

ALESSANDRO PIRRI

**POLIMORFISMO DE HLA-G E SUA RELAÇÃO COM
TRANSPLANTE RENAL**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, na área de concentração de Genética, do Curso de Pós-Graduação em Genética, do Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria da Graça Bicalho.

CURITIBA
2006

Aos meus pais, Riccardo e Valmira, e meus irmãos. Aos meus sobrinhos, pela alegria.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, em especial, à minha orientadora, Prof^a Dr^a Maria da Graça Bicalho, pelas oportunidades, disposição, ensinamentos e conselhos oferecidos desde os tempos da graduação até hoje, e que resultaram na realização desta dissertação.

Aos meus pais, Riccardo e Valmira Pirri, meus irmãos, Carla, Ricardo e Leonardo, além de meus sobrinhos, Júlia, Murilo, Carolina e Thiago, pelo apoio, sustento, alegria e lições de vida, durante a minha vida.

A todo o pessoal do LIGH pela ajuda e durante meus anos de trabalho, na graduação e pós-graduação: Sonia Maria Correia Machado da Costa, Fabiana Poerner, Prof^a Eni P. Bompeixe, pela ajuda, ensinamentos e paciência, desde o início, em 2002, como estágio até hoje, no final do mestrado; Fernanda Ribas Zacarias, pelo auxílio com a coleta das amostras e prontuários; Pablo Santos e Rafael Vargas, pelas sugestões e explicações; e a todos os que conviveram comigo nesses anos, pelo companheirismo e amizade: José Luiz M. Bilá, Claudia T. Schuertz, Sibelle B. Mattar, Fabio Trotsdorf, Marina B.S. Xavier, Izolde Gaertner, Gorete Y. Rezende, Renate von Linsingen, Raquel T. Maciel e Téó M. Ruiz.

Aos meus grandes amigos, Clineu Julien Seki Uehara e Márcio Marques de Moraes, pelos bons momentos, e ajuda a todas as horas. A Paulo Roberto Sarturi, que além de um grande amigo, me ajudou muito com o sequenciamento, desde o manuseio do aparelho até sugestões na metodologia.

Às Professoras Maria Luiza Petzl-Erler e Valéria E. Roxo, pela ajuda e sugestões durante o desenvolvimento deste trabalho.

A meus demais amigos que compartilharam vários bons momentos, contribuindo direta ou indiretamente para a realização do projeto.

Obrigado a todos!!!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 TRANSPLANTE RENAL	4
2.1.1 Sobre os transplantes.....	4
2.1.2 Mecanismos efetores da rejeição do aloenxerto.....	5
2.1.3 Transplante renal e HLA.....	8
2.2 HLA-G	10
2.2.1. Sobre o MHC.....	10
2.2.2 Histórico do <i>HLA-G</i>	12
2.2.3 Estrutura do gene <i>HLA-G</i> e elementos de controle de sua expressão.....	13
2.2.4 Estrutura da Proteína HLA-G e suas Isoformas.....	16
2.2.5 Polimorfismos de <i>HLA-G</i>	21
2.2.6 A ação da molécula de HLA-G.....	26
2.3 HLA-G EM TRANSPLANTES	32
3. OBJETIVOS	37
4. JUSTIFICATIVA	38
5. MATERIAIS E MÉTODOS	39
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	39
5.2 SEQÜENCIAMENTO DOS EXONS 2 E 3 DO GENE <i>HLA-G</i>	41
5.2.1 Coleta das amostras.....	41
5.2.2 Extração de DNA.....	42
5.2.3 Concentração do DNA.....	42
5.2.4 Amplificação dos éxons 2 e 3.....	42
5.2.5 Purificação e seqüenciamento das amostras amplificadas.....	43

5.3 CARACTERIZACAO DOS ALELOS <i>HLA-G</i>	44
5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
6. RESULTADOS	47
6.1 DETERMINAÇÃO DAS VARIANTES POLIMÓRFICAS DE <i>HLA-G</i> NO ÉXONS 2 E NO ÉXON 3.....	47
6.2 VARIANTES POLIMÓRFICAS DE <i>HLA-G</i> E OS EPISÓDIOS DE REJEIÇÃO.....	48
6.2.1 Freqüências Alélicas.....	49
6.2.2 Freqüências Genotípicas.....	51
6.2.3 Freqüência dos Portadores.....	52
6.2.4 Alelos Agrupados.....	54
6.3 SIMILARIDADES <i>HLA-G</i> ENTRE A DUPLA RECEPTOR-DOADOR.....	56
6.4 EQUILÍBRIO DE HARDY WEINBERG E DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO.....	57
7. DISCUSSÃO	63
7.1 DETERMINAÇÃO DAS VARIANTES POLIMÓRFICAS DE <i>HLA-G</i> NO ÉXONS 2 E NO ÉXON 3.....	64
7.2 VARIANTES POLIMÓRFICAS DE <i>HLA-G</i> E OS EPISÓDIOS DE REJEIÇÃO.....	64
7.3 SIMILARIDADES <i>HLA-G</i> ENTRE A DUPLA RECEPTOR-DOADOR.....	67
7.4 EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG E DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO.....	68
8. CONCLUSÃO	74
9. REFERÊNCIAS	75
ANEXOS	85
ANEXO 1 - SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DOS ALELOS DE <i>HLA-G</i>	85
ANEXO 2 - TIPAGENS <i>HLA-G</i> DOS RECEPTORES E DOADORES.....	90
ANEXO 3 - TERMO DE ANUÊNCIA	92
ANEXO 4 - FICHA PRONTUÁRIO.....	93

