

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Análise de haplótipos da região 3'UTR de *HLA-G* em pacientes infectados por HCV que desenvolveram carcinoma hepatocelular, cirrose ou fibrose**

Julio Daimar Oliveira Correa

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. José Artur Bogo Chies

Porto Alegre, 25 de Março de 2019

## **Sumário**

Abreviaturas.....	3
Resumo.....	4
Abstract.....	5
Introdução.....	6
Artigo.....	15
Discussão.....	31
Referências Bibliográficas.....	35

## **Abreviaturas**

3'UTR – Região 3' não traduzida (*3' untranslated region*)

HCC – Carcinoma hepatocelular (*hepatocellular carcinoma*)

HCV – Vírus da Hepatite C (*hepatitis C virus*)

HLA-G - Antígeno Leucocitário Humano G (*human leucocyte antigen G*)

PCR – Reação em cadeia da polimerase (*polimerase chain reaction*)

## Resumo

A infecção pelo vírus da hepatite C (*hepatitis C virus*, HCV) é uma das principais causas de doenças crônicas do fígado, podendo desencadear comorbidades associadas como carcinoma hepatocelular (*hepatocelular carcinoma*, HCC), cirrose e fibrose. O HCV, contra o qual não existe uma vacina eficaz, é, em muitos casos, capaz de evadir a resposta imune do hospedeiro e estabelecer uma infecção crônica. A molécula imunomoduladora codificada pelo gene *HLA-G* pode ter relação com a suscetibilidade à infecção. A região 3' não traduzida (*3' untranslated region*, 3'UTR) do *HLA-G* é importante para sua expressão e variantes nessa região são herdadas em bloco, formando haplótipos. Este trabalho focou na análise de haplótipos na região 3'UTR do gene *HLA-G* em 286 pacientes infectados por HCV, comparando com 129 indivíduos saudáveis. Os principais haplótipos identificados foram UTR-1, UTR-2 e UTR-3 nas frequências de 0.276, 0.255 e 0.121, respectivamente, nos pacientes. A comparação das frequências haplotípicas entre pacientes e controles e entre os diferentes grupos classificados de acordo com o desenvolvimento de comorbidades (HCC, cirrose ou fibrose) não apresentou diferenças estatisticamente significativas.

## **Abstract**

Hepatitis C virus (HCV) infection is a major cause of chronic liver disease, and such condition can result in comorbidities such as hepatocellular carcinoma (HCC), cirrhosis and fibrosis. There is no effective vaccine against HCV infection, which, in some cases can efficiently evade the host immune response and establish a chronic infection. The *HLA-G* gene encodes an immunomodulatory protein suggested to be related to HCV infection susceptibility. The *HLA-G* 3' untranslated region (3'UTR) is an important gene regulatory region and different polymorphic variants which interfere in gene expression are located in this region and are inherited as haplotypes. This study comprised the *HLA-G* 3'UTR evaluation of 286 HCV+ patients, and 129 healthy control subjects. From the distinct described *HLA-G* haplotypes, the most commonly observed in our sample were UTR-1, UTR-2 and UTR-3 in the frequencies of 0.276, 0.255 e 0.121, respectively, in HCV+ patients. No statistically significant difference was observed between HCV+ and control subjects, even when they were grouped according to outcome (HCC, cirrhosis or fibrosis).

## **Introdução**

### ***Hepatite C***

A hepatite C é uma doença do fígado causada por infecção pelo Vírus da Hepatite C (*hepatitis C virus*, HCV). A infecção por HCV afeta cerca de 170 milhões de pessoas no mundo, sendo a principal causa de doenças do fígado como cirrose e carcinoma hepatocelular (de Oliveira Crispim et al. 2012). Tais sequelas não são imediatas e podem ser identificadas tardiamente, após intervalos tão grandes como dez anos, visto que a infecção geralmente não gera sintomatologia grave na fase aguda (de Oliveira Crispim et al. 2012, Mohd Hanafiah, Groeger et al. 2013). A infecção por HCV é um grande problema de saúde global, e sua transmissão geralmente ocorre por exposição a sangue ou outro fluido corporal contaminado.

Apesar da meta da Organização Mundial da Saúde de erradicar a hepatite C até 2030, é discutido na literatura que a erradicação só será possível com uma vacina eficaz e conscientização da população (Lombardi, Mondelli et al. 2019). Desde 2014, o uso de fármacos baseados em agentes antivirais de ação direta mudou a terapia anti-HCV. O que antes era uma doença de difícil erradicação cujo tratamento apresentava possíveis efeitos colaterais adversos severos, tornou-se uma doença que pode ser erradicada em um período de 8 a 12 semanas com tratamento utilizando-se uma a três pílulas por dia de medicamentos antivirais de amplo espectro como ribavirina (*European Association for Study of Liver*, 2017, Lombardi, Mondelli et al. 2019). Apesar disso, e do fato do número absoluto de pacientes com HCV ter diminuído no mundo desde 2007, a infecção por HCV ainda é um problema global (Polaris Observatory HCV Collaborators, 2017, Lombardi, Mondelli et al. 2019). Estima-se que de três a quatro milhões de pessoas são infectadas a cada ano no mundo (Mohd Hanafiah, Groeger et al. 2013). Parte dos novos casos de hepatite C deve-se ao uso recorrente de drogas injetáveis, a partir do compartilhamento de agulhas e seringas (Lombardi, Mondelli et al. 2019). Além disso, 350.000 mortes ocorrem todo ano por causas relacionadas à infecção por HCV, independente do modo de contágio (Mohd Hanafiah, Groeger et al. 2013).

O genoma do HCV é composto por um RNA de fita simples (ssRNA) de sentido positivo (o próprio RNA do vírus é traduzido como mRNA). Esse RNA está organizado com regiões não traduzidas (*untranslated region*, UTR) em ambas as extremidades e

apresenta uma única fase aberta de leitura (*open reading frame*, ORF) que codifica uma poliproteína de 327 kDa. Esta poliproteína é posteriormente processada em 10 proteínas virais, muitas delas multifuncionais (McGivern and Lemon 2011). Muitas dessas proteínas virais podem interagir com proteínas do hospedeiro, facilitando a amplificação do genoma, interferindo na resposta imune do hospedeiro, ou facilitando a replicação viral (McGivern and Lemon 2011).

O desenvolvimento da hepatite crônica, isto é sua progressão para fibrose, cirrose ou carcinoma, é altamente variável em diferentes indivíduos (Marcellin, Asselah et al. 2002, McCaughan and George 2004, Guo, Jin et al. 2015). Diferenças nas características virais, fatores ambientais e do hospedeiro, como idade no momento da infecção, sexo, ingestão exagerada de álcool, esteatose, sobrepeso e obesidade, coinfeção com HIV e características genéticas do hospedeiro, são capazes de influenciar a progressão da infecção (de Oliveira Crispim et al. 2012, Guo, Jin et al. 2015).

A inflamação decorrente da infecção crônica é responsável por dano no tecido hepático, o que ativa o processo de regeneração e cicatrização (Mesri, Feitelson et al. 2014, Guo, Jin et al. 2015). Esse processo, que inicialmente pode ser considerado uma resposta fisiológica e positiva ao dano, pode evoluir para fibrose, cirrose ou carcinoma (Mesri, Feitelson et al. 2014). A cirrose é caracterizada histologicamente por regeneração nodular difusa cercada por septos fibróticos densos com subsequente colapso de estruturas hepáticas e distorção da disposição vascular do fígado (Nishikawa and Osaki 2015).

O processo de oncogênese do carcinoma hepatocelular (*hepatocellular carcinoma*, HCC) envolve uma combinação de mecanismos diretos e indiretos decorrentes de dano oxidativo crônico, o qual promove o estabelecimento de mutações (Mesri, Feitelson et al. 2014). Além disso, as proteínas 5A (NS5A) e NS3, codificadas pelo HCV, são capazes de interferir na expressão gênica do hospedeiro, promovendo o desenvolvimento de HCC diretamente. A inflamação mediada pelo sistema imune contribui indiretamente para o desenvolvimento de HCC. O HCC é a terceira causa de morte por câncer no mundo (Heikenwälder and Pikarsky 2017).

Assim como outros vírus, o HCV é capaz de evadir a resposta imune do hospedeiro, característica que pode ter efeito direto na progressão da infecção e é, portanto, alvo de estudos (Ortega-Pietro, Dorner, 2017). O sistema imune do hospedeiro

falha em eliminar o vírus em 50 a 85% dos casos (de Oliveira Crispim et al. 2012). A evasão do vírus também pode estar relacionada com o curso atenuado e clinicamente assintomático da infecção e progressão lenta (Rehermann and Nascimbeni 2005). O HCV é capaz de escapar do sistema imune modulando tanto a resposta imunológica inata quanto a adaptativa, por exemplo, bloqueando a produção de células T auxiliares do tipo 1 (Th1) (Catamo, Zupin et al. 2017). Uma molécula do hospedeiro com propriedades imunomodulatórias que pode estar relacionada com a suscetibilidade diferencial e permissividade à infecção, bem como com o desenvolvimento de cirrose e HCC, é o Antígeno Leucocitário Humano G (*Human Leukocyte Antigen G*, HLA-G).

### ***HLA-G***

Os genes do Antígeno Leucocitário Humano (*Human Leukocyte Antigen*, HLA) estão relacionados com a resposta imune e são localizados na região do Complexo Principal de Histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) (Murphy 2014, Jeanmougin, Noirel et al. 2017). O MHC é uma região genômica de alta densidade e variabilidade que compreende um tamanho de 3,6 megabases (3,6 Mb), engloba mais de 200 genes e está localizada no cromossomo 6 (6p21.3) (Klein and Sato 2000, Castelli, Mendes-Junior et al. 2010).

O *HLA-G* é um gene não clássico do HLA classe I, composto por oito exons, sete introns, com um códon de terminação no exon 6, uma região promotora, (5' *upstream regulatory region*, 5'URR) e uma região 3'UTR. É importante mencionar que o gene *HLA-G* tem uma variabilidade mais baixa do que os genes clássicos do HLA. O transcrito do gene *HLA-G* pode sofrer um processo de *splicing* alternativo, potencialmente dando origem a sete isoformas proteicas, sendo quatro de membrana e três solúveis (Catamo, Zupin et al. 2014). A molécula de HLA-G inibe a função citolítica das células *natural killer* (NK) e das células T citotóxicas ligando-se a receptores específicos nessas células (Catamo, Zupin et al. 2017).

