

**LUCIANE VIATER TURECK**

**POLIMORFISMOS NA REGIÃO PROMOTORA E 3'UTR DE HLA-G EM UMA  
AMOSTRA AFRO-BRASILEIRA DO PARANÁ**

**Curitiba**

**2011**

**LUCIANE VIATER TURECK**

**POLIMORFISMOS NA REGIÃO PROMOTORA E 3'UTR DE HLA-G EM UMA  
AMOSTRA AFRO-BRASILEIRA DO PARANÁ**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra Maria da Graça Bicalho

Aluna: Luciane Viater Tureck

**Curitiba**

**2011**



## PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **LUCIANE VIATER TURECK** para fins de obter o título de Mestre em Ciências Biológicas na Área de Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira à candidata o conceito "A".

Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 14 de março de 2011

**Professora Doutora Eni Picchioni Bompeixe**  
UFPR – Membro Titular

**Professor Doutor João Carlos Marques Magalhães**  
UFPR – Membro Titular

**Professora Doutora Lupe Furtado Alle**  
UFPR – Membro Titular

**Professora Doutora Maria da Graça Bicalho**  
Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

Visto

**Professora Doutora Maria Luiza Petzl-Erler**  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela oportunidade de ingressar e concluir o mestrado, mesmo diante de todas as dificuldades enfrentadas.

Aos meus queridos e inesquecíveis avós, Roberto e Ivone Tureck, que mesmo não estando fisicamente presentes durante a realização do mestrado sempre estiveram vivos em meus pensamentos, e com certeza me auxiliaram de alguma forma.

Agradeço a minha família, que mesmo sem entender ao certo meu trabalho sempre esteve presente. Em especial meu irmão André Luiz que foi um grande incentivador, e também meu “assistente”. Minhas tias Marly e Glacy e minha mãe.

Ao Lucas que se mostrou um grande companheiro, em que todos os momentos me auxiliou, tanto em conversas, quanto em atitudes que fizeram chegar ao final desta jornada.

A minha querida amiga e companheira de trabalho Luana, por estar presente todos os dias ao longo destes dois anos de mestrado, sem contar nos quatro anos anteriores de graduação. Obrigada pela valiosa ajuda e companheirismo, sozinha com certeza não teria conseguido.

Ao meu querido professor e amigo Professor Euclides Fontoura da Silva Jr, que não está mais aqui entre nós, mas que com certeza contribuiu muito para minha formação, e que de algum lugar estará se sentindo feliz com essa conquista.

A professora Roseli Wassen sempre muito solícita e dedicada, sem seus conselhos toda a técnica não teria sido padronizada. Ao professor João Carlos Marques Magalhães por sua orientação nas análises estatísticas e pelas conversas. A professora Lupe e ao professor Ricardo pela prontidão ao emprestar seu laboratório para que eu pudesse correr os géis, além de conselhos valiosos. A professora Débora do Departamento de Patologia, sem sua imensa boa vontade não teríamos terminado o sequenciamento das amostras, obrigado pela torcida e pela ajuda. Ao professor Emanuel do Departamento de Bioquímica, sem sua ajuda não conseguiríamos acertar nossas *PCRs*. A minha orientadora Maria da Graça Bicalho pela orientação e oportunidade.

Ao pessoal do laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade LIGH: A Pryscila pela orientação, acompanhamento, e imensa ajuda com os protocolos, pelo Joandrei pelas dicas e ensinamentos, a Sibelle pela imensa boa vontade e esforço em resolver nossos problemas. Com certeza sem estas pessoas o trabalho não seria concluído. A Cynthia e Geórgia, ao Alessandro, Paulo, Gorethi, Sônia, Marina, Márcio, Zé, Claudia, enfim todos que de alguma forma merecem reconhecimento e agradecimento.

“Há verdadeiramente duas coisas diferentes: saber e crer que se sabe.

A Ciência consiste em saber; em crer que se sabe consiste a ignorância”

Hipócrates

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b>	vi
<b>LISTA DE TABELAS</b>	vii
<b>LISTA DE SIGLAS</b>	ix
<b>RESUMO</b>	x
<b>ABSTRACT</b>	xi
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b>	1
<b>2 OBJETIVOS</b>	3
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	4
3.1 O COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE	4
3.1.1 O Polimorfismo dos genes MHC	9
3.2 O HISTÓRICO DE <i>HLA-G</i>	10
3.2.1 A Proteína <i>HLA-G</i>	10
3.2.2 A Expressão de <i>HLA-G</i>	11
3.2.3 O Papel Biológico das moléculas <i>HLA-G</i>	12
3.3 O GENE <i>HLA-G</i>	13
3.3.1 Os Elementos Reguladores de <i>HLA -G</i>	14
3.4 OS POLIMORFISMOS E ESTUDOS POPULACIONAIS DE <i>HLA-G</i>	17
3.4.1 Os Polimorfismos em Regiões não Codificantes do <i>HLA-G</i>	23
3.4.2 Os Polimorfismos na Região Promotora de <i>HLA-G</i>	24
3.5 OS PRINCIPAIS ESTUDOS CLÍNICOS ASSOCIADOS AO <i>HLA-G</i>	28
3.6 POPULAÇÃO AFRO BRASILEIRA NO ESTADO DO PARANÁ	31
<b>4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	33
<b>5. ARTIGO</b>	42
<b>6 CONCLUSÃO GERAL</b>	57
<b>7 APÊNDICE</b>	58

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - MHC HUMANO	7
FIGURA 2 - TRANSCRITO PRIMÁRIO DE <i>HLA-G</i> E SUAS ISOFORMAS	11
FIGURA 3 - GENE <i>HLA-G</i>	13
FIGURA 4 - REGIÃO REGULADORA 5' DO GENE <i>HLA-G</i>	16
FIGURA 5 – GEL DE POLIACRILAMIDA/FRAGMENTOS INS/DEL 14pb REGIÃO 3'UTR DE <i>HLA-G</i> .	60
FIGURA 6 - ELETROFEROGRAMA DO FRAGMENTO1 DE <i>HLA-G</i>	65
FIGURA 7 - ELETROFEROGRAMA DO FRAGMENTO 2 DE <i>HLA-G</i>	65

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS DAS MOLÉCULAS MHC DE CLASSES I E II _____	8
TABELA 2 - ESTRUTURA E PRODUTOS DOS ÉXONS DO GENE <i>HLA - G</i> _____	13
TABELA 3 – POLIMORFISMOS EM REGIÕES REGULADORAS E CODIFICADORAS DO DNA DE <i>HLA-G</i> QUE CARACTERIZAM OS ALELOS _____	19
TABELA 4 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO <i>HLA-G</i> EM DIFERENTES POPULAÇÕES MUNDIAIS _____	20
TABELA 5 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO <i>HLA - G</i> EM DIFERENTES POPULAÇÕES ÉTNICAS COMPILADAS POR HIIVD (2006) _____	22
TABELA 6 - POLIMORFISMO 14 PB INSERÇÃO/DELEÇÃO ASSOCIADO COM CADA ALELO DE <i>HLA-G</i> ENCONTRADO EM UMA POPULAÇÃO BRASILEIRA _____	24
TABELA 7 - TAXAS DE SNPs EM REGIÕES PROMOTORAS (P) E EM TODAS AS REGIÕES DO GENOMA (A) _____	25
TABELA 8 – SNPs DA REGIÃO PROMOTORA DE <i>HLA-G</i> E VARIAÇÕES NUCLEOTÍDICAS _____	26
TABELA 9 – ALELOS MENOS FREQUENTES EM 18 SÍTIOS POLIMÓRFICOS NA REGIÃO REGULATÓRIA 5'- UPSTREAM DE <i>HLA-G</i> _____	27
TABELA 10 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES _____	61
TABELA 11 – FREQUÊNCIA ALÉLICA DOS SNPs DA REGIÃO PROMOTORA E 3'UTR DE <i>HLA-G</i> NA AMOSTRA AFRO BRASILEIRA ( $n=150$ ) _____	67
TABELA 12- FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG PARA OS (SNPs) DA REGIÃO PROMOTORA E 3'UTR DE <i>HLA-G</i> NA AMOSTRA AFRO BRASILEIRA ( $n=150$ ) _____	67

TABELA 13 – VALORES DE $p$ PARA O DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE CADA SNP DA REGIÃO PROMOTORA E +14pb/-14pb DE <i>HLA-G</i> NA AMOSTRA AFRO BRASILEIRA (n=150)	70
TABELA 14 – VALORES DE $D'$ ENTRE CADA SNP DA REGIÃO PROMOTORA E 3'UTR DE <i>HLA-G</i> NA AMOSTRA AFRO-BRASILEIRA (n=150)	70
TABELA 15 – VALORES DE $r^2$ ENTRE CADA SNP DA REGIÃO PROMOTORA E 3'UTR DE <i>HLA-G</i> NA AMOSTRA AFRO-BRASILEIRA (n=150)	71
TABELA 16-HAPLÓTIPOS MAIS COMUNS DA REGIÃO PROMOTORA DE <i>HLA-G</i> E SUA RESPECTIVA FREQUÊNCIA NA AMOSTRA AFRO-BRASILEIRA (n=150)	71
TABELA 17 – COMPARAÇÃO ENTRE AS CONFIGURAÇÕES HAPLOTÍPICAS DAS AMOSTRAS AFRO-BRASILEIRAS E EURO-BRASILEIRAS (LARSEN e HVIID, 2003) (SILVA, 2009), E OS ALELOS ASSOCIADOS SEGUNDO LARSEN e HVIID, 2003	49
TABELA 18-COMPARAÇÃO ENTRE AS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE UMA AMOSTRA HUTTERITE (OBER <i>et al.</i> ,2003) COM A AMOSTRA AFRO-BRASILEIRA	72
TABELA 19 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA MOLECULAR ENTRE AMOSTRA AFRO-BRASILEIRA E HUTTERITES (OBER <i>et al.</i> , 2003)	72
TABELA 20 – COMPARAÇÃO ENTRE AS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DA AMOSTRA AFRO-BRASILEIRA COM UMA AMOSTRA EURO-BRASILEIRA (SILVA, 2009)	79
TABELA 21 – COMPARAÇÃO ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DA AMOSTRA AFRO-BRASILEIRA COM UMA AMOSTRA EURO-BRASILEIRA (SILVA, 2009)	73
TABELA 22 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA MOLECULAR ENTRE AMOSTRA AFRO BRASILEIRA E EURO-BRASILEIRA (SILVA, 2009)	75
TABELA 23 –COMPARAÇÃO ENTRE AS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DA REGIÃO 3'UTR DE <i>HLA-G</i> ENTRE AS AMOSTRAS AFRO E EURO BRASILEIRAS (SILVA, 2009)	75
TABELA 24 - COMPARAÇÃO ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DA REGIÃO 3'UTR DE <i>HLA-G</i> ENTRE AS AMOSTRAS AFRO E EURO BRASILEIRAS (SILVA, 2009)	75

## LISTA DE SIGLAS

MHC	- <i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complexo Principal de Histocompatibilidade)
ARE	- Aborto Espontâneo de Repetição
HLA	- Antígeno Leucocitário Humano
LIGH	- Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade
5'URR	- <i>Upstream Regulatory Region</i>
3'UTR	- <i>Untranslated Region</i>
CÉLULAS NK	- Células <i>Natural Killer</i>
APCs	- Células Apresentadoras de Antígenos
IFN- $\gamma$	- Interferon Gama
ISRE	- Elemento de Resposta ao Interferon
mRNA	- RNA mensageiro
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
RE	- Retículo Endoplasmático
TAP	- Transportador Associado a Processamento

## RESUMO

O estudo de polimorfismos genéticos é uma ferramenta de extrema importância para a genética de populações. Através de sua descrição é possível caracterizar diferentes amostras populacionais, unindo dados no sentido de delinear padrões de variabilidade de genes de interesse em diferentes grupos étnicos. Neste sentido, Polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) na região reguladora/promotora de *HLA-G* vêm sendo investigados em associação com múltiplas patologias reprodutivas e auto-imunes, dentre estas, casos de abortamento recorrente, pré-eclampsia e processos de rejeição a transplantes, já que podem vir a influenciar a ligação de fatores transcricionais, e por conseguinte nos padrões de expressão do gene. Informações descritivas sobre *HLA-G* são essenciais para correta interpretação de resultados em estudos caso-controle. Sendo assim, foram investigados 15 SNPs na região reguladora/promotora, e o polimorfismo Ins/Del de 14 pb na região 3'UTR de *HLA-G* em uma amostra populacional composta por 150 indivíduos saudáveis de ancestralidade africana, que compõem o banco de dados de doadores voluntários de medula óssea do Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH). Todas as frequências genotípicas relativas aos SNPs investigados estavam em acordo com o equilíbrio de Hardy e Weinberg, e a estimativa do desequilíbrio de ligação foi significativa entre os SNPs da região promotora, mas não para com a variação de 14 pb no éxon 8 de *HLA-G*. Foram encontradas 4 configurações haplotípicas mais comuns, e suas respectivas frequências para os SNPs da região promotora de *HLA-G*, todas semelhantes às encontradas em uma amostra euro-brasileira (SILVA, 2009) investigada pelo mesmo grupo de estudo. Testes AMOVA foram também realizados a fim de estimar o grau de diferenciação da amostra afro-brasileira, quando comparada com a amostra euro-brasileira (SILVA, 2009) e uma amostra de Hutterites estudada por OBER *et al.*, 2003. Em todos eles, a amostra afro-brasileira pareceu ser mais próxima da amostra euro-brasileira (SILVA, 2009), de acordo com o esperado, já que a amostra Hutterites (OBER *et al.*, 2003) consiste em um isolado populacional que pode estar sujeito ao isolamento genético.

