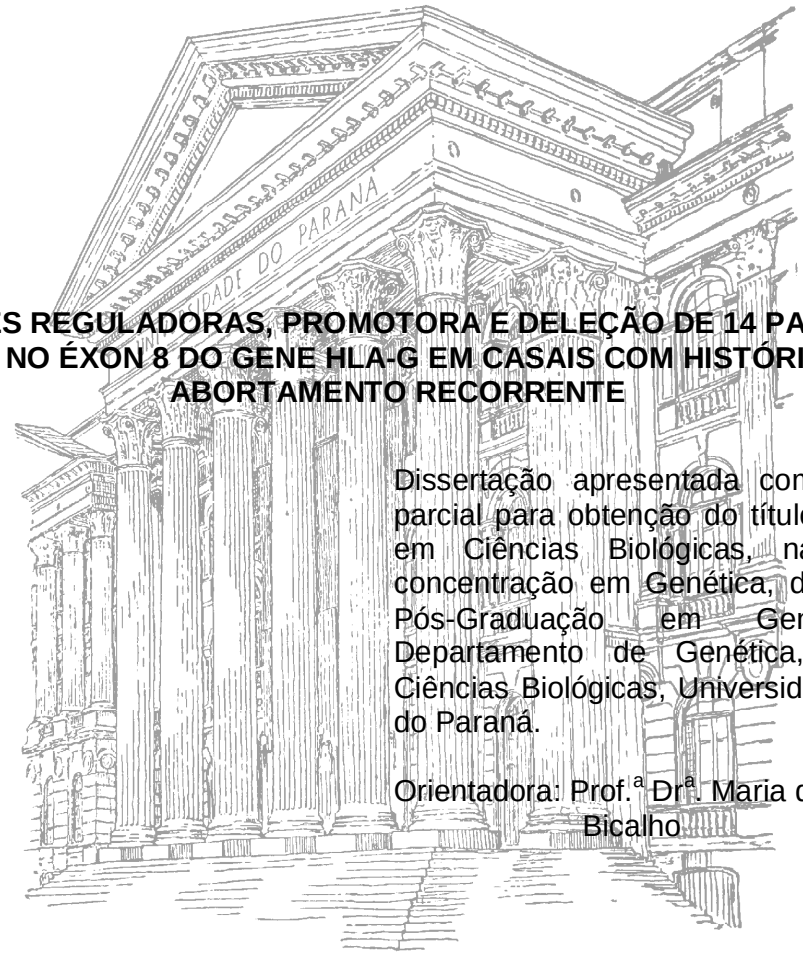
JOANDREI DOS SANTOS SILVA



REGIÕES REGULADORAS, PROMOTORA E DELEÇÃO DE 14 PARES DE BASES NO ÉXON 8 DO GENE HLA-G EM CASAIS COM HISTÓRICO DE ABORTAMENTO RECORRENTE

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

Orientadora: Prof.ª Drª. Maria da Graça Bicalho

CURITIBA

2009

JOANDREI DOS SANTOS SILVA

REGIÕES REGULADORAS, PROMOTORA E DELEÇÃO DE 14 PARES DE BASES NO ÉXON 8 DO GENE *HLA-G* EM CASAIS COM HISTÓRICO DE ABORTAMENTO RECORRENTE

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

Orientadora: Prof.ª Drª. Maria da Graça Bicalho

CURITIBA

2009

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente à Prof[a]. Maria da Graça Bicalho, minha orientadora, pela sua disposição e dedicação ao longo desse período, com seus conselhos e ensinamentos e principalmente pela oportunidade oferecida. Também pela sua amizade, incentivo e pelo exemplo como profissional.

Ao Prof. João Carlos M. Magalhães, mais que um professor, um grande amigo.

À Profa. Roseli Wassem, Prof[a] Chirlei Glienke de Blanco e ao Prof. Ricardo Lehtonen, pelas inestimáveis dicas e conselhos para a produção dessa pesquisa.

Às Professoras Valéria E. Roxo e Karin Braun-Prado, pela incansável ajuda no delineamento desse trabalho e suas devidas correções.

À Sônia, Fernanda, Alessandro, Eni, Fabiana, José, Téo, Gorete, Marina, Paulo, Claudia, Isabel, Samuel, Waldir, Isolde, grandes companheiros do Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade.

Agradeço ao Clineu Julien Seki Uehara pela sua amizade e pela sua disposição em ajudar a todos. Também agradeço a Sibele Mattar que contribuiu muito com sua experiência em seqüenciamento.

Ao Alessandro e ao Rafael pela ajuda na revisão do trabalho.

Aos meus grandes amigos, Ivan Santos e André Filipe Testoni.

Aos meus amigos de turma.

A todos os colegas, funcionários e professores do Departamento de Genética, pelo apoio durante a execução desse trabalho.

A minha esposa Dulce de Jesus Bastos, que me apoiou em todos os momentos e suportou todos os momentos difíceis ao meu lado. Foi minha amiga e companheira, sem seu amor e carinho não seria possível chegar até aqui.

Aos meus pais, Andrelina e João e meus irmãos Joeldson e Jaqueline, pelo apoio moral durante todo esse tempo de estudo.

A todos que, de forma direta ou indireta, sempre contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa.

A Deus, por permitir todas essas pessoas sempre ao meu lado.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES v

LISTA DE TABELAS vi

LISTA DE ABREVIATURAS Viii

RESUMO X

1. INTRODUÇÃO 1

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 4

2.1 GESTAÇÃO E O FETO 4

2.2 ABORTAMENTO ESPONTÂNEO RECORRENTE (AER) 4

2.2.1 PRINCIPAIS CAUSAS ASSOCIADAS AO AER 5

2.3 O COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE 9

2.4 *HLA-G* 13

2.4.1 HISTÓRICO DO *HLA-G* 13

2.4.2 TECIDOS ONDE TEM-SE DESCRITO A PRESENÇA DE HLA-G 13

2.4.3 IMPORTÂNCIA DO *HLA-G* PARA GESTAÇÃO 14

2.4.4 ESTRUTURA DO GENE *HLA-G* 19

2.4.5 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE *HLA-G* 20

2.4.6 ESTRUTURA DA PROTEÍNA HLA-G 25

2.4.7 HLA-G E SUAS ISOFORMAS 26

2.4.8 EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS TRANSCRITOS DE HLA-G (isoformas) NA GESTAÇÃO 29

2.4.9 POLIMORFISMOS NA REGIÃO REGULADORA,PROMOTORA E ÉXON 4 DO GENE *HLA-G* 31

3. OBJETIVOS **35**

4. JUSTIFICATIVA **36**

5. MATERIAIS E METODOS **37**

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA 37

5.2 SEQÜENCIAMENTO DA REGIÃO REGULADORA DE *HLA-G* 38

5.2.1 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO 38

5.2.2 CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DO DNA 38

5.2.3 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA ENTRE AS POSIÇÕES -1446 A +77 DE *HLA-G* 38

5.2.4 PURIFICAÇÃO E SEQÜENCIAMENTO DAS AMOSTRAS AMPLIFICADAS 43

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA 44

6.RESULTADOS **46**

6.1 SNPs DA REGIÃO PROMOTORA E REGULADORA DE *HLA-G* 46

6.1.1 ANÁLISE DOS FRAGMENTOS DA REGIÃO PROMOTORA DE *HLA-G* 46

6.2 SNPS DA REGIÃO PROMOTORA DE *HLA –G*: FREQÜÊNCIAS ALÉLICAS 47
6.3 SNPs DA REGIÃO PROMOTORA DE HLA-G: FREQÜÊNCIAS GENOTÍPICAS E VALORES DE EQUILÍBRIO DE HARDY – WEINBERG 50
6.4 FREQÜÊNCIA GENOTÍPICA, EQUILÍBRIO DE HARDY – WEINBERG E ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO EM HOMENS E MULHERES DOS GRUPOS PACIENTES E CONTROLES 55
6.5 ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO: COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E ENOTÍPICAS DO FRAGMENTO DE 14 PARES DE BASES NO ÉXON 8 (14pb/del) DO GENE *HLA-G* 63
6.6 ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO: COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DO SÍTIO POLIMÓRFICO -725C/G e 14pb/DEL 65
6.7 RAZÃO DE PROBABILIDADES *Odds Ratio* (OR) 66
6.8 ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO: COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DO SÍTIO POLIMÓRFICO -725C/G e 14pb/DEL 64
6.9 RAZÃO DE PROBABILIDADES *Odds Ratio* (OR) 65
6.10 HAPLÓTIPOS E FREQÜÊNCIAS HAPLOTÍPICAS 68
6.11 SÍTIOS CRE/TER 68
7. DISCUSSÃO 69
7.1 DETERMINAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA (SNPs) NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *HLA-G* 70
7.2 ANALISE DAS FREQÜÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS SNPs DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *HLA-G* 71
7.3 FREQÜÊNCIAS GENOTÍPICAS E EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG 74
7.4 SNP -725C/G/T NA REGIÃO PROMOTORA E A DELEÇÃO DE 14 PARES DE BASES NA REGIÃO 3´UTR (EXON 8) DO GENE *HLA-G* 76
7.5 FREQÜÊNCIAS HAPLOTÍPICAS 77
8. CONCLUSÃO 79
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 80
ANEXOS 94

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Mapa do MHC Humano estendido 11

Figure 2. Organização do gene *HLA-G* 20

Figura 3. Estrutura promotora dos genes *HLA-E, HLA-F e HLA-G* 22

Figura 4. Representação esquemática do promotor de *HLA-G* 23

Figure 5. Região regulatória 5´ a montante (upstream) de *HLA-G* 24

Figura 6. Visão geral da estrutura do *HLA-G* 25

Figura 7. a. Isoformas de HLA-G 28

Figura 8. Sumario da expressão da isoforma do mRNA de *HLA-G* na preimplantação de embriões humanos 30

Figura 9. Região reguladora e promotora do gene *HLA-G* compreendendo 1544pb 40

Figura 10. Fragmento 1 e os oligonucleotideos G*- 1447F e G*-830R utilizados para sua amplificação 41

Figura 11. Fragmento 2 e os oligonucleotideos G*- 919F e G*-304R utilizados para sua amplificação 41

Figura 12. Fragmento 3 e os oligonucleotídeos G*- 389F e G*+77R utilizados para sua amplificação 42

Figura 13. Visualização simultânea da análise das sequências nucleotídicas da região promotora de *HLA-G* de nove indivíduos de acordo com o programa SeqScape v.2x 46

Figura 14. Eletroferograma de parte do fragmento 2 da regão reguladora do gene *HLA-G* em indivíduos do grupo controle em análise no programa BioEdit v.7.0.8.0 47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. RECEPTORES DAS CÉLULAS NK E SEUS LIGANTES 18

TABELA 2. ALELOS MENOS FREQÜENTES (*MINOR ALLELES*) PARA OS 18 SÍTIOS POLIMÓRFICOS NA REGIÃO REGULATÓRIA 5' DE HLA-G 32

TABELA 3. ANÁLISE DE PERDA FETAL EM HUTTERITES 34

TABELA 4. OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES 39

TABELA 5 – COMPARAÇÃO DAS FREQÜÊNCIAS ALÉLICAS DOS SNPs DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *HLA-G* NO GRUPO PACIENTE (N= 112) E O GRUPO CONTROLE (N= 138) 48

TABELA 6 – COMPARAÇÃO DAS FREQÜÊNCIAS ALÉLICAS DOS SNPs DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *HLA-G* EM CASAIS DO GRUPO PACIENTE (N=56 + N=56) E CASAIS DO GRUPO CONTROLE (N=69 + N=69) 49

TABELA 7. FREQÜÊNCIAS GENOTÍPICAS E EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG (*VALOR DE P*) PARA OS *SNPs* DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *HLA-G* NO GRUPO PACIENTE (GP N= 112) E NO GRUPO CONTROLE (GC N= 138) 51

TABELA 8. (continuação) FREQÜÊNCIAS GENOTÍPICAS E EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG (*VALOR DE P*) PARA OS SNPs DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *HLA-G* NO GRUPO PACIENTE (GP N= 112) E NO GRUPO CONTROLE (GC N= 138) 52

TABELA 9. COMPARAÇÃO DA FREQÜÊNCIA GENOTÍPICA DOS *SNPs* DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *HLA-G* EM CASAIS PACIENTES COM AER (n:112) E CASAIS CONTROLE (N: 138) 53

TABELA 10. (continuação) COMPARAÇÃO DA FREQÜÊNCIA GENOTÍPICA DOS *SNPs* DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *HLA-G* EM CASAIS PACIENTES COM AER (n:112) E CASAIS CONTROLE (N: 138) 54

TABELA 11. FREQÜÊNCIAS GENOTÍPICAS, EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG (*VALOR DE P*) PARA OS *SNPs* DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *HLA-G* NO GRUPO PACIENTE FEMININO (GPF N= 56) E MASCULINO (GPM N= 56) E DO GRUPO CONTROLE FEMININO (GCF N= 69) E MASCULINO (GCM N= 69) 56

TABELA 12. (continuação) FREQÜÊNCIAS GENOTÍPICAS, EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG (*Valor de P*) PARA OS *SNPs* DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *HLA-G* NO GRUPO PACIENTE FEMININO (GPF N= 56) E MASCULINO (GPM N= 56) E DO GRUPO CONTROLE FEMININO (GCF N= 69) E MASCULINO (GCM N= 69) 57

TABELA 13 – (continuação) FREQÜÊNCIAS GENOTÍPICAS, EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG (*Valor de P*) PARA OS *SNPs* DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *HLA-G* NO GRUPO PACIENTE FEMININO (GPF N= 56) E MASCULINO (GPM N= 56) E DO GRUPO CONTROLE FEMININO (GCF N= 69) E MASCULINO (GCM N= 69) 58

TABELA 14. COMPARAÇÃO DA FREQÜÊNCIA GENOTÍPICA DOS SNPs DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *HLA-G* ENTRE HOMENS PACIENTES COM (n:56) E HOMENS CONTROLE (N: 69) 60

TABELA 15. (continuação) COMPARAÇÃO DA FREQÜÊNCIA GENOTÍPICA DOS SNPs DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *HLA-G* ENTRE HOMENS PACIENTES COM AER (n:56) E HOMENS CONTROLE (N: 69)CONTROLE FEMININO (GCF N= 69) E MASCULINO (GCM N= 69) 61

TABELA 16. COMPARAÇÃO DA FREQÜÊNCIA GENOTÍPICA DOS SNPs DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *HLA-G* ENTRE MULHERES PACIENTES (n:56) E MULHERES CONTROLE (N: 69) 62

TABELA 17. (continuação) COMPARAÇÃO DA FREQÜÊNCIA GENOTÍPICA DOS SNPs DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *HLA-G* ENTRE MULHERES PACIENTES (n:56) E MULHERES CONTROLE (n: 69) 63

TABELA 18. FREQÜÊNCIAS ALÉLICAS DA DELEÇÃO DO FRAGMENTO DE 14 PARES DE BASES NO ÉXON 8 DO GENE HLA-G 64

TABELA 19. FREQÜÊNCIAS ALÉLICAS DA DELEÇÃO DO FRAGMENTO DE 14 PARES DE BASES NO ÉXON 8 DO GENE HLA-G EM MULHERES 64

TABELA 20. FREQÜÊNCIAS ALÉLICAS DA DELEÇÃO DO FRAGMENTO DE 14 PARES DE BASES NO ÉXON 8 DO GENE HLA-G EM HOMENS 64

TABELA 21. FREQÜÊNCIA GENOTIPICAS DA DELEÇÃO DO FRAGMENTO DE 14 PARES DE BASE NO ÉXON 8 DO GENE HLA-G 65

TABELA 22. FREQÜÊNCIAS GENOTÍPICAS DA DELEÇÃO DO FRAGMENTO DE 14 PARES DE BASE NO ÉXON 8 DO GENE HLA-G EM MULHERES 65

TABELA 23. FREQÜÊNCIAS GENOTÍPICAS DA DELEÇÃO DO FRAGMENTO DE 14 PARES DE BASE NO ÉXON 8 DO GENE HLA-G EM HOMENS 65

TABELA 24. COMPARAÇÃO DAS FREQÜÊNCIAS DE PORTADORES DA DELEÇÃO DE 14 PARES DE BASES NO ÉXON 8 E DO ALELO -725G NO GENE *HLA-G* 66

TABELA 25. RAZÃO DE PROBABILIDADES (*Odds Ratio*) DA FREQUENCIA DE PORTADORES ENTRE HOMENS E CASAIS DO GRUPO PACIENTE (N= 112) VERSUS: HOMENS E CASAIS DO GRUPO CONTROLE (N= 138) PARA O SNP -725C/G DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *HLA-G* 67

TABELA 26. RAZÃO DE PROBABILIDADES (*Odds Ratio*) ENTRE HOMENS E CASAIS DO GRUPO PACIENTE (N= 112) VERSUS: HOMENS E CASAIS DO GRUPO CONTROLE (N= 136) PARA O SNP -725C/G DA REGIÃO PROMOTORA E O SÍTIO POLIMORFICO 14pb/del DA REGIÃO 3´ UTR DO GENE *HLA-G* 67

TABELA 27. HAPLÓTIPOS OBSERVADOS NO GRUPO PACIENTE E CONTROLE 68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AER	Abortamento Espontâneo Recorrente
ATF	Ativador de fator de transcrição
β_2m	Beta-2-microglobulina
BTN	Butirofilina
C^M	Citosina metilada
CRE	Elemento de resposta ao cAMP
CREB	Proteína ligante ao elemento de resposta ao cAMP
CIITA	Transativador de Classe II
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EXOI	Exonuclease I
FF	Fluido folicular
GPI	Glicosil-fofatidil-inositol
HLA	(Human Leukocyte Antigen) Antígenos Leucocitários Humanos
IFN	Interferon (INF)
IL	Interleucinas
IRF	Fator regulatório de interferon
ISRE	Elemento de Resposta ao Interferon
IVF	Fertilização “in vitro”
JAR	Linhagem de células de carcinoma
KIR	(Killer Cell Immunoglobulin Like Receptor) Receptores semelhantes a imunoglobulina das células exterminadoras naturais
LD	Desequilíbrio de ligação
LIGH	Laboratório de Imunogenética Humana
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade

mRNA	RNA mensageiro
NF-$_k$B	Fator transcricional $_k$B
NK	Exterminadoras Naturais, “Natural Killer”
PCR	(Polymerase Chain Reaction) Reação de Polimerização em Cadeia
RNA	Ácido Ribonucléico
RT-PCR	PCR em tempo real
SAP	Fosfatase alcalina de camarão
SEAD	Unidade de Seqüenciamento e Análise de DNA
sHLA-G	HLA-G solúvel
SNPs	Alterações de uma única base
Sp1	Fator transcricional mediador das rotas de transcrição constituídas e induzidas por citocinas
STAT1	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
SXY	Módulo SXY, seqüência de nucleotídeos presente na região promotora dos genes HLA
TNF	Fator de necrose tumoral
TPA	12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate
TRE	Elemento de resposta ao TPA
TRIM	Motivos tripartides
3’UTR	(Untranslated Region) Região 3´ transcrita e não traduzida
5´UTR	(Untranslated Region) Região 5´ transcrita e não traduzida
VNR	Receptor Vomeronasal

RESUMO

Não são poucas as evidências que sugerem que a modulação da expressão das moléculas HLA-G poderia ser uma condição fundamental para uma gestação bem sucedida, o que estaria em parte, associada à expressão em níveis elevados da molécula HLA-G solúvel (sHLA-G). A região reguladora do gene *HLA-G* tem se destacado como objeto de estudos nos casos de AER. Em um estudo mais recente foi descrita a presença de 27 SNPs nesta região. No SNP -725C>G>T o alelo -725G pode estar relacionado ao maior risco de AER. O presente estudo investigou a região promotora em especial a presença do alelo -725G em casais com AER e casais férteis comparando a freqüência dos SNPs presentes nesta região, verificando se existe alguma relação entre estes snps e os casos de abortamento recorrente. Também foi estudado a deleção de 14 pares de bases no Exon 8 de HLA-G. No presente estudo a identificação dos alelos foi obtida utilizando a técnica de seqüenciamento de DNA. Para reação de seqüenciamento da região promotora foi utilizado o Kit *ABI PRISM*® ***BigDye***®. A região promotora foi dividida em três seqüências. A leitura das seqüências foram feitas no seqüenciador automático *Genetic Analyser-ABI3110.* O grupo paciente é constituído por 56 casais com histórico de no mínimo três abortamentos recorrentes e o grupo controle é constituído por 69 casais sem histórico de abortamento. Para as comparações que apresentaram significância (P<0,05), foi calculado o Odds Ratio. Dos 27 SNPs descritos, foram observados 18 SNPs. Comparando as freqüências destes SNPs o alelo -725G mostrou-se representativo quanto ao aumento do risco de abortamentos. Os resultados permitiram concluir que a presença do SNP -725G Aumenta o risco de abortamentos recorrentes principalmente quando presente em homens. Casais que apresentam o genótipo -725C/-725C teria um risco menor de abortamentos.

1. INTRODUÇÃO

O Complexo Principal de Histocompatibilidade Humano (do inglês *Major Histocompatibility Complex*) designado pela sigla MHC, está localizado no cromossomo 6 e se estende por aproximadamente 7 Mb de DNA, numa região genômica referida como MHC estendido (xMHC). Nessa região encontram-se diversos genes que codificam produtos os quais apresentam varias funções, tais como: moléculas ou receptores odorantes, fatores de transcrição, histonas, etc.

No Complexo Principal de Histocompatibilidade humano (MHC) está localizado o sistema gênico HLA (*Human Leukocyte Antigen*), o qual codifica moléculas glicoprotéicas que ligam uma grande variedade de peptídeos. Esses genes organizam-se e classificam-se em genes MHC das regiões de Classe I e de Classe II, de acordo com a estrutura e a função de seus produtos moleculares, que exibem peptídeos derivados respectivamente, de proteínas degradadas no citosol (MHC Classe I) ou peptídeos derivados de proteínas degradadas nas vesículas endocíticas (MHC Classe II) (JANEWAY *et al*. , 2002).

As moléculas protéicas MHC de Classe II são nominadas pelas siglas HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DO. As moléculas MHC de Classe I compreendem aquelas referenciadas como MHC de Classe I Clássicas, HLA-A, HLA-B e HLA-Cw e MHC Classe I não-Clássicas (ou MHC Classe Ib), HLA-E, HLA-F e HLA-G (GOBIN e VAN DEN ELSEN, 2000; VAN DEN ELSEN *et al.*, 2001; JANEWAY *et al.*, 2002;).

A diversidade alélica de *HLA-G,* compreendendo um pequeno número de alelos, 36 alelos descritos até janeiro de 2009 (www.antthonynolan.org.uk), contrasta com aquela observada nos genes MHC Classe I Clássicos, altamente polimórficos e polialélicos.

O processamento alternativo do mRNA de *HLA-G* resulta em 6 isoformas protéicas , sendo quatro ligadas a membrana (HLA-G1, -G2, -G3 e G4) e duas solúveis (HLA-G5 e –G6, também descritas como sHLA-G1 e sHLA-G2. A variante HLA-G7, também solúvel (MOROU; *et al.* , 2003; YAO; BARLOW; SARGENT,2005;) tem sido de difícil detecção nos procedimentos laboratoriais.

Os mecanismos que regulam a expressão das moléculas HLA-G e que controlam a recomposição alternativa do transcrito primário do RNA (*splicing*) ainda estão em estudo. A expressão de moléculas HLA-G, a princípio caracterizada como restrita ao trofoblasto, tem sido observada em outros tecidos e células, tais como: células medulares epiteliais tímicas, córnea, tecidos extraembrionários e no endotélio durante um processo inflamatório. As propriedades funcionais de HLA-G, relacionam-se com a supressão das funções de células T CD4 e CD8 e, mais recentemente, sua interação com células Natural Killer (NK) evidencia seu papel modulador da resposta imune, razão pela qual tem sido considerada uma molécula tolerogênica. A ausência da expressão de *HLA-G* em muitos tecidos pode ser atribuída a metilação de algumas seqüências reguladoras (LEFEBVRE *et al.* 2000; MOREAU; *et al.*, 2003; BAHRI; *et al.*, 2006) e um número maior de estudos são necessários para uma melhor compreensão desse mecanismo.

Admite-se que mecanismos reguladores diferentes estejam atuando em tipos celulares distintos, por exemplo, em células de tumores e células do trofoblasto. A expressão de HLA-G em trofoblasto coincide com a ausência de expressão dos genes de Classe I Clássicos HLA-A e HLA-B, sugerindo um controle transcricional que favoreceria a expressão de HLA-G e a inibição dos genes de Classe I Clássicos. A presença de regiões conservadas, tais como, três elementos CRE/TRE (Elemento de resposta à cAMP (Adenosina Monofosfato Cíclico) e Elemento de resposta ao TPA (12-o-Tetradecanoilforbol-13-acetato), sugere que *HLA-G* poderia estar sob controle transcricional da família de proteínas reguladoras CREB/ATF (GOBIN; *et al.*, 2002).

Desde a descoberta de HLA-G em 1990 em células da placenta fetal na interface materno-fetal, esta molécula tem chamado a atenção dos biologistas (biólogos da área clínica) e imunologistas da reprodução (ELLIS; PALMER; MICHAEL, 1990; KOVATS *et al.*, 1990). Os resultados observados em estudos permitiram hipotetizar que níveis reduzidos de expressão da isoforma –G1 de HLA-G possam estar relacionados com o insucesso reprodutivo.(OBER; *et al.*, 2003).

O objetivo do atual estudo é investigar a relação entre alterações nas regiões reguladoras, promotora e a deleção de 14 pares de bases do gene HLA-G e a sua relação com o abortamento recorrente. Este trabalho vai dar continuidade aos estudos feitos no LIGH (Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade) sobre o HLA-G e sua relação com o abortamento recorrente, analisando regiões reguladoras e éxons que ainda não haviam sido investigados nos estudos anteriores.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 GESTAÇÃO E O FETO

O feto pode ser comparado a um aloenxerto tolerado e que ocorre de modo natural para a gestante. Metade dos genes do embrião são herdados do pai e os que se expressarem no período pré-natal poderão ser alogênicos para a mãe. No entanto, raramente ocorre um episódio de rejeição do feto pela mãe, apesar dela estar exposta aos antígenos fetais durante a gravidez. Entender como o feto escapa do sistema imune pode trazer informações importantes para a imunogenética dos transplantes. Vários mecanismos moleculares e as barreiras da placenta e da imunossupressão local provavelmente estão envolvidos na proteção do feto (ABBAS, LICHTMAN & POBER., 2003).

2.2 ABORTAMENTO ESPONTÂNEO RECORRENTE (AER)

Sendo uma das complicações mais comum da gravidez, o aborto espontâneo ocorre em 10% a 15% das gestações clinicamente detectadas (ZINAMAN *et al.* 1996). O abortamento espontâneo recorrente (AER) é caracterizado pela perda espontânea e sucessiva de três ou mais gestações até a 20ª semana de gravidez. Esta situação atinge 1% a 2% das mulheres em idade reprodutiva enquanto que a freqüência esperada seria de algo em torno de 0,3% para três abortamentos consecutivos (COULAM, 1986; REGAN *et al.*, 1998).

Para CAETANO *et al.* (2006), a idade acima de 40 anos, fatores imunológicos (particularmente fatores autoimunes) e dois ou mais fatores etiológicos como causas anatômicas e causas endócrinas, estão associados aos casos de AER no grupo de mulheres por eles estudado.