A região 3'UTR do *HLA-G* é uma região regulatória cujas variantes podem influenciar na expressão do gene por mecanismos de controle pós-transcricional (Castelli, Mendes-Junior et al. 2010, Zambra, Biolchi et al. 2016). Algumas das principais variantes conhecidas dessa região são o polimorfismo 14pb inserção / deleção na posição +2960 e os polimorfismos de nucleotídeo únicos (*single nucleotide*

*polymorphisms*, SNPs) +3142G/C e +3187A/G. Os alelos 14pb inserção, +3142G e +3187A dessas variantes foram associados com baixa produção e disponibilidade do mRNA de *HLA-G* (Harrison, Humphrey et al. 1993, Rebmann, van der Vem et al. 2001, Hviid, Hylenius et al. 2003, Hviid, Rizzo et al. 2006, Ye, Li et al. 2008, Castelli, Moreau et al. 2009, Veit, Chies et al. 2009, Rizzo, Bortolotti et al. 2012). Outros cinco SNPs adicionais (+3003T/C, +3010C/G, +3027A/C, +3035C/T e +2196C/G), ainda não foram diretamente associados com expressão diferencial de *HLA-G*, mas englobam potenciais sítios de ligação de microRNAs, podendo afetar os níveis de *HLA-G* (Castelli, Moreau et al. 2009, Porto, Mendes-Junior et al. 2015, Zambra, Biolchi et al. 2016). Estes oito polimorfismos estão descritos na literatura e sabe-se que são herdados em bloco como haplótipos (Castelli, Mendes-Junior et al, 2010). Os haplótipos mais bem conhecidos e de maior frequência na população brasileira, de acordo com Castelli et al (2010) são: UTR-1 (frequência 0,258), UTR-2 (0,242), UTR-3 (0,126), UTR-4 (0,132), UTR-5 (0,093), UTR-6 (0,068), UTR-7 (0,055) e UTR-8 (0,013).

A molécula *HLA-G* pode ligar-se ao receptor *ILT-2* (*immunoglobulin-like transcript 2*; CD85j; LILRB1) em células NK e células T, levando à inibição das funções destas células por mudanças na capacidade proliferativa e citotoxicidade (Colonna, Navarro et al. 1997, Amiot, Vu et al. 2015). Por outro lado, a interação do *HLA-G* com o receptor *ILT-4* (*immunoglobulin-like transcript 4*; CD85d; LILRB2) inibe a função de apresentação de antígenos das células que expressam *ILT-4*, enfraquecendo a resposta imune adaptativa (Basturk, Karakayali et al. 2006, Amiot, Vu et al. 2015). Sabe-se que células dendríticas, macrófagos e monócitos expressam *ILT-4*, e estas células estão presentes no fígado (Colonna, Samaridis et al. 1998, Amiot, Vu et al. 2015). Células NK também expressam um receptor específico para *HLA-G*, denominado *KIR2DL4* (*killer immunoglobulin-like receptor DLA*), que pode ter tanto função inibitória como de ativação (Rajagopalan, Long. 1999, Faure, Long. 2002, Albayati, Alomar et al. 2017).

Em situações fisiológicas, a expressão de *HLA-G* está restrita a células, tecidos e alguns órgãos específicos, como as células do trofoblasto na interface materno-fetal (Kovats, Main et al. 1990), a córnea (Le Discorde, Moreau et al. 2003), o timo (Mallet, Blaschitz et al. 1999) e células eritróides e endoteliais (Menier, Rabreau et al. 2004). Entretanto, já foi verificada a expressão da molécula *HLA-G* em situações patológicas, como câncer (Yan 2011) e em doenças autoimunes (Rizzo, Bortolotti et al. 2014), bem

como em doenças infecciosas (Rizzo, Bortolotti et al. 2014). De especial interesse para nosso trabalho, a expressão da molécula HLA-G já foi detectada em doenças do fígado, incluindo hepatite C (Amiot, Vu et al. 2015). Sua expressão depende fortemente de fatores presentes no microambiente, como citocinas, tais como IL-10, GM-CSF, IL-2, TGF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Yang, Geraghty et al. 1995, Moreau, Yang, Chu et al. 1996, Moreau, Adrian-Cabestre et al. 1999, Gros, Sebti et al. 2006, Amiot, Vu et al. 2015). Dentre estas citocinas destaca-se a IL-10, que é uma citocina importante na estratégia de evasão da resposta imune do hospedeiro pelos vírus (Couper, Blount et al. 2008).

### ***HLA-G e infecções***

A molécula imunomodulatória HLA-G vem sendo avaliada em doenças infecciosas nos últimos anos quanto a sua expressão e influência de variantes polimórficas do seu gene. Devido ao seu papel imunossupressor, é possível que uma maior expressão de *HLA-G* possa estar relacionada com suscetibilidade a infecções (Xu, Shi et al. 2014, Catamo, Zupin et al. 2017). Em infecções virais, diversos estudos avaliaram polimorfismos de *HLA-G* em pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Fabris, Catamo et al. 2009, Larsen, Zinyama et al. 2013, Luo, Czarnecki et al. 2013, Turk, Kimani et al. 2013, Segat, Zupin et al. 2014), o vírus do papiloma humano (HPV) (Metcalf, Roger et al. 2013, Bortolotti, Gentili et al. 2014, Xu, Shi et al. 2014), o vírus da influenza A (LeBouder, Khoufache et al. 2009, Foucault, Moules et al. 2011), citomegalovírus (CMV) (Guberina, Michita et al. 2017), vírus da hepatite B (HBV) (Laaribi, Zidi et al. 2015) e o vírus da hepatite C (HCV) (Martinetti, Pacati et al. 2006, Cordero, Veit et al. 2009, Catamo, Zupin et al. 2017). Alguns destes estudos diferem entre si por avaliarem polimorfismos distintos do gene ou contextos clínicos diferentes de infecção, como ocorrência de co-infecção ou mesmo realização concomitante de transplante. Uma breve revisão dos principais achados desses estudos é apresentada nos próximos parágrafos.

Estudos com pacientes HIV positivos abordaram diversas situações, incluindo tanto a transmissão materna e suscetibilidade, como co-infecção com HCV e HPV (Martinetti, Pacati et al. 2006, Fabris, Catamo et al. 2009, Larsen, Zinyama et al. 2013, Luo, Czarnecki et al. 2013, Turk, Kimani et al. 2013, da Silva, Vianna et al. 2014, Segat, Zupin et al. 2014, Alves, Prellwitz et al. 2015). No contexto da infecção por HIV,

o polimorfismo 14pb inserção / deleção (rs66554220) na região 3'UTR do gene *HLA-G* foi associado com baixa sobrevivência (taxa de mortalidade de quatro anos), sendo o genótipo del/del associado com maior carga viral de HIV, baixa contagem de células CD4+ e maior mortalidade em uma coorte do Zimbábue (Larsen, Zinyama et al. 2013). O estudo anteriormente citado utilizou 150 indivíduos HIV-1 positivos e 158 indivíduos HIV-1 negativos, a amplificação foi feita por PCR competitiva.

Em infecções por HPV o alelo del do polimorfismo 14pb inserção / deleção foi identificado como um potencial fator de risco que pode estar relacionado com desenvolvimento de câncer em decorrência da infecção (Bortolotti, Gentili et al. 2014, Xu, Shi et al. 2014). O estudo chinês que verificou a relação do alelo del com desenvolvimento de câncer por HPV utilizou amostras de 179 mulheres infectadas e 143 mulheres saudáveis cujas amostras de DNA foram amplificadas por PCR (Xu, Shi et al. 2014). Quanto ao vírus da influenza A, um estudo francês verificou que diferentes cepas virais eram capazes de induzir um aumento da expressão de *HLA-G* em células do epitélio alveolar (LeBouder, Khoufache et al. 2009). Neste estudo francês foram utilizadas as linhagens celulares A549 e células de rim canino Madin-Darby para verificar os níveis de expressão de células infectadas e não infectadas, foi realizada PCR em tempo real.

O genótipo +3142 CC do gene *HLA-G* foi associado como fator de risco para infecção por CMV em pacientes com transplante de rim (Guberina, Michita et al. 2017). O estudo anteriormente citado utilizou amostras coletadas no University Hospital Essen, Alemanha, de 178 receptores de transplante de rim e de seus respectivos doadores, a genotipagem foi realizada por PCR-RFLP. Um estudo da Tunísia avaliando o polimorfismo 14pb inserção / deleção em pacientes infectados com HBV não encontrou associação com suscetibilidade à infecção, porém o alelo ins foi associado com maiores níveis de DNA do vírus, e o genótipo ins/ins foi relacionado com suscetibilidade para um aumento na replicação do HBV (Laaribi, Zidi et al. 2015). Este estudo da Tunísia incluiu 263 indivíduos com Hepatite B crônica e amostras de 246 doadores de sangue saudáveis, a genotipagem foi realizada por PCR.

Um estudo em indivíduos do Senegal infectados pelo parasita *Plasmodium falciparum*, causador da malária, associou o haplótipo UTR-1 (Del/+3003T/+3010G/+3035C/+3052C/+3142C/+3187G/+3196C) da região 3'UTR de *HLA-G* com baixos níveis de infecção em um modelo dominante (Garcia, Milet et al.

2013). Por sua vez, o haplótipo UTR-3 (Del/+3003T/+3010C/+3035C/+3152C/+3142G/+3187A/+3196C) foi associado com altos níveis de infecção em um modelo recessivo neste mesmo estudo. Os resultados foram obtidos a partir de amostras de 1202 indivíduos de 2 a 18 anos de idade com genotipagem a partir de sequenciamento direto de um fragmento de 314 pbs.

### ***HLA-G e HCV***

No que diz respeito a estudos correlacionando *HLA-G* e HCV, foi encontrada uma relação de proteção contra a infecção com o alelo C do SNP *HLA-G*+3142 C/G (rs1063320) em pacientes brasileiros com anemia falciforme (Cordero, Veit et al. 2009). Neste estudo foram incluídos 93 pacientes Brasileiros de ascendência Africana do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, todos com anemia falciforme, enquanto o grupo controle foi composto de 264 indivíduos saudáveis de ascendência Africana, de regiões urbanas de Porto Alegre e Rio de Janeiro. A genotipagem foi feita por PCR-RFLP. Em outro estudo, vários polimorfismos de *HLA-G* e um haplótipo específico foram mais frequentes em europeus infectados com HCV quando comparados com controles não infectados (Catamo, Zupin et al. 2017). No estudo italiano anteriormente citado, os dados foram obtidos de amostras de 258 indivíduos HCV positivos do nordeste da Itália e 284 doadores de sangue HCV negativos, a genotipagem foi feita por sequenciamento bidirecional de amplicons obtidos por PCR. Este estudo italiano é o mais abrangente encontrado na literatura, cobrindo o gene inteiro, incluindo a região 3'UTR, e verificou que o haplótipo UTR-5 era mais frequente em indivíduos HCV positivos. Porém a associação foi feita com apenas quatro variantes da região 3'UTR e a análise de haplótipos incluía variantes em outras regiões do gene.