PALAVRAS CHAVE: Polimorfismos, *HLA-G*, população, afro-brasileira.

## **ABSTRACT**

The study of genetic polymorphisms is a very important tool for population genetics. Through their description is possible to characterize different population samples, combining data in order to delineate patterns of variability of genes of interest in different ethnic groups. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the regulatory / promoter of *HLA-G* gene have been investigated in association with multiple reproductive disorders and autoimmune diseases as: recurrent miscarriage, preeclampsia, and the processes transplants rejection, since come to influence the binding of transcription factors, and therefore on the patterns of gene expression. Descriptive information about HLA-G are essential for correct interpretation of results in case-control studies. So, we investigated 15 SNPs in the regulatory region / promoter polymorphism and Ins / Del of 14 bp in the 3'UTR of the HLA-G in a population sample constituted of 150 healthy individuals of African ancestry, that make up the database voluntary donors of bone marrow from the Laboratory of Histocompatibility and Immunogenetics (LIGH). All genotype frequencies on the SNPs investigated were in agreement with the Hardy and Weinberg, and the estimation of linkage disequilibrium was significant between the SNPs of the promoter region, but not to the variation of 14 bp in exon 8 of HLA-G. We found four more common haplotypes configurations, and their frequencies for the SNPs of the promoter region of HLA-G, all similar to those found in a sample of Euro-Brazilian (SILVA, 2009) investigated by the same study group. AMOVA tests were also performed to estimate the degree of differentiation of African-Brazilian sample compared with the Euro-Brazilian sample (SILVA, 2009) and a sample of Hutterites studied by OBER et al., 2003. In all, the sample African-Brazilian appeared to be closer to the Euro-Brazilian sample, as expect, since come the Huterittes sample (OBER *et al.*, 2003) is a population isolated that may be a genetic isolated.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

GERAGHTY *et al.*, em 1987 descreveram pela primeira vez o gene *HLA-G* quando realizavam uma análise do DNA, na região do MHC (*Major Histocompatibility Complex*) humano localizado no braço curto do cromossomo 6. O gene *HLA-G* é constituído por 4396 pb, distribuídos entre oito éxons, sete íntrons e uma região 3' não traduzida (FAVIER *et al.*, 2007).

Inicialmente, acreditava-se que a expressão das proteínas *HLA-G* estivesse restrita ao fluído amniótico e ao soro de mulheres grávidas. No entanto, sua expressão foi detectada no timo (CRISA *et al.*, 1997), na córnea (LE DISCORDE *et al.*, 2003), no pâncreas (CIRULLI *et al.*, 2006) em precursores eritróides e endoteliais (MENIER *et al.*, 2004); além de outras regiões como a região anterior do olho, pele, pulmão, rim, ovário, cólon, intestino, timo (KIRSZENBAUM *et al.*, 1999; LILA *et al.*, 2002). Tecidos fetais como o timo, olhos, pulmão, coração e rim, tiveram a expressão do mRNA de *HLA-G* detectada (VAN DER VEN *et al.*, 2000).

O processamento alternativo (*splicing*), do mRNA (RNA mensageiro) de *HLA-G* resulta em sete isoformas protéicas, sendo quatro ligadas à membrana celular (*HLA-G1*, *-G2*, *-G3* e *G4*), e duas formas solúveis (*HLA-G5* e *-G6*, também denominados como *sHLA-G1* e *sHLA-G2*). Essas últimas já foram detectadas em fluídos corporais, biópsias de tumores, e soro de pacientes (PAUL *et al.*, 2000). A variante *HLA-G7*, a qual também é solúvel, tem a característica de difícil detecção laboratorial (MOREAU *et al.*, 2003).

Uma vasta gama de estudos sobre os efeitos da molécula *HLA-G* na gravidez têm sugerido que sua expressão alterada parece estar associada com complicações gestacionais, tais como, a falha na implantação, pré-eclampsia e com o risco de abortamento, o qual tem sido freqüentemente associado a polimorfismos do gene *HLA-G* (ALDRICH *et al.*, 2001; CAROSELLA *et al.*, 2003). Suas implicações em situações de câncer e transplantes, também vêm sendo cada vez mais destacadas (ROUAS-FREISS *et al.*, 2007). Estudos atuais vêm sustentando a hipótese de que *HLA-G* pode ser ativado durante o processo de transplante, promovendo a tolerância e reduzindo a resposta imune ao aloenxerto. Dessa forma, os estudos e o entendimento dos mecanismos que atuam na expressão de *HLA-G* também podem contribuir para o controle da rejeição aguda e crônica no contexto dos transplantes clínicos (LILA *et al.*, 2000).

O polimorfismo e polialelismo descritos para o gene *HLA-G*, 46 alelos descritos até janeiro de 2011, (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html>), contrastam com a diversidade apresentada pelos genes MHC Classe I Clássicos, os quais são altamente polialélicos e polimórficos.

Em populações brasileiras são poucos os estudos sobre *HLA-G*, em especial, em regiões reguladoras. Nossos resultados foram comparados com aqueles obtidos de uma amostra de euro-brasileiros investigada por nosso grupo de pesquisa (SILVA, 2009), e também com os dados disponíveis na literatura obtidos num grupo isolado populacional Huterite-USA (OBER *et al.*, 2003), investigado para os mesmos SNPs.

O presente estudo objetivou caracterizar numa amostra populacional de afro-brasileiros do Paraná, a variação genética de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) compreendidos entre as posições -1446 e -304, na região promotora do gene *HLA-G*. O polimorfismo *Ins/Del* de 14pb presente no éxon 8 (região 3' UTR) de *HLA-G* também foi investigado.

Esperamos que os resultados do presente estudo, além de caracterizar a variação genética de *HLA-G*, possam também referenciar comparações mais robustas sobre os SNPs de regiões não codificadoras de *HLA-G*, suas frequências alélicas, e configurações haplotípicas em estudos caso-controle, uma vez que define um panorama da composição genética de uma amostra da população brasileira, em especial do Estado do Paraná.

Adicionalmente esperamos trazer subsídios que conduzam a um melhor entendimento da variação genética em regiões não transcritas do gene e seu papel na regulação dos níveis transcricionais de *HLA-G*.

## 2. OBJETIVOS

Caracterizar a variação genética de 15 SNPs da região promotora 5' URR e o polimorfismo Ins/Del14pb na região 3' UTR de HLA-G, em uma amostra de afro-brasileiros da população do Paraná, visando com estes dados referenciar de modo mais consistente futuras pesquisas que utilizem amostras populacionais brasileiras, e que tenham o *HLA-G* como gene alvo de investigação em diversos contextos patológicos.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

\*Estimar as frequências alélicas de 15 SNPs compreendidos entre -1446 e -304 na região 5' URR do gene HLA -G, numa amostra da população brasileira afro descendente do Estado do Paraná.

\*Estimar a frequência de polimorfismos (14-pb inserção/deleção) na região 3' não transcrita do éxon 8 do gene HLA-G.

\*Estimar as frequências haplotípicas dos SNPs das regiões 5'URR.

\*Verificar a conformidade das distribuições genotípicas SNPs estudados para o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

\*Comparar frequências alélicas e haplotípicas dos SNPs entre amostras populacionais de afro-brasileiros e euro-brasileiros, do Estado do Paraná e com os resultados observados em outros estudos populacionais.

Os seguintes objetivos se fundamentam na necessidade de se somar esforços no sentido de consolidar informações sobre o padrão de variação dos polimorfismos na região promotora e 3'UTR de *HLA-G* em diferentes amostras populacionais e étnicas, uma vez que tais informações são ainda escassas na literatura, e muito úteis como referência para estudos do tipo caso-controle.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 O COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE

Historicamente se atribui a Peter Gorer (1936), ter sido o primeiro pesquisador a descrever, em camundongos, os genes relacionados à histocompatibilidade (H-2) do inglês *Histocompatibility-2*. Estudos clássicos relacionados ao Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), do inglês *Major Histocompatibility Complex*, surgiram no ano de 1940, com George Snell e colaboradores, que estudavam em camundongos, aspectos genéticos do fenômeno da rejeição de tumores e órgãos.

Para este estudo foram utilizadas linhagens congênicas, ou seja, que apresentavam o mesmo genótipo em todos os *loci* gênicos, exceto aqueles pelos quais foram selecionadas para serem diferentes (ABBAS e LICHTMAN, 2005). Como resultado observou-se que, quando o transplante ou enxerto era realizado entre animais de uma mesma linhagem, o fenômeno da rejeição não ocorria ou ocorria com menor frequência do que era observado quando esse procedimento envolvia animais de linhagens endogâmicas diferentes. A partir daí consolidou-se o termo *histocompatibilidade* para definir o fenômeno de aceitação/rejeição de um enxerto, concluindo-se que o mesmo era uma característica hereditária (KLEIN *et al.*, 1997).

Pesquisas realizadas por George Snell e colaboradores, ganhador do Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 1980, pelos estudos genéticos relacionados ao complexo gênico *H-2*, sugeriram que em uma região gênica, um único *locus* no cromossomo 17, seria responsável por tal mecanismo de resposta a enxertos. Mais tarde, concluiu-se que essa região gênica continha vários genes, sendo então denominada de Complexo Principal de Histocompatibilidade, cuja presença era uma característica comum de todas as espécies de mamíferos investigadas até então (BAHRAM *et al.*, 1994).

No entanto, a função, das proteínas codificadas por genes situados nessa região só foi elucidada a partir de 1970, a qual seria apresentar antígenos (peptídeos) para que sejam reconhecidos pelos linfócitos T, durante a resposta imune. Através de análises genéticas clássicas, outras características dos genes do *MHC* puderam ser definidas, tais como: duas categorias de genes, *MHC I* e *MHC II*, que codificam respectivamente proteínas estruturalmente distintas, mas homólogas;

genes mais polimórficos do genoma; genes expressos de forma co-dominante em cada indivíduo (EDWARDS E HEDRICK, 1998).

O estudo do *MHC* humano aconteceu de modo diferente, já que não era possível realizar experimentos baseados em endogamia. Os avanços de tratamentos clínicos, como a transfusão sanguínea e os transplantes de órgãos, forneceram o estímulo necessário para que fossem melhor compreendidos os genes que controlam os eventos de rejeição em humanos (HANSEN *et al.*, 1993).

O método de estudo para definir tais genes foi através de anti-soros, que continham aloanticorpos, e reagem contra células de outros indivíduos, geralmente, contra aloantígenos de membrana em situações de transplante ou transfusões e, em laboratório, em situações experimentais apropriadas. Sendo assim, depois de muitos esforços e pesquisas definiu-se em humanos vários *loci* gênicos polimórficos agregados em uma única região no cromossomo 6, cujos produtos eram os aloantígenos, alvos do fenômeno da aceitação-rejeição de tecidos transplantados (GERAGHTY *et al.*, 1987).

Sabendo-se que os aloantígenos eram expressos em leucócitos humanos, desde então passaram a ser denominados de Antígenos Leucocitários Humanos (HLA). O sistema gênico HLA é a denominação que recebe o Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) em humanos, região do genoma onde estão situados outros genes envolvidos com a resposta imune, mas que não participam da histocompatibilidade (BAHRAM *et al.*, 1994).

Nos seres humanos, o MHC é didaticamente dividido em três regiões (Figura 1): classe I, II e III, conforme sua localização cromossômica, bem como estrutura e função dos produtos codificados pelos seus genes.

Os genes *HLA-A*, *-B*, *-C* codificam a cadeia  $\alpha$  (alfa), ou cadeia pesada das proteínas HLA de Classe I Clássicas (Ia), que estruturalmente são constituídas por duas sub-unidades polipeptídicas. A subunidade  $\alpha$  liga-se de forma não covalente a uma subunidade denominada  $\beta_2$ -microglobulina, codificada por um gene localizado no cromossomo 15 (GERAGHTY *et al.*, 1987).

As proteínas HLA classe I estão presentes em todas as células nucleadas, e desempenham função na apresentação de antígenos endógenos para células TCD8<sup>+</sup> (GERAGHTY *et al.*, 1987) na modulação do repertório de linfócitos circulantes e no controle da atividade citotóxica das células NK (*Natural Killer*) (JONES *et al.*, 1997).