2.2.1 PRINCIPAIS CAUSAS DO AER

Segundo BOUÉ *et al.* (1975) as alterações cromossômicas são as principais causas genéticas e representam 50% a 60% dos casos de abortamentos espontâneos de 1º trimestre. Com maior freqüência encontram-se as alterações cromossômicas numéricas : 50% a 60% trissomias, 20% a 25% poliploidias e 15% a 25% monossomias do cromossomo X. A presença de trissomia no cariótipo fetal aumenta a chance de um novo caso de abortamento na próxima gestação.

As alterações cromossômicas, segundo CARR (1970) são observadas em 60% dos abortos de 1º trimestre. As alterações cromossômicas associadas ao ARE mais comuns são as monossomias e as poliploidias.Ressaltando-se por exemplo, que a única compatível com a sobrevivência do embrião é a monossomia do X, associada a Síndrome de Turner.

Além das alterações numéricas, alterações estruturais e mosaicismo também são observados em fetos abortados. A translocação balanceada (alteração estrutural onde ocorre quebra e troca entre os fragmentos de dois cromossomos) foi identificada em 7,2% dos casos (BOUÉ & BOUÉ, 1976). A presença de mosaicismo no cariótipo materno ou paterno contribuiria para os casos de abortos espontâneos recorrentes, com freqüência semelhante ao das translocações balanceadas (SACHS *et al.*, 1985). ROBINSON *et al.*, (2001) observou que a inativação do cromossomo X foi encontrado em 14% das mulheres com AER de causa desconhecida. Nestes casos há uma hipótese de que uma mutação no cromossomo X o tornaria inativo em fetos masculinos resultando em abortamento

Estima-se que 15% a 27% dos casos de AER sejam conseqüência de defeitos anatômicos do útero (HARGER *et al.*, 1983; STRAY-PETERSEN & STRAY-PETERSEN., 1984). Alguns exemplos desta causa de abortamentos seriam os úteros bicornos, unicorno e didelfo (BUTTRAM & GIBBONS., 1979; HOMER *et al.*, 2000), as sinéquias uterinas (COSTA, 1994) os miomas tornando a

cavidade uterina saliente e a insuficiência cervical (KURUP &GOLDKRAND, 1999).

A ocorrência de AER também está relacionada a algumas causas endocrinológicas sendo a insuficiência do corpo lúteo a causa endócrina mais relatada, e é caracterizada por uma produção reduzida da progesterona na segunda fase do ciclo, período de implantação, levando a maturação endometrial insuficiente para suportar a nidação e o desenvolvimento do ovo (BOTELLA, 1962).

O *diabetes mellitus* foi citado como uma causa de aborto (SUTHERLAND & PRITCHARD, 1986), porém, MILLS (1983) não encontrou evidências da relação entre *diabetes mellitus* e AER, ao comparar mulheres insulino-dependentes e mulheres saudáveis.

JONES & DELFS (1951), ao estudar casos de abortamento em mulheres com hipotireoidismo, verificou que havia uma relação entre abortamento e mulheres que apresentavam alterações funcionais da tireóide. Na década de noventa ROUSSEV *et al.* (1996), avaliaram o soro de 45 mulheres com histórico de AER e compararam com o soro de 15 mulheres sem histórico de AER do grupo controle. Os resultados mostraram que as taxas de anticorpos antitireoideanos positivos foi de 9% no grupo paciente e de 0% no grupo controle. ABRAMSON & STAGNARO-GREEN (2001), observaram que havia uma associação entre os casos de AER e a presença de anticorpos antitireoideanos no soro materno. STAGNARO-GREEN & GLINOER (2004), descreveram os resultados de um estudo com 876 mulheres com histórico de AER. Neste trabalho foi analisada a taxa de anticorpos antitireoideanos positivos e negativos. Os resultados para associação da presença de anticorpos positivos e o aumento da taxa de abortamento, foram altamente significativos.

Alguns agentes infecciosos como *Chlamydia trachomatis*, *Toxoplasma gondii*, *Brucella abortus*, *Listeria monocytogenes*, *Mycoplasma hominis*, *Citomegalovirus* e *Herpes simplex*, já foram citados na literatura como responsáveis por episódios de AER. No entanto, não há na literatura evidências

que comprovem a existência de uma relação entre as infecções provocadas por estes agentes e os casos de perda fetal (CARP *et al.*, 1990).

Casos de abortamento recorrente também foram descritos em mulheres que apresentavam algum distúrbio da coagulação (trombofilias). Esse termo é aplicado à tendência para desenvolver trombose em idade precoce ou com recorrência freqüente. Esta condição parece interferir no desenvolvimento do sistema vascular útero-placentário tornando-o ineficaz (GLUECK *et al.*, 2000). A mutação do fator de Leiden (G20210A) no gene da prototrombina, a mutação C677T no gene da enzima metileno tetrahidrofolato redutase, a deficiência das proteínas C e S, e a deficiência da antitrombina III, são descritos como os principais fatores no desenvolvimento da trombofilia hereditária (CARVALHO, 2001).

CLIFFORD *et al.* (1997) ao estudar um grupo de 201 mulheres com idade entre 22 e 43 anos, observaram que em mulheres com idade igual ou abaixo dos 30 anos, a taxa de ocorrência de aborto seria de aproximadamente 25%, enquanto que em mulheres com idade igual a 40 anos ou superior a ocorrência de aborto se elevaria para 52%. No trabalho realizado por CAETANO *et al.* (2006), foram avaliadas 229 mulheres com histórico de AER, submetidas aos testes de avaliação genética (cariótipo), hormonal, infeccioso, fatores anatômicos e imunológicos. Após as avaliações concluíram que mulheres com idade acima de 40 nos e as causas imunológicas são os fatores mais significativamente associados aos casos de perda gestacional.

É descrita uma associação do uso de fumo e álcool com uma maior incidência de abortos espontâneos (ANOKUTE,1986). Segundo McALLER & TUAN (2004), a exposição do feto aos agentes contaminantes contidos no cigarro e no álcool, especialmente na fase pré-natal, pode ser a causa de malformações, retardo mental e abortamentos.

Foi descrito que distúrbios autoimunes e/ou aloimunes foram encontrados em mais de 80% dos casos em que a etiologia dos abortos era desconhecida (Mc INTYRE *et al.*, 1989). Segundo JANEWAY *et al.*(2002), acreditava-se que o feto não seria atacado pelo sistema imune materno por não expressar moléculas MHC

paternas. Porém, foi comprovado que os genes MHC de origem paterna estão presente no feto assim como antígenos de histocompatibilidade H secundários (também conhecidos como H secundários) são expressos pelas células fetais.

Outra possível explicação para aceitação do feto, é que o feto não seria imunogênico, dessa forma não seria reconhecido como um corpo estranho. Porém, mulheres que geraram vários filhos usualmente produzem anticorpos contra as proteínas MHC do pai (JANEWAY *et al.*, 2002).

Também foi proposto que a gestação tornaria a mãe imunologicamente incompetente. Sabe-se que isto não está correto, e que o sistema imune da gestante responde normalmente aos antígenos neste período. Havia também a hipótese de que o útero fosse um local imunologicamente privilegiado. Porém, enxertos de pele intra-uterinos são prontamente rejeitados em um hospedeiro pré-sensibilizado (GURKA &ROCKLIN, 1987).

A placenta parece ter um papel importante nesta tolerância. Ela é um tecido derivado do feto, que parece mantê-lo afastado das células T (linfócitos) da mãe atuando como uma barreira. O trofoblasto, que é a camada externa da placenta, a interface entre os tecidos fetais e maternos, não expressa moléculas de MHC de Classe I Clássicas (expressa baixas concentrações de HLA-C) e Classe II, o que o torna resistente ao reconhecimento imune mediado por células T maternas (linfócitos). Porém, os tecidos que não expressam MHC Classe I são vulneráveis às células exterminadoras naturais (do inglês: *natural killer ou NK)*. A expressão de HLA-G, poderia ser responsável pela proteção do trofoblasto ao ataque pelas células *NK*. As moléculas HLA-G ligam-se aos principais inibidores dos receptores NK, KIR1 e KIR2 (KIR2DL4), e dessa forma inibem a lise celular pelas células *Nk* (LANGAT, 2004).

A placenta também poderia proteger o feto por um mecanismo ativo de retirada de nutrientes. Na interface materno fetal, a enzima idoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) é expressa em altos níveis. Esta enzima elimina o aminoácido essencial triptofano. Isso reduz a eficiência das células T, que, portanto mostram resposta reduzida.

Outro fator que pode contribuir para tolerância materna ao feto é a secreção de citocinas pelo epitélio uterino e trofoblasto. As citocinas TGF-β, a IL-4 e a IL-10, tendem a promover as respostas T_H2 (perfil inibidor de inflamação) e suprimir as respostas T_H1 (perfil ativador de inflamação).

O feto seria tolerado por duas razões principais: (a) está alojado em um local protegido por uma barreira tecidual não imunogênica; e (b) promove uma resposta imunossupressora na mãe.

Segundo MOWBRAY *et al.* (1985), mulheres com histórico de AER, que receberam linfócitos purificados de seus maridos, tiveram maior sucesso em sua gestação. Algo em torno de 80% das causas desconhecidas de abortamento espontâneo recorrente pode ser devido a causas imunológicas o que abre um campo vasto para novas pesquisas.

2.3 O COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE

O Complexo Principal de Histocompatibilidade designado pela sigla MHC (do Inglês *Major Histocompatibility Complex*), foi descrito pela primeira vez em camundongos no ano de 1936 e recebeu esta denominação devida sua influência nos transplantes de tecidos nesses animais. As primeiras moléculas foram descritas como antígenos polimórficos da superfície celular e eram codificadas pelo complexo gênico denominado H-2. Os produtos deste complexo gênico constituíam a principal barreira imunológica aos transplantes de aloenxertos. Esses antígenos foram denominados antígenos de histocompatibilidade e são codificados por genes de mesmo nome. Posteriormente, complexos gênicos homólogos que codificavam produtos moleculares envolvidos na resposta imune foram descritos em varias espécies de mamíferos (DUNHAM *et al.*, 1987).

O MHC humano só foi descoberto na década de 50, por Dausset, Payne e Van Rood. Ao realizarem estudos sorológicos em pacientes transfundidos, perceberam diferenças entre leucócitos de diferentes indivíduos. Por isso esses genes são chamados antígenos Leucocitários Humanos ou genes HLA (do inglês *Human Leukocyte Antigen*). O MHC humano localiza-se no braço curto do

cromossomo 6, na região cromossômica 6p21.31 (LAMM *et al.*, 1985; Bell, 1989; HYLENIUS, 2004).

É importante ressaltar que nesta região cromossômica estão presentes outros genes, muitos não pertencentes ao sistema HLA. Com uma extensão de aproximadamente 7600kb, o MHC humano pode ser dividido em 5 sub-regiões (figura 1) (HORTON *et al.*, 2004; KELLEY *et al.*, 2005; ZIEGLER, 2005).

HORTON *et al.* (2004), definiu agrupamentos gênicos (*Clusters*) com sendo três ou mais genes parálogos ou pseudogenes que estão presentes dentro de uma seqüência de 1 mb, também definiu super-agrupamentos (*superclusters*) como agrupamentos com genes adicionais no núcleo do agrupamento, mas ainda dentro do xMHC.

Em 2004, HORTON *et al.* (2004) apresentaram em uma revisão o mapa do MHC humano estendido (xMHC). Algo em torno de 20% do genoma humano pode ser atribuído tanto a duplicações de segmentos pequenos quanto de segmentos grandes são necessárias para explicar a distribuição das famílias gênicas humanas. Estas duplicações resultam na formação de agrupamentos gênicos, e esta é uma característica marcante do xMHC. Há algumas possíveis explicações para a formação de agrupamentos para os genes do sistema imune no MHC. Se os produtos de genes fisicamente associados, por exemplo, no *HLA-DQA* e *HLA-DQB* ligados, podem assegurar que seus produtos gênicos sejam co-expressados em quantidades apropriadas para a formação de heterodímeros. Dois outros grandes agrupamentos gênicos do MHC humano são para genes de histonas e tRNA. Os transcritos de ambas as classes de genes são necessários em enormes quantidades.

O mapa apresentado por HORTON *et al.*(2004), (figura1) foi dividido em seis super-agrupamentos gênicos e seis agrupamentos gênicos:

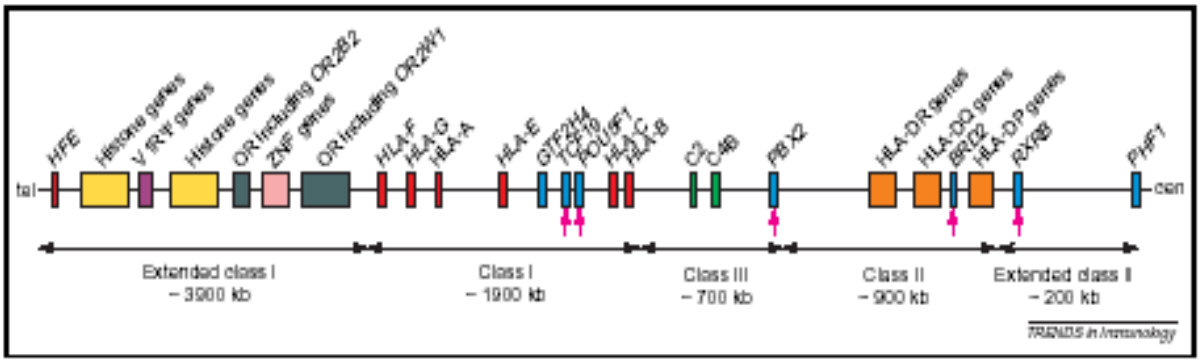


Figura 1. Mapa do MHC Humano estendido. O mapa (não em escala) mostra genes selecionados e agrupamentos genicos do MHC estendido (xMHC) do telomero (tel, esquerda) para o centrômero (cen, direita) no braço curto do cromossomo 6 humano. O numero total de genes no xMHC é de 578. As 5 subregiões do xMHC apresenta aproximadamente 7600 kilobases (Kb) e estão indicadas no mapa com extensão aproximada.(modificado de ZIEGLER; KENTENICH e ZIEGLER., 2005)

1- Super-agrupamento de histonas: São proteínas básicas envolvidas na formação do nucleossomo. Elas ocorrem em cinco classes, H1 (histonas de ligação), H2A, H2B, H3 e H4 (histonas do núcleo). Com um total de 66 *loci* (55 genes expressados e 11 pseudogenes). Individualmente são 6 H1, 12 H2A, 15 H2B, 10 H3 e 12 H4 genes expressados.
2- Agrupamento de carregadores de solutos: Estes genes fazem parte de uma família diversificada e pouco estudada, porém seu papel fisiológico é crucial no transporte de solutos e nutrientes.
3- Super-agrupamento HLA Classe I: Compreende os genes HLA Classe I Clássicos (*HLA-A, HLA-B e HLA-C*) e os genes *HLA* Classe I não-clássicos (*HLA-E, HLA-F, HLA-G, HFE* e 12 pseudogenes *HLA-H, -J, -K e –L*) e os genes classe I que atuam como ligantes para ativação e inibição de células NK (*MICA e MICB* e 5 pseudogenes). Embora o produto do gene *HFE* (na região telomérica do xMHC) seja parecido com uma proteína classe I clássica em muitos aspectos, incluindo a associação de sua cadeia pesada com β2-microglobulina (β2-M codificada por um gene do mesmo nome no cromossomo 15). Sua função está no metabolismo do ferro mais do que no processamento e apresentação de antígeno. Em conjunto com β2-M, os produtos dos genes classe I clássicos apresentam antígenos endógenos para células $TCD8^{+}$ e

estão envolvidas na resposta imune mediada por células NK (*Natural Killer*), assim como os genes classe I não-clássicos *HLA-E e HLA-G.* Esta resposta envolve a interação com receptores codificados no complexo de receptores de Leucócito (LRC) e o Complexo *Natural Killer* (NKC) (HORTON *et al.*, 2004; GOBIN; VAN DEN ELSEN, 2000).

4- Super-agrupamento tRNA: A presença de um agrupamento tRNA no braço curto do cromossomo 6 (6p21.2-p22.3) foi descrita pela primeira vez em 1996. O agrupamento t RNA no genoma humano compreende 157 genes.
5- Super-agrupamento Butirofilina (BTN): Localizado na sub-região classe II Clássica esses genes são membros de uma superfamília de imunoglobulina (IgSF). Um gene BTN (*BTN1A1*) é expresso exclusivamente e abundantemente no leite.
6- agrupamento de Receptor Vomeronasal (VNR): genes da família de receptores de feromônios, em humanos há apenas a presença de pseudogenes.
7- Super-agrupamento de Receptores Olfatórios: Este agrupamento contem 34 *loci* de receptores olfatórios sendo 14 potencialmente funcionais. Tem função na percepção de odores envolvidos no comportamento reprodutivo e predação (HORTON *et al.*, 2004).
8- Super-agrupamento Dedos de Zinco (*Zinc-finger*): Os 36 *loci* que fazem parte deste Super-agrupamento podem ser subdivididos em: genes cujos produtos contém domínio "*SCAN*" (13 *loci*), motivos tripartides (TRIM, 8 *loci*) que consiste em um domínio "rig-finger", "b-box" e um domínio "SPRY", ou outros domínios "*zinc-finger*" (15 *loci*).
9- agrupamento Fator de Necrose de Tumor: Contém genes para 3 citocinas (*TNF,LTA e LTB*). Todas envolvidas em vários caminhos inflamatórios.
10- agrupamento de antígenos linfocitários: Os genes *LY6* (*lymphocyte antigen 6*), codificam glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) ancorado em proteínas de superfície com suposta função imune. Este cluster está localizado na sub-região MHC classe III.
11- Agrupamento de choque térmico: Estes genes codificam proteínas de choque térmico e são regulados pelo stress celular e atuam como chaperona na

síntese, dobramento, agrupamento, transporte e degradação de proteínas. Também está localizado na sub-região classe III.

12-agrupamento HLA Classe II: Este agrupamento compreende os genes HLA classe II clássicos *(HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR* e pseudogenes) e os genes HLA classe II não-clássicos (*HLA-DM e HLA-DO*). Os genes HLA classe II clássicos são expressados na superfície celular como heterodímeros consistindo das cadeias α e β que apresentam antígenos para células T $CD4^{+}$. Os genes classe II não-clássicos não são expressados na superfície , mas formam complexos heterodiméricos envolvidos no transporte e mudanças de peptídeos em moléculas classe II clássicas. O genoma das não-clássicas também tem sido observado em humanos (HORTON *et al.*, 2004; ALFONSO & KARISSON., 2000; VAN DEN ELSEN *et al.* 2001).

2.4. HLA-G

2.4.1 HISTÓRICO DO HLA-G

O HLA-G foi descrito pela primeira vez por GERAGHTY *et al.* (1987), quando realizavam uma análise do DNA genômico da região do MHC humano. Esta analise revelou genes similares aos bem conhecidos genes do MHC classe I *HLA-A, HLA-B e HLA-C* (HUNT *et al.*, 2000). Inicialmente Geraghty descreveu e nomeou esta molécula de HLA-6.0 (por estar localizado no interior de um fragmento de restrição gerado por Hind III, com 6.0 kb). Somente em 1990 foi possível associar HLA-6.0 como sendo HLA-G (VAN DER VEN; PFEIFFER; SKRABLIN, 2000).

2.4.2 TECIDOS ONDE SE TEM DESCRITO A PRESENÇA DE HLA-G

Acreditava-se que HLA-G possuía uma distribuição tecidual limitada, apresentando expressão pronunciada nas células trofoblásticas da placenta durante o primeiro trimestre da gravidez (HVIID *et al.* 1997). Posteriormente foram

detectadas moléculas HLA-G em outros tecidos fetais (como timo, olhos, pulmão, coração e rim) e em adultos, como na região anterior do olho, pele, pulmão (nestes em taxas elevadas), rim, ovário, cólon, intestino (nestes em níveis reduzidos), timo (sugerindo que o HLA-G possa participar da “educação” das células T), além de monócitos, em inflamações musculares e cultura de mioblastos (CAROSELLA; DAUSSET; KIRSZENBAUM, 1996; CAROSELLA *et al.*, 1999; LILA *et al.*, 2002; WIENDL *et al.*, 2003)

A presença de HLA-G também foi observada em células tumorais e especula-se que a expressão de algumas das isoformas de HLA-G seja uma das estratégias para que as metástases escapem ilesas das células do sistema imune. (ROUAS-FREISS, 2005)

O gene HLA-G, também é estudado no contexto dos transplantes de tecidos alogênicos (aloenxerto). Segundo um estudo realizado por PIRRI *et al.* (2009) a presença de um alelo *HLA-G (HLA-G*010401)* poderia estar contribuindo como um fator de risco aumentando as chances de rejeição.

2.4.3 IMPORTÂNCIA DO HLA-G PARA GESTAÇÃO

Não são poucas as evidências que sugerem que a modulação da expressão das moléculas HLA-G poderia ser uma condição fundamental para uma gestação bem sucedida, o que estaria em parte, associada à expressão em níveis elevados da molécula HLA-G solúvel (sHLA-G) (VINGANO *et al.*, 2003). O nível de HLA-G solúvel parece modular o perfil materno de citocinas. Em casos onde os níveis de sHLA-G são baixos, há uma relação com o perfil Th1 de citocinas: IL2, TNF-α e lFN-γ (perfil inflamatório), enquanto que altos níveis de sHLA-G parecem estar associados ao perfil Th2 de citocinas: IL-4, IL-5 e IL10 (perfil inibidor de inflamação). As moléculas de sHLA-G também poderiam ter uma função na regulação da angiogênese placentária ou poderiam agir como imunossupressores durante a gestação (LE BOUTEILLER; LEGRAND-ABRAVANEL; SOLIER, 2003).

Também foi observado que, no tecido placentário, a expressão acentuada do HLA-G neste tecido é inversa à expressão das moléculas classe Ia (Clássicas)

e de classe II, podendo ser considerada quase insignificante a expressão dessas moléculas. Esta característica parece ser importante para o mecanismo de tolerância imunológica materno-fetal (LE BOUTEILLER; LEGRAND-ABRAVANDEL; SOLIER, 2003; VAN DER VEN *et al.*, 2000; GOBIN *et al.*, 1999).

Provavelmente as formas solúveis de HLA-G possuam uma ação, local ou sistêmica, de regulação da produção de citocinas por meio da interação com células $TCD4^{+}$ ou por alterações nos grupos de leucócitos presentes no útero (indução de apoptose em células $TCD8^{+}$) (LE BOUTEILLER *et al.*, 2003; HUNT *et al.*, 2000).

Segundo KWAK-KIM & GILMAN-SACHS (2008), a falta da expressão de moléculas MHC de classe I clássicas, pode tornar a villos do trofoblasto (região do trofoblasto em contato íntimo com a parede do útero) vulnerável ao processo de lise pelas células NK ($CD56^{dim}/16^{+}$).

As células *NK*, representam um subtipo de linfócitos e suas funções tem sido melhor compreendidas nos últimos anos, principalmente aquelas relacionadas com a interação na interface materno fetall. Estas células *NK* são encontradas em uma variedade de tecidos, dentre os quais a decídua, onde nos primeiros estágios da gestação a população de células predominante são aquelas com fenótipo CD3 – CD16 – CD56+ (KING; BURROWS; LOKE, 1996). Devido a este aumento de sua presença e seu contato direto com o trofoblasto, as células NK tem sido consideradas uma população celular crucial para a gestação (CLARK *et al.*, 1996).

O mecanismo pelo qual as células NK reconhecem as células alvo e discrimina quais são as células normais e quais devem se lisadas depende de um balanço de sinais transduzidos por receptores ativadores e inibidores (YOKOHAMA., 1993). Segundo VARLA-LEFTERIOTI *et al.* (2003), os receptores das células NK (NKRs) são divididos em três famílias principais:

a) Família dos receptores semelhantes à imunoglobulina das células exterminadoras naturais (KIR);

b) Família lectina tipo-C (CD94/NKGs);

c) Família de transcritos semelhantes a imunoglobulina.

Atualmente, um número significativo de receptores assim como dos seus ligantes, já foram identificados. Sabe-se que:

(1) as funções das células NK são inibidas pelo reconhecimento de moléculas Classe I do MHC, por receptores NK inibidores específicos, que possuem em sua estrutura os motivos ITIMs (Imunoreceptor com Motivo Inibidor baseado em Tirosina) (VARLA-LEFTERIOTI *et al.*, 2003).

(2) A natureza da ativação dos receptores iNK também ocorre pela ligação com moléculas MHC, por receptores que possuem motivos ITAMs (Imunoreceptor com Motivo Ativador baseado em Tirosina) (BOTTINO *et al.*, 2005).

(3) Múltiplas combinações de receptores *NK* são expressas em clones das células *NK*. O repertório dos receptores *NK* variam entre diferentes indivíduos e Células *NK* humanas. As células *NK* utilizam diferentes receptores de todas as famílias de receptores para o reconhecimento de diferentes moléculas classe I de Antígenos Leucocitários Humanos (HLA) (BOTTINO *et al.*, 2005).

(4) Toda células *NK* madura expressa um tipo de receptor inibidor dominante para seus próprios MHC classe I, o que poderia prevenir a auto-relatividade contra células normais (BOTTINO *et al.*, 2005) (Tabela 1).

A ação das células *NK* é regulada pela interação com citocinas e outros fatores. Apesar de serem componentes da resposta imune inata, as células *NK* também estão em constante interação com a resposta imune adaptativa. Possuem a capacidade de lisar células-alvo que estejam apresentando antígenos reconhecidos como não próprios ou que não possuam, em sua superfície, moléculas próprias. As moléculas HLA interagem com receptores inibidores de células *NK* (KIR), protegendo as células trofoblásticas (na interface materno-fetal) contra a lise mediada por células *NK* que ocorreria devido a quase ausência da expressão de moléculas MHC de classe I nestas células (EMMER *et al.*, 1999; PAZMANY *et al.*, 1999; ROUSSEAU *et al.*, 2000).

Segundo PARHAM (2004), na decídua uterina as células NK constituem 50-90% dos leucócitos presentes neste local, enquanto que as células B e T são tipos celulares raros. As células NK presentes na decídua são diferentes das NK encontradas no sangue periférico. As NK uterinas são especializadas na secreção

de citocinas. As artérias da decídua apresentam-se em espiral, e devem ser remodeladas para receber o feto. Para PARHAM (2004), ocorre a interação entre moléculas apresentadoras de antígenos (MHC) classe I não clássicas (HLA-G e HLA-E) e clássicas (HLA-C). Por meio desta interação as células *NK* regulariam a expressão de citocinas, responsáveis pela mudança anatômica das artérias da decídua.

Em um estudo realizado por VARLA-LEFTERIOTI *et al.* (2003), com 26 casais com histórico de abortamento recorrente (grupo paciente) e 26 casais sem histórico de abortamento recorrente (grupo controle), analisaram e compararam o repertório de moléculas *KIR* presente em ambos os grupos. Foi observado que nos casais do grupo paciente, as mulheres possuíam um repertório limitado de genes *KIR* inibidores quando comparado com as mulheres do grupo controle. Isto poderia aumentar o risco de perda fetal porque as moléculas HLA classe I do trofoblasto são reconhecidas pelas células *NK* maternas, faltando os receptores KIR inibidores apropriados.