Em um estudo italiano de transmissão vertical de HCV (mãe para filho) foi identificado que homozigotos para a deleção de 14pb da região 3'UTR de *HLA-G* eram mais suscetíveis à infecção (Martinetti, Pacati et al. 2006). Foram avaliadas 109 mulheres entre 25 e 41 anos infectadas por HCV e seus 135 filhos, as mulheres foram então divididas em dois grupos, infectadas apenas por HCV (n=66) e infectadas por HCV e HIV (n=43). A genotipagem foi realizada por PCR-RFLP. Finalmente, outro estudo avaliando o polimorfismo 14pb inserção / deleção da região 3'UTR verificou

que indivíduos afrodescendentes co-infectados com HIV e HCV apresentavam uma frequência maior do genótipo ins/ins em relação àqueles infectados apenas por HIV (da Silva, Vianna et al. 2014). Este estudo foi realizado pelo nosso grupo de pesquisa (Laboratório de Imunobiologia e Imunogenética da UFRGS) em colaboração com outros laboratórios e incluiu 582 pacientes infectados por HCV, brasileiros e italianos, e 626 indivíduos não infectados, a genotipagem foi realizada por PCR-RFLP.

Com relação especificamente ao desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (HCC), um estudo em uma população chinesa verificou que indivíduos com o genótipo del/del do polimorfismo 14pb eram mais suscetíveis a desenvolver esta enfermidade (Jiang, Chen et al. 2011). Uma estratificação com indivíduos infectados por HBV aumentou a correlação e análises imunohistoquímicas nesse mesmo estudo mostraram maior expressão de *HLA-G* em indivíduos com o genótipo del/del (Jiang, Chen et al. 2011). O estudo utilizou amostras de 318 pacientes recentemente diagnosticados com HCC e 599 controles saudáveis e a genotipagem foi realizada por PCR.

Conforme pode ser observado nos trabalhos acima citados, a metodologia de análise de haplótipos da região 3'UTR do *HLA-G* já está estabelecida no Laboratório de Imunobiologia e Imunogenética da UFRGS. Além disso, esta mesma metodologia já foi aplicada em estudos com câncer de próstata e sepse, bem como em estudos com gestação e transplantes por nosso grupo de pesquisa. Estudos publicados pelo nosso grupo associaram o haplótipo UTR-4, o genótipo +3003C/T e o alelo +3003C como fatores de risco para câncer de próstata, assim como o haplótipo UTR-7 e o genótipo +3027A/C como fatores de risco para o desenvolvimento de sepse (Zambra, Biolchi et al. 2016, Hahn, Zambra et al. 2017). Ainda, foram feitos em nosso laboratório estudos associando o haplótipo UTR-1 e os genótipos +3141C/C e +3187A/G com menor risco gestacional recorrente, tendo sido o genótipo +3010C/C associado com maior risco. (Michita, Zambra et al. 2016). Em paralelo, também estamos estudando a infecção por HCV através da investigação da influência de outros genes relacionados a imunidade, como *CCR5*, especificamente a variante *CCR5Δ32*. Não foi possível, porém, identificar influência dessa variante na susceptibilidade à infecção por HCV (Ellwanger, Leal et al. 2018).

A região 3'UTR do *HLA-G* é uma região importante para sua expressão e, portanto, para sua atividade imunomodulatória. Entretanto, a maioria dos estudos envolvendo a região 3'UTR do *HLA-G* e HCV foca apenas na variante de inserção / deleção de 14 pares de bases, limitando-se a uma breve discussão da importância de

uma análise de haplótipos na região, uma vez que outros polimorfismos nesta região podem afetar o papel desta variante. Considerando a importância do *HLA-G* na imunidade do hospedeiro, incluindo resposta a infecções virais, e o pequeno número de trabalhos avaliando haplótipos da região 3'UTR deste gene no contexto da infecção por HCV, um estudo avaliando este aspecto em uma população da região sul do Brasil pode contribuir para o entendimento da relação entre expressão de *HLA-G* e suscetibilidade diferencial à infecção por HCV.

### ***Objetivos***

#### ***Objetivo geral***

Realizar um estudo de associação, avaliando a frequência dos haplótipos da região 3'UTR do gene *HLA-G* em pacientes infectados por HCV que desenvolveram HCC, fibrose ou cirrose.

#### ***Objetivos específicos***

- Avaliar a frequência dos haplótipos da região 3'UTR do gene *HLA-G* e potencial impacto na expressão deste gene na infecção por HCV em estudo de associação.
- Avaliar possíveis diferenças nas frequências dos haplótipos da região 3'UTR do gene *HLA-G* em grupos de pacientes com diferentes desfechos relacionados à infecção por HCV.

**Artigo – a ser submetido à revista *HLA***

***HLA-G* 3'UTR haplotype analyses in HCV infection and HCV-derived cirrhosis, hepatocellular carcinoma and fibrosis**

Julio Daimar Oliveira Correa<sup>1</sup>; Francis Maria Bão Zambra<sup>2</sup>; Rafael Tomoya Michita<sup>1</sup>, Daniel Simon<sup>3</sup>; José Artur Bogo Chies<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

<sup>2</sup>Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

<sup>3</sup>Laboratório de Genética Molecular Humana, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA)

**Short title: *HLA-G* 3'UTR haplotypes in HCV**

Key words: HCV, HLA-G, 3'UTR, haplotypes,

Abstract: Hepatitis C virus (HCV) infection is a major cause of chronic liver disease. Persistent HCV chronic infection is also an important cause of hepatic fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). The HCV has the capacity to evade immune surveillance by altering the host immune response. Also, variations in immune-related genes can lead to differential susceptibility to HCV infection as well as can interfere on the susceptibility to the development of hepatic fibrosis, cirrhosis and HCC. The *Human Leukocyte Antigen G (HLA-G)* gene, codes for a immunomodulatory protein known to be expressed in the maternal-fetal interface and in immunoprivileged tissues. The *HLA-G* 3' untranslated region (3'UTR) is important for mRNA stability and variants in this region are known to impact the gene expression. Studies, mainly focusing in the 14 bp insertion / deletion polymorphism, have correlated *HLA-G* 3'UTR with susceptibility to viral infections, but other polymorphic regions in the *HLA-G* 3'UTR might also affect HCV infection since they are inherited as haplotypes. The present study evaluated the *HLA-G* 3'UTR region and performed LD test and haplotype assembly by PHASE and Haploview softwares in 286 HCV infected patients who have developed fibrosis, cirrhosis or HCC, as well as 129 healthy control subjects. From the distinct described *HLA-G* haplotypes, the most commonly observed in our sample were UTR-1, UTR-2 and UTR-3 in the frequencies of 0.276, 0.255 e 0.121, respectively, in HCV+ patients. No statistically significant difference was observed between HCV+ and control subjects, even when they were grouped according to outcome (HCC, cirrhosis or fibrosis). However, our results suggest that variants associated to high *HLA-G* expression can be involved in HCV infection.

## ***Introduction***

Hepatitis C is a liver disease caused by hepatitis C virus (HCV) infection. This infection affects about 170 million people worldwide and is also a major driver of cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) [1, 2]. Such comorbidities sometimes develop and are diagnosed after more than ten years after infection, since frequently the patient does not display severe symptoms during the acute phase of infection [1]. HCV infection is a major global health issue and its transmission is mainly due to exposition to contaminated blood and other body fluids.

About 3 to 4 million individuals are infected each year in the world and it is estimated that a considerable amount of new cases is due to the use of inject drugs (PWID) [3]. In addition, 350,000 deaths occur every year due to HCV infection and associated comorbidities, highlighting the importance of study such condition [4]. Chronic hepatitis can course to fibrosis, cirrhosis or HCC, although such behavior is highly variable, being associated to viral characteristics, environmental factors such as alcohol consumption and occurrence of co-infections, as well as obesity, sex, and other host genetic factors [2, 5-7].

The HCV genome is composed of a single stranded RNA (ssRNA) which encodes a 327 kDa polyprotein processed into 10 multifunctional viral proteins [8]. Such proteins can interact with host proteins facilitating viral DNA replication and interfering with the host immune response [8]. Viral replication occurs within the cytoplasm of hepatocytes but can also occur in other host cells [9]. In response to virus infection, innate immune response is quickly activated to restrict viral replication, and this response is followed by the activation of adaptive immune mechanisms. The immune response can be extended from four to ten weeks, being this period the only opportunity for spontaneous infection resolution. Chronic hepatitis C is defined as the persistence of HCV DNA in blood for over six months after the acute infection [10].

During the chronic infection phase, inflammation can damage the hepatic tissue, triggering regeneration and scarring (fibrosis), this process can eventually develop into cirrhosis or HCC [7, 11]. HCC oncogenesis can results from a combination of direct and indirect mechanisms involved in HCV infection, including chronic oxidative damage, interactions with viral proteins (NS5A and NS3) and the immune system-mediated

inflammation [11, 12]. Of note, HCC is the fifth most common cancer and the third leading cause of death worldwide [12, 13].

HCV is capable of evade the host immuosurveillance by modulating the innate and adaptive immunities through the blockade of type 1 T helper cells (Th1 cells) production [14]. Viral immune evasion can also be related to the attenuated and clinically asymptomatic course of the HCV infection as well as to the slow progression of chronic hepatitis C [15]. The *Human Leukocyte Antigen G (HLA-G)*, a gene located in the Major Histocompatibility Complex (MHC) region at human chromosome 6, was suggested to be related to differential susceptibility to HCV infection in the context of immune evasion [14, 16].

*HLA-G* is a non-classic class I HLA loci encompassing 8 exons and 7 introns, with a stop codon at exon 6, a 5' promoter region and a 3' untranslated region (3'UTR) [17]. The product of this gene can potentially display seven isoforms [18]. The HLA-G molecule inhibits the cytolytic functions of natural killer (NK) cells and cytotoxic T cells upon binding to its receptors, ILT-2, ILT-4 and KIR2DL4 [18-20]. In a physiological context, *HLA-G* expression is restricted to specific immunoprivileged tissues, such as the trofoblast in the maternal-fetal interface [21], cornea [22], thymus [23] and erythroid and endothelial cells [24]. Reported *HLA-G* expression in pathological conditions includes cancer [25], autoimmune diseases [26], infectious diseases [26] and liver diseases, including Hepatitis C [19].