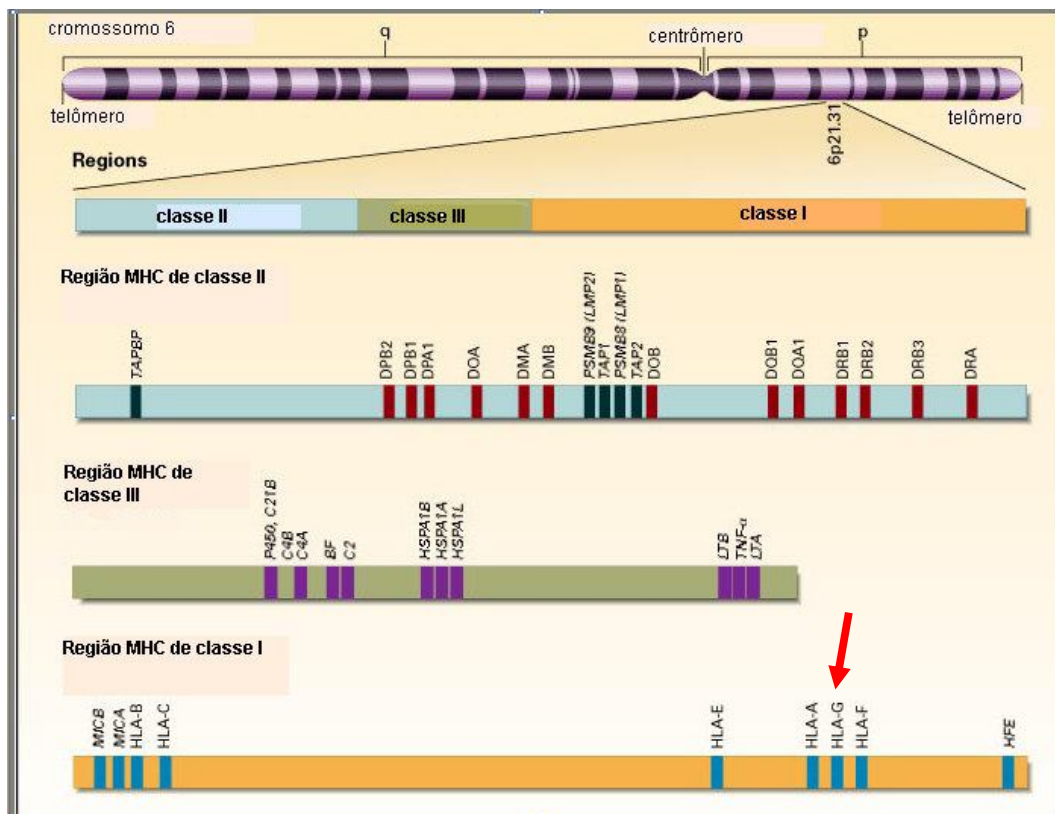
As proteínas de Classe I são também referenciadas como antígenos clássicos de transplante HLA – A, HLA-B e HLA-C, expressam-se em todas as células nucleadas, contrapondo-se às não clássicas HLA-E, HLA-F e HLA-G com expressão tecidual mais restrita. As proteínas HLA-C, HLA-E e HLA-G- são as únicas expressas pelas células trofoblásticas na interface materno fetal (HVIID *et al.* 1997).

Os genes de Classe II situam-se em duplas em cada uma das sub-regiões *HLA-DR* (*DRA* e *DRB*), *HLA-DP* (*DPA* e *DPB*) e *HLA-DQ* (*DQA* e *DQB*) do MHC. Codificam as respectivas cadeias polipeptídicas  $\alpha$  e  $\beta$  que se unem de forma não covalente para estruturar as proteínas HLA-DR, HLA-DP e HLA-DQ presentes na superfície de células apresentadoras de antígenos (APCs), tais como, células dendríticas, macrófagos e linfócitos B, e apresentam antígenos extracelulares para as células TCD4<sup>+</sup>. (MURPHY *et al.*,2010) .

A região MHC de Classe III humana compreende os genes (*Bf*, *C2*, *C4A*, *C4B*) relacionados à ativação do sistema complemento, genes *TNF* e *LT $\alpha$*  e *LT $\beta$* , codificantes de citocinas, além de outros genes codificantes de proteínas envolvidas com a resposta ao choque térmico (MURPHY *et al.*,2010).

Muitos dos produtos de genes localizados no MHC classe III não possuem um papel conhecido nas reações imunológicas, como é o caso do gene *CYP21*, o qual codifica um hormônio esteróide produzido no córtex adrenal (JAATINEN, T., 2002). No entanto, as interações entre diferentes produtos protéicos são complexas, e possivelmente alguns genes localizados na região de Classe III, inesperadamente, podem vir a participar da modulação do sistema imune (JAATINEN, T., 2002). A região de classe III se situa entre as regiões de Classe I e de Classe II, e a mesma apresenta alta densidade gênica, um gene a cada 14.500 bases (SHINA *et al.*, 2004).

FIGURA 1 - MHC HUMANO



Representação esquemática do cromossomo 6 humano, com destaque para a região MHC humana, incluindo as regiões classe I (na cor laranja), classe II (cor azul), e classe III (cor verde). A localização do gene *HLA-G* está assinalada com a seta vermelha.

Fonte: KLEIN *et al.*, 2000.

Algumas características estruturais são comuns às proteínas MHC: uma fenda ou sulco extracelular onde se ligam os peptídeos, seguida por domínios ancorados por uma região transmembrana e outro citoplasmático (EDWARDS E HEDRICK, 1998).

A fenda anteriormente mencionada é formada quando a porção aminoterminal da cadeia  $\alpha$  nas proteínas de Classe I, e  $\alpha\beta$  nas proteínas de Classe II, se dobram formando  $\alpha$  hélices apoiadas em uma estrutura de oito fitas  $\beta$  pregueadas (GERAGHTY *et al.*, 1987) (Tabela 1). Os aminoácidos que variam devido ao grande polimorfismo e polialelismo dos genes MHC estão localizados na fenda de ligação ao peptídeo, ou próximos a ela. Sítios não polimórficos são geralmente locais de ancoragem de moléculas co-receptoras CD8 e CD4 presentes nas células T, participando também desta forma do reconhecimento de antígenos (MURPHY *et al.*, 2010).

TABELA 1 – CARACTERÍSTICAS DAS MOLÉCULAS MHC DE CLASSES I E II

Característica	MHC da Classe I	MHC da Classe II
Cadeias polipeptídicas	$\alpha$ (44-47 kD) $\beta$ 2-microglobulina(12 kD)	$\alpha$ (32-34 kD) $\beta$ (29-32 kD)
Localização dos resíduos polimórficos	Domínios $\alpha$ 1 e $\alpha$ 2	Domínios $\beta$ 1 e $\beta$ 2
Local de ligação para o co-receptor da célula T	A região $\alpha$ 3 liga CD8	A região $\beta$ 2 liga CD4
Tamanho da fenda de ligação de peptídeos	Acomoda peptídeos com 8-10 aminoácidos	Acomoda peptídeos com 10-30 aminoácidos ou mais
Nomenclatura Humana	HLA-A, HLA-B, HLA-C Classe I clássicos	HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP
Nomenclatura Camundongo	H-2K, H-2D, H-2L	I-A, I-E

FONTE: (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

As vias celulares de processamento de antígenos protéicos são elaboradas para gerar peptídeos que possuam as características estruturais para uma inserção e exposição adequada na fenda das proteínas apresentadoras do MHC, (MURPHY *et al.*; 2010). A ligação de peptídeos às moléculas MHC ocorre antes da expressão na superfície celular.

A maioria dos peptídeos que se alojam na fenda das proteínas MHC de Classe II é derivada de antígenos protéicos interiorizados através de endossomos nas APCs. A síntese das cadeias polipeptídicas MHC II ocorre no RE, e durante seu trajeto em direção a superfície celular no interior de vesículas exocíticas se encontram e se fundem às vesículas endocíticas contendo antígenos interiorizados e processados. (MURPHY *et al.*; 2010).

Os peptídeos que são apresentados ligados a moléculas do MHC classe I são derivados de proteínas citosólicas endógenas ou virais, sintetizadas em todas as células nucleadas. O principal mecanismo para a geração de peptídeos a partir de antígenos protéicos citosólicos é a proteólise que ocorre nos proteossomos, (MURPHY *et al.*; 2010). Peptídeos gerados no citosol, são translocados ao RE pelo transportador associado a processamento (TAP), mediador do transporte ativo de peptídeos gerados no citosol para a luz do RE. No lado luminal da membrana do RE, a proteína TAP fixa de maneira não covalente às moléculas MHC-I recém sintetizadas, permitindo que os peptídeos translocados se liguem às moléculas MHC-I que estão fixadas no dímero TAP (MURPHY *et al.*; 2010).

### 3.1.1 O POLIMORFISMO DOS GENES MHC

Vários eventos que resultaram na grande diversidade dos genes MHC parecem ter ocorrido ao longo do processo evolutivo das espécies, dentre os quais fatores clássicos que alteram as frequências alélicas tais como: seleção, deriva genética, fluxo gênico, mutação e conversão gênica. A diversidade de sequências nucleotídicas que resultam na grande diversidade alélica observada em alguns genes MHC classe I e classe II, e a ocorrência destes alelos em baixa frequência (mais que 95% dos indivíduos são heterozigotos), contribuem para que estes genes sejam os mais polimórficos do genoma (PETZL-ERLER M. L., 2009).

Há que se considerar, que outros fatores contribuem para a manutenção desta diversidade, como por exemplo, a suscetibilidade diferencial a doenças, onde a resposta imune antígeno específica (adaptativa) é importante. Indivíduos MHC heterozigotos, teoricamente possuem maiores chances de responder a uma maior gama de antígenos patogênicos, resultando em uma resposta imune mais eficiente. Sendo assim, a seleção balanceadora parece estar atuando neste sentido, a favor do heterozigoto e contribuindo para a grande diversidade alélica observada nos genes MHC (MESSAOUDI *et al.*, 2002).

A diversidade MHC tem sido também associada à escolha parceiro para fins reprodutivos, os indivíduos escolhem preferencialmente parceiros com alelos MHC diferentes dos seus, num conseqüente aumento da heterozigose (SCOTT V.; PHILIP W., 1998).

De forma geral não é necessário assumir que somente um mecanismo particular atuou na construção desta diversidade, mas sim que vários mecanismos podem ter atuado simultaneamente ou em diferentes tempos da história evolutiva das espécies, promovendo a diversidade genética do MHC (CAVALLI-SFORZA E FELDMAN, 2003).

### 3.2 O HISTÓRICO DE HLA-G

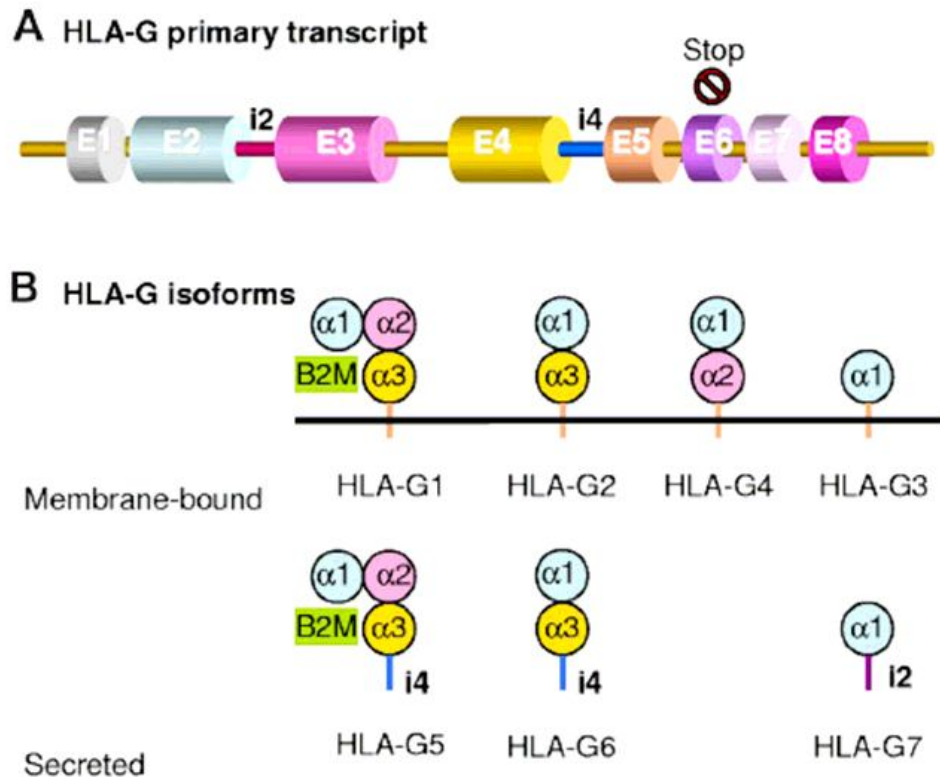
No final da década de 80 três novos genes HLA de Classe I foram descritos e designados como genes *HLA-Ib*, por apresentarem características que os distinguem dos genes clássicos de Classe I do sistema HLA. Com exceção de *HLA-E*, esses genes possuem diferentes mecanismos envolvidos em sua regulação, que os leva a uma distribuição restrita em determinados tecidos, além do número reduzido de alelos (KOLLER *et al.*, 1988; GERAGHTY D. E., 1993). Todos eles possuem características que favorecem a tolerância imunológica (SULLIVAN *et al.*, 2006; CAROSELLA *et al.*, 2008a).

