 3, p. 482–488, 2006.
- SMITH, D. B. et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. **Hepatology**, v. 59, n. 1, p. 318–27, 2014.
- STAHMEYER, J. T.; ROSSOL, S.; KRAUTH, C. Outcomes, costs and cost-effectiveness of treating hepatitis C with direct acting antivirals. **Journal of comparative effectiveness research**, p. 1–11, 2015.
- STEPHENS, M.; SMITH, N. J.; DONNELLY, P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. **American journal of human genetics**, v. 68, n. 4, p. 978–989, 2001.
- STETSON, D. B.; MEDZHITOV, R. Type I Interferons in Host Defense. **Immunity**, v. 25, n. 3, p. 373–381, 2006.
- SULKOWSKI, M. S. et al. Daclatasvir plus sofosbuvir for previously treated or untreated chronic HCV infection. **The New England journal of medicine**, v. 370, n. 3, p. 211–21, 2014.
- THEIN, H.-H. et al. Natural history of hepatitis C virus infection in HIV-infected individuals and the impact of HIV in the era of highly active antiretroviral therapy: a meta-analysis. **AIDS**, v. 22, n. 15, p. 1979–1991, 2008.
- THOMAS, D. L. et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. **Nature**, v. 461, n. 7265, p. 798–801, 8 out. 2009.
- TILLMANN, H. L. et al. Low frequency of HLA-DRB1\*11 in hepatitis C virus induced end

stage liver disease. **Gut**, v. 48, n. 5, p. 714–718, 2001.

TORRES, M. A.; MORAES, M. E. H. Nomenclature for factors of the HLA system.

**Einstein**, v. 9, n. 11, p. 2010–2012, 2011.

VILAR, F. C. **Expressão do HLA-G no tecido hepático de pacientes coinfectados com HIV / HCV**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2014.

WENG, P.-J. et al. Elevation of plasma soluble human leukocyte antigen-G in patients with chronic hepatitis C virus infection. **Human immunology**, v. 72, n. 5, p. 406–411, 2011.

WESTBROOK, R. H.; DUSHEIKO, G. Natural history of hepatitis C. **Journal of Hepatology Update: Hepatitis C**, v. 61, p. S58–S68, 2014.

WHO. **Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis c infection**2014

WHO. **Hepatitis C**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>>.

Acesso em: 17 maio. 2016.

WHO. **HIV/AIDS**. Disponível em: <<http://www.who.int/hiv/en/>>. Acesso em: 17 maio. 2016.

ZEUZEM, S. et al. Simeprevir increases rate of sustained virologic response among treatment-experienced patients with HCV genotype-1 infection: A phase IIb trial.

**Gastroenterology**, v. 146, n. 2, p. 430–441, 2014.

## **9 Anexos**

---

## ANEXO I



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA  
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Ribeirão Preto, 12 de maio de 2014

Ofício nº 1549/2014  
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 6102/2013

“INFLUÊNCIA DA EXPRESSÃO DA MOLÉCULA IMMUNOREGULADORA  
HLA-G NA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE C E NA COINFECÇÃO  
COM O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA”

Prezado Senhor,

O Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 386ª Reunião Ordinária, realizada em 12/05/2014, tomou ciência e aprovou as recomendações solicitadas pela CONEP e atendidas por Vossa Senhoria (conforme parecer anexo).

Atenciosamente.

**DRª. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA**  
Coordenadora do Comitê de Ética  
em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP


Ilustríssimo Senhor  
**PROF.DR. EDUARDO ANTÔNIO DONADI**  
Depto. de Clínica Médica

Campus Universitário – Monte Alegre  
14048-900 Ribeirão Preto SP


Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP  
FWA-00002733;IRB-00002186 e Registro PB/CONEP n 5440  
(16) 3602-2228  
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

## ANEXO II



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA  
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Ribeirão Preto, 11 de abril de 2012

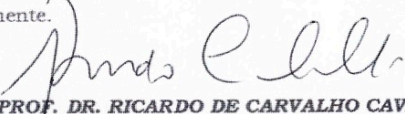
Ofício nº 1335/2012  
CEP/RCC

**PROCESSO HCRP nº 3416/2003**

**Prezada Pesquisadora,**

O Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 343ª Reunião Ordinária realizada em 09/04/2012, tomou ciência e aprovou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de Guarda de Material – Biorrepositório de Fígado Laboratório Multidisciplinar (versão 2.0 de 02 de abril de 2012) e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de Guarda Material – Biorrepositório de Soro, Plasma e DNA Laboratório Multidisciplinar (versão 2.0 de 02 de abril de 2012), referente a **“PROPOSTA DE RECONHECIMENTO E DE CRIAÇÃO DE BANCO DE AMOSTRA BIOLÓGICA DO DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA – DIVISÃO DE GASTROENTEROLOGIA DO HCFMRP-USP”**. O CEP também tomou ciência da solicitação de dispensa da apresentação das novas versões aos pacientes anteriormente consentidos com a versão 1.0 do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Guarda de Material Biológico.

Atenciosamente.



**PROF. DR. RICARDO DE CARVALHO CAVALLI**  
Vice-Coordenador do Comitê de Ética  
em Pesquisa do HCRP-USP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora  
**PROFª DRª ANA DE LOURDES CANDOLO MARTINELLI**  
Depto. de Clínica Médica – Divisão de Gastroenterologia

---

Campus Universitário – Monte Alegre  
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP  
FWA-00002733; IRB-00002186 e Registro SISNEP/CONEP nº 4  
(016) 3602-2228  
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br