The relationship between *HLA-G* and susceptibility to infectious diseases have been a subject to several worldwide studies [27-33]. Associations of variants of *HLA-G*, in particular, a 14bp deletion in the 3'UTR, with viral infections due to pathogens such as Human Immunodeficiency Virus (HIV), Human Papilloma Virus (HPV) and HCV, have already been reported [28, 34, 35]. Considering its importance in the context of viral infections, the aim of this study is to evaluate the potential influence of haplotypes in the 3'UTR of *HLA-G* in the HCV infection and the development of associated comorbidities in a cohort of southern Brazilian patients.

### ***Material and methods***

The studied population consisted of 286 patients infected by HCV, as well as 129 healthy control subjects, diagnosed at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). HCV+ patients were further classified according to fibrosis, cirrhosis and HCC development. All participants signed an informed consent according to the Helsinki Declaration.

DNA was extracted from total blood samples and amplification and genotyping of the 3'UTR of the *HLA-G* was performed according to the methodology previously described [36]. Eight *HLA-G* 3'UTR polymorphisms were evaluated, including the 14 bp insertion/deletion (rs66554220), +3003T/C (rs1707), +3010C/G (rs1710), +3027A/C (rs17179101), +3035C/T (rs17179108), +3142G/C (rs1063320), +3187A/G (rs9380142) and +3196C/G (rs1610696). Briefly, the region was amplified by polymerase chain reaction (PCR) in an Applied Biosystems™ 2720 Thermal Cycler. The primers used were HLA-G8F-5' TGTGAAACAGCTGCCCTGTGT 3' [17] and GmiRNA-R-5' CTGGTGGGACAAGGTTCTACTG 3' [16]. Visualization of PCR products was performed in a 1% agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide, under UV irradiation, as 537 or 523 bp fragments, according to presence or absence of the 14 bp insertion allele, respectively. Amplicons were sequenced using the reverse primer GmiRNA-R in an ABI 3730 XL DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA) according to the manufacturer's instructions. Genotyping of all eight polymorphisms was performed by direct interpretation of electropherogram using FinchTV software version 1.4.

Pairwise linkage disequilibrium (LD) was tested for SNPs using the Haploview software. The softwares Haploview and PHASE version 2.1 were used to estimate the most likely haplotypes pair for each sample and the haplotypic frequencies, and the results were compared. Chi-square test was used to verify differences between cases and control groups. The significance level was set at  $\alpha = 0.05$  and the exact P-value was considered for the results since some of our data had expected values < 5. Statistical analyses were performed using the software IBM SPSS version 23.0.

## Results

A total of 286 HCV+ patients and 129 health control subjects were genotyped for eight variants in the 3'UTR region of *HLA-G* (see Table 1 for demographic data). LD for all variants in patients was overall high, LD was also detected between most pairs of polymorphic sites amongst controls. The patients were further divided into three subgroups according to their outcomes: HCC (n = 85), cirrhosis (n = 153) and fibrosis (n = 47). One individual was excluded from this analysis since it was not possible to undoubtedly clinically ascertain this patient to a unique and specific group.

Nine different haplotypes were identified among patients, while only seven haplotypes were identified in controls. A relation of all haplotypes identified and their respective allele compositions are shown in Table 2, the frequency of the distinct haplotypes in patients and controls are shown in Table 3. No statistically significant difference between cases and controls was observed considering the haplotypes distribution.

The stratified HCV+ groups were compared against the control group and against each other. One specific haplotype was observed only in the HCC subgroup (UTR-10), haplotype frequencies in HCC, cirrhosis and fibrosis subgroups are shown in Table 4. No statistically significant difference between the groups was observed. Although not statistically significant, the comparison between HCC and fibrosis resulted in a  $p = 0.067$ , the lowest p-value among all comparisons.

### ***Discussion***

Due to the immunomodulatory properties of the *HLA-G* molecule, the expression of the *HLA-G* gene in pathological contexts such as viral and bacterial infections as well as in cancer can be deleterious and even harmful [19, 37]. The *HLA-G* 3'UTR is important for the mRNA stability and variants in this region are known to impact gene expression [17, 38]. Studies, mainly focusing in the 14 bp insertion / deletion polymorphism, have correlated *HLA-G* 3'UTR variants and haplotypes with susceptibility to viral infections. Some studies point to the fact that polymorphisms in other positions in the *HLA-G* 3'UTR might affect the role of the 14 bp polymorphism as they are inherited as haplotypes [17, 39]. For that reason, studies focusing in the *HLA-G* 3'UTR in viral infections such as hepatitis C are important. Unfortunately, the majority

of the studies evaluating the *HLA-G* 3'UTR in HCV infection focus only in the 14 bp polymorphism. The present study evaluated the *HLA-G* 3'UTR of HCV+ patients, comparing with healthy control individuals.

The *HLA-G* 3'UTR haplotypic frequencies in the control group are consistent with frequencies reported to the general Brazilian population, as well as to admixed European populations [17, 40-42]. Despite the fact of no statistically significant difference was observed, some trends in the results should be highlighted. The UTR-1 haplotype is more frequent amongst the patients, while the UTR-2 haplotype is more frequent in the control group. The UTR-5 haplotype seems to be considerably less frequent in the patients. Of note, the UTR-1 haplotype has been associated with high levels of *HLA-G* expression while the UTR-5 haplotype has been associated with low levels of *HLA-G* expression [41]. This picture could suggest a profile of higher *HLA-G* expression in HCV infected patients. To confirm this suggestion, future studies should focus on the determination of the *HLA-G* levels in infected and uninfected individuals.

When the patients were stratified into HCC, cirrhosis and fibrosis subgroups, the UTR-1 haplotype was still more frequent in the HCC and cirrhosis subgroups while the UTR-2 was the second more frequent haplotype. UTR-2 is associated with intermediary levels of *HLA-G* expression and is the most frequent *HLA-G* 3'UTR haplotype in the Brazilian population in some studies [40, 41]. The UTR-5 haplotype still seems to be considerably less frequent in the HCC and cirrhosis subgroups, which alongside UTR-1 haplotype as the more frequent, could suggest a high expression profile. This high expression profile could be related to the severity of those comorbidities. The results in the fibrosis subgroup could be due to its low sample size. In fact, the small sample size in all groups could also explain why the differences are not statistically significant.

In addition to sample size, the difference in the frequencies of euro-descendant individuals between cases and controls is another limitation of this study. There are data in the literature about the discrepancy between Europeans and other populations [43]. The difference between groups could interfere in the analysis of the result. Additionally, there are studies that show a high prevalence of hepatitis C in African Americans in the United States, as well as a more aggressive course of the disease in Latinos [44, 45].

The difference suggesting a high expression profile in patients is in accordance with studies that reported a high *HLA-G* expression in viral infections [2, 20, 46, 47],

despite not being statistically significant. Studies evaluating *HLA-G* expression in HCV infection suggest a higher expression in chronic inflammation [2, 46]. Whether this high *HLA-G* expression in chronic HCV infection is due to interactions with viral proteins, to genetic host factors or due to a combination of both situations, it is a question that demands more studies.

### **References**

1. Zajac, M., et al., Hepatitis C - New drugs and treatment prospects. *Eur J Med Chem*, 2019. 165: p. 225-249.
2. 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. *Hum Immunol*, 2012. 73(3): p. 258-62.
3. Lombardi, A., M.U. Mondelli, and E.S.G.f.V.H. (ESGVH), Hepatitis C: Is eradication possible? *Liver Int*, 2019. 39(3): p. 416-426.
4. Mohd Hanafiah, K., et al., Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology*, 2013. 57(4): p. 1333-42.
5. Marcellin, P., T. Asselah, and N. Boyer, Fibrosis and disease progression in hepatitis C. *Hepatology*, 2002. 36(5 Suppl 1): p. S47-56.
6. McCaughan, G.W. and J. George, Fibrosis progression in chronic hepatitis C virus infection. *Gut*, 2004. 53(3): p. 318-21.
7. Guo, P.F., J. Jin, and X. Sun, Influence of IL10 gene polymorphisms on the severity of liver fibrosis and susceptibility to liver cirrhosis in HBV/HCV-infected patients. *Infect Genet Evol*, 2015. 30: p. 89-95.
8. McGivern, D.R. and S.M. Lemon, Virus-specific mechanisms of carcinogenesis in hepatitis C virus associated liver cancer. *Oncogene*, 2011. 30(17): p. 1969-83.

9. Ellwanger, J.H., et al., Immunogenetic studies of the hepatitis C virus infection in an era of pan-genotype antiviral therapies - Effective treatment is coming. *Infect Genet Evol*, 2017.
10. Lingala, S. and M.G. Ghany, Natural History of Hepatitis C. *Gastroenterol Clin North Am*, 2015. 44(4): p. 717-34.
11. Mesri, E.A., M.A. Feitelson, and K. Munger, Human viral oncogenesis: a cancer hallmarks analysis. *Cell Host Microbe*, 2014. 15(3): p. 266-82.
12. Heikenwälder, M. and E. Pikarsky, Learning the Roles of the Hepatic Adaptive Immune System in Hepatocellular Carcinoma-Nature's Guide for Successful Cancer Immunotherapy. *Semin Liver Dis*, 2017. 37(3): p. 210-218.
13. Akram, N., et al., Oncogenic Role of Tumor Viruses in Humans. *Viral Immunol*, 2017. 30(1): p. 20-27.
14. Catamo, E., et al., HLA-G regulatory polymorphisms are associated with susceptibility to HCV infection. *HLA*, 2017. 89(3): p. 135-142.
15. Rehmann, B. and M. Nascimbeni, Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol*, 2005. 5(3): p. 215-29.
16. Cordero, E.A., et al., HLA-G polymorphism influences the susceptibility to HCV infection in sickle cell disease patients. *Tissue Antigens*, 2009. 74(4): p. 308-13.
17. Castelli, E.C., et al., The genetic structure of 3'untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes. *Genes Immun*, 2010. 11(2): p. 134-41.
18. Catamo, E., et al., Non-classical MHC-I human leukocyte antigen (HLA-G) in hepatotropic viral infections and in hepatocellular carcinoma. *Hum Immunol*, 2014. 75(12): p. 1225-31.
19. Amiot, L., N. Vu, and M. Samson, Biology of the immunomodulatory molecule HLA-G in human liver diseases. *J Hepatol*, 2015. 62(6): p. 1430-7.
20. Albayati, Z., et al., The Influence of Cytomegalovirus on Expression of HLA-G and its Ligand KIR2DL4 by Human Peripheral Blood Leucocyte Subsets. *Scand J Immunol*, 2017. 86(5): p. 396-407.