#### 3.2.1 A PROTEÍNA HLA – G

A porção externa da proteína HLA-G é composta pelos domínios  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ , e  $\alpha 3$ , codificados pelos éxons 2, 3 e 4, respectivamente, sendo que os domínios  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  contribuem para estruturar a fenda de ligação ao peptídeo. Está ancorada na membrana celular pela região transmembrana, a qual é codificada pelo éxon 5. Dentre as proteínas HLA de Classe I, HLA-G é especial, pois é expressa em diferentes isoformas e em membranas celulares do trofoblasto, bem como de outros tipos teciduais. No total, são sete isoformas HLA-G (Figura 2) sendo 4 ligadas à membrana (HLA-G1,-G2,-G3,-G4) e 3 solúveis (sHLA-G5,G6,G7), geradas por processamento (*splicing*) alternativo do mRNA (HVIID, 2006).

Nas isoformas solúveis de HLA-G (sHLA-G), fica retido o íntron 4 ou o íntron 2, levando à perda do domínio transmembrana (CAROSELLA *et al.*, 2008b).

FIGURA 2 – TRANSCRITO PRIMÁRIO DE HLA-G E SUAS ISOFORMAS



Representação esquemática do transcrito primário de HLA-G e das múltiplas isoformas. (A) O transcrito primário de HLA-G é homólogo ao da molécula HLA de classe I, porém contém um códon prematuro de término de leitura presente no éxon 6, logo após a seqüência codificadora do domínio transmembrana. (B) O *splicing* alternativo do transcrito primário leva a sete isoformas da proteína: as isoformas truncadas são geradas pela exclusão de um ou dois éxons codificadores de domínios globulares, enquanto a tradução do íntron 4 ou do íntron 2 leva à isoforma solúvel, que perde o domínio transmembrana.

FONTE: CAROSELLA *et al.*, (2008b).

### 3.2.2 A EXPRESSÃO DE HLA – G

Muito embora o mRNA tenha sido identificado em vários tecidos, a expressão de proteínas HLA-G têm sido descrita apenas no trofoblasto, células da placenta; em sítios imunoprivilegiados como o timo, e em determinadas células do sistema imune, como por exemplo, os monócitos (KIRSZENBAUM *et al.*, 1999) e linfócitos (KIRSZENBAUM *et al.*, 1996). A expressão de HLA-G pode ser observada em fibras musculares, no fígado e em células epiteliais tubulares, porém o significado biológico da expressão de HLA-G nestas células não está bem definido, podendo estar

possivelmente associado a mecanismos inflamatórios, bem como inibitórios das células *NK*, e células T (WIENDL *et al.*, 2005).

Uma gama de estudos, (CRISA *et al.*, 1997; FUZZI *et al.*, 2002) demonstrou que HLA-G é expresso em células do trofoblasto no primeiro trimestre, e durante todo o restante da gravidez. Até agora o que parece ser consenso, é que as invasivas células citotrofoblásticas extravilosas têm expressão mais forte de HLA-G ligadas à membrana celular, assim como as células do trofoblasto endovascular (KOVATS *et al.*, 1990). Já os sinciciotrofoblastos exprimem apenas sHLA-G, e parece que todos os outros subtipos celulares do trofoblasto também expressam sHLA-G (CRISA *et al.*, 1997).

### 3.2.3 O PAPEL BIOLÓGICO DAS MOLÉCULAS HLA – G

A estrutura das proteínas HLA-G é sugestiva de que a mesma possua a função clássica da apresentação de antígenos (LEE *et al.*,1995), regulação da expressão de HLA-E (LEE *et al.*.,1998), e inibição ou ativação das células *natural killer* (NK), tanto através da interação direta com os receptores ILT2 e ILT4 como também com o receptor KIR2DL4 (KING *et al.*,1996). Além destas funções, as proteínas HLA-G também têm se mostrado inibidoras da proliferação de células T maternas (LE GAL *et al.*, 1999), induzindo a produção de IL – 10 placentária e em células do trofoblasto, sangue periférico e monócitos (MOREAU *et al.*, 2000), e regulando a angiogênese coriônica (HVIID, 2006). Devido a este papel inibidor das células efectoras do sistema imune a expressão de *HLA-G* parece ser uma das estratégias imunossupressoras realizadas pelas células tumorais (MENIER *et al.*, 2008).

HLA-G possui importante papel na gravidez humana, incluindo a indução ou manutenção da tolerância, tanto localmente no útero materno, como em regiões periféricas. Alguns estudos (JURISICOVA *et al.*, 1996; HVIID, 2006) possibilitaram a detecção da expressão de HLA-G em blastocistos e até em blastocistos no período pré – implantacional (FUZZI *et al.*, 2002). A expressão de HLA-G foi associada com um aumento na taxa de clivagem (divisão celular), quando comparado a embriões com falta de mRNA HLA-G (JURISICOVA *et al.*, 1996).



aminoácidos em sua cauda citoplasmática resultado de um códon de término de leitura (UGA) no éxon 6 (Figura 3), enquanto que nas moléculas de Classe Ia, a mesma cauda citoplasmática apresenta aproximadamente 30 aminoácidos (KIRSZENBAUM *et al.*, 1999).

Além disso, pode ser observada uma região de inserção/deleção de 14 pb, no éxon 8 do gene *HLA-G* na região 3'UTR (ROUSSEAU *et al.*, 2003). Dados de ROUSSEAU e colaboradores, (2003) sugerem que alelos apresentando a deleção de 14pb (*Del14* ou  $14^-$  pb) tem frequência de 58% na população caucasiana, enquanto que alelos contendo a inserção de 14pb (*Ins14* ou  $14^+$ pb) está presente em 42% destes indivíduos. Algumas sugestões sobre as conseqüências funcionais desse polimorfismo são propostas. Ele poderia estar associado a baixos níveis de transcrito de *HLA-G*, pois os alelos que apresentassem a *Ins14*pb no éxon 8 sofreriam um processamento alternativo do mRNA, o qual proporcionaria estabilidade à molécula tornando-a mais resistente à degradação, e aumentando o nível do transcrito, diferente das situações onde a deleção estava presente (CASTELLI *et al.*, 2007).

Sendo assim, a sequência de 14pb estaria agindo como um elemento de controle de processamento alternativo, *splicing*, produzindo um padrão diferente de processamento quando ocorresse a ligação de um elemento em *trans* (transativador) (CASTELLI *et al.*, 2007).

### 3.3.1 OS ELEMENTOS REGULADORES DE *HLA-G*

Os elementos reguladores da expressão de *HLA-G* (Figura 4) estão localizados na região promotora do gene, formando um módulo de indução. A reunião destes elementos sugere que eles poderiam atuar tanto de forma sinérgica, como de forma aditiva na transativação de genes MHC classe I (ELSEN *et al.*; 1998). Estes elementos são também referidos como seqüências de ação *cis*, por estarem nas adjacências e na mesma fita do DNA do gene alvo. São eles: **Intensificador A**, o **ISRE** (Elemento de Resposta ao Interferon) e o **módulo SXY**. Todos estes são sensíveis às proteínas das famílias **NF- $\kappa$ B**, que são proteínas reguladoras da transcrição também denominadas fatores transcricionais (SOLIER *et al.*, 2001).

Além das sequências ou elementos controles já citados, existem também as sequências CAAT e TATA, alvos da ligação e posicionamento do complexo basal de iniciação da transcrição (SOLIER *et al.*, 2001).

O Intensificador A possui dois sítios  $\kappa$ B ( $\kappa$ B1 e  $\kappa$ B2), que têm afinidade com as proteínas NF- $\kappa$ B. Estas proteínas constituem uma família de fatores de transcrição que compreende diferentes membros: p50, p65, p52, c-Rel e Rel B (ELSEN *et al.*, 1998).

Devido a variações nos sítios  $\kappa$ B1 e  $\kappa$ B2 dos diferentes *loci* do MHC I, estes fatores interagem como homo ou heterodímeros, resultando em diferentes efeitos sobre a regulação da transcrição destes genes. Sendo que, os sítios  $\kappa$ B presentes no gene *HLA-G* ligam-se apenas ao homodímero p50 (ELSEN *et al.*, 1998).

Os elementos  $\kappa$ B presentes no intensificador A dos genes MHC classe I parecem ser também sequências alvo potenciais para proteínas dedo de zinco, tais como MZF1, ZFX, e ativadoras coletivamente referidas como as MBP-1 e MBP-2, porém o papel exato destas proteínas permanece por ser elucidado (TING *et al.*, 2002). Sendo assim, o intensificador A parece desempenhar um importante papel na expressão constitutiva e induzida por citocinas de genes MHC classe I.

O ISRE (Elemento de resposta ao Interferon), parece reagir ao estímulo de IFN- $\beta$  (LEFEBVRE *et al.*, 2002), e em particular ao IFN- $\gamma$  que possui papel crucial na regulação da transcrição basal e induzida dos genes MHC classe I, incluindo o gene *HLA-G* (TING *et al.*, 2002).

Semelhante ao intensificador A, um número de ativadores ligantes ao ISRE pode ser observado. Estes incluem o IRF-1, IRF-2, ICSBP e ISGF3. O fator IRF-1 atua como ativador da transcrição de genes MHC classe I, enquanto o IRF-2 e ICSBP agem como repressores da transcrição destes genes (LEFEBVRE *et al.*, 2002).

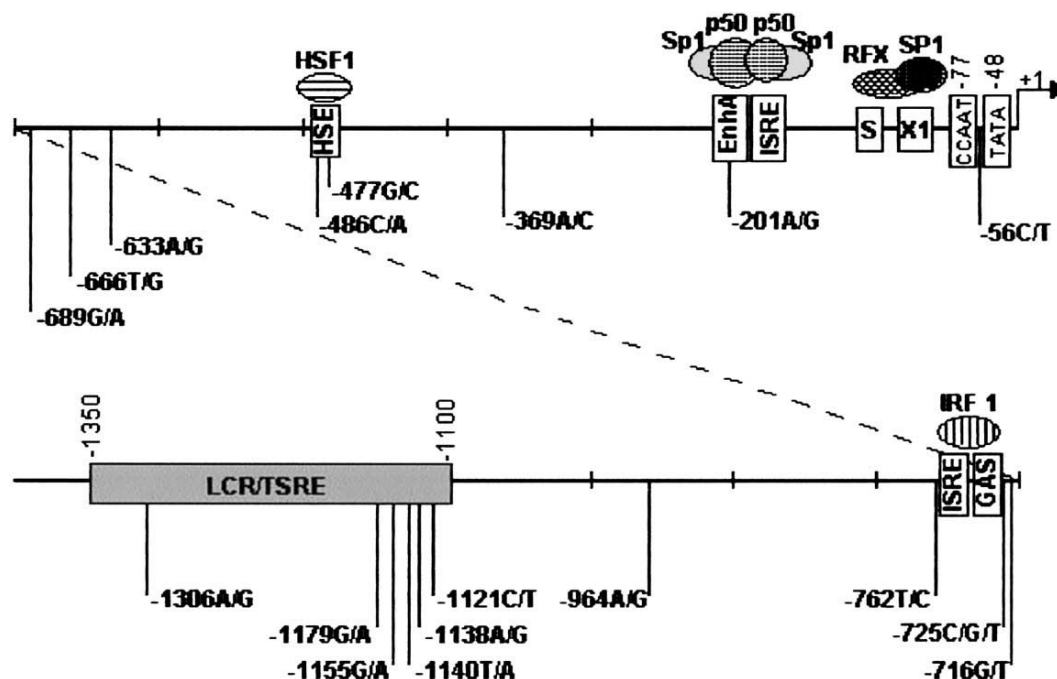
O IFN- $\gamma$  ativa a transcrição dos genes MHC classe I de forma indireta. O mesmo induz por meio da via JAK/STAT de transdução de sinal a expressão do gene IRF-1. O produto do gene IRF-1 subsequentemente se liga ao elemento ISRE no promotor dos genes MHC classe I, mediando assim a indução da expressão de genes MHC I por IFN- $\gamma$  (ELSEN *et al.*, 1998).