TABELA 1. RECEPTORES DAS CÉLULAS NK E SEUS LIGANTES.

NKR	FUNÇÃO	Ligante MHC
KIR		
KIR2DL1	(inb)	HLA-C moléculas Asn77, Lys80 (Cw2,4,6,15)
KIR2DL2	(inb)	HLA-C moléculas Asn77, Lys80 (Cw1,3,7,8)
KIR2DL3	(inb)	HLA-C moléculas Asn77, Lys80 (Cw1,3,7,8)
KIR2DL4	***(?)***	***HLA-G***
KIR2DS1	(atv)	HLA-Cw4
KIR2DS2	(atv)	HLA-C (?)
KIR2DS3	(atv)	?
KIR2DS4	(atv)	HLA-C (?)
KIR2DS5	(atv)	?
KIR3DL1	(inb)	HLA-B grupo sorológico Bw4
KIR3DL2	(inb?)	HLA-A3 (?)
KIR2DS1	(?)	HLA-B (?)
NKG (CD94/NKG)		
CD94/NKG2A	(inb)	HLA-E*, MICA
CD94/NKG2B	(inb)	HLA-E*
CD94/NKG2C	(?)	HLA-E*
CD94/NKG2D	(atv)	?
CD94/NKG2E	(?)	HLA-E*, MICA
CD94/NKG2F	(?)	?
ILT (transcritos semelhantes a Ig)		
ILT1	(atv)	
ILT2/LIR1	***(inb)***	***HLA-G (?), C***
ILT3	(inb)	
ILT4/LIR2	***(inb)***	***HLA-I (inclusive G)***
ILT5	(inb)	

(inb) função inibitória; (atv) função ativadora; (?) função desconhecida; ? expressão não confirmada; *HLA-I* :HLA de classe I. (Modificado de VARLA-LEFTERIOTI, 2003)

Desenvolvendo experimentos com tecidos fetais e maternos frescos, obtidos durante o primeiro trimestre de gestação, ROUAS-FREISS *et al.*, (1999) demonstraram o provável papel das moléculas HLA-G na proteção do feto contra a atividade lítica das células NK maternas do útero. Para execução do experimento, analisaram seis combinações semi-alogênicas (células *NK* uterinas maternas e suas próprias contra-partes trofoblásticas) e 20 combinações alogênicas (células NK uterinas maternas e trofoblastos de diferentes origens maternas). Em todas as combinações, foi observado um efeito protetor pronunciado da molécula HLA-G. Observou-se também, que o tratamento dos

trofoblastos com anticorpos monoclonais (W6/32), os quais se ligam e inativam as moléculas de HLA-C e HLA-G, removem o efeito protetor de lise por células NK.

2.4.4 ESTRUTURA DO GENE HLA-G

O conjunto de éxons e introns do gene *HLA-G* apresenta 4396 pb, oito éxons, sete íntrons e uma região 3' não traduzida, semelhante os genes do grupo classe I clássicos. O éxon 1 apresenta 73 pb, codificando o peptídeo sinal; éxon 2, com 270 pb, éxon 3, com 276 pb e o éxon 4, com 276 pb, codificam os domínios α1, α2 e α3 respectivamente; o éxon 5, com 114 pb, codifica a região transmembrana; os éxons 6,7,8, totalizam 105 pb, codificam o domínio citoplasmático da molécula HLA-G. A cauda citoplasmática da molécula HLA-G apresenta 6 aminoácidos enquanto a cauda das moléculas de classe Ia apresentam aproximadamente 30 aminoácidos. Isso ocorre devido a presença de um códon de termino de leitura (UGA) no éxon 6 (figura 2). (CAROSELLA; DAUSSET ; KIRSZZENBAUM, 1996; O'CALLAGHAN & BELL, 1998; CAROSELLA *et al.*, 1999).

Segundo ROUSSEAU *et al.*, (2004), a presença de uma deleção (14pb) na região 3´ UTR, a qual faz parte do exon 8 do gene HLA-G, poderia estar influenciando a estabilidade do RNAm de *HLA-G*. Segundo ROUSSEAU *et al.*, (2004), na população euro-descendente a deleção esta presente em aproximadamente 58% dos indivíduos enquanto que, a seqüência de 14 pares de base, é encontrada em algo próximo de 42% desta população. Este polimorfismo poderia ter conseqüências funcionais, estando associado a baixos níveis de transcrito de *HLA-G*. ROUSSEAU *et al.* (2004) observaram que os alelos de *HLA-G* que apresentavam a seqüência de 14pb (exon 8) sofriam recomposição alternativa (splicing) que removia 92pb da região 3´UTR, o que tornava a molécula mais estável e, portanto, mais resistente à degradação. Aparentemente, a seqüência de 14pb seria reconhecida pelo mecanismo de recomposição como um ponto de clivagem. Outra hipótese para explicar sua função, afirma que a seqüência de 14pb seria um elemento de controle acentuador da recomposição

(*splicing*), no qual a ligação de um transativador produziria um padrão diferenciado de processamento. Portanto, patologias como o abortamento recorrente espontâneo poderiam estar associadas à deleção de 14pb na região 3´UTR do exon 8 presente em alguns alelos.

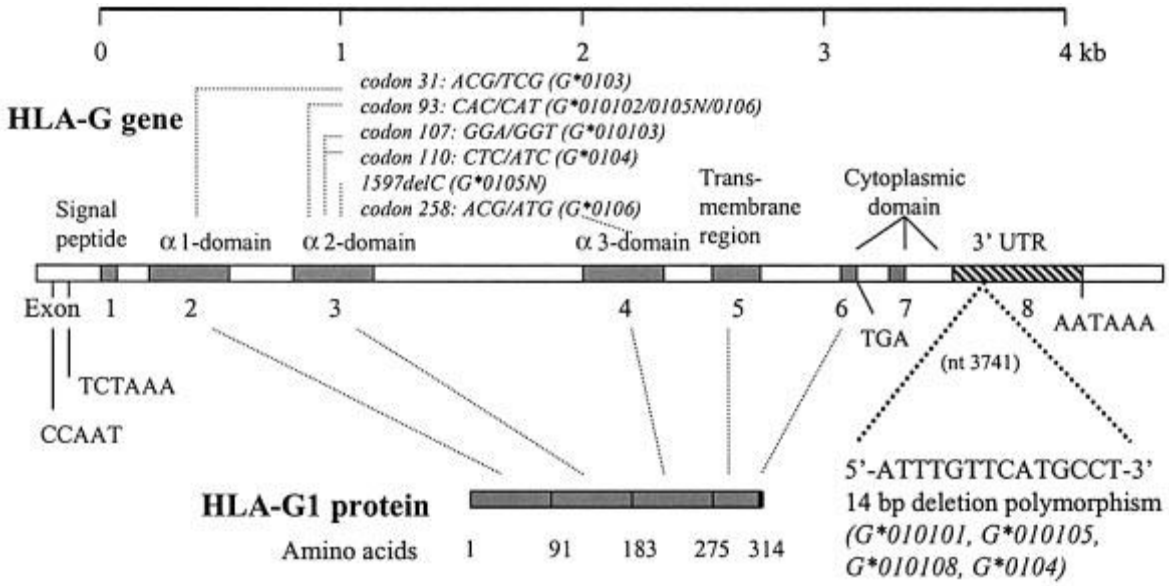


Figure 2. Organização do gene HLA-G . Éxons são identificados pelos retângulos cinza e os íntrons pelos retângulos brancos. Alguns polimorfismos nestes sítios também são mostrados. (Modificado de HYLENIUS *et al.*, 2004)

2.4.5 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE HLA-G

O controle da transcrição do HLA-G ocorre via elementos reguladores de ação cis. Intensificador A, ISRE (Elemento de Resposta ao Interferon) e o módulo SXY. O intensificador A, o ISRE e o módulo SXY localizam-se na região promotora do gene e formam um módulo de indução com sítios ligantes para proteinas reguladoras ou fatores transcricionais, membros das famílias NF-kB (fator transcricional das rotas de transativação constitutiva induzida por citocinas).p50, p65 e c-Rel, IRF-1 e IRF2, ISF1 e ISF2, e Sp1 (reguladores e fatores de transcrição) (GOBIN & VAN DEN ELSEN, 2000; GOBIN *et al.* 2002).

O módulo SXY é composto por seqüências S, X (compreendendo os meio-sítios X1 e X2) e Y ligadas cooperativamente por complexos de multiproteínas (RFX, CREB/ATF e NFY). Em HLA-G, este módulo SXY possui seqüências S e X1 homólogas aos de classe I, mas seqüências Y e X2 divergentes. Como este segundo bloco é muito importante para formação ordenada do complexo no módulo SXY e para a transativação induzida por CIITA (Transativador de Classe II), o HLA-G não é induzido por CIITA nem RFX5 (GOBIN & VAN DEN ELSEN, 2000; GOBIN *et al.* 2002).

Em HLA-G, os dois sítios kB do intensificador A (kB1 e kB2) apresentam afinidade somente para a subunidade p50 do NF-kB (fator transcricional kB), Mas não possui propriedades de transativação visto que a intensidade de ligação para outras partes de NF-kB apresenta níveis não significativos. Além disso, o sítio kB2 do HLA-G também se liga ao Sp1 (fator transcricional mediador das rotas de transativação constitutivas e induzidas por citocinas). A região de supressão do intensificador A, o qual contém o ISRE em promotores de MHC de Classe I, alguns trabalhos sugerem que ele esteja parcialmente ausente em HLA-G (figura 2). Além disso, nesta porção 3'do sitio kB1 e nas seqüências supressoras, não há afinidade de ligação para as proteínas de fatores transcricionais da família IRF (Fator Regulador de Interferon), mas contém um outro sítio de ligação com Sp1. Contudo, este elemento não pode mediar a expressão de HLA-G induzida por IFN-γ. Nenhum outro sítio de ligação para o IRF ou STAT1 (Tradutor de Sinal e Ativador de Transcrição) foi identificado nesta região promotora de 220pb, o que demonstra a não-responsividade do HLA-G ao IFN-γ (LEFEBVRE *et al.* 2000; GOBIN & VAN DEN ELSEN, 2000).

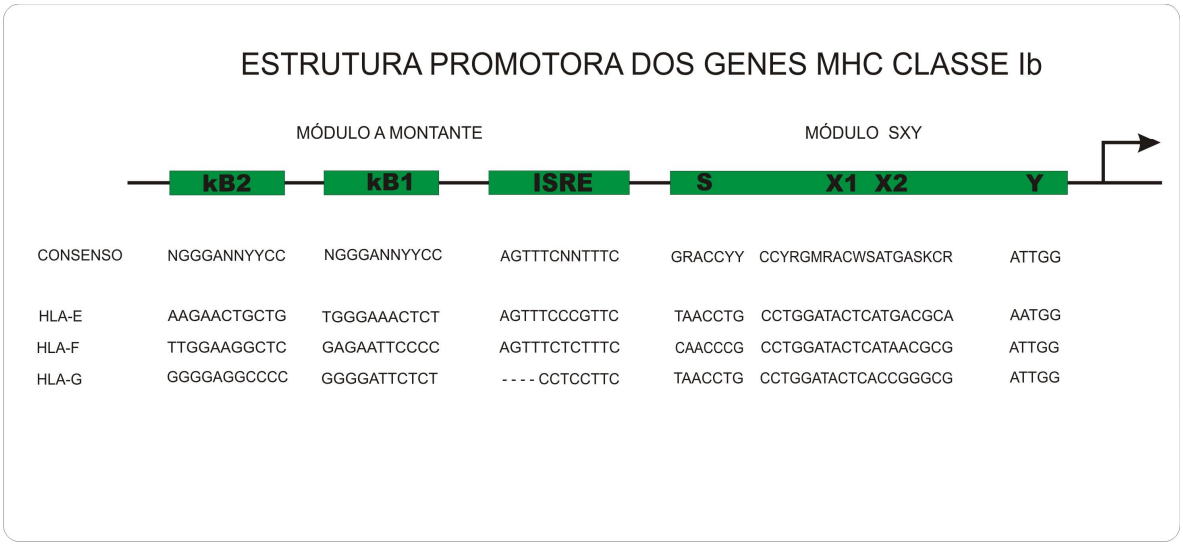


Figura 3. Estrutura do promotor dos genes HLA-E, HLA-F e HLA-G. Seqüência nucleotidica conservada de elementos regulatórios a upsteam e o modulo SXY dos promotores de HLA-E, HLA-F e HLA-G. Seqüências consensos dos sítios kB e ISRE, do X1X2 e Y boxes são destacadas para comparação (modificado de: GOBIN *et al.* 2000)

O sitio ISRE localizado na região promotora de HLA-G mostrou-se capaz de reagir ao estimulo de IFN-β (LEFEBVRE *et al.* 2000)

Também foi revelada a presença de três potenciais sítios CRE/TRE (designado, CRE $_{-1380}$, CRE $_{-930}$, CRE$_{-770}$) no promotor de HLA-G. O que está localizado a montante das três seqüências (CRE $_{-1380}$) está flanqueado por um segundo sitio potencial CRE/TRE O sítio mais a montante CRE/TRE (CRE $_{-1380}$) mostrou afinidade de ligação por complexos contendo CREB1, ATF1 e c-Jun. O segundo sítio CRE/TRE (CRE $_{-930}$) mostrou ligação por um complexo que continha predominantemente CREB1, embora o terceiro sítio CRE/TRE (CRE $_{-770}$) mostrou ligação de CREB1 e ATF1. Ao testar a atividade dos três sítios contendo mutações induzidas, a atividade de CREB foi nula para realçar a transativação de HLA-G. Nos ensaios com mutações individuais, a construção (o gene silenciado) contendo mutação no sitio (CRE $_{-1380}$), foi a que apresentou maior redução de atividade, as construções nos outros dois sítios não apresentaram uma redução de atividade significativa. Os três sitos CRE, ISRE$_{-734}$ e intensificador A possivelmente representou um importante caminho regulador agindo ao longo de 1438-bp da região promotora do HLA-G (figura 3) (GOBIN *et al.* 2002).

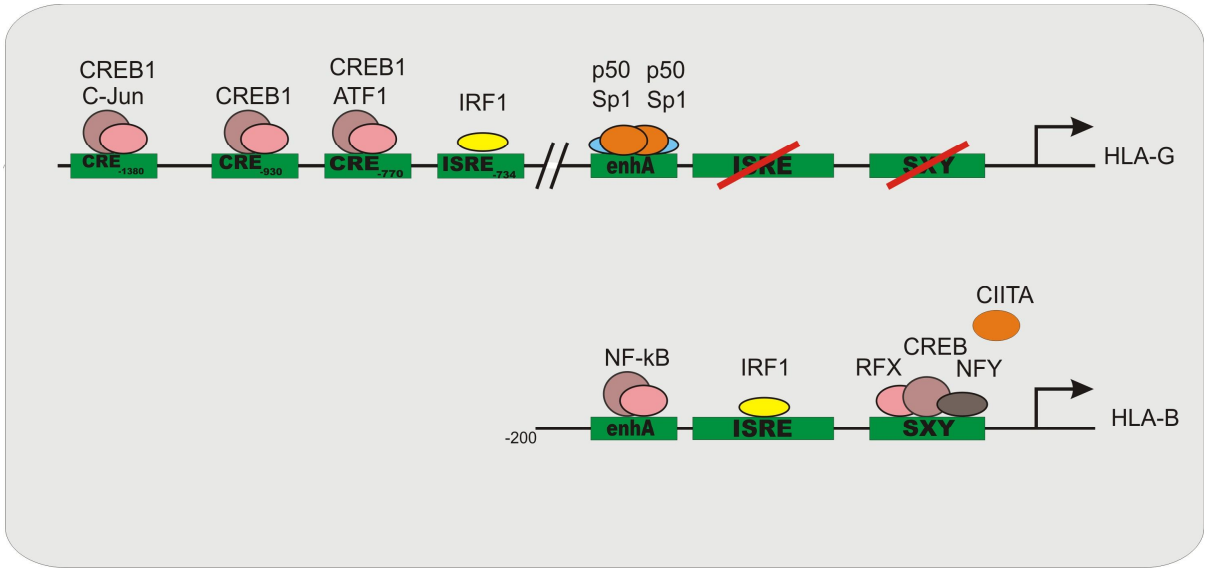


Figura 4. **Representação esquemática do promotor de *HLA-G*.** Três sitos funcionais CRE/TER localizados na região a montante do promotor de HLA-G são sitos de ligação para CREB1, ATF1, e c-Jun. Embora o ISRE em HLA-G seja capaz de ligar IRF1, este sito não tem um papel claro na transativação de HLA-G. Os elementos reguladores clássicos como o acentuador A (enhA), ISRE, e módulo SXY, derivados destes observados nos promotores de genes MHC Clássicos Classe I (e.g. HLA-B). Estes resultam em uma ligação mais restrita de NF-kB p50 e Sp1 na região do acentuador A. (modificado de: GOBIN *et al.* 2002)

Em uma publicação mais recente, OBER *et al.* 2003, analisaram alguns polimorfismos na região reguladora e promotora de HLA-G em uma comunidade de Hutterites que são um grupo anabatista e se concentram na região Sul de Dakota, Estados Unidos, deste os anos de 1800. Foi avaliada uma seqüência de 1.752 pb que foi amplificado por PCR . O fragmento tem seu inicio na base -1477 (5´) até a base +208 (3´) que abrange toda a região reguladora do gene HLA-G, e também região promotora (figura 4).

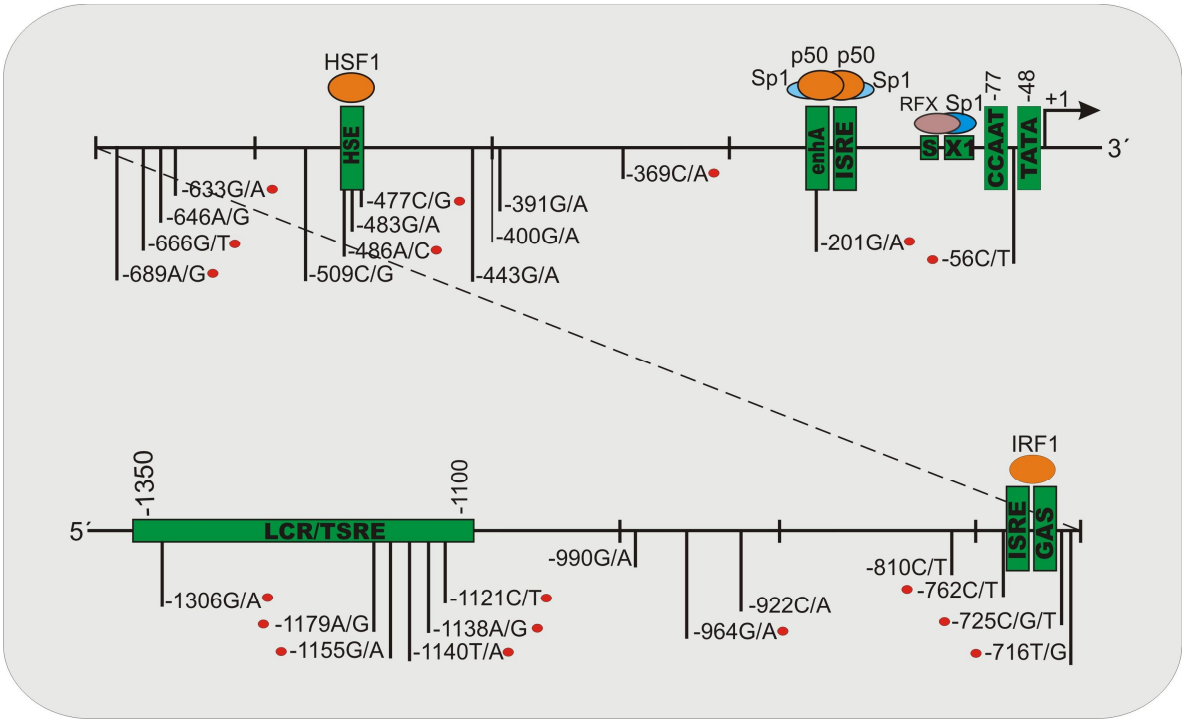


Figure 5. Região reguladora 5´ a montante de HLA-G (modificado de from Solier *et al.* 2001). +1 designado como sitio de inicio de transcrição. São mostrados elementos de ação reguladora cis: TATA p TATA box; CCAAT p CAAT box; S/X1p *Pan* HLA elementos regulatórios; ISRE elemento regulador inteferon especifico; EnhA para acentuador A; HSE para proteína de choque térmico; GAS p sito gama ativado (interferon); LCR para locus região controle(também conhecido como "TSRE" [elemento regulador tecido especifico]). O LCR (or TSRE) contém elementos reguladores que direcionam a expressão específica do trofoblasto (Schmidt and Orr 1995). (modificado de: OBER *et al.* 2003)

Em células de carcinoma (JAR) tratadas com 5-aza-2´-deoxycytidine, para induzir a demetilação de algumas regiões dos éxons de HLA-G, foi observada a ativação transcricional. Isto sugere que a repressão de HLA-G em muitas células pode ser epigenética. Estes genes seriam demetilados somente durante alguns processos inflamatórios ou em células tumorais (MOREAU *et al.* 2003). Este estudo corrobora com a hipótese de que o gene HLA-G de origem paterna poderia não estar participando do processo de interação com a interface materno-fetal talvez por regulação epigenética (SASAKI *et al.* 1999; CHRISTHIANSEN *et al.* 1990) .

2.4.6 ESTRUTURA DA PROTEÍNA HLA-G

A estrutura da molécula de HLA-G é bastante similar à molécula HLA-A2 nas regiões altamente conservadas, da qual acredita-se serem essenciais para interação com as células T. Igualmente conservada, estão as posições relevantes para interação com a β2-microglobulina, necessária para que a conformação estrutural das moléculas de HLA de classe I sejam funcionais, estão conservadas na seqüência do alelo "referencia" do HLA-G: HLA-G *010101(figura 5) (VAN DER VEN; PFEIFFER; SKRABLIN, 2000).

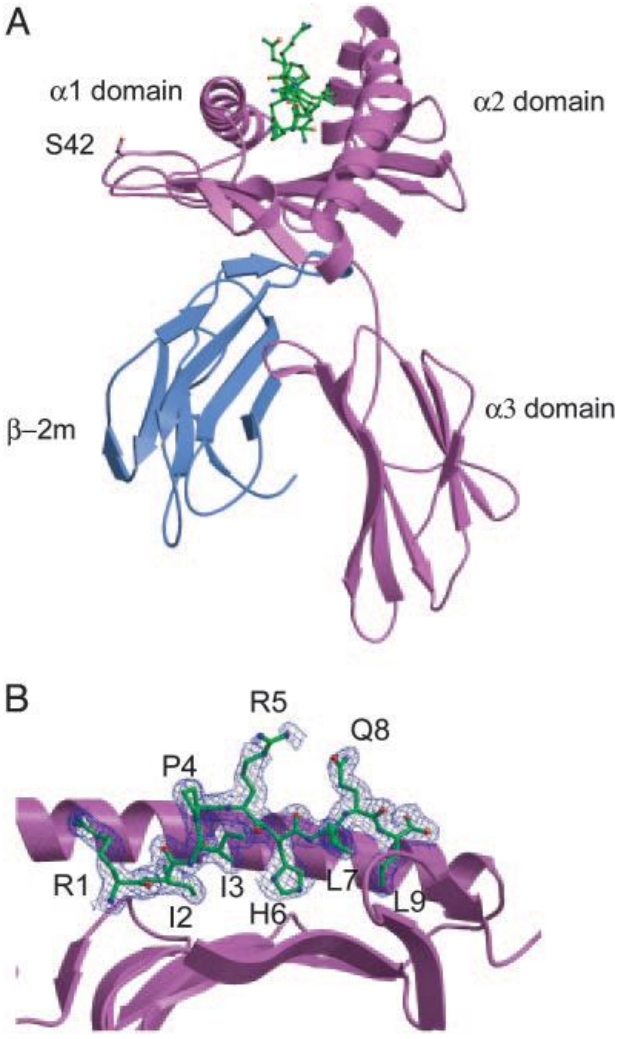


FIGURA 6. Visão geral da estrutura do HLA-G. (A) a cadeia pesada está em púrpura, a β2-m em azul e o peptídeo em verde. É mostrada também a posição de uma mutação em Cys-42 3 Ser. (B) conformação da ligação com peptídeo. O peptídeo está sendo mostrado no formato de bola e arame (modificado de CLEMENTS *et al.*, 2005).

Nos genes de HLA classe I, os éxons 2 e 3 transcrevem para os domínios α1 e α2 formando a região de ligação com o peptídeo antigênico, para que este seja apresentado aos receptores das células T. HLA-G difere do HLA-A2 em 12 das 19 posições de aminoácidos relevantes para ligação com o antígeno. Nas regiões onde as variações de aminoácidos são toleráveis, a molécula de HLA-G exibe um alto grau de diversidade. Esta diversidade está de acordo com o fato de haver um repertório deferente de peptídeos apresentadores para HLA-G e HLA-A2 (VAN DER VEN; PFEIFFER; SKRABLIN, 2000).

A molécula de HLA-G teoricamente é capaz de apresentar um número expressivo de peptídeos estranhos que podem capacitar células T a proteger o trofoblasto (e outros tecidos) de infecções virais ou transformações malignas (VAN DER VEN; PFEIFFER; SKRABLIN, 2000).

A estrutura do peptídeo ligante de HLA-G segue os mesmos princípios daqueles que se ligam às moléculas HLA clássicas, ainda que apresente suas próprias características. Estes peptídeos geralmente consistem de 9 aminoácidos, com resíduos de ancoragem na posição 2 (isoleucina ou leucina), na posição 3 (prolina) e na posição carboxi-terminal 9 (leucina). Nas posições de não-ancoragem, algumas características são observadas, tal como, resíduos positivamente carregados na posição 1 e resíduos hidrofóbicos na posição 7. Os resíduos 2 e 3 mostraram ser suficientes para a ligação (DIEHL *et al.*, 1996; PAUL *et al.*, 2000).

2.4.7 HLA-G E SUAS ISOFORMAS

A recomposição alternativa do transcrito de HLA-G resulta em pelo menos seis mRNA que codificam os peptídeos: HLA-G1, -G2, -G3 e –G4 ligados a membrana, e HLA-G5 e –G6 em forma solúveis (OBER *et al.*, 2003). A expressão de uma 3^{a} isoforma solúvel (HLA-G7) também tem sido descrita (YAO; BARLOW; SARGGENT, 2005).

HLA-G1 é uma macromolécula que contém os domínios extracelulares α1 e α2 e α3 ligados ao domínio transmembrana codificado pelo éxon 5 e uma cauda

citoplasmática curta devido a presença de um códon de término de leitura no éxon 6. Por recomposição alternativa ocorre a exclusão do éxon 3 resultando na isoforma HLA-G2 que retém os domínio α1 e α3 unido a região transmembrana. Também pode formar homodímeros semelhantes as moléculas HLA classe II (PAUL *et al.*, 2000; OBER *et al.*, 2003). A exclusão dos éxons 3 e 4 gera a isoforma HLA-G3 que retém somente o domínio α1 unido a região transmembrana. E a exclusão do éxon 4 gera a isoforma HLA-G4 que retém os domínios α1 e α2 unidos a região transmembrana (PAUL *et al.*, 2000; OBER *et al.*, 2003).