21. Kovats, S., et al., A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science*, 1990. 248(4952): p. 220-3.
22. Le Discorde, M., et al., Expression of HLA-G in human cornea, an immune-privileged tissue. *Hum Immunol*, 2003. 64(11): p. 1039-44.
23. Mallet, V., et al., HLA-G in the human thymus: a subpopulation of medullary epithelial but not CD83(+) dendritic cells expresses HLA-G as a membrane-bound and soluble protein. *Int Immunol*, 1999. 11(6): p. 889-98.
24. Menier, C., et al., Erythroblasts secrete the nonclassical HLA-G molecule from primitive to definitive hematopoiesis. *Blood*, 2004. 104(10): p. 3153-60.
25. Yan, W.H., HLA-G expression in cancers: potential role in diagnosis, prognosis and therapy. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2011. 11(1): p. 76-89.
26. Rizzo, R., et al., HLA-G Molecules in Autoimmune Diseases and Infections. *Front Immunol*, 2014. 5: p. 592.
27. Fabris, A., et al., Association between HLA-G 3'UTR 14-bp polymorphism and HIV vertical transmission in Brazilian children. *AIDS*, 2009. 23(2): p. 177-82.
28. Larsen, M.H., et al., HLA-G 3' untranslated region 14-base pair deletion: association with poor survival in an HIV-1-infected Zimbabwean population. *J Infect Dis*, 2013. 207(6): p. 903-6.
29. Luo, M., et al., HLA-G and mother-child perinatal HIV transmission. *Hum Immunol*, 2013. 74(4): p. 459-63.
30. Metcalfe, S., et al., The association between human leukocyte antigen (HLA)-G polymorphisms and human papillomavirus (HPV) infection in Inuit women of northern Quebec. *Hum Immunol*, 2013. 74(12): p. 1610-5.
31. Bortolotti, D., et al., Implication of HLA-G 3' untranslated region polymorphisms in human papillomavirus infection. *Tissue Antigens*, 2014. 83(2): p. 113-8.

32. Segat, L., et al., HLA-G 14 bp deletion/insertion polymorphism and mother-to-child transmission of HIV. *Tissue Antigens*, 2014. 83(3): p. 161-7.
33. Laaribi, A.B., et al., Association of an HLA-G 14-bp Insertion/Deletion polymorphism with high HBV replication in chronic hepatitis. *J Viral Hepat*, 2015. 22(10): p. 835-41.
34. Xu, H.H., et al., HLA-G 3' untranslated region polymorphisms influence the susceptibility for human papillomavirus infection. *Tissue Antigens*, 2014. 84(2): p. 216-22.
35. 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. *Infect Genet Evol*, 2014. 21: p. 418-23.
36. Zambra, F.M., et al., Immunogenetics of prostate cancer and benign hyperplasia--the potential use of an HLA-G variant as a tag SNP for prostate cancer risk. *HLA*, 2016. 87(2): p. 79-88.
37. Amiot, L., et al., Biology of HLA-G in cancer: a candidate molecule for therapeutic intervention? *Cell Mol Life Sci*, 2011. 68(3): p. 417-31.
38. Donadi, E.A., et al., Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. *Cell Mol Life Sci*, 2011. 68(3): p. 369-95.
39. Garcia, A., et al., Association of HLA-G 3'UTR polymorphisms with response to malaria infection: a first insight. *Infect Genet Evol*, 2013. 16: p. 263-9.
40. Castelli, E.C., et al., A comprehensive study of polymorphic sites along the HLA-G gene: implication for gene regulation and evolution. *Mol Biol Evol*, 2011. 28(11): p. 3069-86.
41. 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*, 2013. 8(10): p. e71742.
42. Castelli, E.C., et al., Insights into HLA-G Genetics Provided by Worldwide Haplotype Diversity. *Front Immunol*, 2014. 5: p. 476.

43. Rosenberg, N.A., et al., Interpreting polygenic scores, polygenic adaptation, and human phenotypic differences. *Evol Med Public Health*, 2019. 2019(1): p. 26-34.
44. Rodríguez-Torres, M., Latinos and chronic hepatitis C: a singular population. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2008. 6(5): p. 484-90.
45. Saab, S., et al., Hepatitis C in African Americans. *Am J Gastroenterol*, 2014. 109(10): p. 1576-84; quiz 1575, 1585.
46. Weng, P.J., et al., Elevation of plasma soluble human leukocyte antigen-G in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Hum Immunol*, 2011. 72(5): p. 406-11.
47. Bortolotti, D., et al., Human Herpes simplex 1 virus infection of endometrial decidual tissue-derived MSC alters HLA-G expression and immunosuppressive functions. *Hum Immunol*, 2018. 79(11): p. 800-808.

Tables

<b>Table 1</b> Characteristics of the sample assessed in the <i>HLA-G</i> 3'UTR study		
	Control (n = 129)	HCV+ (n = 286)
Ethnicity (euro-descendant)	84.5 % (102)	70.6 % (202)
Age: mean $\pm$ SD	57.6 $\pm$ 7.8	59.6 $\pm$ 8.9
Age: range	41 - 75	32 - 81
Outcome: HCC	-	85
Outcome: Cirrhosis	-	153
Outcome: Fibrosis	-	47

**Table 2** Polymorphisms at *HLA-G* 3'UTR haplotypes

Haplotype Name	14 pb	+3003	+3010	+3027	+3035	+3142	+3187	+3196	Ref.
UTR-1	Del	T	G	C	C	C	G	C	a
UTR-2	Ins	T	C	C	C	G	A	G	a
UTR-3	Del	T	C	C	C	G	A	C	a
UTR-4	Del	C	G	C	C	C	A	C	a
UTR-5	Ins	T	C	C	T	G	A	C	a
UTR-6	Del	T	G	C	C	C	A	C	a
UTR-7	Ins	T	C	A	T	G	A	C	a
UTR-8	Ins	T	G	C	C	G	A	G	a
UTR-10	Del	T	C	C	C	G	A	G	b
UTR-14	Del	T	G	C	C	G	G	C	b

<sup>a</sup>Castelli, Mendes-Junior et al. 2010; <sup>b</sup>Lucena-Silva, Monteiro et al. 2012

**Table 3** Haplotype frequencies in control and HCV+ patients

Haplotype	Control	HCV+
UTR-1	0.267 (69)	0.276 (165)
UTR-2	0.302 (78)	0.255 (153)
UTR-3	0.163 (42)	0.121 (73)
UTR-4	0.089 (23)	0.095 (57)
UTR-5	0.078 (20)	0.048 (29)
UTR-6	0.054 (14)	0.079 (47)
UTR-7	0.047 (12)	0.053 (31)
UTR-8	-	0.014 (9)
UTR-14	-	0.014 (9)

**Table 4** Haplotype frequencies in control and HCV+ patients stratified according to the outcome.

Haplotype	Control	HCC	Cirrhosis	Fibrosis
UTR-1	0.267 (69)	0.252 (43)	0.296 (91)	0.244 (23)
UTR-2	0.302 (78)	0.185 (31)	0.289 (88)	0.245 (23)
UTR-3	0.163 (42)	0.17 (29)	0.109 (33)	0.074 (7)
UTR-4	0.089 (23)	0.112 (19)	0.081 (25)	0.117 (11)
UTR-5	0.078 (20)	0.045 (8)	0.036 (11)	0.096 (9)
UTR-6	0.054 (14)	0.089 (15)	0.069 (21)	0.086 (8)
UTR-7	0.047 (12)	0.041 (7)	0.059 (18)	0.043 (4)
UTR-8	-	0.018 (3)	0.013(4)	0.011 (1)
UTR-10	-	0.016 (3)	-	-
UTR-14	-	0.018 (3)	-	0.012 (1)
Others	-	0.012 (2)	-	0.075 (7)

## Discussão

Como o gene *HLA-G* apresenta um número limitado de polimorfismos na região codificadora, poucas moléculas variantes são codificadas, apresentando pouca variabilidade de aminoácidos em regiões de dimerização e interação com receptores (Donadi, Castelli, et al. 2011). Por esse motivo as regiões regulatórias tem um papel ainda mais importante nos níveis de expressão de *HLA-G*. Polimorfismos nessas regiões podem, portanto, impactar a expressão deste gene. Pouco se sabe sobre os mecanismos que regulam a expressão de *HLA-G* e poucos estudos avaliaram o impacto de variantes de regiões regulatórias na sua expressão (Moreau, Flajollet et al. 2009, Donadi, Castelli, et al. 2011, Martelli-Palomino, Pancotto et al. 2013). Devido às propriedades imunomodulatórias da molécula HLA-G, a expressão de seu gene em contextos fisiopatológicos como infecções e câncer pode ser prejudicial.

Apesar de não ter sido possível identificar uma diferença estatisticamente significativa entre controles e pacientes neste trabalho, é possível identificar sentido biológico nas leves diferenças observáveis entre os indivíduos saudáveis e os pacientes infectados. Enquanto o haplótipo mais frequente nos indivíduos saudáveis é o UTR-2, nos indivíduos infectados o haplótipo UTR-1 é o mais frequente. Além disso, o haplótipo UTR-5 é consideravelmente menos frequente nos pacientes infectados.

As frequências haplotípicas do grupo controle são condizentes com as frequências encontradas na população brasileira e em populações europeias miscigenadas, conforme pode ser verificado em estudos presentes na literatura (Castelli, Mendes-Junior, et al. 2010, Castelli, Mendes-Junior, et al. 2011, Martelli-Palomino, Pancotto et al. 2013, Catelli, Ramalho et al. 2014). Enquanto isso as frequências nos pacientes infectados parecem apontar para um perfil de maior expressão de *HLA-G*. O haplótipo UTR-1 é associado com níveis altos de expressão de *HLA-G*, enquanto o haplótipo UTR-5 é associado com níveis baixos de expressão de *HLA-G* (Martelli-Palomino, Pancotto et al. 2013).