O módulo SXY possui as sequências S, X (que são os meio - sítios X1 e X2) e Y, as quais são ligadas de forma cooperativa por complexos protéicos (RFX,

CREB/ATF e NFY). Em especial o *HLA-G* possui S e X1 homólogas aos genes clássicos MHC de classe I, porém Y e X2 são divergentes, por este motivo *HLA-G* não é induzido por CIITA nem por RFX5 (SOLIER *et al.*, 2001).

Posteriormente mais três potenciais sítios CRE/TRE regulatórios foram revelados para o gene *HLA-G*, (CRE<sub>-1380</sub>, CRE<sub>-930</sub>, CRE<sub>-770</sub>), os quais estão localizados na sua região promotora (HVIID, 2006).

FIGURA 4 – REGIÃO REGULADORA 5' DO GENE *HLA-G*



O número 1 corresponde ao início do sítio transcripcional. Elementos de cis-regulação são representados: TATA para TATA Box; CCAAT para CAAT Box; S/X1 para elementos reguladores HLA; ISRE para elemento regulatório interferon específico; EnhA para Intensificador A; HSE para elementos de proteínas de choque térmico; GAS para local gama (interferon) ativado; LCR para região de controle de locus ou (TSRE – Elemento regulador tecido específico.).

FONTE: Modificado de SOLIER (2001).

### 3.4 OS POLIMORFISMOS E ESTUDOS POPULACIONAIS DE *HLA-G*

A maioria dos genes estruturais no genoma humano possui um alelo predominante de “tipo selvagem”, que está presente na maioria dos indivíduos. Isso não ocorre para os genes *HLA* de Classe I e II, pois muitos alelos estão presentes em frequências relativamente iguais. As variações nucleotídicas nos *loci* *HLA* responsáveis pelo alto grau de polimorfismo e polialelismo desses genes, são ferramentas muito úteis para estudos populacionais. (PARHAM, 2001).

No genoma humano, as variações nucleotídicas observadas, por exemplo, entre alelos de um mesmo gene *HLA* de classe I clássico, podem diferir consideravelmente. Algumas variantes alélicas *HLA* são restritas ou ausentes em certos grupos populacionais, enquanto outras apresentam diferenças de frequência em diferentes populações. Dessa forma, o estudo da diversidade *HLA* tem sido utilizado como marcador de ancestralidade, permitindo a caracterização de diferentes amostras populacionais quanto à sua estrutura genética e sua história evolutiva (PETZL-ERLER M. L., 2009). Além disso, a importante participação dos genes *HLA* na implementação da resposta imune tem permitido também o entendimento de como esta diversidade influencia a base genética de várias doenças (VAN DER VEN *et al.*, 2000).

Estudos sobre os genes *HLA* clássicos de classe I (*HLA-A*, *-B* e *C*) e II (*HLA-DR* e *-DQ*), foram realizados na população de Curitiba, constatando-se que o componente europeu é predominante entre os brancos (80,6%), enquanto nos africanos é de 12,5% e ameríndios é de 7,0%. Entre os mulatos, o componente predominante foi o africano (49,5%), sendo as contribuições europeia de 41,8% e ameríndia de 8,7% (PROBST *et al.*, 2000).

No entanto, BRAUN-PRADO e colaboradores (2000), em seu estudo sobre genes *HLA* de classe I, mostraram que não só para os brancos, mas também para os mulatos, o componente europeu é predominante. A contribuição de europeus, africanos e ameríndios, foi respectivamente, 94%, 3% e 3% para brancos e 57%, 39% e 4% para mulatos da região metropolitana. Atualmente a composição da população de Curitiba de acordo com o censo do IBGE 2010, é de 1.678.965 habitantes, sendo composta aproximadamente de 77% brancos, 18% pardos, 3% negros e 1,5 % de amarelos.

Caracterizar as populações quanto à frequência dos genes, e presença de alelos e haplótipos HLA, é importante para referenciar estudos sobre a origem de determinada população e seu grau de mistura, já que diferentes padrões de distribuição de frequências de alelos *HLA* tornam possível distinguir as populações humanas. No entanto, a extensão do conhecimento sobre a diversidade dos genes *HLA* difere muito entre as regiões geográficas e grupos étnicos, o que restringe o potencial de várias aplicações da genética de populações (VAN DER VEN *et al.*, 2000).

As variações nucleotídicas presentes no gene *HLA-G* resultam em pouca variação nas proteínas correlatas. Segundo dados fornecidos pelo endereço eletrônico <http://hla.alleles.org/proteins/class1.html> atualizados em janeiro de 2011, tais variações correspondem a uma variedade de 15 produtos protéicos, sendo esta uma característica que se encontra em evidente contraste com a diversidade antigênica *HLA* de Classe I e Classe II, cujos genes correspondentes apresentam a maior diversidade observada no genoma humano (CASTELLI *et al.*, 2007). Mesmo assim, o estudo populacional de polimorfismos do gene *HLA-G* é relevante, pois genes de classe I não clássicos estão pouco representados nos estudos de genética de populações, e o polimorfismo observado no gene *HLA-G* quando comparado com outros genes do genoma é bastante significativo.

Estudos sobre os polimorfismos em regiões codificadoras do gene *HLA-G* nas populações caucasóides (ALVAREZ *et al.*, 1999), negras africanas (ISHITANI *et al.*, 1999), e japonesas (VAN DER VEN *et al.*, 2000) revelaram limitado polimorfismo, embora um outro estudo de afro-americanos revelasse um elevado polimorfismo no éxon 3, (que codifica o domínio protéico  $\alpha 2$ ) (OBER *et al.*, 1996).

No gene *HLA-G*, polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) que alteram a sequência de aminoácidos da proteína *HLA-G*, definem os principais grupos alélicos (Tabela 3). Uma substituição nucleotídica não sinônima (que resulta na troca de aminoácidos na proteína correspondente) foi descrita no éxon 2 (códon 31 thr → ser), definindo os alelos *HLA-G\*01:02* e *HLA-G\*01:03*; e duas substituições não sinônimas no éxon 3 (códon 110 leu → ilê), sendo a outra uma mudança de matriz de leitura no códon 130 (*1597delC*).

Assim, as proteínas *HLA-G*, que resultam como produtos codificados pelos diferentes exons, apresentam pouca variação em suas diferentes versões, com somente quatro mudanças de aminoácidos descritos (HVIID *et al.*, 2002).

TABELA 3 – POLIMORFISMOS EM REGIÕES REGULADORAS E CODIFICADORAS DO DNA DE *HLA-G* QUE CARACTERIZAM OS ALELOS

Alelos <i>HLA-G</i>	5'URR/ promotor		Exon 2					Exon 3					Exon 4				3'UTR (nt3741)	
	-725	-201	31	35	54	57	69	93	100	107	110	130	188	236	241	258		
<i>G*01:01:01</i>	C	ou	G	ACG	CGG	CAG	CCG	GCC	CAC	GCG	GGA	CTC	CTG	CAC	GCA	TTC	ACG	–
<i>G*01:01:02</i>	G			---	---	---	--A	---	--T	---	---	---	---	---	---	---	---	+14 bp
<i>G*01:01:03</i>	C		A	---	---	---	--A	---	---	---	--T	---	---	---	---	-C-	---	+14 bp
<i>G*01:01:04</i>	C		G	---	---	---	---	--T	---	---	---	---	---	nd	Nd	nd	Nd	Nd
<i>G*01:01:05</i>	nd		nd	---	---	---	---	---	---	---	--T	---	---	---	---	---	---	–
<i>G*01:01:06</i>	nd		nd	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--T	---	---	---	Nd
<i>G*01:01:07</i>	nd		nd	---	---	---	--A	---	--T	---	--T	---	---	---	---	---	---	Nd
<i>G*01:01:08</i>	C		G	---	---	---	--A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	–
<i>G*01:02</i>	nd		nd	---	---	-G-	---	---	---	---	---	---	---	---	--C	---	---	Nd
<i>G*01:03</i>	C	ou	T	G	<b>T--</b>	---	---	---	---	---	---	---	---	--T	Nd	nd	---	+14 bp
<i>G*01:04:01</i>	C		A	---	---	---	--A	---	---	---	<b>A--</b>	---	---	---	---	---	---	–
<i>G*01:04:02</i>	nd		nd	---	---	---	--C	---	---	---	<b>A--</b>	---	---	--T	---	---	---	Nd
<i>G*01:04:03</i>	nd		nd	---	---	---	---	---	---	---	<b>A--</b>	---	---	---	---	---	---	–
<i>G*01:05N</i>	C		A	---	---	---	--A	---	--T	---	---	---	<b>•TG</b>	---	nd	nd	---	+14 bp
<i>G*01:06</i>	C		A	---	---	---	--A	---	--T	---	---	---	---	---	---	---	<b>-T-</b>	+14 bp
<i>G*01:01g<sup>#</sup></i>	nd		nd	---	--A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	nd	nd	---	+14 bp
<i>G*3d5<sup>#</sup></i>	nd		nd	---	---	---	--A	---	--T	--T	---	---	---	---	nd	nd	---	+14 bp

(#) Alelos ainda não reconhecidos pelo Comitê de Nomenclatura para Fatores do Sistema HLA, porém têm sido relatados em vários estudos independentes.









(nd) corresponde a não determinado

FONTE: Adaptação de HIIVD, (2006).

Substituições nucleotídicas silenciosas, que não alteram o aminoácido correspondente, podem ser observadas, bem como variações em íntrons e outras regiões reguladoras definindo variantes dentro de cada sub-grupo alélico, resultando em um total de 46 alelos descritos para o *HLA-G* até o momento (<http://hla.alleles.org/nomenclature/status.html>). A variabilidade descrita está principalmente localizada em regiões gênicas que correspondem aos domínios  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$ , os quais interagem diretamente com o peptídeo (PARHAM *et al.*, 1995)







A Tabela 4 expõe os diferentes alelos de *HLA-G* e suas respectivas frequências alélicas em algumas populações mundiais, tendo como base estudos independentes onde o número amostral utilizado foi bastante variável.

TABELA 4 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE *HLA-G* EM DIFERENTES POPULAÇÕES MUNDIAIS

<b>HLA-G</b>	 Dinamarca (n=150)	 Alemanha (n=132)	 Brasil São Paulo (n=103)	 Brasil- Paraná (n=52)	 China (n=146)	 Índia (n=120)	 Japão (n=41)	 Polônia (n=58)
<b>G*01:01</b>	56,75%	87,4%						
G*01:01:01			39,8%	29,0%	37,3%	10,0%	42,7%	52,6%
G*01:01:02			19,9%	24,0%	11,6%	16,3%	14,6%	20,7%
G*01:01:03			5,3%	2,0%	20,2%	5,0%	4,9%	6,9%
G*01:01:04			0,5%					
G*01:01:05			0,00%			0,00%		
G*01:01:06			1,0%					0,9%
G*01:01:07			0,00%					
G*01:01:08			4,4%	18,0%	5,5%	0,00%		6,0%
G*01:01:09			0,00%					
<b>G*01:02</b>			0,00%			1,3%		
<b>G*01:03</b>	43,2%		8,7%	14,0%	0,3%	24,2%		
<b>G*01:04</b>		8,0%				17,5%	37,8%	
G*01:04:01			8,3%	12,0%	18,5%			4,3%
G*01:04:02			0,00%					
G*01:04:03			0,00%		2,7%			
G*01:04:04			3,9%					
<b>G*01:05N</b>		2,3%	1,0%	1,0%	1,4%	15,4%	0,00%	1,7%
<b>G*01:06</b>			4,9%			2,9%		5,2%
<b>G*01:07</b>			0,00%					

(continua)

TABELA 4 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS (%) DE *HLA-G* EM DIFERENTES POPULAÇÕES MUNDIAIS

	 Espanha (n=114)	 USA Afroamericanos (n=42)	 Zâmbia (n=256)	 Zimbábue (n=108)	 Gana (n=42)	 Coreia do Sul (n=486)
<b>G*01:01</b>						
G*01:01:01	51,3%	70,2%	41,1%	39,3%	83,3%	38,9%
G*01:01:02	25,1%	6,0%	21,3%	14,4%	2,4%	6,6%
G*01:01:03	7,3%	2,4%		0,00%	0,00%	3,8%
G*01:01:04			24,2%	0,00%		
G*01:01:05				0,00%		1,0%
G*01:01:06				0,00%		
G*01:01:07				0,00%		0,00%
G*01:01:08				14,4%		11,2%
G*01:01:09						
<b>G*01:02</b>				0,00%		
<b>G*01:03</b>	0,0%			0,00%		
<b>G*01:04</b>	11,1%	13,1%			9,5%	
G*01:04:01				20,4%		23,7%
G*01:04:02						
G*01:04:03				0,4%		12,9%
G*01:04:04						
<b>G*01:05N</b>	3,1%	8,3%		11,1%	4,8%	1,9%
<b>G*01:06</b>						
<b>G*01:07</b>						

n (em negrito) corresponde ao tamanho amostral utilizados em cada estudo populacional.

FONTE: <<http://www.allelefrequencies.net/>> Acesso em 23/01/2011.