Ambos HLA-G1 e HLA-G2 também são expressados como isoformas solúveis. A isoforma solúvel de HLA-G1 é chamada de sHLA-G1 ou HLA-G5**,** e a isoforma solúvel de HLA-G2 é denominada como sHLA-G2 ou HLA-G6. As isoformas solúveis ocorrem devido a inclusão da seqüência do íntron 4 no mRNA, o qual contém um códon de término de leitura (UAA) anterior a seqüência para transcrição do domínio transmembrana. A isoforma solúvel HLA-G5 contém os domínios α1 e α2 e α3 mais 21 aminoácidos provenientes do íntron 4. A isoforma solúvel HLA-G6 contém os domínios α1 e α2 mais os 21 aminoácidos do íntron 4. Também foi descrita uma isoforma de HLA-G6 que perde o domínio α2 da proteína, veja figura 6 (PAUL *et al.*, 2000; ROUSSEV & COULAM, 2007).

A forma solúvel HLA-G7 é uma variante que retém as seqüências do íntron 2, que também possui um códon de término de leitura UAA, produzindo uma proteína com 117 aminoácidos que contém apenas o domínio α1 ligado a 2 aminoácidos no terminal carboxila provenientes do íntron 2 (PAUL *et al.*, 2000; ROUSSEV & COULAM, 2007).

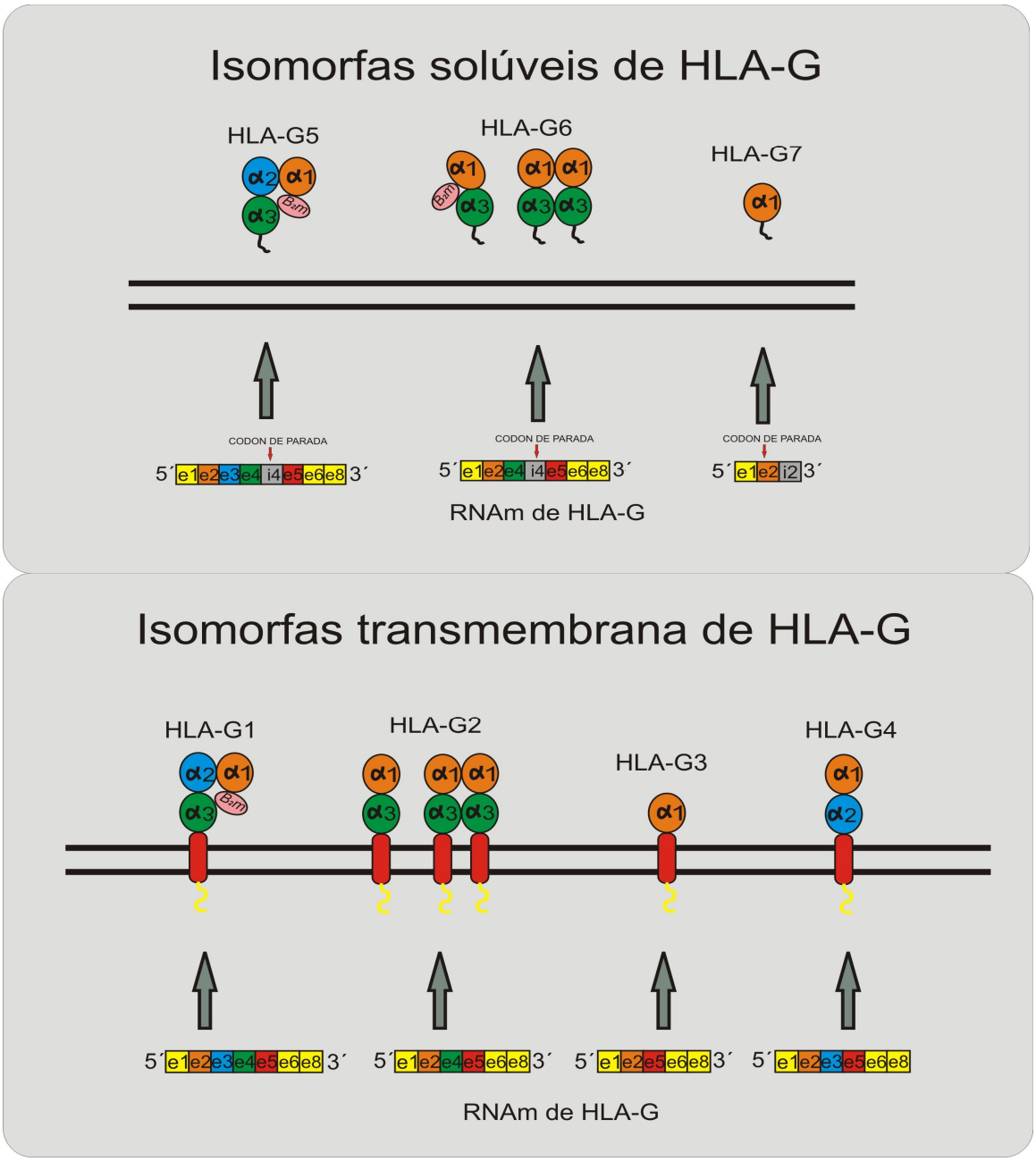


FIGURA 7. **a**. Isoformas HLA-G [três mensageiros codificam isoformas de membrana (HLA-G1, -G2, -G3) e dois codificam isoformas solúveis (HLA-G5 e –G6 também chamados sG1 e sG2 respectivamente). HLA-G1 e –G5 associados com a cadeia leve. HLA-G4 e –G7 por serem pouco definidos não estão incluídos]. **b** O gene HLA é composto de 8 exons arranjados na mesma seqüência como os demais genes HLA de classel. O gene sofre recomposição alternativa para originar 7 transcritos. Em dois desses, uma seqüência de parada no intron 4 resulta em isoformas solúveis. Uma inserção/deleção de 14pb está presente no exon 8 na 3´UTR. Todos a2, a3 domínios extracelular (modificado de Hviid, et al. 2006)

2.4.8 EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS TRANSCRITOS DE HLA-G (isoformas) NA GESTAÇÃO

Em uma revisão publicada por RIZZO *et al.*, (2007), afirma-se que foi demonstrada a ativação do genoma embrionário humano entre o quarto e oitavo ciclo de divisão celular, aproximadamente 70 horas após a fertilização. Por isso o mRNA materno parece ser fundamental na produção de moléculas de sHLA-G em cultura de embriões. No processo de fertilização *in vitro* (IVF)os ovócitos são geralmente selecionados com base em parâmetros morfológicos. O fluido folicular (FF) é um microambiente específico para maturação do ovócito, e foi proposto que haja uma relação entre os componentes específicos do fluido folicular e seu efeito na fertilização *in vitro*. Em analises realizadas neste fluido foram encontradas altas concentrações de sHLA-G (65,1 $\pm$ 70,6 ng/ml) com um valor médio maior que o encontrado em amostras de plasma (38,6 $\pm$ 5.0 ng/ml). Ao analisar 50 amostras de fluido folicular, foram detectada moléculas de sHLA-G (HLA-G5) e relação significante entre sua presença no fluido folicular e a produção de sHLA-G pelos embriões.

Utilizando a técnica de análise por RT-PCR, YAO; BARLOW &SARGENT., (2005) analisaram as amostras de 20 embriões humanos (processo de IVF). As isoformas de mRNA de HLA-G foram analisadas nos seguintes estágios do desenvolvimento embrionário: 2 células, 4 células, 8 células, 16 células, mórula e blastocisto. De uma forma geral a expressão de mRNA foi aumentando com os estágios embrionários. Em todos os estágios as isoformas predominantes foram HLA-G3 E HLA-G4. As isoformas ligadas à membrana HLA-G1 E HLA-G2 e as isoformas solúveis HLA-G5 E HLA-G6, foram as que apresentaram maior variação nestes estágios do desenvolvimento embrionário, com a presença de mRNA de HLA-G1 em 80% dos blastocistos analisados, enquanto que a isoforma solúvel HLA-G5 esteve presente em apenas 20% das amostras e, a também solúvel HLA-G6, em 32%. Observando o gráfico (figura 6) é possível comparar a expressão dos mRNA das isoformas de HLA-G em cada um destes estágios e as taxas de expressão.

Utilizando as técnicas de Elisa e citometria de fluxo, ALEGRE *et al.*, (2007), obtiveram resultados que mostram um aumento na concentração de HLA-G durante todos os estágios de gestação. As moléculas solúveis de HLA-G são as mais expressadas e provavelmente têm papel importante na angiogênese e na proteção do feto. Há uma notável variabilidade intraindividual nos níveis sHLA-G ao longo dos meses de gestação.

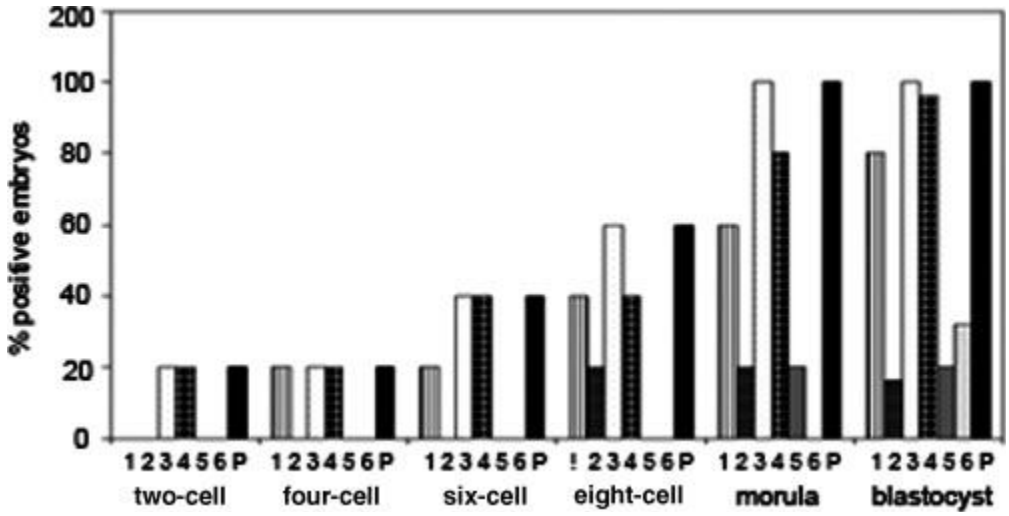


FIGURA 8. Sumario da expressão da isoforma de mRNA de HLA-G na preimplantação de embriões humanos.1, HLA-G1; 2, HLA-G2; 3, HLA-G3; 4, HLAG4; 5, HLA-G5; 6, HLA-G6; and P, Pan HLA-G. (modificado de: YAO, 2005)

As isoformas solúveis de HLA-G também são observadas na membrana coriônica (extravillus) de células do citotrofobrasto. Embora a isoforma HLA-G5 seja expressa essencialmente em todas as células do citotrofoblasto, na região do ponto de origem trofoblastica para a villus e invadindo a decídua, adicionalmente é expresso HLA-G1 e HLA-G2/G6. Após a gestação foi observado o amniocórion com HLA-G5 abundantemente expressado na membrana do córion, enquanto que HLA-G1, HLA-2 e –G6 são detectados essencialmente nas células do citotrofoblasto diretamente adjacente a decídua (HUNT *et al.*, 2007).

Nas células do citotrofoblasto da villus, tem-se investigado a possibilidade de que a isoforma HLA-G5 seja produzida sem a presença de β2-microglobulina, uma situação que é encontrada quando há carência ou ausência de β2-microglobulina. A analise e observação das isoformas solúveis de HLA-G no sinciciotrofoblasto, tem sido difícil pelas técnicas e estratégias atuais (HUNT *et al.*, 2007).

No estudo dirigido por EIDUKAITE & TAMOSIUNAS (2008), foram detectadas diferenças significantes na concentração de HLA-G solúveis no fluido peritoneal de mulheres com endometriose comparado com aquelas que não tinha registro de endometriose.

2.4.9 POLIMORFISMOS NA REGIÃO REGULADORA, PROMOTORA E ÉXON 4 DO HLA-G

No estudo realizado por OBER *et al.*, (2003) em uma comunidade de Hutterites no sul de Dakota, EUA, foram identificados 13 polimorfismos na região promotora do gene *HLA-G*, que somados aos 5 polimorfismos já descritos na literatura cientifica totalizam 18 polimorfismos descritos até então.

Os primeiros 5 SNPs (alterações de uma única base) descritos estão localizados nas posições: -201A>G, -964 A>G, -1140 T>A, -1179 G>A e -1306 A>G. Os demais polimorfismos estão nas posições: -56 C>T, -369 A>C, -477 G>C, -486 C>A, -633 A>G, -666 T>G, -689 G>A, -716 G>T, -725 C>G>T, -762 T>C, -1121 C>T, -1138 A>G e -1155 G>A. Destes 18 SNP's, 13 estão dentro ou próximos de sítios de ligação para fatores de transcrição ou outros elementos regulatórios.

Alguns dos SNPs descritos encontram-se em completo desequilíbrio de ligação (LD) com outros sítios; por exemplo o SNP -964 A>G com o SNP -1306 A>G.

O alelo -666 T, encontra-se em um potencial sítio de ligação para fatores de transcrição GATA2>GATA3 (figura 5). As freqüências dos alelos são mostradas na tabela 2. Cinco variantes no promotor, todas com freqüência inferior a 0,20 foram encontradas exclusivamente em um alelo *HLA-G* único: Os alelos -56 T e -1138 G

ocorrem somente em *G*01031*, o alelo -725 G e o alelo -1121 T acorrem somente em *G*01011*, e o alelo -1155 A ocorre somente com *G*01041*. As outras 13 variantes foram associadas com mais de um alelo *HLA-G* (OBER *et al.*, 2003).

Em um estudo mais recente foi descrita a presença de 9 SNPs aumentando para 27 o numero de SNPs presentes nesta região. As novas regiões descritas são: -990G>A, -922C>A, -810C>T, -646A>G, -509C>G, -483G>A, -443G>A, -400G>A e -391G>A (OBER *et al.*, 2006).

TABELA 2. ALELOS MENOS FREQÜENTES (*MINOR ALLELES*) PARA OS 18 SÍTIOS POLIMÓRFICOS NA REGIÃO REGULATÓRIA 5' DE HLA-G

Posição[a]	Polimorfismo	Alelos menos frequentes	Freqüência
-1306	G/A	A	0,38
-1179	A/G	G	0,41
-1155	G/A	A	0,13
-1140	A/T	T	0,25
-1138	A/G	G	0,011
-1121	C/T	T	0,035
-964	G/A	A	0,38
-762	C/T	T	0,36
-725	C/G	G	0,16
-716	T/G	G	0,36
-689	G/T	T	0,36
-666	G/T	T	0,36
-633	G/A	A	0,36
-486	A/C	C	0,36
-477	G/C	C	0,35
-369	C/A	A	0,35
-201	G/A	A	0,38
-57	C/T	T	0,036

[a] Posição nucleotidica relativa ao sitio transcricional inicial (Inr+1)

Nos modelos multivariáveis, onde os fatores, idade materna, endocruzamento e compatibilidade HLA-B são incluídos na análise juntamente com a presença do alelo -725 G (Tabela 3), esse foi o único polimorfismo de HLA-

G significantemente associado com a perda fetal (Odds Ratio [OR] 2,72; 95%; CI 1,08-6,87; P= .034; (OBER *et al.*, 2003).

A transversão de uma base C para uma base G na posição -725 cria um dinucleotideo CpG para os nucleotídeos -726 e -725. Foi questionado se a base C na posição -726 estaria metilada quando associada com uma G no nucleotídeo -725. Esse estado de metilação poderia influenciar na ligação do fator transcricional denominado Fator 1 de Resposta ao Interferon (IRF-1), que se ligaria em um sítio vizinho próximo ao elemento cis regulador interferon especifico. Após alguns testes, ficou evidente que o nucleotídeo -726C estava metilado na presença do alelo -725G na maioria das células. Dessa forma, em casais Hutterites ficou também evidente que o alelo C^M -726 está associado com abortamento espontâneo (OBER *et al.*, 2003).

Em um estudo posterior, OBER *et al.*, (2006), clonaram sequências codificadoras e a região reguladora/promotora de *HLA-G* de casais Hutterites que apresentavam os SNPs -725G, -725C e -725T. Insertos dessa região foram transferidos para as linhagens celulares JEG-3, visando análise de expressão de *HLA-G*. Observou-se que, contrariando a hipótese de que o SNP -725G silenciaria a expressão do gene devido uma metilação da base nucleotídica -726 C adjacente, a taxa de expressão foi superior àquela observada nos alelos contendo que apresentavam os SNPs -725C e -725T.

OBER e colaboradores propõem a hipótese de que taxas elevadas ou baixas na expressão do gene *HLA-G,* podem ser prejudiciais para o desenvolvimento da gestação, mas que ainda é necessário esclarecer como estaria ocorrendo este mecanismo de interação entre o feto e a gestante (mais precisamente entre o trofoblasto e a decídua).

TABELA 3. ANÁLISE DE PERDA FETAL EM HUTTERITES

Variável	P	OR	IC 95%
idade da mãe	0,061	1,07	0,99-1,15
endocruzamento materno	0,751	0,96	0,80-1,18
matching HLA-B	0,056	1,85	0,98-3,34
-725G em um dos parceiros	0,116	1,71	0,88-3,34
-725G em ambos os parceiros	0,034	2,72	1,08-6,87

SIPAK-SZMIGIEL *et al.* (2007), realizaram um estudo semelhante ao de OBER *et al.*, (2003) em um grupo de 58 casais com histórico de três ou mais abortos recorrentes espontâneos no primeiro trimestre de gestação e 58 casais férteis sem histórico de abortamento espontâneo. Foram analisadas as regiões do exon 2 e 4, assim como a região para o polimorfismo -725 C>G em associação com a deleção de 14pb na região 3´UTR (exon 8). Não foi encontrada nenhuma relação da variante -725 C>G + 14pb/del com o aumento do risco de abortos nos casais por eles estudados. Este estudo foi realizado em uma população polonesa.

O AER acarreta uma grande frustração e estresse entre os casais que esperam constituir um núcleo familiar através da gestação de um filho. Cabe à comunidade medica e científica atender a essa preocupação, investigar e oferecer respostas mais atualizadas e que possam solucionar essa condição clínica. Nesse contexto, são muitas as evidências da influência de *HLA-G* no processo gestacional. Conhecer a região promotora deste gene, visando elucidar os possíveis mecanismos genéticos que modulam a resposta imune materna contra o embrião, poderá resultar em alternativas de tratamento que possam melhorar a qualidade de vida trazendo maior conforto para estes casais.

3. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral caracterizar a região promotora do gene *HLA-G* e a região de regulação pos-transcripcional mediada pela presença/ausência de 14 pb localizada no éxon 8 precissamente no nucleotídeo 3741, para buscar evidencias de que alterações nestas regiões possam influenciar o abortamento recorrente.

Objetivos específicos são:

1. Estimar as freqüências alélicas, genotípicas, haplotípicas e de portadores dos SNPs compreendidos entre – 1446 e + 77 do gene *HLA-G*, em casais com abortamento recorrente (n=56) e em casais controles (n=69);

2. Comparar as freqüências alélicas, genotípicas e haplotípicas e de portadores dos SNPs compreendidos entre – 1446 e + 77 do gene HLA-G dos grupos de casais pacientes e controles;

3. Comparar as freqüências fenotípicas, genotípicas e haplotípicas do SNP -725C/G isoladamente e a freqüência de portadores em combinação com a deleção de 14pb na região 3'UTR do gene *HLA-G.*

4. JUSTIFICATIVA

O presente trabalho se justifica pelo fato de haver poucos estudos sobre a variabilidade genética da região promotora, reguladora e o éxon 8 (ainda não abordado nos estudos anteriores do LIGH), relacionando estas variações com o fenômeno biológico do abortamento espontâneo recorrente (AER). Com este trabalho será dada continuidade a uma linha de pesquisa e investigação do LIGH (Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade) que já há alguns anos vem investigando a relação ente *HLA-G* (e outros genes) e ocorrência de abortos de repetição.

É importante levantar evidências que ajudem a montar o panorama complexo que cerca o fenômeno do abortamento espontâneo recorrente, contribuindo com mais informações dentro da comunidade cientifica, que tenta encontrar uma resposta para explicar e quem sabe amenizar o problema de casais que não podem deixar descendentes.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Foi realizado um estudo caso-controle em uma amostra constituída por 56 casais pacientes, cuja mulher apresentava abortamento recorrente de causa desconhecida e 69 casais do grupo controle.

A amostra paciente é constituída por casais de ancestralidade predominantemente européia, não aparentados e de nível sócio-econômico semelhante. Atendendo critérios de exclusão para compor a amostra paciente a ser investigada, as mulheres não apresentavam registros de infecções, doenças auto-imune, alterações hormonais, ginecológicas, anatômicas ou cromossômicas, que pudessem ser associadas ao quadro clínico do abortamento recorrente. As mulheres apresentavam pelo menos 3 abortamentos recorrentes de causa desconhecida. O número médio de abortos dos 68 casais foi de 3,14 e o desvio padrão de 1,72. As amostras foram obtidas através da Unidade de Genética Médica e Reprodução Humana do Hospital de Clínicas da UFPR e na clínica Genetika, em Curitiba no período compreendido entre os anos de 1997 e 2005.

A amostra controle foi por constituída por casais nos quais as mulheres apresentaram gestações a termo sem complicações, saudáveis e sem registros de abortamentos. Estas amostras foram pareadas atendendo a critérios de mesmo grupo étnico e faixa etária da amostra paciente.

O presente estudo faz parte de um projeto aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clinicas da UFPR, sendo que os grupos paciente e controle assinaram um termo de consentimento para participação do estudo e para a coleta de amostras sanguíneas (ver apêndices: Termo de Consentimento e Fichas de Averiguação). A realização da pesquisa e demais análises foram conduzidas no Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH) do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná.

5.2 SEQÜENCIAMENTO DA REGIÃO REGULADORA DE *HLA-G*

5.2.1 Extração do DNA Genômico

O DNA genômico foi extraído de leucócitos do sangue periférico pelo método *salting out* (JOHN *et al.* 1990, modificado por LAHIRI e NURNBERGER Jr. 1991), o qual se desenvolve essencialmente em quatro etapas:

a) Obtenção da camada de leucócitos por centrifugação do sangue total coletado com anticoagulante EDTA (2500 rpm);

b) Lise de eritrócitos através dos detergentes IGEPAL CA630 (SIGMA), SDS 10% e soluções hipotônicas TKM1 e TKM2;

c) Precipitação de proteínas com NaCl 6M;

d) Precipitação de DNA genômico com etanol absoluto.

5.2.2 CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DO DNA

O DNA genômico extraído foi quantificado pela leitura de densidade ótica, utilizando-se o espectrofotômetro Gene Quant*pro* RNA/DNA calculator.

5.2.3 Amplificação da região promotora compreendida entre as posições – 1446 a + 77 de *HLA-G*

Após a diluição das amostras (20ng/ul), foi realizada a amplificação do segmento de DNA que totalizava 1544pb (Figuras 8,9,10 e 11), compreendido entre as posições – 1446 a + 77 do gene *HLA-G.* A escolha dos seis oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) (TABELA 4) necessários para a amplificação e posterior reação de sequenciamento da região alvo, foi fundamentada no protocolo utilizado por OBER *et al.*, (2003) em estudo similar com casais da população Hutterite. O oligonucleotídeo iniciador G*–830R sofreu modificações na orientação *Forward* para *Reverse* para atender ao critério, por nós proposto, de analisar fragmentos de tamanho e numero de pares de base similares (aproximadamente 600 pb). Os

oligonucleotídeos iniciadores G*–919F e G*-361F, especialmente desenhados para o desenvolvimento deste trabalho, não faziam parte do conjunto de oligonucletideos utilizados por OBER e colaboradores em sua análise da região promotora de *HLA-G*. O desenho e a síntese desses dois últimos oligos iniciadores permitiram um padrão no tamanho dos fragmentos gerados, compatível com o equipamento *Genetic Analyser-ABI3110*, utilizado na rotina laboratorial do LIGH, o que não seria possível caso fossem utilizados para essa região os oligonucleotídeos utilizados no trabalho original de OBER *et al.*, (2003).
Para verificar a especificidade da hibridação* dos oligonucleotídeos iniciadores, eles foram testados empiricamente através da utilização de recursos disponíveis do site *http://genome.ucsc.edu/* que também está conectado com o site http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), que utiliza-se do BLAST Algoritmo, e realiza uma PCR virtual antecipando anelamentos* em regiões não desejadas e, outras possíveis ocorrências.

TABELA 4 .OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES

Oligos Iniciadores	Sequência	Temperatura de anelamento	Tamanho do fragmento	Região amplificada
G* -1447F	ACATTCTAGAAGCTTCACAAGAATG			
		68°C	638pb	Reguladora intensificadora
G*-830R	CGTAGCCCTAAGTTTCCGTGTG			
		68 °C		Reguladora intensificadora
G*-919F	CTGTGAGGTGAATAAAGTTTGTGC			Reguladora
		60 °C	637pb	intensificadora
G*-304R	GCCAAGCGTTCTGTCTCAGTGT			
		64 °C		Reguladora *intensificadora*
		72 °C	459pb	promotora
G*-389F	TGAAAAGTGAAGGGAGAGGGAC			
G* +77R	GTTTCCCTCCTGACCCCGCACT	72 °C		promotora
G85S´	GTGATGGGCTGTTTAAAGTGTCACC	74 °C		éxon 8
G83S´	GGAAGGAATGCAGTTCAGCATGA	68 °C		éxon 8

*O termo hibridação, correto por descrever essa etapa do processo, foi substituído pelo termo *anelamento* nos protocolos laboratoriais.