Interessante notar que quando os pacientes são estratificados em três subgrupos de acordo com o desfecho clínico da infecção por HCV, a saber: HCC, fibrose e cirrose, UTR-1 continua sendo o haplótipo mais frequente nos subgrupos de HCC e fibrose. Especialmente nos pacientes que desenvolveram HCC, a diferença nas frequências dos haplótipos UTR-1 (mais frequente) e UTR-2 (segundo mais frequente) é mais

acentuada. Diferente do UTR-1, o haplótipo UTR-2 é associado com níveis intermediários de expressão de *HLA-G* e aparece como o haplótipo mais frequente na população brasileira em alguns estudos (Castelli, Mendes-Junior, et al. 2011, Martelli-Palomino, Pancotto et al. 2013). O haplótipo UTR-5 continua pouco frequente nos subgrupos HCC e cirrose. Estes dois subgrupos demonstram um perfil que pode ser interpretado como de maior expressão de *HLA-G*. Este perfil de maior expressão poderia ter relação com a severidade destas comorbidades. O subgrupo fibrose destoa dos outros dois, porém suas frequências podem ser as menos precisas devido ao baixo tamanho amostral representado neste subgrupo.

O fato de as diferenças entre os grupos analisados não serem estaticamente significativas pode ser devido ao tamanho amostral de casos e controles. Um aumento no tamanho amostral poderia gerar um resultado diferente, com uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos, ou corroborar os dados já observados. O tamanho amostral pode explicar também o fato de dois haplótipos (UTR-8 e UTR-14) terem sido observados apenas no grupo de pacientes infectados, que tinha um tamanho amostral maior, enquanto o grupo controle, de tamanho amostral menor, não apresentou esses haplótipos. Entretanto, na estratificação dos pacientes infectados, que dividiu esse grupo em subgrupos menores, outro haplótipo (UTR-10) apareceu no subgrupo HCC, além de outros haplótipos de menor frequência que não puderam ser identificados nos subgrupos HCC e fibrose. Um aumento no tamanho amostral de pacientes poderia aumentar a precisão da inferência de haplótipos, principalmente após a estratificação, uma vez que cada subgrupo fica com um tamanho amostral reduzido. O presente trabalho utilizou-se de uma metodologia condizente com as metodologias utilizadas atualmente em estudos da área, conforme verificado em revisão da literatura, uma metodologia já aplicada em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa. Para garantir a confiabilidade dos resultados, quatro pacientes cuja leitura do eletroferograma apresentava excesso de ruídos foram excluídos da amostragem inicial.

Em adição ao tamanho amostral, outra limitação do estudo encontra-se na diferença de frequências de euro-descendentes entre casos e controles. Existem dados na literatura sobre a discrepância entre europeus e outras populações (Rosenberg, Edge et al. 2019). A diferença entre grupos pode interferir na análise do resultado. Além disso, estudos apontam para uma alta prevalência de hepatite C em afrodescendentes nos

Estados Unidos, bem como uma maior severidade na progressão da doença em latinos (Rodríguez-Torres 2008, Saab, Jackson et al. 2014.).

Ainda que a diferença entre os casos e controles não seja estatisticamente significativa, um perfil de maior expressão de *HLA-G* em indivíduos infectados por HCV está em concordância com estudos que encontraram uma maior expressão deste gene em infecções virais (Weng, Fu et al. 2011, de Oliveira Crispim, Silva et al. 2012, Albayati, Alyami et al. 2017, Bortolotti, Rossignoli et al. 2018). Uma maior expressão de *HLA-G* em pacientes infectados por Citomegalovírus (CMV) foi verificada por citometria de fluxo (Albayati, Alyami et al. 2017). Também foi verificada uma maior expressão em pacientes infectados pelo vírus da herpes simples 1 (human Herpes simplex 1 virus, HSV-1) em um estudo utilizando a técnica de ensaio de imunoabsorção enzimática (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) (Bortolotti, Rossignoli et al. 2018). Um aumento nos níveis de *HLA-G* solúvel foi verificado em pacientes com infecção crônica por HBV utilizando ELISA (Laaribi, Bortolotti et al. 2017).

Estudos avaliando a expressão de *HLA-G* no contexto da infecção por HCV apontam para uma maior expressão desta molécula na infecção crônica (Weng, Fu et al. 2011, de Oliveira Crispim, Silva et al. 2012). Um estudo chinês avaliou por ELISA a presença de *HLA-G* solúvel em plasma de 67 pacientes com infecção crônica comparado com um grupo controle (Weng, Fu et al. 2011). O estudo observou uma prevalência significativamente maior de *HLA-G* solúvel nos casos em relação aos controles. Um estudo francês foi capaz de identificar por imunohistoquímica a expressão de *HLA-G* por mastócitos em biópsia de fígado e associar a expressão com o desenvolvimento de fibrose induzida por HCV (Amiot, Vu et al. 2014). No entanto, nem todos os trabalhos existentes nesta área corroboram associação de maior expressão de *HLA-G* e a severidade da doença associada. Por exemplo, um estudo brasileiro avaliou por imunohistoquímica a presença de *HLA-G* em tecido de biópsia de fígado de 89 pacientes com infecção crônica por HCV e verificou uma maior frequência da molécula no estágio mais leve da hepatite crônica (de Oliveira Crispim, Silva et al. 2012).

O presente estudo traz uma contribuição para o entendimento do impacto da região 3'UTR do *HLA-G* no contexto da infecção por HCV relatando que não foi verificado um impacto estatisticamente significativo na suscetibilidade à infecção, nem

na progressão da doença. Se o aumento na expressão de *HLA-G* observado em diversos estudos da literatura e sugerido através da avaliação da frequência de haplótipos da região 3'UTR deve-se primariamente a ação direta do vírus ou se a genética do hospedeiro tem um papel importante na suscetibilidade à infecção ainda é uma questão em aberto. Mais estudos focando nas regiões regulatórias do gene, bem como estudos cruzando dados de genética do hospedeiro com análise de expressão são necessários para elucidar este ponto.

## Referências bibliográficas

Akram N., M. Imran, M. Noreen, F. Ahmed, M. Atif, Z. Fatima, A. Bilal Waqar. (2017) "Oncogenic Role of Tumor Viruses in Humans." *Viral Immunol.* 30(1):20-27.

Albayati, Z., A. Alyami, S. Alomar, D. Middleton, L. Bonnett, S. Aleem, B. F. Flanagan, and S. E. Christmas (2017). "The Influence of Cytomegalovirus on Expression of HLA-G and its Ligand KIR2DL4 by Human Peripheral Blood Leucocyte Subsets." *Scand J Immunol* 86(5): 396-407.

Alves, B. M., I. M. Prellwitz, J. D. Siqueira, Â. Meyrelles, A. Bergmann, H. N. Seuánez, E. S. Machado, M. A. Soares and E. A. Soares (2015). "The effect of human leukocyte antigen G alleles on human papillomavirus infection and persistence in a cohort of HIV-positive pregnant women from Brazil." *Infect Genet Evol* 34: 339-343.

Amiot, L., N. Vu, M. Rauch, A. L'Helgoualc'h, F. Chalmel, H. Gascan, B. Turlin, D. Guyader and M. Samson (2014). "Expression of HLA-G by mast cells is associated with hepatitis C virus-induced liver fibrosis." *J Hepatol* 60(2): 245-252.

Amiot, L., N. Vu, M. Samson (2015). "Biology of the immunomodulatory molecule HLA-G in human liver diseases." *J Hepatol* 62(6): 1430-1437.

Amiot L., S. Ferrone, H. Grosse-Wilde, B. Seliger. (2011) "Biology of HLA-G in cancer: a candidate molecule for therapeutic intervention?" *Cell Mol Life Sci.* 68: 417–31.

Barrett, J. C., B. Fry, J. Maller and M. J. Daly (2005). "Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps." *Bioinformatics* 21: 263-265.

Baştürk, B., F. Karakayali, R. Emiroğlu, O. Sözer, A. Haberal, D. Bal, M. Haberal (2006). "Human leukocyte antigen-G, a new parameter in the follow-up of liver transplantation." *Transplant Proc* 38(2):571-4.

Bortolotti, D., V. Gentili, A. Rotola, D. Di Luca and R. Rizzo (2014). "Implication of HLA-G 3' untranslated region polymorphisms in human papillomavirus infection." *Tissue Antigens* 83(2): 113-118.

Bortolotti, D., F. Rossignoli, A. Rotola, D. Campioni, R. Cultrera, G. Grisendi, M. Dominici and R. Rizzo (2018). "Human Herpes simplex 1 virus infection of endometrial decidual tissue-derived MSC alters HLA-G expression and immunosuppressive functions." *Hum Immunol* 79: 800-808.

Bruno S., T. Stroffolini, M. Colombo, S. Bollani, L. Benvegnù, G. Mazzella, A. Ascione, T. Santantonio, F. Piccinino, P. Andreone, A. Mangia, G. B. Gaeta, M. Persico, S. Faggioli, P. L. Almasio; Italian Association of the Study of the Liver Disease (AISF). (2007) "Sustained virological response to interferon-alpha is associated with improved outcome in HCV-related cirrhosis: a retrospective study." *Hepatology*. 45:579-587.12.

Castelli, E. C., C. T. Mendes-Junior, N. H. Deghaide, R. S. de Albuquerque, Y. C. Muniz, R. T. Simões, E. D. Carosella, P. Moreau and E. A. Donadi (2010). "The genetic structure of 3'untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes." *Genes Immun* 11(2): 134-141.

Catamo, E., L. Zupin, S. Crovella, F. Celsi and L. Segat (2014). "Non-classical MHC-I human leukocyte antigen (HLA-G) in hepatotropic viral infections and in hepatocellular carcinoma." *Hum Immunol* 75(12): 1225-1231.

Catamo, E., L. Zupin, N. Freato, V. Polesello, F. Celsi, S. L. Crocè, F. Masutti, G. Pozzato, L. Segat and S. Crovella (2017). "HLA-G regulatory polymorphisms are associated with susceptibility to HCV infection." *HLA* 89(3): 135-142.

Castelli E. C., C. T. Mendes-Junior, N. H. Deghaide, R. S. de Albuquerque, Y. C. Muniz, R. T. Simões, E. D. Carosella, P. Moreau, E. A. Donadi. (2010) "The genetic structure of 3' untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes." *Genes Immun*. 11: 134-41.

Castelli E.C., C. T. Mendes-Junior, L. C. Veiga-Castelli, M. Roger, P. Moreau, E. A. Donadi. (2011) "A comprehensive study of polymorphic sites along the HLA-G gene: implication for gene regulation and evolution." *Mol Biol Evol*. 28(11):3069-86. doi: 10.1093/molbev/msr138. Epub 2011 May 28.