A tabela 5, extraída do trabalho de HIIVD (2006), também enumera as distribuições dos alelos *HLA-G* em diferentes grupos populacionais e em algumas populações euro-descendentes e afro-descendentes.

Interessante observar que a família alélica *HLA-G\*01:01* e suas variantes (excetuando-se o alelo *HLA-G\*01:01:02*) reúne os alelos mais comumente presentes, com uma frequência de até 80% em algumas populações negras africanas (ISHITANI *et al.*, 1999) e, aproximadamente cerca de 50% - 60% em populações caucasianas e japonesas. As variantes alélicas *HLA-G\*01:01*, exceto o alelo *HLA-G\*01:01:02*, mostraram-se também predominantes num estudo realizado em população polonesa, sendo sua frequência de 67% (SIPAK-SZMIGIEL *et al.*, 2007).

Nesse mesmo estudo realizado por Sipak-Szmigiel e colaboradores o alelo *HLA-G\*01:01:02* foi observado com uma frequência de 22%, quando em outras populações caucasóides apresenta uma frequência de aproximadamente 30%.

Porém é pouco freqüente em certas populações africanas (2%-14%) (ISHITANI *et al.*, 1999).

A freqüência do alelo *HLA-G\*01:01:02*, o qual está relacionado com o polimorfismo 14pb inserção/deleção (+14pb/- 14pb) no éxon 8, desperta curiosidade pela possibilidade de fazer parte de uma linhagem mais ancestral quando comparado com os demais alelos. Todos os genes *MHC-G* estudados em primatas (chimpanzé, gorila, orangotango), possuem a sequência (+14pb), não tendo sido observado o polimorfismo de 14pb inserção/deleção nestas espécies (CASTRO *et al.*, 2000).

TABELA 5 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO *HLA-G* EM DIFERENTES POPULAÇÕES ÉTNICAS COMPILADAS POR HIIVD (2006).

Alelos <i>HLA-G</i>	Americanos Africanos (%)	Africanos Ghanaian (%)	Africanos Shona (%)	Dinamarquês (%)	Dinamarquês (%)*	Finlandês (%)	Germanicos/ Croatas(%)	Hutterite (%)	Norte Indianos (%)	Japoneses (%)
	(n=42)	(n=42)	(n=108)	(n=72)	(n=52)	(n=52)	(n=132)	(n=80)	(n=120)	(n=54)
<i>G*01:01:01</i>	70	83	39.3	62	56	58	32	46	10	33
<i>G*01:01:02</i>	6	2.4	14.4	27	25	38	36	20	16	16
<i>G*01:01:03</i>	2.4	0	0	5.1	5	4.8	6.8	2	5	6
<i>G*01:01:04</i>	–	–	0	–	0	–	–	4.4	8	–
<i>G*01:01:05</i>	–	–	0	–	0	–	–	–	0	–
<i>G*01:01:06</i>	–	–	0	–	–	–	–	–	–	–
<i>G*01:01:07</i>	–	–	0	–	0	–	1.9	–	0	–
<i>G*01:01:08</i>	–	–	14.4	–	1	–	9.1	–	0	–
<i>G*01:02</i>	–	–	0	–	0	–	–	–	1	–
<i>G*01:03</i>	–	–	0	–	4	–	2.3	2.7	24	–
<i>G*01:04:01</i>	13	9.5	20.4	4.5	9	–	6.1	13	18	45
<i>G*01:04:02</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>G*01:04:03</i>	–	–	0.4	–	0	–	–	–	–	–
<i>G*01:05N</i>	8.3	4.8	11.1	0.6	1	–	2.3	–	15	–
<i>G*01:06</i>	–	–	–	–	‡	–	–	–	3	–
Others	–	–	–	–	–	–	3.1	12	–	–

n corresponde ao número amostral utilizado nos estudos.

\*Com base em seqüenciamento de éxons 2 e 3.

‡ Corresponde a freqüência alélica de 4,0% do alelo *G\*01:06* na população dinamarquesa.

Os alelos *HLA-G\*01:05N*, *HLA-G\*01:04:01*, *HLA-G\*01:06*, e o *HLA-G\*01:03* foram descritos em uma população polonesa com freqüência abaixo de 5%, em concordância com o observado em outras populações caucasóides (1% a 6%) (SIPAK-SZMIGIEL *et al.*, 2007). Esses alelos são mais comuns em populações não caucasóides (5% a 45%). Por exemplo, o alelo nulo *G\*01:05N* está presente com aproximadamente 5% a 11% em certas populações africanas (ISHITANI *et al.*,

1999), e aproximadamente 15% em populações do norte da Índia (ABBAS *et al.*, 2004), chegando a 6,1 % na população espanhola (SUAREZ *et al.*, 1997).

O alelo *HLA-G\*01:04:01* está presente com uma frequência de 9% a 20% em certas populações africanas (ISHITANI *et al.*, 1999), e 18% em populações do norte da Índia (ABBAS *et al.*, 2004). Porém, em populações japonesas esse alelo possui alta frequência (45%) (YAMASHITA *et al.*, 1999). Já o alelo *HLA-G\*01:03:01* é particularmente comum em populações do norte da Índia (24%) (ABBAS *et al.*, 2004).

Uma comparação da frequência alélica de *HLA-G\*01:06* entre populações da China, Índia e Malásia revelou diferenças, com frequências de 1,1%, 8,3% e 2,2% respectivamente (ABBAS *et al.*, 2004).

### 3.4.1 OS POLIMORFISMOS EM REGIÕES NÃO CODIFICANTES DO *HLA-G*

Polimorfismos de *HLA-G* têm sido descritos na região 5' (URR) a montante do promotor, e na região 3' (UTR) não transcrita do gene (Ver tabela 7) (HVIID *et al.*, 2002), bem como em íntrons. (HARRISON *et al.*, 1993; OBER *et al.*, 2003). A tabela 3 relata alguns destes polimorfismos.

O *World Health Organization* (WHO), se baseia principalmente nos polimorfismos presentes nos éxons 2, 3, e 4 do gene para reportar os alelos de *HLA-G*. Mas recentemente, o foco tem se voltado para variações nucleotídicas presentes nas regiões 5' URR e 3'UTR, sendo que nessa última, o foco tem sido o polimorfismo *Ins/Del14pb* presente no exon 8 de *HLA-G*, uma vez que esses polimorfismos podem influenciar a regulação da expressão de *HLA-G*.

Na região compreendida entre 1.1 e 1.4 kb a partir do sítio de início da transcrição do gene *HLA-G*, situam-se sequências reguladoras ou elementos de ação *cis*, sugeridos como importantes sítios reguladores adicionais, ou seja os loci *LCR* (região controladora de locus) e *TSRE* (elemento de resposta tecido específico) (SCHIMIDT *et al.*, 1993). Polimorfismos nessas sequências foram também relatadas (HVIID, 2006), embora ainda se desconheçam as relações funcionais e a importância deste polimorfismo no controle da expressão de *HLA-G*.

Os primeiros relatos sobre o polimorfismo *Ins/Del 14pb* no exon 8, na região 3' UTR (Ver tabela 6), surgiram em 1993 com HARRISSON *et al.* Neste estudo, esse polimorfismo foi relacionado com a estabilidade e o processamento alternativo (*splicing*), do transcrito de mRNA do *HLA-G*.

TABELA 6 – POLIMORFISMO 14 PB INSERÇÃO/ DELEÇÃO ASSOCIADO COM CADA ALELO DE *HLA-G* ENCONTRADO EM UMA POPULAÇÃO BRASILEIRA

<i>HLA-G</i> alleles	14-bp allele	Occurrence	Previous association <sup>a</sup>
<i>G*010101</i>	Del	81	Del
<i>G*010102</i>	Ins	41	Ins
<i>G*010103</i>	Ins	11	Ins
<i>G*010104</i>	Del	01	Del
<i>G*010105</i>	Na	00	Del
<i>G*010106</i>	Ins	02	Na
<i>G*010107</i>	Na	00	Na
<i>G*010108</i>	Del	08	Del
	Ins	01	
<i>G*010109</i>	Na	00	Na
<i>G*0102</i>	Na	00	Del
<i>G*0103</i>	Ins	18	Ins
<i>G*010401</i>	Del	15	Del
	Ins	02	
<i>G*010402</i>	Na	00	Na
<i>G*010403</i>	Na	00	Del
<i>G*010404</i>	Del	08	Na
<i>G*0105N</i>	Ins	02	Ins
<i>G*0106</i>	Ins	09	Ins
<i>G*0107</i>	Na	00	Na
Others	Ins	01	—
	Del	04	—

Del corresponde a deleção de 14pb; Ins corresponde a inserção de 14pb; e Na corresponde a não avaliado.

FONTE: Adaptado de HVIID (2006); CASTRO *et al.*;(2000); O' BRIEN *et al.*;(2001); OBER *et al.*;(2003).

### 3.4.2 OS POLIMORFISMOS NA REGIÃO PROMOTORA DE *HLA-G*

Análises dos SNPs em regiões promotoras de vários genes humanos descrevem que estes SNPs ocorrem com maior frequência em regiões mais próximas ao sítio de início da transcrição (GUO e JAMISON, 2005). Nessas regiões estão localizadas as sequências alvo de ligação de fatores transcricionais e, sua alteração pode impactar na expressão gênica, influenciando o nível de transcrição dos seus respectivos genes. A Tabela 7 mostra as taxas de SNPs observados em regiões promotoras dos genes (P), e SNPs para todas as regiões do genoma (A).

TABELA 7 – TAXAS DE SNPs EM REGIÕES PROMOTORAS (P) E EM TODAS AS REGIÕES DO GENOMA (A).

TIPO	SUBSTITUIÇÃO	FREQUÊNCIA (P)	FREQUÊNCIA (A)
Purina	A↔G	31,55%	33,10%
Pirimidina	C↔T	30,99%	33,10%
Purina ↔ Pirimidina	C↔G*	12,75%	8,93%
Purina ↔ Pirimidina	A↔C	9,43%	8,77%
Purina ↔ Pirimidina	G↔T	9,33%	8,82%
Purina ↔ Pirimidina	A↔T	5,94%	7,42%

\* Ligeiro aumento em substituição C↔G nas regiões promotoras, corresponde ao grande número de regiões ricas em CG.

FONTE: Adaptado de GUO e JAMISON (2005).

Na região promotora de *HLA-G* um interessante polimorfismo foi relatado na posição -201 (HVIID *et al.*, 2006) (Tabela 3). A “G” (guanina) presente no alelo *HLA-G\*01:01:01* é substituída por “A” (adenina) nos alelos *HLA-G\* 01:01:02*, - *HLA-G\* 01:01:03*, *HLA-G\*01:04* e *HLA-G\*01:05N*. O polimorfismo é localizado em sequências reguladoras *cis* descritas como Intensificador A. No entanto, estudos adicionais são necessários para elucidar se esse polimorfismo na região promotora, teria qualquer efeito sobre a expressão dos alelos de *HLA-G*, influenciando a ligação de fatores NF–kB2 ao elemento Intensificador A.

Outra variante (-725 C>G) na região promotora (Tabela 8) tem sido investigada, sugerindo-se que a variação -725G aumenta as taxas de transcrição do gene *HLA-G* em culturas celulares (OBER *et al.*, 2006).

TABELA 8 -SNPs DA REGIÃO PROMOTORA DE *HLA-G* E VARIAÇÕES NUCLEOTÍDICAS

SÍTIO REGULADOR	POSIÇÃO	SNPs
TSRE - Elemento de resposta trofoblasto-específica	-1201 a -1100	-1179 G/A
		-1155 G/A
		-1140 T/A
		-1138 A/G
		-1121 C/T
ISRE/GAS - Resposta estimulada por Interferon Elemento gamma – interferon Região flanqueadora sítio ativada		-762 T/C
		-725 C/G/T
		-716 G/T
HSE - Elemento de proteínas do choque térmico	-487 a -475	-477 G/C
		-486 C/A

SNPs investigados neste estudo

FONTE: PYO *et al.*; (2006)

Inicialmente 5 SNPs na região promotora foram relatados por HVIID *et al.*, no ano de 1999. Em estudos posteriores OBER *et al.*, 2003 identificaram 13 SNPs na região promotora de *HLA-G* (tabela 9), na comunidade de Hutterites no sul de Dakota, EUA, sendo que em 2006 o mesmo grupo descreveu mais 9 SNPs, totalizando 27 o número de SNPs presentes nessa região até fevereiro de 2011.

TABELA 9 – ALELOS MENOS FREQUENTES EM 18 SÍTIOS  
POLIMÓRFICOS NA REGIÃO PROMOTORA 5'- URR

Posição *	Polimorfismos	Alelo menos frequente	Freqüência
-1306	G/A	A	.38
-1179	A/G	G	.41
-1155	G/A	A	.13
-1140	A/T	T	.25
-1138	A/G	G	.011
-1121	C/T	T	.0.35
-964	G/A	A	.38
-762	C/T	T	.36
-725	C/G	G	.16
-716	T/G	G	.36
-689	G/T	T	.36
-666	G/T	T	.36
-633	G/A	A	.36
-486	A/C	C	.36
-477	G/C	C	.35
-369	C/A	A	.35
-201	G/A	A	.38
-56	C/T	T	.036

\*Usando como referência a posição +1 do sítio de início de transcrição

FONTE: Adaptação de OBER et al., (2003).