Figura 9. Região reguladora e promotora do gene *HLA-G* compreendendo 1544pb

acattctagaagcttcacaagaatgaggtggagccactggagtgttttaggtggagaaatgacacactctgactcatagtagc
aggaccactatagagagaacactcatgtagcaggtcatggaacagtgctagagccacaattcaggagtgagagggtggtg
gggattaaggggagaagagggcctgagggatgagagggacggagggaagggctggaggagcaggaggtgaggaaa
aggagcagaggaaagaattccaaagcagcggaactcttaggtttaaacacattgttttatagattttattacatccatctacaga
gcctcgctgggtgttctttgcagttggcctttaatatcttatgtgggtctgcctagaaactaattgtttttttatgttaatcaggtttaaaaa
atactaagtattcctaaaaaatatacactccactcacatgtggatacttcctaaaaacaggcagtgcatgagcactagtgaggg
gcattgtgactgcactgaacacttacaactgtgaggtgaataaagtttgtgctggctcctggttgcaacatatagtaacatagtgt
ggtactttgtcttgaggagatgtcctggactcacacggaaacttagggctacggaatgaaggtaaatttaaaataaaacaagc
gggagtcacagatacattgtctgggaaagtgaaacttaagagctttgtgagtcctgttgtaaggcttttagatgcatttatatacca
acgggccaaagtcacatttttacctattagattcctgatcattcaggggttaccaagattatgctacccactatagttaataaaca
aaaagcaaactggtctctattctatctcatgcactcaggcacaacttttccagatttaaaggggaaaaaaaaccctgtctttaca
cctacaatcccagggcgagctcactctctggcaccaagctccgtggggtgatttttcttctagaagagtacaggaggacaggc
aaggagtgggaggcagggagtccagttcagggacagggattccgggatgaaaagtgaagggagagggacagggacctt
gccgagggtttctccctggtttctcagacagctcctgggccaagactcagggagacactgagacagaacgcttggcacaaga
gtagcggggtcagggcgaagtcccagggcctcaagcgtggctctcagggtctcaggccccacaggcggtgtatggattggg
gaggccccgcgttggggattctctcctccttctcctaacctgtgtcgggtccttcttcctggatactcaccgggcggccccagttctc
actcccattaggtgacaggtttttagagaagccaatcagcgtcgccgcggtcctggttctaaagtcctcgctcacccacccgga
ctcattctccccagacgccaagg**at**ggtggtcatggcaccccgaaccctcttcctgctactctcgggggccctgaccctgaccg
agacctgggcgggtgagtgcggggtcaggagggaaacggcccctgcgcggaggagggaggggccggcccggcgggg
gcgcaggacccggcagccgc

Figura 10. Fragmento 1 e os oligonucleotideos G*- 1447F e G*-830R utilizados para sua amplificação

Figura 11. Fragmento 2 e os oligonucleotideos G*- 919F e G*-304R utilizados para sua amplificação

Figura 12. Fragmento 3 e os oligonucleotídeos G*- 389F e G*+77R utilizados para sua amplificação

A PCR foi realizada de acordo com as seguintes condições:

DNA Molde	0,5ng/ µl
Tampão Taq 10X	1X
dNTPs	0,21mM
Oligonucleotídeos Iniciadores	0,5 pmoles/Cada
MgCl2	2mM
Taq Platinum Invitrogen	2U
Água Ultrapura	q.s.p.50µl

Ciclagem: temperatura/tempo

Desnaturação Inicial	96ºC – 3´
1 – Desnaturação	96ºC – 1´
2 – Anelamento	66ºC – 1´
3 – Alongamento	72ºC – 1´
Alongamento Final	72ºC – 10´
Número de Ciclos (passos 1, 2 e 3)	30 ciclos
(Termociclador GeneAmp PCR System	9700 (P.E.)

5.2.4 Purificação e Seqüenciamento das Amostras Amplificadas

Purificação Enzimática:

Exonuclease I (*EXO* I) – *Amersham Biosciences* - E70073Z (2.500U)

Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP), *Amersham Biosciences* - E70092X 5000U

Protocolo:

0,33 µL de EXO (3,3U)	Termociclador:
0,33 µL de SAP (0,66U)	30 min – 37 ºC
0,34 µL de H2O Mili-Q	15 min – 80 ºC
6 µL de produto de PCR	

O produto está pronto para a reação de seqüenciamento.

Em seguida, as amostras foram submetidas à reação de seqüenciamento (cada fragmento em um tubo separado) com o Kit *ABI PRISM*® ***BigDye***®. Conforme protocolo abaixo:

Master Mix – Amostra/Reação	
DNA	6,9 µl (100 ng/reação)
Primer Seqüenciamento	1,6 µl (1,6 pmol)
Big Dye	1 µl
Save (tampão)	0,5µl

Ciclagem: Temperatura/Tempo

Desnaturação Inicial	96ºC – 1´
1 – Desnaturação	96ºC – 15´´
2 – Anelamento	54ºC – 15´´
3 – Alongamento	60ºC – 4´
(Número de Ciclos – Passos 1, 2 e 3)	35 Ciclos

PRECIPITAÇÃO

2 µl de acetato de sódio (TA) – spin
25 µl de etanol absoluto (TA)
Vortex intenso por 30 seg.
Centrifugar em 4000 rpm por 40 min.
Spin invertido 800 rpm por 10 seg. (em papel toalha)
Etanol 80% (TA) - 50 µl - vortex por 10 seg.
Centrifugar 4000 rpm por 15 min.
Spin invertido 800rpm por 10seg.
Secagem 15min. à 45^{o}C
Guardar a -20^{o}C ou descongelar formamida e:
15 µl de formamida – vortex rápido + spin de 800rpm 10seg.
Desnaturar por 2 min. a 95^{o}C
Choque térmico no gelo por 30 seg.
Levar ao seqüenciador

5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As freqüências genotípicas/fenotípicas foram obtidas por contagem direta.
O número de indivíduos portadores da variante alélica ou SNP foi dividido pelo número total (N) de indivíduos em cada amostra. Este valor foi multiplicado por 100 para obtenção de freqüências percentuais para serem comparadas com as freqüências esperadas, de acordo com o Teorema de Hardy-Weinberg. Para tanto, foi utilizado o programa "*Genepop on the Web*" (Genepop 4.0), que gerou também as freqüência alélicas em questão (http://genepop.curtin.edu.au/).

As freqüências de portadores de cada alelo ou variante foram obtidas pelo método de contagem direta e as freqüências haplotípicas foram calculadas com o auxílio do programa ARLEQUIN 3.11 (Bootstraps = 10.000) (Excoffier *et al.* 2005).

As freqüências alélicas, genotípicas, haplotípicas e de portadores foram comparadas através do uso do teste exato de Fisher bilateral em tabelas de contingência 2x2 mediante o uso do programa *BioEstat 5.0*

Para as comparações que apresentaram significância (P<0,05), foi calculado o Odds Ratio (OR ou razão de probabilidades) com Intervalo de Confiança de 95%, com auxílio do programa *BioEstat 5.0.*

Os valores de OR acima de 1 indicam que o fator está associado a uma maior probabilidade de desenvolver a afecção enquanto que valores abaixo de 1, representam que existe uma menor probabilidade.

Nos casos em que o valor de alguma das células (A, B, C ou D) foi 0, foi realizada a correção de Haldane, cuja fórmula é: RR=[(A+1/2)**.**(D+1/2)**/**(B+1/2)**.**(C+1/2)] (SVEJGAARD e RYDER, 1994).

	Pacientes	Controles
Positivo para o fator pesquisado	A	B
Negativo para o fator pesquisado	C	D

QUADRO 10 – VALORES PARA CÁLCULO DE ODDS RATIO
FONTE: WOLF, 1955

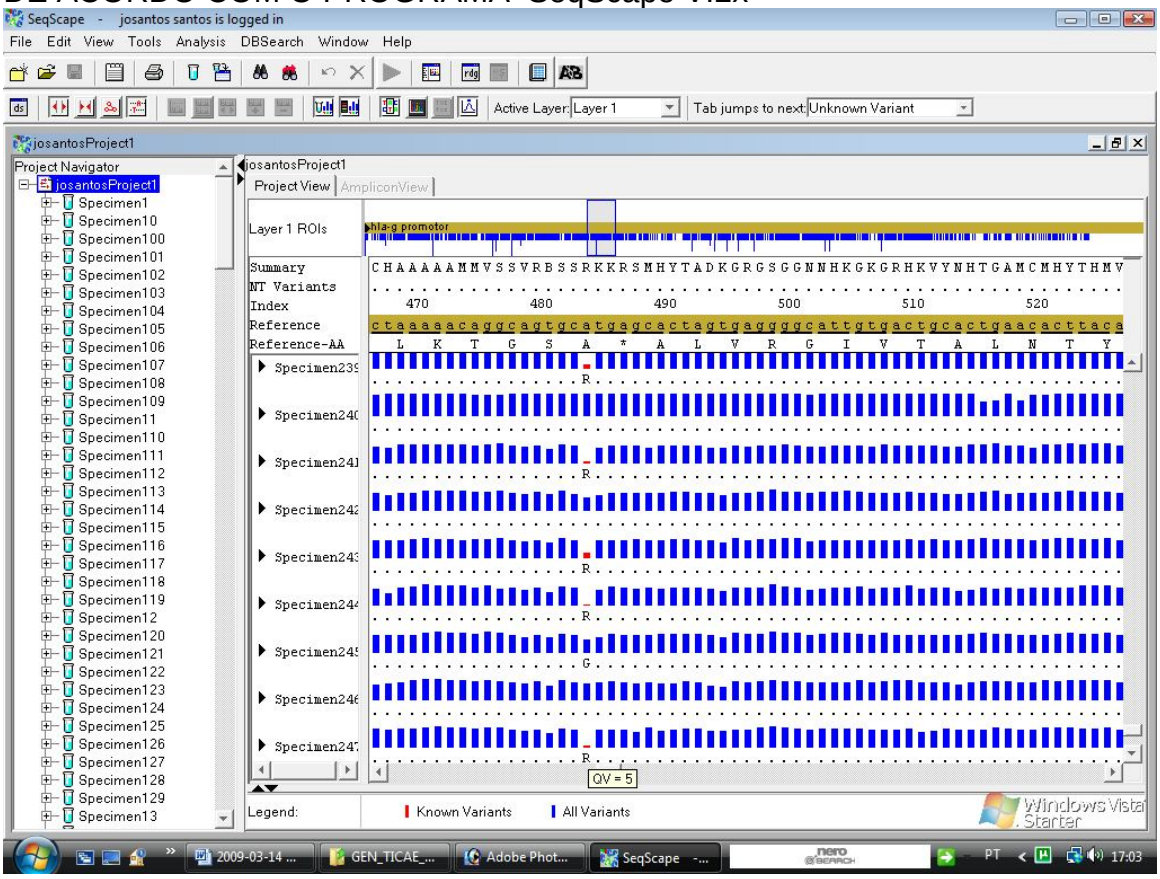
6. RESULTADOS

6.1 SNPs DA REGIÃO PROMOTORA E REGULADORA DE *HLA-G*

6.1.1 ANÁLISE DOS FRAGMENTOS DA REGIÃO PROMOTORA DE *HLA-G*

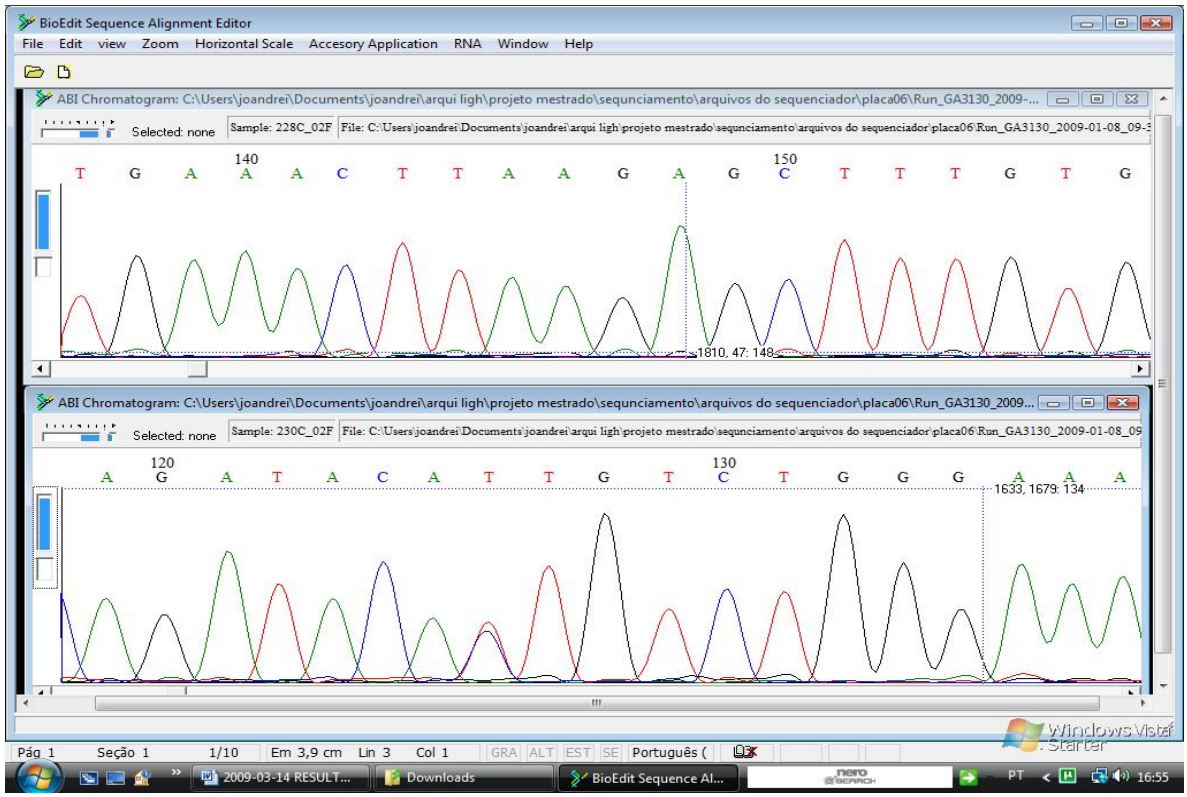
Na análise dos eletroferogramas buscamos identificar os SNPs já conhecidos, bem como evidências de novos SNPs na região promotora/reguladora de 1544pb de *HLA-G* região através da comparação com a seqüência de referência obtida no site www.ncbi.nlm.nih.gov. No entanto, todos os SNPs observados no presente estudo já haviam sido descritos no trabalho de OBER *et al.* 2003.

FIGURA 13. VISUALIZAÇÃO SIMULTÂNEA DA ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DA REGIÃO PROMOTORA DE *HLA-G* DE NOVE INDIVÍDUOS DE ACORDO COM O PROGRAMA SeqScape V.2x



Escore do seqüenciamento de alguns indivíduos sendo analisado

FIGURA 14. ELETROFEROGRAMA DE PARTE DO FRAGMENTO 2 DA REGIÃO REGULADORA DO GENE *HLA-G* EM INDIVÍDUOS DO GRUPO CONTROLE EM ANÁLISE NO PROGRAMA BioEdit V. 7.0.8.0



6.2 SNPs DA REGIÃO PROMOTORA DE *HLA –G*: FREQÜÊNCIAS ALÉLICAS

As freqüências alélicas dos SNPs da região promotora de *HLA-G* foram estimadas com o apoio do programa *Genepop*. Na tabela 5 está descrita a região do cromossomo onde se encontra o SNP, a freqüência do alelo menos freqüente no Grupo Paciente (GP) e a freqüência para o mesmo alelo no Grupo Controle (GC). O mesmo procedimento foi realizado quando comparamos sub-grupos masculinos e femininos dentro de cada um dos grupos Controle e Paciente, respectivamente, sendo representado o alelo de menor freqüência dentro desses grupos (Tabela 6).

Na tabela 5, comparando a freqüência alélica do SNP -1306A/G em pacientes e controles, observa-se que o valor de P está próximo ao limiar de significância. A diferença de freqüência entre os grupos de pacientes e controles para o SNP -725 C>G foi estatisticamente significante como revelado pelo valor de P. Ao aplicar o teste de Razão de Probabilidades verificou-se que a presença do alelo -725G aumentaria as chances de abortamento em quase duas vezes (OR:1,8789, I.C. 95%:[1,08 - 3,27]).

TABELA 5. COMPARAÇÃO DAS FREQÜÊNCIAS ALÉLICAS DOS SNPs DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *HLA-G* NO GRUPO PACIENTE (N= 112) E O GRUPO CONTROLE (N= 138)

		ALELO DE MENOR FREQUENCIA NOS	FREQÜÊNCIAS			
POSIÇÃO	BASES	PACIENTES	PACIENTES	CONTROLE	*Valor de P*	OR I.C.(95%)
-1306	A/G	A	0,31	0,39	**0,0609**	OR:0,6964 I.C95%:[0,48-1,01]
-1179	G/A	G	0,35	0,40	0,2675	
-1155	G/A	A	0,05	0,07	0,5646	
-1140	T/A	T	0,26	0,30	0,2771	
-1138	A/G	G	0,03	0,01	0,3106	
-1121	C/T	T	0,11	0,12	0,6739	
-964	A/G	A	0,35	0,38	0,5146	
-762	T/C	T	0,42	0,44	0,5861	
-725	C/G/T	G	0,15	0,09	**0,0469**	OR:1,8789 I.C95%:[1,08 - 3,27]
-716	G/T	G	0,42	0,44	0,5861	
-689	G/A	G	0,42	0,44	0,5861	
-666	T/G	T	0,42	0,44	0,5861	
-633	A/G	A	0,42	0,44	0,5861	
-486	C/A	C	0,42	0,44	0,5861	
-477	G/C	G	0,44	0,50	0,1503	
-369	A/C	A	0,43	0,50	0,1050	
-201	G/A	A	0,35	0,38	0,5146	
-56	C/T	T	0,10	0,12	0,6739	

Comparando as freqüências alélicas entre as amostras femininas do grupo controle e paciente, não foi encontrada significância estatística indicando diferença entre as amostras em todos os SNPs (tabela 6). O SNP -725C>G>T mostro-se estatisticamente significativa ao contrastar as freqüências das amostras masculinas. Testando o OR para as freqüências deste SNP verificou-se que a sua

presença no parceiro masculino aumenta as chances de abortamento em aproximadamente três vezes e meia (OR:3,58 I.C95%:[1,44 - 8,92]). O SNP -477G>C apresentou freqüências significativamente diferentes quando comparados os grupos de homens pacientes e controles. A freqüência do SNP -369 A>C foi significativamente diferente quando comparada entre os grupos de homens, porém muito próximo do limiar de significância. O teste de OR para suas frequqncias mostrou que a presença deste alelo pode ser um fator protetor com relação ao abortamento OR:0,59 I.C95%:[0,36 – 0,98], o mesmo pode ser observado ao testar as freqüências do alelo -477G, OR:0,6118 I.C95%:[0,37-1,01], porem o valor de P para a comparação de freqüências ficou acima do limiar de significancias (Tabela 6).

TABELA 6. COMPARAÇÃO DAS FREQÜÊNCIAS ALÉLICAS DOS SNPs DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *HLA-G* EM CASAIS DO GRUPO PACIENTE (N=56 + N=56) E CASAIS DO GRUPO CONTROLE (N=69 + N=69)

		ALELO DE MENOR FREQUENCIA NOS	MULHERES			HOMENS			
POSIÇÃO	BASES	PACIENTES	GPF	GCF	*Valor de P*	GPM	GCM	*Valor de P*	OR I.C.(95%)
-1306	A/G	A	0,30	0,36	0,4198	0,32	0,43	0,1168	
-1179	G/A	G	0,33	0,38	0,4274	0,38	0,42	0,5170	
-1155	G/A	A	0,06	0,05	0,7848	0,04	0,08	0,1846	
-1140	T/A	T	0,26	0,27	0,8864	0,27	0,35	0,2167	
-1138	A/G	G	0,03	0,01	0,6592	0,03	0,01	0,3281	
-1121	C/T	T	0,09	0,14	0,3355	0,12	0,10	0,8381	
-964	A/G	A	0,37	0,36	1,0000	0,34	0,41	0,2962	
-762	T/C	T	0,42	0,36	0,3601	0,41	0,53	0,0748	
-725	C/G/T	G	0,13	0,12	0,8503	0,16	0,05	**0,0053**	OR:3,58 I.C95%:[1,44 - 8,92]
-716	G/T	G	0,42	0,36	0,3601	0,41	0,53	0,0748	
-689	G/A	G	0,42	0,36	0,3601	0,41	0,53	0,0748	
-666	T/G	T	0,42	0,36	0,3601	0,41	0,53	0,0748	
-633	A/G	A	0,42	0,36	0,3601	0,41	0,53	0,0748	
-486	C/A	C	0,42	0,36	0,3601	0,41	0,53	0,0748	
-477	G/C	G	0.45	0.46	0,8988	0.43	0.56	**0,0578**	OR:0,6118 I.C95%:[0,37-1,01]
-369	A/C	A	0.44	0.46	0,7989	0.42	0.55	**0,0427**	OR:0,59 I.C95%:[0,36 – 0,98]
-201	G/A	A	0.37	0.36	1,0000	0.34	0.41	0,2962	
-56	C/T	T	0.09	0.14	0,3355	0.12	0.10	0,8399	

6.3 SNPs DA REGIÃO PROMOTORA DE HLA-G: FREQÜÊNCIAS GENOTÍPICAS E VALORES DE EQUILÍBRIO DE HARDY – WEINBERG

Foi testado o Equilíbrio de H-W para as freqüências de SNPs observadas nos Grupos Paciente (GP) e Grupo Controle (GC) total (Tabela 7 e 8). As tabelas 9 e 10 apresentam os valores de P para o estudo de associação entre as freqüências dos grupos controle e paciente. Segundo os valores de P (tabelas 7 e 8), todos os SNPs estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. O SNP -1179G/A apresentou valor de P (P=0,0757) próximo do limiar de significância em casais do grupo controle.

TABELA 7. FREQÜÊNCIAS GENOTÍPICAS E EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG (*VALOR DE P*) PARA OS *SNPs* DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *HLA-G* NO GRUPO PACIENTE (GP N= 112) E NO GRUPO CONTROLE (GC N= 138)

-1306A/G	A/A	A/G	G/G	*Valor de P*
GP	8 (7,14%)	54 (48,22%)	50 (44,64%)	0,2756
GC	17 (12,32%)	75 (54,35%)	46 (33,33%)	0,1537

-1179G/A	G/G	G/A	A/A	*Valor de P*
GP	11 (9,82%)	57 (50,89%)	44 (39,29%)	0,2931
GC	17 (12,32%)	77 (55,80%)	44 (31,88%)	0,0757

-1155G/A	G/G	G/A	A/A	*Valor de P*
GP	102 (91,07%)	9 (8,04%)	1 (0,89%)	0,2285
GC	120 (86,96%)	18 (13,04%)	0 (0,00%)	1,0000

-1140T/A	T/T	T/A	A/A	*Valor de P*
GP	6 (5,36%)	47 (41,96%)	59 (52,68%)	0,4745
GC	12 (8,70%)	61 (44,20%)	65 (47,10%)	0,8414

-1138A/G	A/A	A/G	G/G	*Valor de P*
GP	106 (94,64%)	6 (5,36%)	0 (0,00%)	1,0000
GC	135 (97,83%)	3 (2,17%)	0 (0,00%)	1,0000

-1121C/T	C/C	C/T	T/T	*Valor de P*
GP	88 (78,57%)	24 (21,43%)	0 (0,00%)	0,6066
GC	105 (76,09%)	32 (23,19%)	1 (0,72%)	0,6955

-964A/G	A/A	A/G	G/G	*Valor de P*
GP	10 (8,93%)	59 (52,68%)	43 (38,39%)	0,1439
GC	16 (11,59%)	74 (53,63%)	48 (34,78%)	0,1535

-762T/C	T/T	T/C	C/C	*Valor de P*
GP	21 (18,75%)	51 (45,54%)	40 (35,71%)	0,5507
GC	26 (18,84%)	70 (50,72%)	42 (30,44%)	0,8623

-725C/G/T	C/C	C/G	G/G	T/C	T/G	T/T	*Valor de P*
GP	60 (53,57%)	30 (26,79%)	1 (0,89%)	20 (17,86%)	1 (0,89%)	0 (0,00%)	0,2235
GC	95 (68,84%)	19 (13,77%)	2 (1,45%)	20 (14,50%)	1 (0,72%)	1 (0,72%)	0,5741

GP= grupo paciente, GC= grupo controle

TABELA 8. (continuação) FREQÜÊNCIAS GENOTÍPICAS E EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG (*VALOR DE P*) PARA OS SNPs DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *HLA-G* NO GRUPO PACIENTE (GP N= 112) E NO GRUPO CONTROLE (GC N= 138)

-716G/T	G/G	G/T	T/T	*Valor de P*
GP	21 (18,75%)	51 (45,54%)	40 (35,71%)	0,5645
GC	26 (18,84%)	70 (50,72%)	42 (30,44%)	0,8616

-689G/A	G/G	G/A	A/A	*Valor de P*
GP	21 (18,75%)	51 (45,54%)	40 (35,71%)	0,5624
GC	26 (18,84%)	70 (50,72%)	42 (30,44%)	0,8650

-666T/G	T/T	T/G	G/G	*Valor de P*
GP	21 (18,75%)	51 (45,54%)	40 (35,71%)	0,5589
GC	26 (18,84%)	70 (50,72%)	42 (30,44%)	0,8643

-633A/G	A/A	A/G	G/G	*Valor de P*
GP	21 (18,75%)	51 (45,54%)	40 (35,71%)	0,5617
GC	26 (18,84%)	70 (50,72%)	42 (30,44%)	0,8618

-486C/A	C/C	C/A	A/A	*Valor de P*
GP	21 (18,75%)	51 (45,54%)	40 (35,71%)	0,5594
GC	26 (18,84%)	70 (50,72%)	42 (30,44%)	0,8615

-477G/C	G/G	G/C	C/C	*Valor de P*
GP	21 (18,75%)	56 (50,00%)	35 (31,25%)	1,0000
GC	37 (26,81%)	65 (47,10%)	36 (26,09%)	0,5007

-369A/C	A/A	A/G	G/G	*Valor de P*
GP	21 (18,75%)	54 (48,21%)	37 (33,04%)	0,8501
GC	37 (26,81%)	65 (47,10%)	36 (26,09%)	0,5000

-201G/A	A/A	A/G	G/G	*Valor de P*
GP	10 (8,93%)	59 (52,68%)	43 (38,39%)	0,1439
GC	16 (11,59%)	74 (53,63%)	48 (34,78%)	0,1535

-56C/T	C/C	C/T	T/T	*Valor de P*
GP	88 (78,57%)	24 (21,43%)	0 (0,00%)	0,6066
GC	105 (76,09%)	32 (23,19%)	1 (0,72%)	0,6955

GP= grupo paciente, GC= grupo controle

Quanto ao estudo de associação, ao serem comparada as freqüências genotípicas dos casais paciente e controle para os genótipos 725C/725C (P=0,0182) e 725C/725G (P=0,0157) foram encontradas diferenças estatisticamente significativas. Contrastando as freqüências observadas nos

grupos paciente e controle para o SNP -725C/-725C, foi encontrado um valor de O. R: 0,5223 que representa estatisticamente um menor risco para aqueles casais que portam este genótipo. O SNP -725C/-725C apresentou valor de O.R: 2,29 o que indica um risco de aproximadamente duas vezes maior de ocorrer um episodio de abortamento para seus portadores (Tabela 9).