Castelli E. C., P. Moreau, A. Oya e Chiromatzo, C. T. Mendes-Junior, L. C. Veiga-Castelli, L. Yaghi, S. Giuliatti, E. D. Carosella, E. A. Donadi. (2009) "In silico analysis of microRNAs targeting the HLA-G 3' untranslated region alleles and haplotypes." *Hum Immunol* 70: 1020–5.

Castelli E. C., J. Ramalho, I. O. Porto, T. H. Lima, L. P. Felício, A. Sabbagh, E. A. Donadi, C. T. Mendes-Junior. (2014) "Insights into HLA-G Genetics Provided by Worldwide Haplotype Diversity." *Front Immunol.* 6;5:476.

Colonna, M., F. Navarro, T. Bellón, M. Llano, P. García, J. Samaridis, L. Angman, M. Cella, M. López-Botet (1997). "A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells." *J Exp Med* 186(11):1809-18.

Colonna, M., J. Samaridis, M. Cella, L. Angman, R. L. Allen, C. A. O'Callaghan, R. Dunbar, G. S. Ogg, V. Cerundolo, A. Rolink (1998). "Human myelomonocytic cells express an inhibitory receptor for classical and nonclassical MHC class I molecules." *J Immunol* 160(7):3096-100.

Cordero, E. A., T. D. Veit, M. A. da Silva, S. M. Jacques, L. M. Silla and J. A. Chies (2009). "HLA-G polymorphism influences the susceptibility to HCV infection in sickle cell disease patients." *Tissue Antigens* 74(4): 308-313.

Couper, K. N., D. G. Bount, E. M. Riley (2008). "IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection." *J Immunol* 180: 5771-5777.

da Silva, G. K., P. Vianna, T. D. Veit, S. Crovella, E. Catamo, E. A. Cordero, V. S. Mattevi, R. K. Lazzaretti, E. Sprinz, R. Kuhmmer and J. A. Chies (2014). "Influence of HLA-G polymorphisms in human immunodeficiency virus infection and hepatitis C virus co-infection in Brazilian and Italian individuals." *Infect Genet Evol* 21: 418-423.

de Oliveira Crispim, J. C., T. G. A. Silva, F. J. D. Souto, F. F. Souza, C. L. Bassi, C. P. Soares, S. Zucoloto, P. Moreau, A. L. C. Matinelli, E. A. Donadi (2012). "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” *Hum Immunol* 73: 258-262.

Donadi E. A., E. C. Castelli, A. Arnaiz-Villena, M. Roger, D. Rey, P. Moreau. (2011) “Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association.” *Cell Mol Life Sci.* 68(3):369-95.

EASL, European Association for Study of Liver (2017). “Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2018.” *J Hepatol* 66(1): 153 –194.

Ellwanger, J. H., V. L. Kaminski, J. M. Valverde-Villegas, D. Simon, V. R. Lunge and J. A. B. Chies (2017). "Immunogenetic studies of the hepatitis C virus infection in an era of pan-genotype antiviral therapies - Effective treatment is coming." *Infect Genet Evol.*

Ellwanger J.H., B. K. Leal, J. M. Valverde-Villegas, D. Simon, C. G. Marangon, V. S. Mattevi, R. K. Lazzaretti, E. Sprinz, R. Kuhmmer, J. A. B. Chies. (2018) “CCR5Δ32 in HCV infection, HCV/HIV co-infection, and HCV-related diseases.” *Infect Genet Evol.* 59:163-166.

Excoffier, L., G. Laval and S. Schneider (2007). "Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis." *Evol Bioinform Online* 1: 47-50.

Fabris, A., E. Catamo, L. Segat, M. Morgutti, L. C. Arraes, J. L. de Lima-Filho and S. Crovella (2009). "Association between HLA-G 3'UTR 14-bp polymorphism and HIV vertical transmission in Brazilian children." *AIDS* 23(2): 177-182.

Faure M., E. O. Long (2002). “KIR2DL4 (CD158d), an NK cell-activating receptor with inhibitory potential.” *J Immunol* 168(12):6208-14.

Foucault, M. L., V. Moules, M. Rosa-Calatrava and B. Riteau (2011). "Role for proteases and HLA-G in the pathogenicity of influenza A viruses." *J Clin Virol* 51(3): 155-159.

Garcia, A., J. Milet, D. Courtin, A. Sabbagh, J. D. Massaro, E. C. Castelli, F. Migot-Nabias, B. Favier, N. Rouas-Freiss, E. A. Donadi and P. Moreau (2013). "Association of HLA-G 3'UTR polymorphisms with response to malaria infection: a first insight." *Infect Genet Evol* 16: 263-269.

Gros, F., Y. Sebti, S. de Guibert, B. Branger, M. Bernard, R. Fauchet and L. Amiot (2006). "Soluble HLA-G Molecules Are Increased during Acute Leukemia, Especially in Subtypes Affecting Monocytic and Lymphoid Lineages." *Neoplasia* 8(3): 223-230.

Guberina, H., R. Tomoya Michita, S. Dolff S, A. Bienholz, M. Trilling, F. M. Heinemann, P. A. Horn, A. Kribben, O. Witzke, V. Rebmann (2017). "Recipient HLA-G +3142 CC Genotype and Concentrations of Soluble HLA-G Impact on Occurrence of CMV Infection after Living-Donor Kidney Transplantation." *Int J Mol Sci* 8(11).

Guo, P. F., J. Jin and X. Sun (2015). "Influence of IL10 gene polymorphisms on the severity of liver fibrosis and susceptibility to liver cirrhosis in HBV/HCV-infected patients." *Infect Genet Evol* 30: 89-95.

Hahn E. C., F. M. B. Zambra, A. J. Kamada, F. Delongui, C. M. C. Grion, E. M. V. Reiche, J. A. B. Chies. (2017) "Association of HLA-G 3'UTR polymorphisms and haplotypes with severe sepsis in a Brazilian population." *Hum Immunol.* 78(11-12):718-723.

Harrison, G. A., K. E. Humphrey, I. B. Jakobsen, D. W. Cooper. (1993) "14 bp deletion polymorphism in the HLA-G gene." *Hum Mol Genet.* 2: 2200.

Heikenwalder, M. and E. Pikarsky (2017). "Learning the Roles of the Hepatic Adaptive Immune System in Hepatocellular Carcinoma-Nature's Guide for Successful Cancer Immunotherapy." *Semin Liver Dis* 37(3): 210-218.

Hviid T. V. F., S. Hylenius, C. Rorbye, L.G. Nielsen. (2003) "HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels." *Immunogenetics.* 55: 63–79.

Hviid T. V. F., R. Rizzo, L. Melchiorri, M. Stignani, O. R. Baricordi. (2006) "Polymorphism in the 5' upstream regulatory and 3' untranslated regions of the HLA-G gene in relation to soluble HLA-G and IL-10 expression." *Hum Immunol.* 67: 53–62.

Ikeda K., S. Saitoh, Y. Arase, K. Chayama, Y. Suzuki, M. Kobayashi, A. Tsubota, I. Nakamura, N. Murashima, H. Kumada, M. Kawanishi. (1999) "Effect of interferon therapy on hepatocellular carcinogenesis in patients with chronic hepatitis type C: a long-term observation study of 1,643 patients using statistical bias correction with proportional hazard analysis." *Hepatology.* 29:1124-1130.10.

Imai Y., S. Kawata, S. Tamura, I Yabuuchi, S. Noda, M. Inada, Y. Maeda, Y. Shirai, T. Fukuzaki, I. Kaji, H. Ishikawa, Y. Matsuda, M. Nishikawa, K. Seki, Y. Matsuzawa. "Relation of interferon therapy and hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. Osaka Hepatocellular Carcinoma Prevention Study Group." *Ann Intern Med.* 129:94-99.9.

Jeanmougin, M., J. Noirel, C. Coulonges and J. F. Zagury (2017). "HLA-check: evaluating HLA data from SNP information." *BMC Bioinformatics* 18(1): 334.

Jiang, Y., S. Chen, S. Jia, Z. Zhu, X. Gao, D. Dong and Y. Gao (2011). "Association of HLA-G 3' UTR 14-bp insertion/deletion polymorphism with hepatocellular carcinoma susceptibility in a Chinese population." *DNA Cell Biol* 30(12): 1027-1032.

Klein, J. and A. Sato (2000). "The HLA system. First of two parts." *N Engl J Med* 343(10): 702-709.

Kovats, S., E. K. Main, C. Librach, M. Stubblebine, S. J. Fisher and R. DeMars (1990). "A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts." *Science* 248(4952): 220-223.

Laaribi, A. B., I. Zidi, N. Hannachi, H. Ben Yahia, H. Chaouch, D. Bortolotti, N. Zidi, A. Letaief, S. Yacoub, A. Boudabous, R. Rizzo and J. Boukadida (2015). "Association of an HLA-G 14-bp Insertion/Deletion polymorphism with high HBV replication in chronic hepatitis." *J Viral Hepat* 22(10): 835-841.

Laarib, A. B., D. Bortolotti, N. Hannachi, A. Mehri, O. Hazgui, H. Ben Yahia, W. Babay, M. Belhadj, H. Chaouech, S. Yacoub, A. Letaief, H. I. Ouzari, A. Boudabous, D. Di Luca, J. Boukadida, R. Rizzo, I. Zidi (2017). "Increased levels of soluble HLA-G molecules in Tunisian patients with chronic hepatitis B infection." *J Viral Hepat* 24(11): 1016-1022.

Larsen, M. H., R. Zinyama, P. Kallestrup, J. Gerstoft, E. Gomo, L. W. Thørner, T. B. Berg, C. Erikstrup and H. Ullum (2013). "HLA-G 3' untranslated region 14-base pair deletion: association with poor survival in an HIV-1-infected Zimbabwean population." *J Infect Dis* 207(6): 903-906.

Le Discorde, M., P. Moreau, P. Sabatier, J. M. Legeais and E. D. Carosella (2003). "Expression of HLA-G in human cornea, an immune-privileged tissue." *Hum Immunol* 64(11): 1039-1044.

LeBouder, F., K. Khoufache, C. Menier, Y. Mandouri, M. Keffous, N. Lejal, I. Krawice-Radanne, E. D. Carosella, N. Rouas-Freiss and B. Riteau (2009). "Immunosuppressive HLA-G molecule is upregulated in alveolar epithelial cells after influenza A virus infection." *Hum Immunol* 70(12): 1016-1019.

Lingala, S. and M. G. Ghany (2015). "Natural History of Hepatitis C." *Gastroenterol Clin North Am* 44(4): 717-734.

Lombardi, A., M. U. Mondelli; ESCMID Study Group for Viral Hepatitis (ESGVH) (2019). "Hepatitis C: Is eradication possible?" *Liver Int* 25.