### 3.5 OS PRINCIPAIS ESTUDOS CLÍNICOS ASSOCIADOS AO HLA-G

Variantes polimórficas de *HLA-G* têm sido associadas a diversas manifestações clínicas diferentes, e intensamente investigadas nas alterações gestacionais. Houveram relatos do aumento da frequência do alelo *HLA-G\*01:01:03* e do alelo *HLA-G\*01:05N* em pacientes alemães com histórico de Abortamento Recorrente Espontâneo (ARE), quando comparados com controles férteis (PFEIFFER *et al.*, 2001). Esses alelos foram posteriormente associados à baixas concentrações de HLA-G solúvel no plasma (sHLA-G), considerado um fator de risco para o abortamento espontâneo de repetição (REBMAN *et al.*, 2001).

Aumento do risco de abortos subseqüentes foi também relatado em casais com história ARE de aborto se um dos parceiros fosse portador do alelo *HLA-G\*01:04* ou do alelo *HLA-G\*01:05N* (ALDRICH *et al.*, 2001). A presença do polimorfismo -725G em homens pode representar um maior risco de ocorrência de abortamentos espontâneos (SILVA, 2009); assim como em casais onde ambos os cônjuges apresentam o polimorfismo -725G, também apresentam maiores chances de desenvolverem um episódio de abortamento (SILVA, 2009).

Outros estudos reportaram associação entre expressão do HLA-G e pré-eclampsia, quadro clínico que evolui durante a segunda metade da gravidez, afetando 2-7% de todas as gestações com gravidade variável (ALDRICH *et al.*, 2000). A gestante pode desenvolver hipertensão, proteinúria, edema, enquanto a condição do feto pode também ser comprometida pelo crescimento intra – uterino e redução do fluxo de sangue placentário, onde o envolvimento de HLA-G foi investigado. Em síntese, várias investigações apóiam a hipótese de que uma redução ou expressão aberrante de HLA-G na placenta e no soro materno estão associados a esse quadro clínico, e que polimorfismos presentes em regiões reguladoras podem estar associados a estas diferenças observadas em estudos caso/controlado (HVIID, 2006).

O SNP -725 têm sido associado com a perda fetal em Hutterites, com um risco aumentado de aborto em casais onde ambos os parceiros eram portadores do alelo -725G (OR=2.8; intervalo de confiança=95%), e em casais onde somente um parceiro possuía o alelo -725G (OR= 1.71; 95%), comparado com casais que não possuíam este alelo (OBER *et al.*, 2003).

Também no ARE, são vários os estudos que sugerem influência do polimorfismo *Ins/Del14pb* na susceptibilidade a esta patologia, uma vez que as variantes *Ins/Del14pb*, influenciariam tanto a estabilidade, quanto no processamento alternativo do mRNA. A presença da *Ins14pb* está associada com um aumento da expressão de *HLA-G* em cultura celular (SIPAK-SZMIGIEL *et al.*, 2007).

Porém esta associação tem apresentado resultados controversos. Em estudo realizado por SILVA (2009), a *Del14pb* no éxon 8 apresentou um possível efeito protetor. Já em estudo com uma população ameríndia da região amazônica do Brasil, não se observou associação entre o polimorfismo *Ins/Del 14pb* e a fertilidade dos casais investigados (MENDES-JUNIOR *et al.*,2007).

Outras investigações sugerem um excesso de homozigotos (+14pb/+14pb) e heterozigotos (+14pb/-14pb) em mulheres com histórico de múltiplos abortos, quando comparados com as mulheres controle em populações da China, Dinamarca e Índia (HIIVD *et al.*, 2004) (YAMASHITA *et al.*, 1999).

*HLA-G* possui crescente importância nas doenças auto-imunes e respostas inflamatórias onde sua presença está associada com estado de tolerância, contribuindo dessa forma para diminuir a antigenicidade e a resposta imunoproliferativa contra componentes próprios, fato comumente observado nessas patologias (WIENDL *et al.*, 2005; DIEPSTRA *et al.*,2008).

No contexto de transplantes, mecanismos imunológicos de tolerância durante a gestação podem ser estendidos e re-interpretados para entender as reações de aceitação/rejeição de órgãos e tecidos transplantados (ZARKHIN *et al.*; 2010). A expressão de sHLA-G no sangue, e em enxertos de coração, fígado e rim tem sido significativamente associada a melhores prognósticos e um número menor de episódios de rejeição ( CREPUT *et al.*,2003), e alguns autores indicam a detecção de sHLA-G com valor prognóstico para monitorar pacientes transplantados que aceitam os enxertos, podendo se beneficiar com a redução do tratamento imunossupressor (QIU *et al.*, 2006; LE MAOULT *et al.*, 2007).

O crescente papel do *HLA-G* associado a diversos tipos de câncer vêm sendo continuamente estudado. *HLA-G* pode ser expresso nas células tumorais ou nos exossomas derivados do tumor, tanto na sua forma solúvel como ligado à membrana (RITEAU *et al.*, 2003; ROUAS-FREISS *et al.*, 2005). A expressão de *HLA-G* em células neoplásicas pode contribuir para o não reconhecimento imunológico das mesmas, devido à capacidade que a molécula *HLA-G* tem de inibir a atividade das

células *Natural Killer* (NK), linfócitos T citotóxicos e células apresentadoras de antígenos (APCs). O grau de expressão da molécula de HLA-G varia de acordo com o tecido tumoral. Existem tecidos tumorais onde a expressão de HLA-G está ausente, tecidos em que a expressão da molécula é mediana e tecidos em que a expressão é relativamente alta, podendo até ser expresso nas células infiltrantes do tumor (CAROSELLA, *et al.*, 2008a).

De modo semelhante aos tumores, os vírus desenvolvem estratégias para escapar do sistema imune. Sendo assim, a indução da expressão da molécula de HLA-G por células infectadas por vírus pode ser um mecanismo adicional e induzido que o ajude a subverter as defesas do hospedeiro, como demonstrado em estudos onde os níveis de HLA-G solúvel foram maiores em indivíduos portadores do HIV (DONAGHY *et al.*, 2007). Em um estudo recente sobre a expressão do *HLA-G* em lesões associadas à infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV), a molécula de HLA-G foi detectada em 45% das amostras de biópsias analisadas. Dentre os diferentes graus histológicos, a expressão da molécula HLA-G aparece aumentada nas lesões benignas, lesões pré- malignas e carcinomas *in situ* de laringe, e essa expressão diminui nos carcinomas invasores sem metástase, carcinomas invasores com metástase e nos linfonodos (SILVA-ALVES, 2009)

A desregulação da maquinaria de processamento do antígeno mediada pelo HPV pode resultar em uma baixa expressão de peptídeos do complexo MHC na superfície de células infectadas, e protegê-las do ataque imune (KEATING *et al.*, 1995). A proteína E7 do HPV 16 e HPV 18 é capaz de reprimir o gene promotor da cadeia pesada do HLA de classe I, levando a uma perda do reconhecimento de células HPV infectadas pelos linfócitos T citotóxicos (MIRRA *et al.*, 2007).

### 3.6 POPULAÇÃO AFRO-BRASILEIRA NO ESTADO DO PARANÁ

O Paraná é um dos estados brasileiros que conta com a maior diversidade étnica do Brasil, refletindo a miscigenação observada em todo o país, onde estão presentes com diferentes contribuições e graus de mistura, o componente indígena, o europeu, o negro e seus mestiços. Essa mistura racial depende da região onde se desenvolve o estudo. Na região sul do país, por exemplo, é consenso a predominância do componente europeu. Ao todo, estima-se que 28 etnias colonizaram o estado do Paraná, dentre estas se destacam os poloneses, alemães, italianos, árabes, espanhóis, holandeses, índios, japoneses e os negros (OLIVEIRA, 2007).

Após a proibição do tráfico de escravos, ocorreu uma crescente colonização na região sul do país e também, no estado do Paraná. Esse fato provocou um aumento na procura de mão-de-obra para trabalhar nas fazendas de café, localizadas principalmente no norte do estado. A partir de 1850, quando o Paraná deixou de ser província de São Paulo, iniciou-se uma campanha para atrair novos imigrantes, o que resultou num influxo de cerca de 20 mil pessoas entre os anos de 1853 e 1886 (NADALIN, 2001).

A população do Paraná tradicional, nos tempos da mineração, agropecuária, das indústrias extrativas do mate e da madeira, era bastante heterogênea e nela estavam presentes os mesmos elementos que compunham outros estados da região brasileira: o índio, o europeu, o negro e também seus mestiços. A participação social e econômica dos negros foi bastante significativa, na primeira metade do século XIX o número relativo dos representantes afro-descendentes chegou a 40% da população da província do Paraná (NADALIN, 2001)

Segundo estimativas feitas pelo IPEA (Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada) com base em dados do censo realizado pelo IBGE-2010 (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), a população negra (auto denominados negros e pardos) do Brasil em 2010 superou a parcela branca da população, o que se deve a maior taxa de fecundidade entre as mulheres negras e pardas. A projeção é que, no entanto após 2010 haja uma estabilização da população de negros, em torno de 50% da população.

Na região Sul do Brasil, o Paraná tem uma população de 10.439.601 pessoas (segundo dados do CENSO 2010), e é o estado da região com mais negros de

acordo com o Mapa da Distribuição Espacial da População Negra, documento elaborado pelo IBGE. Segundo este órgão, 21% dos paranaenses (um número de 2.017.481 pessoas) se consideram negros (como negros o IBGE considera 18,2% dos paranaenses pardos, e 2,8% dos paranaenses pretos) de acordo com a autodenominação na entrevista do censo. Nos outros estados da região sul, como em Santa Catarina, esta proporção fica em 9,6%, e no Rio Grande do Sul em 11,2%.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. J. The Major Histocompatibility Complex. In: SCHMITT, W. **Cellular and molecular immunology**, 5 ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2005.

ABBAS, A.; TRIPATHI, P.; NAIK, S.; AGRAWAL, S. Analysis of human leukocyte antigen (HLA)-G polymorphism in normal women and in women with recurrent spontaneous abortions. **European Journal Immunogenetic**, v. 31, p. 275–278, 2004.

ALDRICH, C. L.; STEPHENSON, M. D.; KARRINSON, T. HLA-G genotypes and pregnancy outcome in couples with unexplained recurrent miscarriage. **Molecular Human Reproduction**. V. 7, p. 1167-1172, 2001.

ALDRICH, C.; VERP, M. S.; WALKER, M. A.; OBER, C. A null mutation in HLA-G is not associated with preeclampsia or intrauterine growth retardation. **Journal Reproduction Immunology**, v.47, p. 41–48, 2000.

ALVAREZ, M.; SANTOS, P.; MARTINHO, A.; SIMÕES, O.; ABADE, A.; BRÊDA-COIMBRA, H. HLA-G Genetic Polymorphism in 57 Portuguese White Families Studied by PCR-RFLP and PCR-SSOP. **Elsevier Science**. v.31, p. 1829-1831, 1999.

BAHRAM, S.; BRESNAHAN, M.; GERAGHTY, D.E.; SPIES, T. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, p. 6259-6263, 1994.

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

Base de dados sobre o Sistema HLA. Disponível em <<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html>> Acesso em 23/01/2011.

Base de dados sobre as frequências alélicas em diferentes populações mundiais. Disponível em: <<http://www.allelefrequencies.net/>> Acesso em 23/01/2011.

Base de dados sobre os polimorfismos dos gene HLA. Disponível em: <<http://hla.alleles.org/proteins/class1.html>> Acesso em 01/01/2011

BRAUN-PRADO, K.; MION, A. L. V.; PEREIRA, N. F.; CULPI, L.; PETZL-ERLER, M. L. HLA class I polymorphism, as characterized by PCR-SSOP, in a Brazilian exogamic population. **Tissue Antigens**, v.56, p. 417-427, 2000.

CAROSELLA, E.D; MOREAU, P.; LE MAOULT, J.; ROUAS-FREISS, N. HLA-G: from biology to clinical benefits. **Trends Immunology**, v. 29, n. 3, p. 125-32, 2008a.

CAROSELLA, E.D.; FAVIER, B.; ROUAS-FREISS, N.; MOREAU, P.; LEMAULT, J. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. **Blood**, v. 111, n. 10, p. 4862-4870, 2008b.

CAROSELLA, E.D.; MOREAU, P.; LE MAOULT, J.; LE DISCORDE, M.; ROUASFREISS, N. HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. **Advances in Immunology**, v. 81, p. 199-252, 2003.