TABELA 9. COMPARAÇÃO DA FREQÜÊNCIA GENOTÍPICA DOS *SNPs* DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *HLA-G* EM CASAIS PACIENTES COM AER (n:112) E CASAIS CONTROLE (N: 138)

Genótipos	Pacientes		Controles		*Valor de P*	
	n	%	n	%		*OR I.C.(95%)*
1306A/1306A	8	7,14	17	12,32	0,2069	
1306A/1306G	54	48,22	75	54,35	0,3738	
1306G/1306G	50	44,64	46	33,33	0,1879	
1179G/1179G	11	9,82	17	12,32	0,5536	
1179G/1179A	57	50,89	77	55,8	0,4475	
1179A/1179A	44	39,29	44	31,88	0,2336	
1155G/1155G	102	91,07	120	86,96	0,3225	
1155G/1155A	9	8,04	18	13,04	0,2254	
1155A/1155A	1	0,89	0	0,00	0,4480	
1140T/1140T	6	5,36	12	8,7	0,3378	
1140T/1140A	47	41,96	61	44,2	0,7975	
1140A/1140A	59	52,68	65	47,1	0,4455	
1138A/1138A	106	94,64	135	97,83	0,3061	
1138A/1138G	6	5,36	3	2,17	0,3061	
1138G/1138G	0	0,00	0	0,00	1,0000	
1121C/1121C	88	78,57	105	76,09	0,6531	
1121C/1121T	24	21,43	32	23,19	0,7626	
1121T/1121T	0	0,00	1	0,72	1,0000	
964A/964A	10	8,93	16	11,59	0,5379	
964A/964G	59	52,68	74	53,63	0,8992	
964G/964G	43	38,39	48	34,78	0,5980	
762T/762T	21	18,75	26	18,84	1,0000	
762T/762C	51	45,54	70	50,72	0,4465	
762C/762C	40	35,71	42	30,44	0,4173	
725C/725C	60	53,57	95	68,84	**0,0182**	OR:0,5223 I.C95%:[0,31-0,88]
725C/725G	30	26,79	19	13,77	**0,0157**	OR:2,29 I.C95%:[1,21-4,34]
725G/725G	1	0,89	2	1,45	1,0000	
725T/725C	20	17,86	20	14,5	0,4921	
725T/725G	1	0,89	1	0,72	1,0000	
725T/725T	0	0,00	1	0,72	1,0000	

TABELA 10. (continuação) COMPARAÇÃO DA FREQÜÊNCIA GENOTÍPICA DOS *SNPs* DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *HLA-G* EM CASAIS PACIENTES COM AER (n:112) E CASAIS CONTROLE (N: 138)

Genótipos	Pacientes		Controles		*Valor de P*	
	n	%	n	%		*OR I.C.(95%)*
716G/716G	21	18,75	26	18,84	1,0000	
716G/716T	51	45,54	70	50,72	0,4465	
716T/716T	40	35,71	42	30,44	0,4173	
689G/689G	21	18,75	26	18,84	1,0000	
689G/689A	51	45,54	70	50,72	0,4465	
689ª/689A	40	35,71	42	30,44	0,4173	
666T/666T	21	18,75	26	18,84	1,0000	
666T/666G	51	45,54	70	50,72	0,4465	
666G/666G	40	35,71	42	30,44	0,4173	
633A/633A	21	18,75	26	18,84	1,0000	
633A/633G	51	45,54	70	50,72	0,4465	
633G/633G	40	35,71	42	30,44	0,4173	
486C/486C	21	18,75	26	18,84	1,0000	
486C/486A	51	45,54	70	50,72	0,4465	
486A/486A	40	35,71	42	30,44	0,4173	
477G/477G	21	18,75	37	26,81	0,1748	
477G/477C	56	50	65	47,1	0,7031	
477C/477C	35	31,25	36	26,09	0,3992	
369A/369A	21	18,75	37	26,81	0,1748	
369A/369C	54	48,21	65	47,1	0,8990	
369C/369C	37	33,04	36	26,09	0,2638	
201G/201G	10	8,93	16	11,59	0,5379	
201G/201A	59	52,68	74	53,63	0,8992	
201A/201A	43	38,39	48	34,78	0,5980	
56C/56C	88	78,57	105	76,09	0,6531	
56C/56T	24	21,43	32	23,19	0,7626	
56T/56T	0	0,00	1	0,72	1,0000	

6.4 FREQÜÊNCIA GENOTÍPICA, EQUILÍBRIO DE HARDY – WEINBERG E ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO EM HOMENS E MULHERES DOS GRUPOS PACIENTES E CONTROLES

As tabelas 11, 12 e 13 apresentam os valores de P para o equilíbrio de H-W nos grupos estratificados de acordo com o sexo: Grupo Paciente Masculino (GPM) versus Grupo Controle Masculino (GCM) e Grupo Paciente Feminino (GPF) versus Grupo Controle Feminino (GCF). As tabelas 14, 15, 16 e 17 apresentam os valores de P referente ao estudo de associação entre as freqüências dos genótipos masculinos dos grupos controle e paciente (tabelas 14 e 15) e mulheres controle e pacientes (tabelas 16 e 17). O grupo controle masculino apresentou valor de P (P=0,0510) no limite de significância para o equilíbrio de H-W (Tabela 11). Os demais SNPs mostrados na tabela 11 estão em equilíbrio de H-W. Na Tabela 12 o SNP -964A>G para o grupo controle masculino está em desequilíbrio, mas o valor de P está próximo do limiar de significância (P= 0,0458).

A distribuição das freqüências dos alelos do SNP -201G>A, no grupo controle masculino, quando comparadas com as esperadas em uma situação de equilíbrio de H-W apresentaram uma diferença estatisticamente significativa (P=0,0458), porém, com um valor de P próximo do limiar de significância (Tabela 13)

TABELA 11. FREQÜÊNCIAS GENOTÍPICAS, EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG (*VALOR DE P*) PARA OS *SNPs* DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *HLA-G* NO GRUPO PACIENTE FEMININO (GPF N= 56) E MASCULINO (GPM N= 56) E DO GRUPO CONTROLE FEMININO (GCF N= 69) E MASCULINO (GCM N= 69)

-1306A/G	A/A	A/G	G/G	*Valor de P*
GPF	4 (7,14%)	26 (46,43%)	26 (46,43%)	0.7522
GPM	4 (7,14%)	28 (50%)	24 (42,86%)	0.3694
GCF	8 (11,59%)	33 (47,83%)	28 (40,58%)	0.7979
GCM	8 (11,59%)	42 (60,87%)	19 (27,54%)	0.0830

-1179G/A	G/G	G/A	A/A	*Valor de P*
GPF	5 (8,93%)	27 (48,21%)	24 (42,86%)	0.7605
GPM	6 (10,71%)	30 (53,57%)	20 (35,71%)	0.3958
GCF	9 (13,04%)	35 (50,72%)	25 (36,23%)	0.6160
GCM	8 (11,59%)	42 (60,87%)	19 (27,54%)	0.0510

-1155G/A	G/G	G/A	A/A	*Valor de P*
GPF	50 (89,28%)	5 (8,93%)	1 (1,78%)	0.1830
GPM	52 (92,86%)	4 (7,14%)	0 (0,00%)	1,0000
GCF	62 (89,86%)	7 (10,14%)	0 (0,00%)	1,0000
GCM	58 (84,06%)	11 (15,94%)	0 (0,00%)	1,0000

-1140T/A	T/T	T/A	A/A	*Valor de P*
GPF	3 (5,36%)	23 (41,07%)	30 (53,57%)	0.7386
GPM	3 (5,36%)	24 (42,86%)	29 (51,78%)	0.7343
GCF	6 (8,69%)	25 (36,23%)	38 (55,07%)	0.5440
GCM	6 (8,69%)	36 (52,17%)	27 (39,13%)	0.2873

-1138A/G	A/A	A/G	G/G	*Valor de P*
GPF	53 (94,64%)	3 (5,36%)	0 (0,00%)	1,0000
GPM	53 (94,64%)	3 (5,36%)	0 (0,00%)	1,0000
GCF	67 (97,10%)	2 (2,90%)	0 (0,00%)	1,0000
GCM	68 (98,55%)	1 (1,45%)	0 (0,00%)	1,0000

-1121C/T	C/C	C/T	T/T	*Valor de P*
GPF	45 (80,36%)	11 (19,64%)	0 (0,00%)	1,0000
GPM	43 (76,79%)	13 (23,21%)	0 (0,00%)	1,0000
GCF	49 (71,01%)	20 (28,99%)	0 (0,00%)	0.3335
GCM	56 (81,16%)	12 (17,39%)	1 (1,45%)	0.5189

TABELA 12. (continuação) FREQÜÊNCIAS GENOTÍPICAS, EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG (*Valor de P*) PARA OS *SNPs* DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *HLA-G* NO GRUPO PACIENTE FEMININO (GPF N= 56) E MASCULINO (GPM N= 56) E DO GRUPO CONTROLE FEMININO (GCF N= 69) E MASCULINO (GCM N= 69)

- 964A/G	A/A	A/G	G/G	*Valor de P*
GPF	6 (10,71%)	29 (51,78%)	21 (37,50%)	0.5624
GPM	4 (7,14%)	30 (53,57%)	22 (39,29%)	0.2313
GCF	9 (13,04%)	32 (46,38%)	28 (40,58%)	1,0000
GCM	7 (10,14%)	42 (60,87%)	20 (28,99%)	0.0458

-762T/C	T/T	T/C	C/C	*Valor de P*
GPF	11 (19,64%)	25 (44,64%)	20 (35,71%)	0.5844
GPM	10 (17,86%)	26 (46,43%)	20 (35,71%)	0.7852
GCF	8 (11,59%)	33 (47,83%)	28 (40,58%)	0.7945
GCM	18 (26,09%)	37 (53,62%)	14 (20,29%)	0.6345

-725C/G/T	C/C	C/G	G/G	T/C	T/G	T/T	*Valor de P*
GPF	32 (57,14%)	13 (23,21%)	1 (1,78%)	10 (17,86%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0.6235
GPM	28 (50%)	17 (30,36%)	0 (0,00%)	10 (17,86%)	1 (1,78%)	0 (0,00%)	0.4714
GCF	39 (56,52%)	14 (20,29%)	1 (1,45%)	13 (18,84%)	1 (1,45%)	1 (1,45%)	0.9448
GCM	56 (81,16%)	5 (7,25%)	1 (1,45%)	7 (10,14%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0.3132

-716G/T	G/G	G/T	T/T	*Valor de P*
GPF	11 (19,64%)	25 (44,64%)	20 (35,71%)	0.5879
GPM	10 (17,86%)	26 (46,43%)	20 (35,71%)	0.7842
GCF	8 (11,59%)	33 (47,83%)	28 (40,58%)	0.7965
GCM	18 (26,09%)	37 (53,62%)	14 (20,29%)	0.6293

-689G/A	G/G	G/A	A/A	*Valor de P*
GPF	11 (19,64%)	25 (44,64%)	20 (35,71%)	0.5849
GPM	10 (17,86%)	26 (46,43%)	20 (35,71%)	0.7879
GCF	8 (11,59%)	33 (47,83%)	28 (40,58%)	0.7967
GCM	18 (26,09%)	37 (53,62%)	14 (20,29%)	0.6302

-666T/G	T/T	T/G	G/G	*Valor de P*
GPF	11 (19,64%)	25 (44,64%)	20 (35,71%)	0.5821
GPM	10 (17,86%)	26 (46,43%)	20 (35,71%)	0.7846
GCF	8 (11,59%)	33 (47,83%)	28 (40,58%)	0.7980
GCM	18 (26,09%)	37 (53,62%)	14 (20,29%)	0.6308

TABELA 13 – (continuação) FREQÜÊNCIAS GENOTÍPICAS, EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG (*Valor de P*) PARA OS *SNPs* DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *HLA-G* NO GRUPO PACIENTE FEMININO (GPF N= 56) E MASCULINO (GPM N= 56) E DO GRUPO CONTROLE FEMININO (GCF N= 69) E MASCULINO (GCM N= 69)

-633A/G	A/A	A/G	G/G	*Valor de P*
GPF	11 (19,64%)	25 (44,64%)	20 (35,71%)	0.5893
GPM	10 (17,86%)	26 (46,43%)	20 (35,71%)	0.7820
GCF	8 (11,59%)	33 (47,83%)	28 (40,58%)	0.7958
GCM	18 (26,09%)	37 (53,62%)	14 (20,29%)	0.6316

-486C/A	C/C	C/A	A/A	*Valor de P*
GPF	11 (19,64%)	25 (44,64%)	20 (35,71%)	0.5849
GPM	10 (17,86%)	26 (46,43%)	20 (35,71%)	0.7846
GCF	8 (11,59%)	33 (47,83%)	28 (40,58%)	0.7985
GCM	18 (26,09%)	37 (53,62%)	14 (20,29%)	0.6311

-477G/C	G/G	G/C	C/C	*Valor de P*
GPF	11 (19,64%)	28 (50%)	17 (30,35%)	1,0000
GPM	10 (17,86%)	28 (50%)	18 (26,09%)	1,0000
GCF	16 (23,19%)	31 (44,93%)	22 (31,88%)	0.4692
GCM	21 (30,43%)	34 (49,28%)	14 (20,29%)	1,0000

-369A/C	A/A	A/G	G/G	*Valor de P*
GPF	11 (19,64%)	27 (48,21%)	18 (26,09%)	1,0000
GPM	10 (17,86%)	27 (48,21%)	19 (33,92%)	1,0000
GCF	16 (23,19%)	31 (44,93%)	22 (31,88%)	0.4654
GCM	21 (30,43%)	34 (49,28%)	14 (20,29%)	1,0000

-201G/A	A/A	A/G	G/G	*Valor de P*
GPF	6 (10,71%)	29 (51,78%)	21 (37,50%)	0.5624
GPM	4 (7,14%)	30 (53,57%)	22 (39,29%)	0.2313
GCF	9 (13,04%)	32 (46,38%)	28 (40,58%)	1,0000
GCM	7 (10,14%)	42 (60,87%)	20 (28,99%)	0.0458

-56C/T	C/C	C/T	T/T	*Valor de P*
GPF	45 (80,36%)	11 (19,64%)	0 (0,00%)	1,0000
GPM	43 (76,79%)	13 (23,21%)	0 (0,00%)	1,0000
GCF	49 (71,01%)	20 (28,99%)	0 (0,00%)	0.3335
GCM	56 (81,16%)	12 (17,39%)	1 (1,45%)	0.5189

GPF= paciente feminino, GPM= paciente masculino, GCF= controle feminino e GCM= controle masculino

A tabela 14 apresenta os valores de P para o estudo de associação entre os genótipos masculinos (paciente e controle). Os genótipos -725C/-725C e -725C/-725G apresentaram valores de P abaixo do limiar de significância (P=0,0003 e P=0,0009 respectivamente) indicando que as amostras são diferenciadas quanto a distribuição de das freqüências dos genótipos.

Contrastando as freqüências genotípicas entre homens controle e paciente observou-se um valor de O.R: 0,2321 para os homozigotos -725C/-725C enquanto que para os heterozigotos -725C/-725G o valor estimado foi O.R:5,5795. Um risco cinco vezes e meia maior de ocorrer um episódio de abortamento para os portadores.

Os demais genótipos não apresentam diferenças estatisticamente diferentes.

Na tabela 15 não foi constatada a presença de diferença significante entre a distribuição de genótipos dos homens controles e pacientes. Os genótipos -716T/-716T; -689A/-689A ; -633G/-633G e -486A/-486A não apresentaram distribuição de freqüência estatisticamente significante evidenciada pelos valores de P (P=0,0693), porém, estes valores estavam próximos ao limiar de significância. Estes SNPs não foram associados ao risco de abortamento recorrente em outros trabalhos mas estão em desequilíbrio de ligação com outros SNPs o que resultaria em uma diferença nas suas freqüências quando comparados os grupos controle e paciente.

TABELA 14. COMPARAÇÃO DA FREQÜÊNCIA GENOTÍPICA DOS SNPs DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *HLA-G* ENTRE HOMENS PACIENTES COM (n:56) E HOMENS CONTROLE (N: 69)

Genótipos	Homens Pacientes		Homens Controles		*Valor de P*	
	n	%	N	%		*OR I.C.(95%)*
-1306A/-1306A	4	7,14	8	11,59	0,5451	
-1306A/-1306G	28	50	42	60,87	0,2776	
-1306G/-1306G	24	42,86	19	27,54	**0,0894**	
-1179G/-1179G	6	10,71	8	11,59	1,0000	
-1179G/-1179A	30	53,57	42	60,87	0,4685	
-1179A/-1179A	20	35,71	19	27,54	0,3394	
-1155G/-1155G	52	92,86	58	84,06	0,1705	
-1155G/-1155A	4	7,14	11	15,94	0,1705	
-1155A/-1155A	0	0,00	0	0,00	1,0000	
-1140T/-1140T	3	5,36	6	8,69	0,5141	
-1140T/-1140A	24	42,86	36	52,17	0,3686	
-1140A/-1140A	29	51,78	27	39,13	0,2056	
-1138A/-1138A	53	94,64	68	98,55	0,3245	
-1138A/-1138G	3	5,36	1	1,45	0,3245	
-1138G/-1138G	0	0,00	0	0,00	1,0000	
-1121C/-1121C	43	76,79	56	81,16	0,6587	
-1121C/-1121T	13	23,21	12	17,39	0,5018	
-1121T/-1121T	0	0,00	1	1,45	1,0000	
-964A/-964A	4	7,14	7	10,14	0,7531	
-964A/-964G	30	53,57	42	60,87	0,4685	
-964G/-964G	22	39,29	20	28,99	0,2564	
-762T/-762T	10	17,86	18	26,09	0,2907	
-762T/-762C	26	46,43	37	53,62	0,4742	
-762C/-762C	20	35,71	14	20,29	0,0693	
-725C/-725C	28	50	56	81,16	**0,0003**	OR:0,2321 I.C95%:[0,10-0,52]
-725C/-725G	17	30,36	5	7,25	**0,0009**	OR:5,5795 I.C95%:[1,91-16,33]
-725G/-725G	0	0,00	1	1,45	1,0000	
-725T/-725C	10	17,86	7	10,14	0,2945	
-725T/-725G	1	1,78	0	0,00	0,448	
-725T/-725T	0	0,00	0	0,00	1,0000	

TABELA 15. (continuação) COMPARAÇÃO DA FREQÜÊNCIA GENOTÍPICA DOS SNPs DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *HLA-G* ENTRE HOMENS PACIENTES COM AER (n:56) E HOMENS CONTROLE (N: 69)

Genótipos	Homens Pacientes		Homens Controles		*Valor de P*
	n	%	n	%	
-716G/-716G	10	17,86	18	26,09	0,2907
-716G/-716T	26	46,43	37	53,62	0,4742
-716T/-716T	20	35,71	14	20,29	**0,0693**
-689G/-689G	10	17,86	18	26,09	0,2907
-689G/-689A	26	46,43	37	53,62	0,4742
-689A/-689A	20	35,71	14	20,29	**0,0693**
-666T/-666T	10	17,86	18	26,09	0,2907
-666T/-666G	26	46,43	37	53,62	0,4742
-666G/-666G	20	35,71	14	20,29	**0,0693**
-633A/-633A	10	17,86	18	26,09	0,2907
-633A/-633G	26	46,43	37	53,62	0,4742
-633G/-633G	20	35,71	14	20,29	**0,0693**
-486C/-486C	10	17,86	18	26,09	0,2907
-486C/-486A	26	46,43	37	53,62	0,4742
-486A/-486A	20	35,71	14	20,29	**0,0693**
-477G/-477G	10	17,86	21	30,43	0,1447
-477G/-477C	28	50	34	49,28	1,0000
-477C/-477C	18	26,09	14	20,29	0,1522
-369A/-369A	10	17,86	21	30,43	0,1447
-369A/-369C	27	48,21	34	49,28	1,0000
-369C/-369C	19	33,92	14	20,29	0,1041
-201G/-201G	4	7,14	7	10,14	0,7531
-201G/-201A	30	53,57	42	60,87	0,4685
-201A/-201A	22	39,29	20	28,99	0,2564
-56C/-56C	43	76,79	56	81,16	0,6587
-56C/-56T	13	23,21	12	17,39	0,5018
-56T/-56T	0	0,00	1	1,45	1,0000

Contrastando as freqüências femininas, controle e paciente, não encontrado valores significativos que indicassem algumas diferença na distribuição genotípica entre as amostras (tabelas 16 e 17).

TABELA 16. COMPARAÇÃO DA FREQÜÊNCIA GENOTÍPICA DOS SNPs DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *HLA-G* ENTRE MULHERES PACIENTES (n:56) E MULHERES CONTROLE (N: 69)

Genótipos	Mulheres Pacientes		Mulheres Controles		*Valor de P*
	n	%	n	%	
-1306A/-1306A	4	7,14	8	11,59	0,5451
-1306A/-1306G	26	46,43	33	47,83	1,0000
-1306G/-1306G	26	46,43	28	40,58	0,5871
-1179G/-1179G	5	8,93	9	13,86	0,5741
-1179G/-1179A	27	48,21	35	50,72	0,8578
-1179A/-1179A	24	42,86	25	36,23	0,4673
-1155G/-1155G	50	89,28	62	89,86	1,0000
-1155G/-1155A	5	8,93	7	10,14	1,0000
-1155A/-1155A	1	1,78	0	0,00	0,4480
-1140T/-1140T	3	5,36	6	8,69	0,5141
-1140T/-1140A	23	41,07	25	36,23	0,7117
-1140A/-1140A	30	53,57	38	55,07	1,0000
-1138A/-1138A	53	94,64	67	97,10	0,6560
-1138A/-1138G	3	5,36	2	2,90	0,6560
-1138G/-1138G	0	0,00	0	0,00	1,0000
-1121C/-1121C	45	80,36	49	71,01	0,2984
-1121C/-1121T	11	19,64	20	28,99	0,2984
-1121T/-1121T	0	0,00	0	0,00	1,0000
-964A/-964A	6	10,71	9	13,04	0,7861
-964A/-964G	29	51,78	32	46,38	0,5921
-964G/-964G	21	37,50	28	40,58	0,8540
-762T/-762T	11	19,64	8	11,59	0,3165
-762T/-762C	25	44,64	33	47,83	0,8570
-762C/-762C	20	35,71	28	40,58	0,5859
-725C/-725C	32	57,14	39	56,52	1,0000
-725C/-725G	13	23,21	14	20,29	0,8274
-725G/-725G	1	1,78	1	1,45	1,0000
-725T/-725C	10	17,86	13	18,84	1,0000
-725T/-725G	0	0,00	1	1,45	1,0000
-725T/-725T	0	0,00	1	1,45	1,0000

TABELA 17. (continuação) COMPARAÇÃO DA FREQÜÊNCIA GENOTÍPICA DOS SNPs DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *HLA-G* ENTRE MULHERES PACIENTES (n:56) E MULHERES CONTROLE (n: 69)

Genótipos	Mulheres Pacientes		Mulheres Controles		*Valor de P*
	n	%	n	%	
-716G/-716G	11	19,64	8	11,59	0,3165
-716G/-716T	25	44,64	33	47,83	0,8570
-716T/-716T	20	35,71	28	40,58	0,5859
-689G/-689G	11	19,64	8	11,59	0,3165
-689G/-689A	25	44,64	33	47,83	0,8570
-689A/-689A	20	35,71	28	40,58	0,5859
-666T/-666T	11	19,64	8	11,59	0,3165
-666T/-666G	25	44,64	33	47,83	0,8570
-666G/-666G	20	35,71	28	40,58	0,5859
-633A/-633A	11	19,64	8	11,59	0,3165
-633A/-633G	25	44,64	33	47,83	0,8570
-633G/-633G	20	35,71	28	40,58	0,5859
-486C/-486C	11	19,64	8	11,59	0,3165
-486C/-486A	25	44,64	33	47,83	0,8570
-486A/-486A	20	35,71	28	40,58	0,5859
-477G/-477G	11	19,64	16	23,19	0,6681
-477G/-477C	28	50	31	44,93	0,5935
-477C/-477C	17	30,35	22	31,88	1,0000
-369A/-369A	11	19,64	16	23,19	0,6681
-369A/-369C	27	48,21	31	44,93	0,7225
-369C/-369C	18	26,09	22	31,88	1,0000
-201G/-201G	6	10,71	9	13,04	0,7861
-201G/-201A	29	51,78	32	46,38	0,5921
-201A/-201A	21	37,50	28	40,58	0,8540
-56C/-56C	45	80,36	49	71,01	0,2984
-56C/-56T	11	19,64	20	28,99	0,2984
-56T/-56T	0	0,00	0	0,00	1,0000

6.5 ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO: COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DO FRAGMENTO DE 14 PARES DE BASES NO ÉXON 8 (14pb/del) DO GENE *HLA-G*

Os dados sobre polimorfismo foram retirados do banco de dados do LIGH sendo que os responsáveis pela análise das amostras e determinação dos

genótipos foram o ex-aluno de mestrado Paulo Sarturi (SARTURI, 2002), e o ex-aluno de doutorado Rafael Vargas (VARGAS, 2009).

As freqüências alélicas da deleção do fragmento de 14 pares de bases no éxon 8 do gene *HLA-G* foram comparadas ente os grupos paciente (n=120) e o grupo controle na tabela 18. Também foram comparadas as mesmas freqüências considerando separadamente entre mulheres e homens segundo as tabelas 19 e 20. Não foi encontrada diferença significativa entre as freqüências totais dos grupos paciente e controle. Igualmente as comparações entre as freqüências alélicas e genotípicas masculinas e femininas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

TABELA 18. FREQÜÊNCIAS ALÉLICAS DA DELEÇÃO DO FRAGMENTO DE 14 PARES DE BASES NO ÉXON 8 DO GENE HLA-G

Exon 8	Pacientes (n=120)		Controles (n=136)		*Valor de P*
	n	%	n	%	
14	82	34,17	110	40,44	
Del	158	65,83	162	59,56	0,1449

TABELA 19. FREQÜÊNCIAS ALÉLICAS DA DELEÇÃO DO FRAGMENTO DE 14 PARES DE BASES NO ÉXON 8 DO GENE HLA-G EM MULHERES

Exon 8	Mulheres Pacientes (n=60)		Mulheres Controles (n=68)		*Valor de P*
	n	%	n	%	
14	46	38,33	54	39,71	
del	74	61,67	82	60,29	0,8863

TABELA 20. FREQÜÊNCIAS ALÉLICAS DA DELEÇÃO DO FRAGMENTO DE 14 PARES DE BASES NO ÉXON 8 DO GENE HLA-G EM HOMENS

Exon 8	Homens Pacientes (n=60)		Homens Controles (n=68)		*Valor de P*
	n	%	n	%	
14	36	30,00	56	41,18	
del	84	70,00	80	58,82	**0,0687**

A comparação das freqüências genotípicas entre casais paciente e controle são mostradas na tabela 21, não apresentando diferenças significativas. A comparação ente as freqüências femininas e masculinas são mostradas nas

tabelas 22 e 23. A freqüência dos genótipos heterozigotos 14/del e homozigoto del/del são estatisticamente similares nos dois grupos. O genótipo homozigoto 14/14 apresentou uma freqüência maior nos controles (P=0,0412; O.R.=0,42, I.C.95%:[0,19 – 0,93])

TABELA 21. FREQÜÊNCIA GENOTIPICAS DA DELEÇÃO DO FRAGMENTO DE 14 PARES DE BASE NO ÉXON 8 DO GENE HLA-G

Genotipos	Pacientes (n=120)		Controles (n=136)		*Valor de P*
	n	%	n	%	
14/14	10	8,33	24	17,65	**0,0412**
14/del	68	56,67	61	44,85	**0,0618**
del/del	42	35	51	37,5	0,6979

TABELA 22. FREQÜÊNCIAS GENOTÍPICAS DA DELEÇÃO DO FRAGMENTO DE 14 PARES DE BASE NO ÉXON 8 DO GENE HLA-G EM MULHERES

Genótipos	Mulheres Pacientes (n=60)		Mulheres Controles (n=68)		*Valor de P*
	n	%	n	%	
14/14	6	10,00	12	17,65	0,3086
14/del	34	56,67	29	42,65	0,1562
del/del	20	33,33	27	39,71	0,4694

TABELA 23. FREQÜÊNCIAS GENOTÍPICAS DA DELEÇÃO DO FRAGMENTO DE 14 PARES DE BASE NO ÉXON 8 DO GENE HLA-G EM HOMENS

Genótipos	Homens Pacientes (n=60)		Homens Controles (n=68)		*Valor de P*
	n	%	n	%	
14/14	4	6,67	12	17,65	**0,0676**
14/del	34	56,67	32	47,06	0,2934
del/del	22	36,67	24	35,29	1,0000

6.6 ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO: COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DO SÍTIO POLIMÓRFICO -725C/G e 14pb/DEL

Quando comparadas as freqüências de portadores entre Homens Pacientes e Homens Controles observou-se uma diferença significativa (P=0,0083). Quando comparados os Casais Paciente e Controle também foi observada uma diferença

significativa, porém com um valor de P próximo ao limiar de significância (P=0,0453) (tabela 24).