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	O MHC HUMANO.....	11
FIGURA 2 -	ESTRUTURA DO RNAm DE <i>HLA-G</i>	14
FIGURA 3 -	A ESTRUTURA DA REGIÃO PROMOTORA DOS GENES <i>HLA-E, HLA-F E HLA-G</i>	18
FIGURA 4 -	REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL DE <i>HLA-E, HLA-F E HLA-G</i>	19
FIGURA 5 -	ISOFORMAS DE <i>HLA-G</i>	21
FIGURA 6 -	ELETROFEROGRAMA DO ÉXON 2 DE <i>HLA-G</i>	47
FIGURA 7 -	ELETROFEROGRAMA DO ÉXON 3 DE <i>HLA-G</i>	48
FIGURA 8 -	SUBSTITUIÇÕES SINÔNIMAS E NÃO-SINÔNIMAS E EPISÓDIOS DE REJEIÇÃO.....	68

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	ALELOS DE <i>HLA-G</i> E POLIMORFISMO DAS PROTEÍNAS.....	23
TABELA 2 -	FREQÜÊNCIA ALÉLICA (%) DE <i>HLA-G</i> EM DIFERENTES POPULAÇÕES.....	24
TABELA 3 -	FREQÜÊNCIAS ALÉLICAS DE <i>HLA-G</i> ENCONTRADAS NAS AMOSTRAS PACIENTE E DOADOR.....	49
TABELA 4 -	FREQÜÊNCIAS ALÉLICAS DE <i>HLA-G</i> NOS PACIENTES RENAI, EM RELAÇÃO À OCORRÊNCIA DE EPISÓDIOS DE REJEIÇÃO.....	50
TABELA 5 -	FREQÜÊNCIAS ALÉLICAS DE <i>HLA-G</i> NOS DOADORES EM RELAÇÃO A OCORRÊNCIA DE EPISÓDIOS DE REJEIÇÃO.....	50
TABELA 6 -	FREQÜÊNCIAS GENOTÍPICAS DE <i>HLA-G</i> NAS AMOSTRAS PACIENTE E DOADOR	51
TABELA 7 -	FREQÜÊNCIAS GENÓTIPICAS DE <i>HLA-G</i> NOS PACIENTES RENAI, EM RELAÇÃO À OCORRÊNCIA DE EPISÓDIOS DE REJEIÇÃO.....	52
TABELA 8 -	FREQÜÊNCIAS GENÓTIPICAS DE <i>HLA-G</i> NOS DOADORES, EM RELAÇÃO À OCORRÊNCIA DE EPISÓDIOS DE REJEIÇÃO.....	52
TABELA 9 -	FREQÜÊNCIAS DOS PORTADORES DE ALELOS <i>HLA-G</i> ENCONTRADAS NAS AMOSTRAS PACIENTE E DOADOR.....	53
TABELA 10 -	FREQÜÊNCIAS DOS PACIENTES PORTADORES DOS ALELOS <i>HLA-G</i> EM RELAÇÃO AOS EPISÓDIOS DE REJEIÇÃO.....	53
TABELA 11 -	FREQÜÊNCIAS DOS DOADORES PORTADORES DOS ALELOS <i>HLA-G</i> EM RELAÇÃO AOS EPISÓDIOS DE REJEIÇÃO.....	54
TABELA 12 -	COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQÜÊNCIAS ALÉLICAS DE ALELOS AGRUPADOS POR TIPO DE SUBSTITUIÇÕES NUCLEOTÍDICAS	55
TABELA 13 -	COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQÜÊNCIAS GENOTÍPICAS DE ALELOS AGRUPADOS POR TIPO DE SUBSTITUIÇÕES NUCLEOTÍDICA.....	55
TABELA 14 -	COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQÜÊNCIAS DOS PORTADORES DE ALELOS AGRUPADOS POR TIPO DE SUBSTITUIÇÕES NUCLEOTÍDICAS.....	56
TABELA 15 -	RELAÇÃO ENTRE OS <i>MATCHES</i> E <i>MISMATCHES</i> <i>HLA-G</i> ENTRE A DUPLA PACIENTE-DOADOR E EPISÓDIOS DE REJEIÇÃO.....	56
TABELA 16 -	RELAÇÃO ENTRE O NÚMERO DE <i>MISMATCHES</i> ENTRE DOADOR- RECEPTOR E OS EPISÓDIOS DE REJEIÇÃO.....	57
TABELA 17 -	TESTE DE EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG PARA OS <i>LOCI</i> <i>HLA-A</i> , <i>-B</i> E <i>-G</i> DOS PACIENTES RENAI.....	57
TABELA 18 -	TESTE DE EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG PARA OS <i>LOCI</i> <i>HLA-A</i> , <i>-B</i> E <i>-G</i> DOS DOADORES.....	58
TABELA 19 -	VALORES DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO (Δ') PARA OS <i>LOCI</i> <i>HLA-A</i> E <i>HLA-G</i> DOS PACIENTES.....	59