Lucena-Silva N., A. R. Monteiro, R. S. de Albuquerque, R. G. Gomes, C. T. Mendes-Junior, E. C. Castelli, E. A. Donadi. (2012) "Haplotype frequencies based on eight polymorphic sites at the 3' untranslated region of the HLA-G gene in individuals from two different geographical regions of Brazil." *Tissue Antigens*. 79(4):272-8.

Luo, M., C. Czarnecki, S. Ramdahin, J. Embree and F. A. Plummer (2013). "HLA-G and mother-child perinatal HIV transmission." *Hum Immunol* 74(4): 459-463.

Mallet, V., A. Blaschitz, L. Crisa, C. Schmitt, S. Fournel, A. King, Y. W. Loke, G. Dohr and P. Le Bouteiller (1999). "HLA-G in the human thymus: a subpopulation of

medullary epithelial but not CD83(+) dendritic cells expresses HLA-G as a membrane-bound and soluble protein." *Int Immunol* 11(6): 889-898.

Marcellin, P., T. Asselah and N. Boyer (2002). "Fibrosis and disease progression in hepatitis C." *Hepatology* 36(5 Suppl 1): S47-56.

Martelli-Palomino G., J. A. Pancotto, Y. C. Muniz, C. T. Mendes-Junior, E. C. Castelli, J. D. Massaro, I. Krawice-Radanne, I. Poras, V. Rebmann, E. D. Carosella, N. Rouas-Freiss, P. Moreau, E. A. Donadi. (2013) "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*. 25;8(10):e71742.

Martinetti, M., I. Pacati, M. Cuccia, C. Badulli, A. Pasi, L. Salvaneschi, E. Minola, A. De Silvestri, A. M. Iannone and A. Maccabruni (2006). "Hierarchy of baby-linked immunogenetic risk factors in the vertical transmission of hepatitis C virus." *Int J Immunopathol Pharmacol* 19(2): 369-378.

McCaughan, G. W. and J. George (2004). "Fibrosis progression in chronic hepatitis C virus infection." *Gut* 53(3): 318-321.

McGivern, D. R. and S. M. Lemon (2011). "Virus-specific mechanisms of carcinogenesis in hepatitis C virus associated liver cancer." *Oncogene* 30(17): 1969-1983.

Menier, C., M. Rabreau, J. C. Challier, M. Le Discorde, E. D. Carosella and N. Rouas-Freiss (2004). "Erythroblasts secrete the nonclassical HLA-G molecule from primitive to definitive hematopoiesis." *Blood* 104(10): 3153-3160.

Mesri, E. A., M. A. Feitelson and K. Munger (2014). "Human viral oncogenesis: a cancer hallmarks analysis." *Cell Host Microbe* 15(3): 266-282.

Metcalfe, S., M. Roger, M. C. Faucher, F. Coutlée, E. L. Franco and P. Brassard (2013). "The association between human leukocyte antigen (HLA)-G polymorphisms and human papillomavirus (HPV) infection in Inuit women of northern Quebec." *Hum Immunol* 74(12): 1610-1615.

Michita R.T., F. M. B. Zambra, L. R. Fraga, M. T. V. Sanseverino, S. M. Callegari-Jacques, P. Vianna, J. A. B. Chies. (2016) "A tug-of-war between tolerance and rejection - New evidence for 3'UTR HLA-G haplotypes influence in recurrent pregnancy loss." *Hum Immunol.* 77(10):892-897.

Mohd Hanafiah, K., J. Groeger, A. D. Flaxman and S. T. Wiersma (2013). "Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence." *Hepatology* 57(4): 1333-1342.

Moreau, P., F. Adrian-Cabestre, C. Menier, V. Guiard, L. Gourand, J. Dausset, E. D. Carosella and P. Paul (1999). "IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes." *Int Immunol* 11(5): 803-811.

Murphy, K. (2014). *Imunobiologia de Janeway*. Porto Alegre, Artmed.

Nishikawa, H. and Y. Osaki (2015). "Liver Cirrhosis: Evaluation, Nutritional Status, and Prognosis." *Mediators Inflamm* 2015: 872152.

Ortega-Pietro, A. M. Dorner (2017). "Immune Evasion Strategies during Chronic Hepatitis B and C Virus Infection". *Vaccines* 5(3).

Polaris Observatory HCV Collaborators (2017). "Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study." *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2(3):161-176.

Porto I. O., C. T. Mendes-Junior, L. P. Felício, R. C. Georg, P. Moreau, E. A. Donadi, J. A. Chies, E. C. Castelli. (2015) "MicroRNAs targeting the immunomodulatory HLA-G gene: a new survey searching for microRNAs with potential to regulate HLA-G." *Mol Immunol.* 65: 230–41.

Rajagopalan S., E. O. Long (1999). "A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells." *J Exp Med* 189(7):1093-100.

Rebmann V., K. van der Ven, M. Passler, K. Pfeiffer, D. Krebs, H. Grosse-Wilde. (2001) "Association of soluble HLA-G plasma levels with HLA-G alleles." *Tissue Antigens*. 57: 15–21.

Rehermann, B. and M. Nascimbeni (2005). "Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection." *Nat Rev Immunol* 5(3): 215-229.

Rizzo, R., D. Bortolotti, S. Bolzani and E. Fainardi (2014). "HLA-G Molecules in Autoimmune Diseases and Infections." *Front Immunol* 5: 592.

Rizzo R., D. Bortolotti, N. B. Fredj, A. Rotola, F. Cura, M. Castellazzi, C. Tamborino, S. Seraceni, E. Baldi, L. Melchiorri, M. R. Tola, E. Granieri, O. R. Baricordi, E. Fainardi. (2012) "Role of HLA-G 14 bp deletion/insertion and +3142C>G polymorphisms in the production of sHLA-G molecules in relapsing-remitting multiple sclerosis." *Hum Immunol* 73: 1140–6.

Rodríguez-Torres, M. (2008). "Latinos and chronic hepatitis C: a singular population." *Clin Gastroenterol Hepatol* 6(5):484-90.

Rosenberg, N. A., M. D. Edge, J. K. Pritchard, M. W. Feldman (2019). "Interpreting polygenic scores, polygenic adaptation, and human phenotypic differences." *Evol Med Public Health* (1):26-34.

Saab S., C. Jackson, J. Nieto, F. Francois (2014). "Hepatitis C in African Americans." *Am J Gastroenterol* 109(10):1576-84.

Segat, L., L. Zupin, H. Y. Kim, E. Catamo, D. M. Thea, C. Kankasa, G. M. Aldrovandi, L. Kuhn and S. Crovella (2014). "HLA-G 14 bp deletion/insertion polymorphism and mother-to-child transmission of HIV." *Tissue Antigens* 83(3): 161-167.

Stephens, M. and P. Donnelly (2003). "A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data." *Am J Hum Genet* 73(5): 1162-1169.

Stephens, M., N. J. Smith and P. Donnelly (2001). "A new statistical method for haplotype reconstruction from population data." *Am J Hum Genet* 68(4): 978-989.

Turk, W. J., J. Kimani, T. Bielawny, C. Wachihi, T. B. Ball, F. A. Plummer and M. Luo (2013). "Associations of human leukocyte antigen-G with resistance and susceptibility to HIV-1 infection in the Pumwani sex worker cohort." *AIDS* 27(1): 7-15.

Veit T.D., J. A. B. Chies. (2009) "Tolerance versus immune response – MicroRNAs as important elements in the regulation of the HLA-G gene expression." *Transpl Immunol.* 20: 229–31.

Veldt B.J., E. J. Heathcote, H. Wedemeyer, J. Reichen, W. P. Hofmann, S. Zeuzem, M. P. Manns, B. E. Hansen, S. W. Schalm, H. L. Janssen. (2007) Sustained virologic response and clinical outcomes in patients with chronic hepatitis C and advanced fibrosis. *Ann Intern Med.* 147:677-684.

Vianna, P., A. G. Mondadori, M. E. Bauer, D. Dornfeld, J. A. Chies (2016). "HLA-G and CD8+ regulatory T cells in the inflammatory environment of pre-eclampsia." *Reproduction* 152(6):741-751.

Weng, P. J., Y. M. Fu, S. X. Ding, D. P. Xu, A. Lin and W. H. Yan (2011). "Elevation of plasma soluble human leukocyte antigen-G in patients with chronic hepatitis C virus infection." *Hum Immunol* 72(5): 406-411.

Xu, H. H., W. W. Shi, A. Lin and W. H. Yan (2014). "HLA-G 3' untranslated region polymorphisms influence the susceptibility for human papillomavirus infection." *Tissue Antigens* 84(2): 216-222.

Yan, W. H. (2011). "HLA-G expression in cancers: potential role in diagnosis, prognosis and therapy." *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 11(1): 76-89.

Yang, Y., D. E. Geraghty and J. S. Hunt (1995). "Cytokine regulation of HLA-G expression in human trophoblast cell lines." *J Reprod Immunol* 29: 179- 195.

Yang, Y., W. Chu, D. E. Geraghty and J. S. Hunt (1996). "Expression of HLA-G in human mononuclear phagocytes and selective induction by INF-gamma." *J Immunol* 156: 4224-4231.

Yie S.M., L. H. Li, R. Xiao, C. L. Librach. (2008) "A single base-pair mutation in the 3'-untranslated region of HLA-G mRNA is associated with pre-eclampsia." *Mol Hum Reprod.* 14: 649-53.

Yoshida H., Y. Shiratori, M. Moriyama, Y. Arakawa, T. Ide, M. Sata, O. Inoue, M. Yano, M. Tanaka, S. Fujiyama, S. Nishiguchi, T. Kuroki, F. Imazeki, O. Yokosuka, S. Kinoyama, G. Yamada, M. Omata. (1999) "Interferon therapy reduces the risk for hepatocellular carcinoma:national surveillance program of cirrhotic and noncirrhotic patients with chronic hepatitis C in Japan." *Ann Intern Med.* 131:174-181.11.

Zajac M., I. Muszalska, A. Sobczak, A. Dadej, S. Tomczak, A. Jelińska. (2019) "Hepatitis C - New drugs and treatment prospects 2019" *Eur J Med Chem.* 1;165:225-249.

Zambra, F. M., V. Biolchi, C. C. de Cerqueira, I. S. Brum, E. C. Castelli and J. A. Chies (2016). "Immunogenetics of prostate cancer and benign hyperplasia--the potential use of an HLA-G variant as a tag SNP for prostate cancer risk." *HLA* 87(2): 79-88.