TABELA 24. COMPARAÇÃO DAS FREQÜÊNCIAS DE PORTADORES DA DELEÇÃO DE 14 PARES DE BASES NO ÉXON 8 E DO ALELO -725G NO GENE *HLA-G*

Grupo	Homens		Mulheres		Casais	
	n	%	n	%	n	%
Pacientes (n=112)	16	28,57	10	17,86	6	10,71
Controles (n=136)	6	8,82	14	20,59	1	1,47
Valor de P	**0,0083**		0,8204		**0,0453**	

6.7 RAZÃO DE PROBABILIDADES *Odds Ratio* (OR)

Foi realizado o teste da razão de probabilidades Odds Ratio para estas amostras comparando as freqüências dos portadores do SNP -725G (Tabela 25) e dos portadores do SNP -725G mais a deleção de 14 pares de bases no éxon 8 de do gene *HLA-G* (Tabela 26).

Segundo os valores apresentados na tabela 25, os casais em que o homem é portador do SNP -725G, apresentam uma probabilidade quase cinco vezes maior de ocorrer episódios de abortamentos (OR:4,9737). Quando o SNP está presente no homem e na mulher o risco é de aproximadamente oito vezes e meio, porém, o valor de P ficou próximo do limiar de significância (P=0,0477).

Para os homens portadores do SNP -725G e da deleção de 14 pares de bases (Tabela 26), o risco aumenta em aproximadamente cinco vezes (OR:4,9737). Quando os dois membros do casal portam os dois alelos o risco aumenta para aproximadamente oito vezes e meio (OR:8,6250).

TABELA 25. RAZÃO DE PROBABILIDADES (*Odds Ratio*) DA FREQUENCIA DE PORTADORES ENTRE HOMENS E CASAIS DO GRUPO PACIENTE (N= 112) VERSUS: HOMENS E CASAIS DO GRUPO CONTROLE (N= 138) PARA O SNP -725C/G DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *HLA-G*

	GP (%)	GC (%)	OR	IC (95%)	*Valor de P*
Homens	18 (32,1)	6 (8,7)	4,9737	1,82 – 13,63	0,0021
Casais	7 (12,5)	1 (1,45)	8,6250	1,03 – 72,2	0,0477

TABELA 26. RAZÃO DE PROBABILIDADES (*Odds Ratio*) ENTRE HOMENS E CASAIS DO GRUPO PACIENTE (N= 112) VERSUS: HOMENS E CASAIS DO GRUPO CONTROLE (N= 136) PARA O SNP -725C/G DA REGIÃO PROMOTORA E O SÍTIO POLIMORFICO 14pb/del DA REGIÃO 3´ UTR DO GENE *HLA-G*

	GP (%)	GC (%)	OR	IC (95%)	*Valor de P*
Homens	16 (28,57)	6 (8,82)	4,13	1,49 -11,45	0,0086
Casais	6 (10,71)	1 (1,47)	8,04	0,94 – 68,92	0,0675

6.10 HAPLÓTIPOS E FREQÜÊNCIAS HAPLOTÍPICAS

TABELA 27. HAPLÓTIPOS OBSERVADOS NO GRUPO PACIENTE E CONTROLE

ID. Hapl.	n: obs.	Freq.	1306 A/G	1179 G/A	1155 G/A	1140T/A	1138 A/G	1121 C/T	964 A/G	762 T/C	C/G/T	716 G/T	689 G/A	666 T/G	633 A/G	486 C/A	477 G/C	369 A/C	201G/A	56C/T
1 C	84	0,3043	G	A	G	A	A	C	G	C	C	T	A	G	G	A	C	C	G	C
2 C	71	0,2572	A	G	G	T	A	C	A	T	C	G	G	T	A	C	G	A	A	C
3 P	49	0,2188	G	A	G	A	A	C	G	C	C	T	A	G	G	A	C	C	G	C
4 P	37	0,1652	A	G	G	T	A	C	A	T	C	G	G	T	A	C	G	A	A	C
5 P	26	0,1161	G	A	G	A	A	C	G	C	G	T	A	G	G	A	C	C	G	C
6 P	23	0,1027	G	A	G	A	A	C	G	T	C	G	G	T	A	C	G	A	G	C
7 P	11	0,0491	G	A	G	A	A	C	G	C	T	T	A	G	G	A	C	C	G	C
8 P	11	0,0491	A	G	G	T	A	C	A	C	C	T	A	G	G	A	C	C	A	C
9 P	10	0,0446	G	A	G	A	A	T	G	C	C	T	A	G	G	A	C	C	G	T
10 P	10	0,0446	G	A	G	A	A	T	G	T	C	G	G	T	A	C	G	A	G	T

A letra letra P representa o grupo paciente e a letra C representa o grupo controle

A tabela 27 apresenta o total de haplótipos observados nos grupos paciente e controle com freqüência acima de 0,05 ou próxima a 0,05. Haplótipos com freqüência menor que 0,05 foram desconsiderados, pois a possibilidade de serem verdadeiros seria baixa. Para confirmar a presença dos demais haplótipos será necessário clonar as amostras onde observa-se SNPs heterozigotos.

A obtenção destas fases haplotípicas, foi calculada utilizando o programa A*rlequim.* O pequeno numero de amostras pode influenciar na apresentação de haplótipos duvidosos.

6.11 SÍTIOS CRE/TRE

Foi investigada a região para os três possíveis sítios CRE/TRE (GOBIN *et al.* 2002). Não foi encontrado nenhum polimorfismo nesta região. A região onde se encontram os três sítios (designado, CRE $_{-1380}$, CRE $_{-930}$, CRE $_{-770}$) é bastante conservada nas amostras utilizadas para seqüenciamento (Grupo Paciente N=112 e Grupo Controle N=138).

7. DISCUSSÃO

O propósito do presente estudo foi investigar uma possível influencia dos polimorfismos de base única (SNPs) na região promotora/reguladora no contexto da gestação. Foram comparadas as freqüências alélicas, genotípicas e fenotípicas dos alelos de HLA-G observados em casais brasileiros com histórico de abortamento espontâneo recorrente com a freqüência de casais do grupo controle (sem histórico de abortamento). Também foi comparado os resultados obtidos neste trabalho em conjunto com informações pertencentes ao banco de dados do Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH) sobre a região de 14pb da região 3´UTR (exon 8).

O tamanho da amostra (n) é um ponto importante quando se analisa estatisticamente um grupo de resultados. Uma amostra constituída por poucos indivíduos aumenta a possibilidade de um erro e portanto, quanto maior a amostra mais confiáveis serão os resultados obtidos. Por exemplo, alguns SNPs dos quais a comparação de suas freqüências apresentaram valores que estavam próximos ao limiar de significância (SNP -1306 valor de P=0,0609).

A amostra do presente trabalho é constituída de 112 indivíduos ou seja, 56 casais do grupo paciente e 138 indivíduos, 69 casais que fazem parte do grupo controle. O estudo de casais com abortamento recorrente feito pelo LIGH, está em atividade desde 1997.

No estudo de famílias realizado por OBER et al. (2003) ,em uma comunidade de Hutterites ao longo de mais de 15 anos, foram acompanhadas 474 gestações, sendo que, 74 gestações terminaram em abortamento. Não houve mulheres que se enquadrassem nos casos de abortamento espontâneo recorrente, porém, elas fazem parte do grupo de gestantes com abortamento por causa desconhecida.

Para a realização do estudo semelhante ao de OBER, realizado na polônia por Sipak-Szmigiel *et al.* (2007), foram selecionados 58 casais do grupo paciente e 58 casais para o grupo controle.

Outro estudo também com casais que apresentavam um histórico de abortamento recorrente realizado na Grécia por VARLA-LEFTERIOTI e colaboradores (2003), contou com 26 casais que faziam parte do grupo paciente e 26 casais do grupo controle. Neste estudo o foco principal eram os receptores das células exterminadoras naturais.

No sul da Índia SURYNARAYANA *et al.* (2008), estudaram a região do exon 8 do gene HLA-G para verificar se havia alguma relação entre o polimorfismo 14pb/del 3´UTR e os episódios de abortamento recorrente em casais desta população. Para este estudo contaram com 169 mulheres que faziam parte do grupo paciente e 92 mulheres que fizeram parte do grupo controle.

Os estudos de abortamento espontâneo recorrente, como pode ser verificado nos trabalhos acima citado, tem como característica a dificuldade em obter uma amostra composta por um numero grande de participantes. Esta dificuldade existe devido a raridade da ocorrência de abortamentos que se enquadre no caso clinico considerado um AER por causa desconhecida, ou seja, deve ter ocorrido no mínimo três vezes consecutivas, e não deve se enquadrar em nenhuma outra causa como trissomias, alterações anatômicas uterinas, problemas hormonais, hematológicos, infecciosos, etc.

Comparada com o tamanho amostral dos artigos acima citados, o tamanho amostral do presente trabalho conta com um número de casais dentro de um valor aceitável para futuras publicações.

7.1 DETERMINAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA (SNPs) NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *HLA-G*

O gene HLA-G é conhecido por ser pouco polimórfico (36 alelos atualmente). Porém, sua região promotora apresenta vários sítios polimórficos, sendo que foram identificados até o momento 27 SNPs nesta região. No estudo presente, foi encontrado 18 SNPs sendo que todos já haviam sido identificados e divulgados na literatura. Não foi observado novos SNPs nesta amostra. Dentre todos os SNPs conhecidos nesta região, o SNP –725C>G>T o qual foi o único que apresentou uma possível relação com os episódios de abortamento espontâneo

recorrente (alelo -725G) segundo a literatura, foi observado nas amostras analisadas neste estudo. Os demais SNPs encontrados foram: e -1306A>G, -1179G>A, -1155G>A, -1138A>G, -1140T>A, -1121C>T, -964A>G, -762T>C, -716G>T, -689G>A, -666T>G, -633A>G, -201A>G, -486C>A, -477G>C, -369A>C, -56C>T. Como não foi encontrado todos os 27 SNPs descritos por OBER et al. (2006), pode-se supor que estes 18 SNPs são mais comuns enquanto que os demais são mais raros. Também é possível que já tenha sido descritos quase todos as variações possíveis nesta região (região promotora do gene *HLA-G*)

7.2 ANALISE DAS FREQÜÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS SNPs DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *HLA-G*

O SNP -725C>G>T que segundo OBER *et al.*, (2003 e 2006) foi relacionado com os episódios de abortamento recorrente em Huterittes, apresentou na amostra do presente trabalho, uma diferença na freqüência do alelo -725G. O teste para amostras independentes apresentou um valor de *P*: 0,0469, ou seja, as freqüências isoladas do alelo -725G são diferentes nas duas amostras. Apesar de o teste estatístico indicar que há diferenças entre as duas amostras, o valor de *P* ficou muito próximo do limite 0,05 para aceitar a hipótese de que o SNP -725G tenha alguma relação com os casos de abortamento recorrente. Como trata-se de amostras pequenas é preciso ter cautela tanto para aceitar a hipótese de que existe associação quanto para rejeitá-la. Os demais SNPS não apresentaram valores de P associado a diferenças em suas freqüências nos grupos paciente e controle (tabela 5).

A freqüência do alelo -725G em pacientes apresentada no presente trabalho (aproximadamente 0,15) (Tabela 5) está próxima a freqüência encontrada por OBER *et al.*, (2003) que era de 0,16 (Tabela 2).

O valor de *P* obtido para este SNP(*P*=0,0469) foi significante, indicando que as amostras são estatisticamente diferentes e que a ocorrência de abortamento pode estar relacionada com a freqüência deste SNP (Tabela 5).

Entretanto, o valor de *P* está próximo do limite de significância de 0,05, e devido ao número amostral pequeno, este resultado pode ser em decorrência de um desvio padrão.

As amostras foram estratificadas em amostras femininas e masculinas do Grupo Paciente e amostras masculinas e femininas do Grupo controle para uma análise mais detalhada dos SNPs. Com esta subdivisão foi possível visualizar melhor como se distribuíam as freqüências alélicas dos 18 SNPs dentro de cada grupo (controle e paciente). O teste de associação entres as freqüências alélicas femininas nos grupos paciente e controle não apresentou resultados significativos indicando que não existe diferenças na distribuição dos alelos para os 18 SNPs (Tabela 6).

O SNP -725C>G>T apresentou uma diferença entre as freqüências alélicas dos homens de cada grupo com relação as mulheres do mesmo grupo. A amostra feminina do grupo paciente apresentou uma freqüência para o alelo -725G igual a 0,13 enquanto que a amostra masculina do mesmo grupo apresentou uma freqüência igual a 0,16. No grupo controle a amostra feminina apresentou uma freqüência de aproximadamente 0,12, enquanto que a amostra masculina apresentou freqüência igual a 0,05.

O teste de associação para distribuição de alelos realizado para comparar as amostras masculinas, foi significativo para as freqüências dos SNPs -725 (P=0,0053) e -369 (P=0,0427) com valor de P próximo ao limiar de significância. Os demais SNPs não apresentaram valores de P que indiquem alguma diferença significativa na distribuição destes alelos nos grupos paciente e controle (Tabela 6).

No teste comparativo da razão de probabilidades (Odds Ratio) para as freqüências do alelo -725G ente os grupos paciente e controle (P=0,0348; OR: 1,8789, I.C.95%:[1,08-3,27]), indicam que a presença do alelo -725G aumenta em quase duas vezes a probabilidade de ocorrer um episodio de abortamento (Tabela 5).

O mesmo teste foi realizado contrastando as freqüências do alelo -725G entre as amostras masculinas paciente e controle (Tabela 6). O resultado indica

que a presença do deste alelo no homem, aumenta a probabilidade de ocorrer um episodio de abortamento em mais de três vezes (P=0,0053; O.R.:3,58, I.C.95%:[1,44-8,92]). Nesta mesma tabela esta sendo apresentado o resultado do teste OR para homens paciente e controle quanto as freqüências do alelo -369A. O resultado foi significativo (mas próximo ao limiar de significância), indicando que este alelo poderia estar relacionado ao risco de abortamento (P=0,0427; .O.R.:0,59, I.C.95%:[0,36-0,98]), também para o alelo -477G do qual o teste de associação para suas freqüências não apresentou valor significante mas muito próximo do limiar de significância (P=0,0578; .O.R.:0,6118 I.C.95%:[0,37-1,01]).

A freqüência do alelo -725G mais elevada no homens do grupo paciente que no grupo controle leva a uma serie de questões. Primeiro, considerando que SASAKI *et al.*,(1999) e CHRISTHIANSEN *et al.*, (1990) levantaram a hipótese de que o alelo HLA-G de origem paterna tem pouca ou nenhuma participação na interação e reconhecimento do feto na interface materno-fetal, e que segundo OBER *et al.*, (2003) o alelo -725G criaria uma região CpG onde a base C seria metilada e, portando, silenciando a expressão do gene. Neste caso, a presença do alelo -725G nas amostras masculinas do grupo paciente em maior freqüência que no grupo controle não poderia ter uma relação direta com a rejeição do embrião, pois este alelo contribuiria para que a expressão do gene paterno não ocorresse, o que já deveria acontecer naturalmente (a não expressão). Porém, segundo OBER *et al.*, (2006), ao analisar o alelo -725G e compará-lo com as variantes -725C e -725T, foi observado que a expressão das isoformas protéicas de HLA-G nos portadores desse alelo (-725G) é mais elevada que a dos demais alelos. Os autores supõem que taxas elevadas ou muito baixas na expressão de proteínas HLA-G poderia influenciar negativamente no processo gestacional. Se os resultados deste estudo forem comprovados, isto significa que os genes paternos das amostras do presente trabalho devem estar expressando seus produtos e, de alguma forma, influenciando no processo gestacional, neste caso para o episodio de abortamento. O alelo -725G também está presente nos homens do grupo controle, o que significa que mesmo nos casos onde o gene masculino é expresso, pode haver um processo gestacional bem sucedido.

Talvez não seja a expressão do gene materno e a não expressão do gene paterno que contribua para uma gestação bem sucedida, mas um equilíbrio entre as concentrações de ambos os produtos dos genes de origem materna e paterna.

Em diversos trabalhos disponíveis sobre a expressão de HLA-G os autores não levaram em consideração se a origem dos produtos do gene HLA-G era materna ou paterna. Estes trabalhos apenas quantificaram as concentrações dos produtos, no caso as isoforma protéicas de HLA-G, em células de origem tumoral OBER *et al.* (2006), em células de embriões (IVF) YAO; BARLOW & SARGENT, (2005), em células do endométrio ALEGRE *et al.* (2007), em decídua (HUNT *et al.*, 2007) e no fluído peritoneal (EIDUKAITE & TAMOSIUNAS, 2008).

Seria interessante verificar as taxas de expressão de HLA-G em embriões que apresentassem o alelo -725G identificando se o alelo ativo é de origem materna, paterna ou ambos.

7.3 FREQÜÊNCIAS GENOTÍPICAS E EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG

As Tabelas 7 e 8 mostram as freqüências genotípicas e o valor de P ao ser testado o equilíbrio de H-W nas amostras paciente e controle. Não foram observado SNPs que estivessem fora do equilíbrio.

As tabelas 9 e 10 apresentam os valores de P para o teste de associação entre as freqüências genotípicas dos SNPs presentes nos grupos paciente e controle. Somente os genótipos -725C/-725C (P=0,0182) e -725C/-725G (P=0,0157) apresentaram valores significantes, indicando que a distribuição dos genótipos entre os grupos paciente e controle são diferenciadas.

Comparando as amostras estratificadas dos grupos paciente (feminino e masculino) e controle (feminino e masculino) Tabelas 11, 12 e 13, observa-se que os SNPs -964A/G e 201G/A no grupo controle masculino estão fora do equilíbrio de H-W (P=0,0458), porém seu valor de P está próximo do limiar de significância. Igualmente, o SNP -1179G/A no grupo controle masculino apresentou valor de P=0,0510, que está no limiar de significância.

Ao estratificar as amostras paciente e controle o N amostral foi reduzido pela metade o que poderia estar influenciando os resultados observados. Considerando o SNP isoladamente, este pode não estar em equilíbrio de H-W devido ao desequilíbrio de ligação com outros SNPs, mas o haplótipo pode estar em equilíbrio de H-W.

No estudo de associação entre homens paciente e controle (Tabela 14) foram comparadas as freqüências genotípicas observando-se que os homozigotos -725C/-725C e heterozigotos -725C/-725G (P=0,0003 e P=0,0009 respectivamente) são estatisticamente diferentes quanto à distribuição dos genótipos.

As mesmas comparações foram realizadas com as amostras femininas paciente e controle. Não foi encontrada diferenças nas freqüências genotípicas que fossem evidenciadas pelos Valores de P (Tabelas 16 e 17).

A tabela 9 apresenta os valores do teste de razão de probabilidades (Odds Ratio) para as freqüências dos genótipos -725C/-725C (P=0,0182; O.R:0,5223, I.C.95%:[0,31-0,88]) e -725C/-725G (P= 0,0157; O.R.:2,29, I.C.95%:[1,21-4,34]). O valor de OR para o genótipo -725C/-725C indica que os portadores desse genótipo tem um efeito protetor reduzindo o risco de abortamento enquanto que, os portadores do genótipo -725C/-725G aumentam as probabilidades de ocorrer episódios de abortamento em aproximadamente duas vezes.

Os valores de OR ao comparar as freqüências genotípicas masculinas (tabela 14), indicam que a presença do genótipo -725C/-725C representa um risco aproximadamente quatro vezes menor de ocorrer episódios de abortamentos (P=0,0003; O.R.:0,2321, I.C.95%:[0,10-0,52]). A presença do genótipo -725C/-725G elevaria a probabilidade de risco de abortamento entre cinco e seis vezes (P=0,0009; O.R.:5,5795, i.C.95%:[1,91-16,33]).

Os resultados encontrados nas freqüências genotípicas corroboram com os encontrados nas freqüências alélicas. O SNP -725C/G/T parece estar relacionado com os episódios de abortamento segundo os dados estatísticos do presente trabalho. Esses resultados estão de acordo com os resultados divulgados por OBER *et al.* (2003) e discordam dos resultados divulgados por Sipak-Szmigiel *et*

al. (2007), que não encontrou nenhuma relação ente este SNP e os casos de AER.

É importante salientar que a estratificação das amostras permitiu visualizar melhor onde está a diferença de freqüências genotípicas assim como ocorreu com as freqüências alélicas. Está claro que as freqüências genotípicas masculinas estão influenciando o resultado do grupo quanto a associação dos alelos com os casos de AER.

7. 4 SNP -725C/G/T NA REGIÃO PROMOTORA E A DELEÇÃO DE 14 PARES DE BASES NA REGIÃO 3´UTR (EXON 8) DO GENE *HLA-G*

A deleção de 14 pares de bases te sido associada aos casos de abortamento recorrente em vários trabalhos onde se fez um estudo de caso controle. Os alelos que possuem os 14pb, perdem 92pb na região 3´UTR no momento em que ocorre o processamento alternativo do RNAm. Esta deleção estaria alterando o padrão de expressão de RNAm, e estes 92pb são mantidos e os RNAm seriam menos estáveis (SURYNARAYANA *et al.* 2008; HVIID *et al.* 2002).

O estudo de associação para as freqüências alélicas não apresentou valores significantes (tabelas 18, 19 e 20). Ao comparar as freqüências genotípicas (tabela 21), foi encontrada associação para o genótipo 14/14 (P=0,0412) sendo que a freqüência foi maior no grupo controle. O OR (O.R:0,42, I.C.95%:[0,19-0,93]), o que representaria um efeito protetor para os portadores. O resultado parece contraditório, com os primeiros estudos sobre esta deleção mas, segundo HVIID *et al.,*(2004) a presença da deleção de 14pb aumentaria a estabilidade do RNAm aumentando as chances de uma gestação segura.

A tabela 24 apresenta os valores do estudo de associação para as freqüências de portadores do alelo -725G e a deleção de 14 pares de bases. Comparando as freqüências masculinas paciente/controle, observou-se um valor de P=0,0083 e para os casais, em que os cônjuges apresentaram as duas

variações, o valor de P=0,0453 (próximo ao limiar de significância). O valor de P não foi significante para as freqüências femininas.

Foi feito o teste da razão de probabilidades para homens e casais portadores do SNP -725G (Tabela 25). Ao comparamos as freqüências masculinas foi encontrado um valor de OR=4,9737 (P=0,0021; I.C.95%:[1,82-13,63]) o que indica que a presença do alelo -725G poderia elevar o risco de abortamento em aproximadamente 5 vezes com relação àqueles casais em que o homem não apresenta este alelo. Este resultado também está de acordo com os resultados já observados comparando as freqüências alélicas e genotípicas destas amostras. A presença do alelo -725G nos homens está relacionada ao risco de abortamento. Em mulheres o alelo -725G poderia aumentar o risco de abortamento somente quando este estiver presente também no genoma paterno, como pode ser observado na tabela 29 ao comparar as freqüências dos casais portadores deste alelo. O valor de OR=8,6250 (P=0,0477; I.C.95%:[1,03-72,2]) o que representa um risco provável de aproximadamente oito vezes e meio de ocorrer um episódio de abortamento.

Quando comparadas as freqüências do alelo -725G e 14/del no mesmo portador (Tabela 26), somente os homens apresentaram um valor de P significante (P=0,0086; O.R:4,13, I.C.95%:[1,49-11,45]). A presença das duas variações podem representar um risco quatro vezes maior quando o homem é o portador.

7. 5 FREQÜÊNCIAS HAPLOTÍPICAS

O número de haplótipos encontrado no presente trabalho está muito acima daquele encontrado por OBER. *et al.* (2003) e OBER *et al.* (2006) em Hutterites. Neste grupo de Hutterites foi observado somente sete haplótipos. Possivelmente o número pequeno de haplótipos foi em decorrência do número inicial de haplotipos nesta comunidade. Segundo OBER e colaboradores (2003), 51 haplótipos ancestrais estavam presentes nos primeiros colonizadores. A amostra estudada, representou apenas uma parte deste haplótipos ancestrais.

No presente estudo, o numero elevado de haplótipos pode ser um artifício do programa *Arlequim* utilizado para calcular as fases haplotípicas. Para evitar a apresentação de haplótipos duvidosos, somente aqueles observados com maior freqüência foram considerados confiáveis. Os demais haplótipos devem ser confirmados ao clonar amostras que apresentem SNPs heterozigotos.

8. CONCLUSÃO

A análise da região promotora do gene *HLA-G* em casais com histórico de abortamento espontâneo recorrente comparado aos casais sem histórico de abortamento, permitiu chegar as seguintes conclusões:

- A presença do alelo -725G em mulheres com histórico de abortamento recorrente não estaria associada aos casos de abortamento;

- Os valores de OR ao comparar as freqüências genotípicas masculinas, indicam que a presença do genótipo -725C/-725C representa um risco aproximadamente quatro vezes menor de ocorrer episódios de abortamentos.

- No presente estudo observou-se que presença do alelo -725G em homens pode representar um risco maior de ocorrer episódios de abortamentos;

- A presença do genótipo -725C/-725G elevaria a probabilidade de risco de abortamento entre cinco e seis vezes.

- Os casais em que ambos os cônjuges apresentam o alelo -725G, tem maiores chances de desenvolverem um episodio de abortamento;

- A deleção de 14 pares de bases do éxon 8, apresentou um possível efeito protetor

- A presença simultânea do alelo -725G e do polimorfismo 14del em homens e nos casais (não em mulheres) foi associada aos episódios de abortamento, mas necessita de mais estudos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J.S. **Imunologia Celular e Molecular**. 4.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003. 486p.