TABELA 20 - VALORES DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO (Δ') PARA OS <i>LOCI</i> <i>HLA-A</i> E <i>HLA-G</i> DOS DOADORES.....	59
TABELA 21 - VALORES DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO (Δ') PARA OS <i>LOCI</i> <i>HLA-B</i> E <i>HLA-G</i> DOS PACIENTES.....	60
TABELA 22 - VALORES DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO (Δ') PARA OS <i>LOCI</i> <i>HLA-B</i> E <i>HLA-G</i> DOS DOADORES.....	61
TABELA 23 - VALORES DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO (Δ') PARA OS <i>LOCI</i> <i>HLA-DRB1</i> E <i>HLA-G</i> DOS PACIENTES.....	62
TABELA 24 - VALORES DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO (Δ') PARA OS <i>LOCI</i> <i>HLA-DRB1</i> E <i>HLA-G</i> DOS DOADORES.....	62
TABELA 25 - HAPLÓTIPOS <i>HLA-A- HLA-G</i> , <i>HLA-B- HLA-G</i> E <i>HLA-DRB1 -HLA-G</i>	73

LISTA DE ABREVIATURAS

ARE	- Abortamento Recorrente Espontâneo
células NK	- células <i>natural killer</i> ;
CIITA	- Transativador de classe II;
HLA	- Antígeno Leucocitário Humano;
IL	- Interleucina;
ILT	- classe de receptores presentes nas células <i>NK</i> , linfócitos B, macrófagos, monócitos;
INF	- Interferon;
IRF	- Fator regulador do interferon;
ISRE	- Seqüência Consenso Interferon;
JEG-3	- células do coriocarcinoma humano;
K586	- células da eritoleucemia humana;
KIR	- receptor das células <i>natural killer</i> ;
MHC	- Complexo Principal de Histocompatibilidade;
MLR	- Reação mixtas de linfócitos;
NF- κ B	- Fator transcricional κ B;
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase;
SNP	- Polimorfismo de Nucleotídeo Único;
Sp1	- Fator transcricional mediador das rotas de transativação constitutivas e induzidas por citocinas;
STAT1	- Tradutor de sinal e ativador da transcrição;
TE671	- células do rabdomyosarcoma humano;
TNF	- Fator de Necrose Tumoral;
TCR	- Receptor das Células T;
β 2-m	- β 2-microglobulina.

RESUMO

No transplante renal, a influência dos genes *HLA* no prognóstico e na sobrevida do alo-enxerto vem sendo muito estudada. Atualmente, a realização de exames para verificar a compatibilidade *HLA*, nos loci *-A*, *-B* e *-DR* é indispensável para a realização do transplante. A importância de outros genes *HLA*, como o *HLA -E* e *-G* ainda está sendo verificada, mas os estudos feitos não têm sido conclusivos. Alguns poucos pesquisadores afirmam que *HLA-G* é fracamente expresso no endotélio renal de pacientes transplantados, sendo detectado em células tubulares renais em transplantes hepático-renais, expressando-se na forma solúvel e/ou ligado à membrana, podendo estar associado à aceitação/rejeição do alo-enxerto. No presente estudo, foi analisado, pela técnica de sequenciamento de DNA, *HLA-G* (éxons 2 e 3) de 52 pacientes transplantados renais e seus respectivos doadores. Destes pacientes, 33 sofreram episódios de rejeição (aguda) até os 4 primeiros meses pós-transplante. No presente estudo, verificou-se que a compatibilidade *HLA-G* pode ter importância na aceitação do alo-enxerto (chance 0,09 menor de ocorrência de rejeição), assim como a compatibilidade *HLA-A*, *-B* e *-DR*. Os resultados permitiram concluir que pacientes cujo genótipo apresente um alelo *HLA-G* com uma substituição sinônima, presente nos alelos *HLA-G*0101A*, *HLA-G*01B*, *HLA-G*010103*, *HLA-G*010107* e *HLA-G*010108* e o outro alelo, com uma não-sinônima, presente nos alelos *HLA-G*0103*, *HLA-G*010401* (este apresentando frequência significativamente maior que os outros alelos deste grupo), *HLA-G*010403* e *HLA-G*0105N*, aparentemente apresentam maior chance (5 vezes maior) de ocorrência de episódios de rejeição.