ABRAMSON, J.; STAGNAARO-GREEN, A. Thyroid antibodies an fetal loss: an envolving story. **Thyroid**, v.11, p. 57-63, 2001;

ALEGRE, E; DIAZ-LAGARES, A; LEMAOULT, J; LOPEZ-MARATALLA, N; CAROSELLA, E. D; GONZALEZ, A. Maternal antigen presenting cells are a souce of plasmatic HLA-G during pregnancy: Longitudinal study during pregnancy. **Human Immunology**. v. 68, p. 661-667, 2007;

ALFONSO,C.; KARISSON, L. Nonclassical MHC class II molecules. **Annual Review of Immunology** V 18, p. 113-142, 2000;

ANOKUTE, C. C. Epidemiology of spontaneous abortions: the effects of alcohol consumption and cigarette smoking. **Journal of National Medical Association**. v. 78, p. 771-775, 1986;

BAHRI, R; HIRSCH, F; JOSSE, A; ROUAS-FREISS, N; BIDERE, N; VASQUEZ, A; CAROSELLA, E. D; CHARPENTIER, B; DURRBACH, A; Soluble HLA-G inhibits cell cycle progression in human alloreactive T lymphocytes. **The journal of immunology**, v.176, p. 1331 – 1339, 2006;

BELL, J. Chromosome crawling in the MHC, **Trends in Genetics**, V.5, n. 9, p. 289-290, 1989;

BOTELLA, T. J. The endometrium in repeated abortion. **International journal of fertility**, v. 7, p. 147-149, 1962;

BOTTINO, C; CASTRICONI, R; MORETTA, L; MORETTA, A: Cellular ligands of activating NK receptors. **TRENDS in Immunology**, v. 26, p. 221-226, 2005;

BOUÉ, J; BOUÉ, A; LAZAR, P. Retrospective and prospective epidemiological studies of 1500 kayotyped spontaneous human abortions. **Teratology**, v. 12, p. 11-26, 1975;

BOUÉ, J.G; BOUÉ, A.Chromosomal anomalies in early spontaneous abortion. (Their consequences on early embryogenesis and in vitro growth of embryonic cells). **Current topics in pathology. Ergebnisse der Pathologie**; V.62, P. 193-208, 1976;

BUTTRAM, V. C; GIBBONS, W. E. Mullerian anomalies: a proposed classification (an analysis of 144 cases). **Fertility and sterility**., v. 32, p. 40 , 1979;

CAETANO, M. R; COUTO, E; JUNIOR, R. P; SIMONI, R. Z; BARINI, R. Gestational prognostic factors in women with recurrent spontaneous abortion. **Sao Paulo Medical Journal**., v. 124(4), p. 181-185,2006;

CARP, H. J. A; TODER, V; MASHIACH, L; SERR, D. M. Recurrent miscarriage: a review of current concepts, immune mechanisms, and results of treatment. **Obstetrical & gynecological survey**, v. 45, p. 657-669, 1990;

CAROSELLA, E. D; ROUAS-FREISS, N; PAUL, P; DAUSSET, J. HLA-G: a tolerance molecule from the major histocompatibility complex. **Immunology today**, v. 20, n. 2, p. 60-62, 1999;

CAROSELLA, E. D; DAUSSET, J; KIRSZENBAUM, M. HLA-G revised. **Immunology today**, v. 17, n.9, p. 407-409, 1996;

CARR,D. R. Chromosome studies in selected spontaneous abortions: 1 conception after oral contraceptives. **The Canadian Medical Association Journal**, v. 103, p. 343-348, 1970;

CARVALHO, E. C. C. Estudo comparativo da frequências de fatores trombogênicos entre mulheres com aborto espontâneo recorrente e mulheres férteis. [**tese**]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas/Faculdade de Ciências Médicas; 2001.

CLARK, D; ARCK, P. C; JALILI, R; MERALI, F. S; MANUEL, J; CHAOUAT, G; UNDERWOOD, J; MOWBRAY, J. F: Psyco-neurocitokine/ endocrine pathways in immunoregulation during pregnance. **American journal Reproductive immunology**, v. 35, p. 330-337, 1996;

CLEMENTS, C. S; KJER-NILSEN, L; KOSTENKO, L; HOARE, H. L; DUNSTONE, M. A; MOSES, E. Crystal structure of HLA-G: A nonclassical MHC class I molecule expressed at the fetal-maternal interface. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 9, p. 3360-3365, 2005;

CLIFFORD, K; RAI, R; REGAN, L. Future pregnancy outcome in unexplained recurrent first trimester miscarriage. **Human reproduction**, v. 12, p. 387-389, 1997;

COSTA, H.L.F.F. Auto-imunidade e perda conceptual. (**tese de doutorado**). ribeirão preto, Universidade Federal de Ribeirão Preto, 1994.

COULAM, C. B. Recurrent pregnancy loss. **Clinical obstetrics and gynecology**. v. 29, p. 863-867, 1986;

CHRISTIANSEN, O. B.; GRUNNET, N.; LAURITSEN, J. G.; MATHIESEN, O. Idiopathic recurrent spontaneous abortion – Evidence of a familial predisposition. **Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v. 69, p. 597-601, 1990;

DIEHL, M; MUNZ, C; KEIHOLZ, W; STEVANOVIA, S; HOLMES, N; LOKE, Y. W; RAMMENSEE, H. G. Nonclassical HLA-G molecules are classical peptide presenters. **Current Biology**, v. 6, n.3, p. 305-314, 1996;

DUNHAN, I; SARGENT, C. A; TROWSDADE, J; CAMPBELL, R. D. Molecular mapping of the human major histocompatibility complex by pulse-field gel eletroforesis**. Proceedings of National Academy of Science of the United States of America**, v. 84, p. 72-75, 1987;

EIDUKAITE, A; TAMOSIUNAS, V. Soluble HLA-G in the peritoneal fluid of women with endometriosis. **Fertility and Sterility**, v. 89, p. 465-467, 2008;

ELLIS, S. A; PALMER, M. S; McMICHAEL, A. J. Humam trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA Class I molecule. **The Journal of Immunology**, v. 144, p. 731-735, 1990;

Excoffier, L. G. Laval, and S. Schneider (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online 1:47-50.

EMMER, P. M; VEERHOEK, M; NELEN, W. L. D. M; STEEGERS, E. A. P; JOOSTEN, I. Natural Killer cell reactivity and HLA-Gin recurrent spontaneous abortion. **Transplantation Procedings**, v. 31, p. 1838-1840, 1999;

GERAGHTY, D. E.; KOLLER, B. H.; ORR, H. T. A Human major histocompatibility

complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmatic segment. **Proceedings of National Academy of Science of United States of America**, Washington, v. 84, p. 9145, 1987;

GLUECK, C. J; AWADALLA, S.G; PHILLIPS, H; CAMERON, D; WANG, P; FONTAINE, R. N. Polycystic avary syndrome, infertility, familial thrombophilia, familial hypofibrinolysis, recurrent loss of in vitro fertilized embrio, and miscarriage. **Fertility and Sterility**, v. 74, p. 394-397, 2000;

GOBIN, S. J. P.; BIESTA, P; ATEENWINKEL, J. E. M; DATEMA, G; VAN DEN ELSEN, P. J. HLA-G transactivation by cAMP- resposnse element-binding protein (CREB) an alternative transactivation pathway to the conserved major histocompatibility complex (MHC) classI reguratory routes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 39525 – 39531, 2002;

GOBIN, S. J. P.; VAN DEN ELSEN, P. J. Transcriptional regulation of the MHC class Ib genes HLA-E, HLA-F and HLA-G. **Human Immunology**, v. 61, p. 1102-1107, 2000;

GOBIN, S. J. P; KEIJSERS, V; CHEONG, C; ZUTPHEN, M; VAN DEN ELSEN, P. J. Transcriptional regulation of HLA-G. **Transplantation Procedings**, v. 31, p. 1710-1716, 1999;

GURKA, G; ROCKLIN, R. E. Reproductive immunology. **The Journal of the American Medical Association**, v. 258, p. 2983-2987, 1987;

HARGER, J. D; ARCHER, D. F; MARCHESE, S. G; MURACCA-CLEMENTS, M; GARVER, K.L. Etiology of pregnancy losses and outcome of subsequent pregnancies. **Obstetrics and Gynecology**., v. 62, p. 574-581, 1983;

HOMER, H. A.; LI, T. C.; COOKE, L. D. The septate uterus: a review of management and reprodutive outcome. **Fertility and Sterility**, v.73, p. 1-14, 2000.

HORTON, R; WILMING, L; RAND, V; LOVERING, R. C; BRUFORD, E. A; KHODIYAR, V. K; LUSH, M. J; POVEY, S; TABBOT Jr, C. C; WRIGHT, M. W; WAIN, H. M; TROWSDALE, J; ZIEGLER, A; BECK, S. Gene map of the extended human MHC**. Nature Reviews Genetics**, v. 5, p. 889-899, 2004;

http://genome.ucsc.edu/ .

HUNT, J. S; MORALES, P. J; PACE, J. L; FAZLEABAS, A. T; LANGAT, D. K. A commentary on gestational programming and functions of HLA-G in pregnancy. **Placenta**, v. 21, p. 57 – 63, 2007;

HUNT, J. S; PETROFF, M. G; MORALES, P; SEDLMAYR, P; GERAGHTH, D. E; OBER, C. HLA-G in reproduction : studies on the maternal-fetal interface. **Human Immunology**, v. 61, p1113-1117, 2000;

HVIID, T V F *et al.* Association between human leukocyte antigen-G genotype and success of in vitro fertilization and pregnancy outcome. **Tissue Antigens**, v. 64, p. 66-9, 2004.

HVIID, T.V.; HYLENIUS, S.; HOEGH, A.M.; KRUSE, C.; CHRISTIANSEN, O.B. HLA-G polymorphisms in couples with recurrent spontaneous abortions. **Tissue Antigens**, v. 60, p.122-132. 2002.

HVIID, T. V; MELDGAARD, M; SORENSEN, S; MORLING, N. Polymorphism of exon 3 of the HLA-G gene. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 35, p. 20-28, 1997;

HYLENIUS, S; ANDERSEN, A-M. N; MELBY, M; HVIID, T. V. Association between HLA-G genotype and risk of preeclampsia: a case-control study using family triads. **Molecular Human Reproduction**, v.10, n. 4, p. 237-246, 2004;

JANEWAY, C.A; TRAVES, P; WALPORT, M; SHLOMCHIK, M. **Imunobiologia o sistema imune na saúde e na doença**. 4. ed. Porto alegre: Artmed, P. 557-559; 2002.

JONES, G. E. S; DELFS, E. Endocrine patters in term pregnacies following abortion. **The Journal of the American Medical Association**, v. 146, p. 1212-1216, 1951;

KELLEY J, WALTER L, TROWSDALE J. Comparative genomics of major histocompatibility complexes **Immunogenetics**, v. 56, p. 683-695. 2005.

KING, A; BURROWS, T; LOKE, Y. W: Human uterine natural killer cells. **Natural Immunology**, v. 5, p. 41-45, 1996;

KOVATS, S; MAIN, E. K; LIVRACH, C; STUBBLEBINE, M; FISHER, S. J; DeMARS, R. A class I antigen, HLA-G expressed in human trophoblast. **Science**, v. 248, p. 220-223, 1990;

KURUP, M.; GOLDKRAND, J. W. Cervical incompetence: eletive, emergent, or urgent cerclage. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. v. 181, p. 240-244,1999.

KWAK-KIM, J; GILMAN-SACHS, A. Clinical implication of Natural Killer cells and reproduction. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 59, p. 388-400, 2008;

LANGAT, D; MORALES, P. J; FAZLEABAS, J. S; HUNT, J. S. Potential regulatory sequences in the untranslated regions of the baboon MHC class Ib gene, Paan-AG, more closely resemble those in the human MHC class Ia genes than those in the classIb gene, HLA-G. **Immunogenetics**, v. 56, p. 657 -666, 2004;

LAMM, L. U; OLASEN, B. Report of the committe on the genetic constitution of chromosome 5 and 6. **Cytogenetics and Cell Genetics**, V. 40, p. 128, 1985;

LE BOUTEILLER, P; LEGRAND-ABRAVANEL, F; SOLIER, C. Soluble HLA-G1 at the materno-foetal interface- A review. **Placenta**, v. 17, p. 10-15, 2003;

LE BOUTEILLER, P; BARAKONYI, A; PIZZATO, N; SOLIER, C. HLA-G, pre-eclampsia, immunity and vascular events. **Journal of reproductive immunology**, v. 59, p. 219-234, 2003;

LEFEBVRE, S; ADRIAN, F; MOREAU, P; GOURAND, L; DAUSSET, J; BERRIH-AKNIN, S; CAROSELLA, E.D; PAUL, P. Modulation of HLA-G expression in human thymic and amniotic epithelial cells. . **Human Immunology**, v. 61, p.1095 – 1101, 2000;

LEFEBVRE, S; AKNIN, S; ADRIAN, F; MOREAU, P; POEA, S; GOURAND, L; DAUSSET, J; BERRIH-AKNIN, S; CAROSELLA, E.D; PAUL, P. A specific interferon (IFN)-stimulated response of the distal HLA-G promoter binds IFN – regulatory factor 1 and mediates enhancement of this nonclassical class I gene by IFN-β. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 6233 – 6139, 2001;

LILA, N; AMREIN, C; GUILLEMAIN, R; CHEVALIER, P; LATREMOUILLE, C; FABIANI, J. N; DAUSSET, J; CAROSELLA, E. D; CARPENTIER, A. Human leukocyte antigen-g expression after heart transplantation is associated with a reduced incidence of rejeition. **Circulation**, v. 105, n. 16, p. 1949-1954, 2002;

McALEER, M. F; TUAN, R. S. Cytotoxicant-induced trophoblast dysfunction and abnormal pregnancy outcomes: Role of zinc and metallothionein. **Birth Defects Research**, v. 72, p. 361-370, 2004;

Mc INTYRE, J. A; COULAM, C. B; FAULK, W. P. Recurrent spontaneous abortion. **American journal of reproductive immunology**, v. 21, p. 100-104, 1989;

MILLS, J.L. A prospective study of fetal losses in diabetic and control pregnancies from the third week post conception. ***Diabetes***, v. 34, p. 46-49, 1983;

MOREAU, P; MOUILLOT, G; ROUSSEAU, P; MARCOU, C; DAUSSET, J; CAROSELLA, E. D. HLA-G gene repression is reversed by demethylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, p. 1191 – 1196, 2003;

MOWBRAY, J. F; GIBBINGS, C; LIDDELL, H; REGINALD, P. W; UNDERWOOD, J. L; BEARD, R. W. Controlled trial of treatment of recurrent spontaneous abortion by immunisation with paternal cell. **Lancet**, v. 30, p. 941-943, 1985;

OBER, C.; BILLSTRAND, C.; KULDANEK, S; TAN, Z: The miscarriage-associated *HLA-G* -725G allele influences transcription rates in JEG-3 cells. **Human Reproduction**, v. 21, p. 1743-1748, 2006;

OBER, C.; ALDRICH, C.; CHERVONEVA, I.; BILLSTRAND, C.; RAHIMOV, F.; GRAY, H. L.; HYSLOP, T. Variation in the HLA-G promoter region influences miscarriage rates. **The American Society of Human Genetics**, v.72, p. 1425-1435, 2003;

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

PAUL, P; CABESTRE, F. A; IBRAHIM, E. C; LEFEBVRE, S; KHALIL-DAHER, I; VAZEUX, G; QUILES, R. N. M; BERMOUND, F; DAUSSET, J; CAROSELLA, E, D. Identification of HLA-G7 as a new splice variant of the HLA-G mRNA and expression of solubres HLA-G5, -G6, -G7 transcript in human transfected cells. **Human Immunology**, v. 64, n.11, p. 1138-1149, 2000;

PARHAN, P: NK cells and trophoblasts: partner in pregnancy. **The Journal Experimental Medicine**, v. 200, p. 951-955, 2004;

PAZMANY, L; MANDELBOIN, O; VALES-GOMEZ; DAVIS, D. M; BECKER, T. C; REYBURN, H. T; SEEBACH, J. D; HILL, J. A; STROMINGER, J. L. Human leukocyte antigen-G and its recognition by natural killer cells. **Journal of reproductive immunology**, v. 43, p. 127-137, 1999;

PIRRI, A; CONTIERI, F; BENVENUTTI, R; BICALHO, M. A study of HLA-G polymorphism and linkage disequibibrium in transplant patients and their donors. **Transplant Immunology**, v. 20, p. 143-149, 2009.

REGAN, C. L; Mc ADAM, B.F; Mc PARLAND, P; BOYLAN, P. C; FITZGERALD, G. A; FITZGERALD, D. J. Reduced fetal expossure to aspossure to aspirin using a novel controlled-release preparation in normotensive and hipertensive pregnancies. **Brazilian journal of obstetrics and gynecology**., v. 105, p. 732-738, 1998;

RIZZO, R; MELCHIORRI, L; STIGNANI, M; BARICORDI, O. R. HLA-G expression is a fundamental prerequisite to pregnancy. **Human Immunology**, v. 68, p. 244 – 250, 2007;

ROBINSON, W. P; BEEVER, C; BROW, C. J; SEPHENSON, M. D. Skewed X inactivation and recurrent spontaneous abortion. **Seminars in Reproductive Medicine**., v. 19, p. 175-181, 2001;

ROUAS-FREISS, N; MOREAU, P; FERRONE, S; CAROSELLA, E. D. HLA-G proteins in câncer; do they provide tumor cells with an escape mechanism. **Cancer research**, v. 65, p. 10139 – 10144, 2005;

ROUAS–FREISS, N; KHALIL-DAHER, I; GONÇALVES, R; MENIER, C; DAUSSET, J; CAROSELLA, E. D. Role of HLA-G in maternal-fetal immune tolerance. **Transplantation procedings**, v. 31, p. 724-725, 1999;

ROUSSEAU, P.; MASTERNAK, K.; KRAWCZYK, M.; REITH, W.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E. D.; MOREAU, P. In vivo, RFX5 binds differently to the human leukocyte antigen-E, -F and –G promoters and participates in HLA class I protein expression in a cell type-dependent manner. **Immunology**, v.111, n.1, p.53-65, 2004;

ROUSSEAU, P; PAUL, P; O'BRIEN, M; DAUSSET, J; CAROSELLA, E. D; MOREAU, P. The X1 box of HLA-G promoter is a target site for RFX and sp1 fators. **Human Immunology**, v. 61, p. 11032-1137, 2000;

ROUSSEV, R. G; COULAM, C. B. HLA-G and its role in implantation (review). **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**., v. 24, p. 288-295, 2007;

ROUSSEV, R. G; KAIDER, B. D; PRIDE, D. E; COULAM, C. B. Laboratory evaluation of women experiencing reproductive failure. **American Journal of Reproductive Immunology.** v. 35, p. 415-420, 1996.

SACHS, E. S; JOHODA, M.G. J; VAN HEMEL, J. O. Chromosome studies of 500 couples with two or more abortions. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**., v. 65, p. 375-378, 1985;

SARTURI, P. R. Variação genética nos exons 2, 3 e 8 de hla-g e sua relação com o abortamento recorrente. [**dissertação**]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2005.

SASAKI, H.; XU, X. C.; SMITH, D.; SHENOY, S.; LOWELL, J.; HOWARD, T.; MOHANAKUMAR, T. HLA-G expression protects porcine endothelial cells against natural killer cell-mediated xenogeneic cytotoxicity. **Transplantation**, v.67, p. 31-37, 1999;

SIPAK-SZMIGIEL, O; CYBULSKI, C; RONIN-WALKNOWSKA, E. HLA-G polymorphism in a Polish population and reproductive failure. **Tissue antigens**, v. 71, p. 67-71, 2007;

STAGNARO-GREEN, A; GLINOER, D. Thyroid autoimmunity and risk of miscarriage. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism.** v.18, p. 167-181, 2004.

STRAY-PETERSEN, B; STRAY-PETERSEN, S. Etiologic factors and subsequent reproductive performance in 195 couples with prior history of habitual abortation. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. v. 148, p. 140-144, 1984.

SUTHERLAND HW, PRITCHARD CW. Increased incidence of spontaneous abortion in pregnancies complicated by maternal diabetes mellitus. **American journal of obstetrics and gynecology**, v.156, p. 135-138, 1987.

SURYANARAYANA, V; RAO, L; KANAKAVALLI, M; PADMALATHA, V; RASESWARI, T; DEENADAYAL, M; SINGH, L. Association between novel HLA-G genotypes and risk of recurrent miscarriages: A case-control study in a south Indian population. **Reproductive Sciences**, doi: 10.1177/1933719107314061, 2008;

SVEJGAARD, A.; RYDER, L.P. HLA and disease associations: detecting the strongest association. **Tissue Antigens**. v. 43, n. 1, p. 18-27. Review. 1994;

VAN DEN ELSEN, P. J; GOBIN, S. J. P; VAN DER STOEP, N; DATEMA, G; VIËTOR, H. E; Transcriptional control of MHC genes in fetal trofoblast cells. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 52, p. 129 – 145, 2001;

VAN DER VEN, K; PFEIFFER, K; SKRABLIN, S. HLA-G polymorphisms and molecule function – question and more questions- a review. **Placenta**, v. 7, n. 4, p. 373-378, 2000;

VARGAS, R. G. Repertório dos genes kir e polimorfismos dos genes hla-cw, kir2dl4 e hla-g no abortamento recorrente. [**tese**]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2009.

VARLA-LEFTHERIOTE, M; SPYROPOULOU-VLACHOU, M; NIOKOU, D; KERAMITSOGLOU, T; DARLAMITSOU, A; TSEKOURA, C; PAPADIMITROPOULOS, M; LEPAGE, V; BALAFOUTAS, C; STAVROPOULOS-GIOKAS, C: Natural Killer (NK) cell receptors repertoire in couples with recurrent spontaneous abortions. **American Journal of Reproductive Immunology,** v. 49, p. 183-191, 2003;

VINGANÓ, P; CHIODO, I; MANGIONI, S; POMPEI, F. Maternal-conceptus cross talk-A review. **Placenta**, v. 00, p. 1-6, 2003;

YAO, Y. Q; BARLOW, D. H; SARGENT, I. L. Differential expression of alternatively spliced transcriptis of HLA-G in human preimplantation embryos and inner cell masses. **The Journal of immunology**, v. 175, p. 8379 – 8385, 2005;

YOKOHAMA, W. M: Recognition structures on natural killer cells. **Current Opinion in Immunology**, v. 5, p. 67-73, 1993;

ZIEGLER, A; KENTENICH, H; ZIEGLER, B. Female choice and the MHC. **TRENDS in immunology**, v. 26, n. 9, p. 498-502, 2005;

ZINAMAN, M. J; CLEGG, E. D; BROWN, C. C; O'CONNOR, J; SELEVAN, S. G. Estimates of human fertility and pregnancy loss. **Fertility and sterility**, v.65, p. 503-509, 1996;

WIENDL, H; MITSDOERFFER, M; HOFMEISTER, V; WISCHHUSEN, J; WEISS, E. H; DICHGANS, J; LOCHMULLER, H; HOHLFELD, R; MELMS, A; WELLER, M. The non-classical MHC molecule HLA-G protects human muscle cells from immune-mediated lysis: implications for myoblast transplantation and gene therapy. **Brain**, v. 126, p. 176-185, 2003;

http://genepop.curtin.edu.au/

www.antthonynolan.org.uk

ANEXOS

FICHA DE AVERIGUAÇÃO CASAL-PACIENTE

Laboratório de Imunogenética. Departamento de Genética – UFPR

PROJETO: Estudos genéticos sobre HLA e Fertilidade

CASAL PACIENTE

CASAL FER –

1 – Identificação do Casal

1 - Nome da mulher

2 - Data de Nasc. Idade G. Étnico

3 – Profissão G. Sanguíneo

4 – Nome do Marido

5 – Data de Nasc. Idade G. Étnico

6 – Profissão G. Sanguíneo

7 – Endereço: Nº

Apartamento Bairro Cidade Estado

CEP Tel. Res. Tel. Com.

2 – Dados do Casal Atual

1 – Data de união Consangüinidade: S N

2 – Idade da mulher ao se casar Grau de parentesco:

3 – Nº total de concepções: Abortos: Natimortos: N. vivos:

4 – Concepções: 1ª 2ª 3ª 4ª 5ª 6ª

5 – Outras uniões ou casamentos: Consangüinidade: S N

6 – Data da união: Nº de concepções:

7 – Idade da mulher ao se casar

3 – Antecedentes Maternos

1 – Concebe facilmente

2 – Usa método anticoncepcional? Há quanto tempo? Qual?

3 – Idade da primeira menstruação

4 – Enfermidade aguda? Especifique:

5 – Enfermidade crônica?

6 – Doença auto-imune?

7 – Recebeu transfusão sanguínea? Quando?

FICHA DE AVERIGUAÇÃO CASAL-PACIENTE - VERSO

Laboratório de Imunogenética. Departamento de Genética – UFPR

4 – Resumo da História Clínica

1 – Nome do médico

2 – Histórico

5 – Heredograma

6 – Outros fatores

1 – Fatores femininos

a) Problemas ovulatórios com Clamídias

b) Cervix incompetente

c) Síndrome de Asherman

d) Endometriose

e) Efeito da fase luteal

2 – Fatores masculinos

a) Prostatite

3 – Fatores do Casal

a) Infecção por Micoplasma

FICHA DE AVERIGUAÇÃO CASAL-CONTROLE

Laboratório de Imunogenética. Departamento de Genética – UFPR

PROJETO: Estudos genéticos sobre HLA e Fertilidade

CASAL CONTROLE

CASAL FER –

1 – Identificação do Casal

1 - Nome da mulher

2 - Data de Nasc. Idade G. Étnico

3 – Profissão G. Sanguíneo

4 – Nome do Marido

5 – Data de Nasc. Idade G. Étnico

6 – Profissão G. Sanguíneo

7 – Endereço: Nº

Apartamento Bairro Cidade Estado

CEP Tel. Res. Tel. Com.

2 – Dados do Casal Atual

1 – Data de união Consangüinidade: S N

2 – Idade da mulher ao se casar Grau de parentesco:

3 – Nº total de concepções: Abortos: Natimortos: N. vivos:

4 – Concepções: 1ª 2ª 3ª 4ª 5ª 6ª

5 – Outras uniões ou casamentos: Consangüinidade: S N

6 – Data da união: Nº de concepções:

7 – Idade da mulher ao se casar

3 – Antecedentes Maternos

1 – Concebe facilmente

2 – Usa método anticoncepcional? Há quanto tempo? Qual?

3 – Idade da primeira menstruação

4 – Enfermidade aguda? Especifique:

5 – Enfermidade crônica?

6 – Doença auto-imune?

7 – Recebeu transfusão sanguínea? Quando?

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

a) Você está sendo convidado a participar como: ( ) PACIENTE ( )CONTROLE de um estudo intitulado “DETECÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES NO PROGNÓSTICO E ACEITAÇÃO DO ALOENXERTO E ENXERTO SEMI-ALOGÊNICO”. É através das pesquisas, inclusive básicas, que ocorrem os avanços na medicina, e sua participação é de fundamental importância;

b) O objetivo desta pesquisa é tentar contribuir para que órgãos transplantados como o rim sejam melhor aceitos pelo receptor bem como contribuir para tentar esclarecer fenômenos relacionados aos abortos recorrentes de causas desconhecidas. E a participação de controles neste caso é de fundamental importância, pois através das comparações entre transplantes bem aceitos ou não é que poderemos chegar a fatos importantes, assim como entre aqueles casais com abortos de repetição e aqueles casais com dois ou mais filhos;

c) Caso você participe da pesquisa, será necessário que você forneça uma amostra de sangue (10ml);

d) O único inconveniente que você poderá experimentar é a dor pela picada na hora da coleta de sangue, bem como pequenos hematomas que possam vir a ocorrer, e que não causam danos a pacientes ou controles;

e) Não há riscos para você;

f) Para tanto você deverá comparecer ao LIGH, para coleta de sangue;

g) A pesquisadora responsável pelo projeto, Profa. Maria da Graça Bicalho – fone: 361-1729 poderá ser contatada no LIGH;

h) Está garantido que você terá todas as informações que você queira, antes, durante e depois da pesquisa;

i) A sua participação neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de recusar participar da pesquisa;

j) As informações relacionadas à pesquisa poderão ser inspecionadas pelos pesquisadores que executam a pesquisa e pelas autoridades legais, no entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório, publicação ou por qualquer meio, isto será feito de forma codificada, para que a confidencialidade seja mantida;

l) Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames) não são de responsabilidade dos pacientes ou controles;

m) Pela sua participação na pesquisa você não receberá qualquer valor em dinheiro;

n) Quando os resultados forem divulgados, não aparecerá seu nome e sim um código;

Eu, ... li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo da pesquisa para a qual fui convocado a participar. A explicação que recebi menciona o fato relacionado a coleta de sangue e seus inconvenientes. Eu entendi que sou livre para interromper ou não participar da pesquisa.
Eu concordo, voluntariamente, em participar desta pesquisa.