CASTELLI, E.C; MENDES-JUNIOR, C.T; DONADI, E.A. HLA-G alleles and HLA-G 14 bp polymorphisms in a Brazilian population. **Tissue Antigens**, v. 70, p. 62-68, 2007.

CASTRO, M. J.; MORALES, P.; MARTINEZ-LASO, J. Evolution of MHC-G in humans and primates based on three new 3'UTR polymorphisms. **Human Immunology** v 61, p. 1157-63, 2000.

CAVALLI-SFORZA, L. L.; FELDMAN M. W.; The application of molecular genetic approaches to the study of human evolution. **Nature Genetic Supplement**, v. 33, p. 266-275, 2003

CIRULLI, V.; ZALATAN, J.; MCMASTER, M.; PRINSEN, R.; SALOMON, D.R.; RICORDI, C.; TORBETT, B.E.; MEDA, P.; CRISA, L. The class I HLA repertoire of pancreatic islets comprises the nonclassical class Ib antigen HLA-G. **Diabetes**, v. 55, n.5, p. 1214-1222, 2006.

CREPUT, C.; DURRBACH, A.; MENIER, C.; GUETTIER, C.; SAMUEL, D.; DAUSSET, J.; CHARPENTIER, B.; CAROSELLA, E. D.; ROUAS-FREISS, N. Human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression in biliary epithelial cells is associated with allograft acceptance in liver-kidney transplantation. **Journal Hepatology** 39, 587-594, 2003.

CRISA, L.; MCMASTER, M.T.; ISHII, J.K.; FISHER, S.J.; SALOMON, D.R. Identification of a thymic epithelial cell subset sharing expression of the class Ib HLAG molecule with fetal trophoblasts. **Journal Exp. Med.**, v. 186, n. 2, p. 289-298, 1997.

DIEPSTRA, A.; POPPEMA, S.; BOOT, M.; VISSER, L.; NOLTE, I.M.; NIENS, M.; TEMEERMAN, G.J.; VAN DEN BERG, A. HLA-G protein expression as potential immune escape mechanism in classical Hodgkin's lymphoma. **Tissue Antigens**, v. 71, n. 3, p. 219-226, 2008.

DONAGHY, L.; GROS, F.; AMIOT, L.; MARY, C.; MAILLARD, A.; GUIGUEN, C.; GANGNEUX, J.P. Elevated levels of soluble non-classical major histocompatibility class I molecule human leucocyte antigen (HLA)-G in the blood of HIV-infected patients with or without visceral leishmaniasis. **Clinical Experimental Immunology**, v. 147, n. 2, p. 236-240, 2007.

EDWARDS, S. V.; HEDRICK P. W. Evolution and ecology of MHC molecules:from genomics to sexual selection. **Tree**, v. 13, p. 305-311, 1998.

ELSEN, P. J.; GOBIN, S. J. P.; EGGERMOND, M. C. A.; PEIJNENBURG, A.; Regulation of MHC class I and II gene transcription: differences and similarities. **Immunogenetics**, v 48, p. 208-221, 1998.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE P. E.; QUATTRO J. M. Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. **Genetics**, v.131, p. 479-491, 1992.

FAVIER, B.; LE MAOULT, J.; ROUAS-FREISS, M.; MOREAU, P.; MENIER, C.; CAROSELLA, E.D. Research on HLA-G: an update. **Tissue Antigens**, v. 69, p. 207–211, 2007.

FUZZI, B.; RIZZO, R.; CRISCUOLI, L.; NOCI, I.; MELCHIORRI, L.; SCARSELLI, B.; BENCINI, E.; MENICUCCI, A.; BARICORDI, O.R. HLA-G expression in early embryos is a fundamental prerequisite for the obtainment of pregnancy. **European Journal Immunology**, v. 32, p.311–315, 2002.

GERAGHTY, D.E. Structure of the HLA class I region and expression of its resident genes. **Immunology**, v. 5, p. 3-7, 1993.

GERAGHTY, D.E.; KOLLER, B.H.; ORR, H.T. A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 84, p. 9145-9149, 1987.

GORER, P. A. The genetic and antigenic basis of tumour transplantation. **Journal Pathology Bacteriology** v.44. p. 691-697, 1936.

GUO, Y.; JAMISON D.C. The distribution of SNPs in human gene regulatory regions. **BioMed Central**, v.6, p. 1-11, 2005.

HANSEN, T. H.; CARRENO, B. M.; SACHS, D. H. The Major Histocompatibility Complex. **Fundamental Immunology**. 3. ed. New York : Raven Press, p. 577-628. 1993.

HARRISON, G.A.; HUMPHREY, K.E.; JAKOBSEN I.B.; COOPER, D.W. A 14 bp deletion polymorphism in the HLA-G gene. **Human Molecular Genetics**, v. 2, p. 2200, 1993.

HVIID, T. V. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. **Human Reproduction Update**. v.12, p.209–32, 2006.

HVIID, T. V.; CHRISTIANSEN, O. B. HOEGH, A. M.; HYLENIUS, S.; KRUSE, C. HLAG polymorphism in couples with recurrent spontaneous abortion. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 60, p. 122-132, 2002.

HVIID, T.V.; SORENSEN, S.; MORLING, N. Polymorphism in the regulatory region located more than 1.1 kilobases 5' to the start site of transcription, the promoter region, and exon 1 of the HLA-G gene. **Human Immunology**, v.60, p. 1237–1244, 1999.

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

IBGE –Instituto brasileiro de geografia e estatística. Disponível em:  
<http://www.ibge.gov.br/home/>

ISHITANI, A.; KISHIDA, M.; SAGESHIMA, N.; YASHIKI, S.; SONODA, S.; HAYAMI, M.; SMITH, A. G.; HATAKE, K. Re-examination of HLA-G polymorphism in African Americans. **Immunogenetics**, v. 48, p. 808-811, 1999.

JAATINEN, T. **Genetic studies of the human complement C4 region in MHC Class III**. Helsinki, 2002. Dissertação (Department of Biosciences) - University of Helsinki, Finland.

JONES, E. Y. MHC class I and class II structure. **Current Opinion Immunology**, v.9, p.75-79, 1997.

JURISICOVA, A.; CASPER, R.F.; MACLUSKY, N.J.; MILLS, G.B.; LIBRACH C.L. HLA-G expression during preimplantation human embryo development. **Proc National Academy Science USA**, v. 93, p.161–165, 1996.

KEATING, P.J.; CROMME, F.V.; DUGGAN-KEEN, M.; SNIJDERS, P.J.; WALBOOMERS, J.M.; HUNTER, R.D.; DYER, P.A.; STERN, P.L. Frequency of down-regulation of individual HLA-A and -B alleles in cervical carcinomas in relation to TAP-1 expression. **Journal Cancer**, v. 72, n. 2, p. 405-411, 1995.

KING, A.; BOOCOCK, C.; SHARKEY, A.M.; GARDNER L.; BERETTA A.; SICCARDI, A.G.; LOKE, Y.W. Evidence for the expression of HLA-A-C class I mRNA and protein by human first trimester trophoblast. **Journal Immunology**, v.156, p.2068–2076, 1996.

KIRSZENBAUM, M.; DJOULAH S.; HORS J.; PROST, S.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E. D. Polymorphism of HLA-G gene and protein. **Journal of reproductive Immunology**, Shannon, v.43, n.2, p.105-109, 1999.

KIRSZENBAUM, M.; MOREAU, P.; GLUCKMAN, E.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E. An alternatively spliced form of HLA-G mRNA in human trophoblasts and evidence for the presence of HLA-G transcript in adult lymphocytes. **Proc. National Academy Science USA**, v. 91, n. 10, p. 4209-4213, 1996.

KLEIN, J.; SATO, A.; The HLA system. First of two parts. **Advances in immunology. New England Journal of Medicine**, Boston, v. 343, n.10, p.702-709, 2000.

KLEIN, J.; HOREJSI, V. **Immunology**; 2 edição; editora: Blackwell Science, Oxford 1997.

KOLLER, B.H.; GERAGHTY, D.E.; SHIMIZU, Y.; DEMARS, R. A Novel HLA Class I Gene Expressed in Resting T Lymphocytes. **Print**, v. 141, p. 897-904, 1988.

KOVATS, S.; MAIN, E.K.; LIBRACH, C.; STUBBLEBINE, M.; FISHER, S.J.; DeMARS, R. A class 1 antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. **Science**, v. 248, p. 220-223, 1990.

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

LE DISCORDE, M.; MOREAU, P.; SABATIER, P.; LEGEAS, J.M.; CAROSELLA, E.D. Expression of HLA-G in human cornea, an immune-privileged tissue. **Human Immunology**, v. 64, n. 11, p. 1039-1044, 2003.

LEE, N.; GOODLETT, D.R.; ISHITANI, A. HLA-E surface expression depends on binding of TAP-dependent peptides derived from certain HLA class I signal sequences. **Journal Immunology**, v.160, p. 4951–4960, 1998.

LEE, N.; MALACKO, A.R.; ISHITANI, A.; CHEN, M.C.; BAJORATH, J.; ARQUARDT, H.; GERAGHTY, D.E. The membrane-bound and soluble forms of HLA-G bind identical sets of endogenous peptides but differ with respect to TAP association. **Immunity**, v. 3, n. 5, p. 591-600, 1995.

LE MAOULT, J.; CAUMARTIN, J.; DAOUYA, M.; FAVIER, B.; LEROND, S.; GONZALEZ, A.; CAROSELLA, E.D. Immune regulation by pretenders: cell-to-cell transfers of HLA-G make effector T cells act as regulatory cells. **Blood**, v. 109, n. 5, p.2040, 2007.

LEFEBVRE, S.; ANTOINE, M.; UZAN, S.; McMASTER, M.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D.; PAUL, P. Specific activation of the non-classical class I histocompatibility HLA-G antigen and expression of the ILT2 inhibitory receptor in human breast cancer. **Journal Pathology**, v. 196, n. 3, p. 266–274, 2002.

LE GAL, F. A.; RITEAU, B.; SEDLIK, C.; KHALIL-DAHER, I.; MENIER, C.; DAUSSET, J.; GUILLET, J. G.; CAROSELLA, E. D.; ROUAS-FREISS, N. HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. **Int Immunol.**,v.11, p.1351–1356, 1999.

LEWONTIN, R. C.The interaction of selection and linkage. I. General considerations; heterotic models. **Genetics**, v. 49, p. 49-67, 1964.

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 rejection. **Circulation**, v.105, p.1949–1954, 2002.

LILA, N.; CARPENTIER, A.; AMREIN, C.; KHALIL-DAHER, I.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E. D.; Implication of HLA-G molecule in heart-graft acceptance. **The Lancet**, New York, v.355, p. 2138, 2000.

LIN, A.; YAN, W.H.; XU, H.H.; TANG L.J.; CHEN, X.F.; ZHU, M. 14 bp deletion/insertion polymorphism in the HLA-G gene is a risk factor for idiopathic dilated cardiomyopathy in a Chinese Han population. **Tissue Antigens**, v. 70, p. 427–431, 2007.

MENDES-JUNIOR, C. T.; CASTELLI, E. C.; SIMÕES, R. T.; SIMÕES, A. L.; DONADI, E. A. HLA-G 14 pb polymorphism at exon 8 in Amerindian populations from the Brazilian Amazon. **Tissue Antigens**, v. 69, p. 255- 260, 2007.

MENIER, C.; RABREAU, M.; CHALLIER, J.C.; LE DISCORDE, M.; CAROSELLA, E.D.; ROUAS-FREISS, N. Erythroblasts secrete the nonclassical HLA-G molecule from primitive to definitive hematopoiesis. **Blood**, v. 104, n. 10, p. 3153-3160, 2004.

MESSAOUDI, I.; PATIÑO, J. A. G.; DYALL, R.; LEMAULT, J.; NIKOLICH-ZUGICH. Direct Link Between *mhc* Polymorphism, T Cell Avidity, and Diversity in Immune Defense. **Science**, v. 298, p. 1797 – 1800, 2002.

MIRRA, A.; MÉGRET, F.; PREHAUD, C.; LAFAGE, M.; MOREAU, P.; ROUAS-FREISS, N.; CAROSELLA E.D.; LAFON, M. Modulation of HLA-G and HLA-E expression in human neuronal cells after rabies virus or herpes virus simplex type 1 infections. **Human Immunology**, v. 68, n. 4, p. 294-302, 2007.

MOREAU, P.; ADRIAN-CABESTRE, F.; MENIER, C.; GUIARD, V.; GOURAND, L.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D.; PAUL, P. IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. **International Immunology**, v.11, p. 803–811, 2000.

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 Science**, v.100, p.1191–1196, 2003.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway – Murphy**. Edição: 7; Artmed; 2010.

NADALIN, S. Paraná: ocupação do território, população e migrações. Curitiba, **SEED**, 2001.

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- 1434, 2003.

OBER, C.; ROSINSKY, B.; GRIMSLEY, C.; VAN DER VEN, K.; ROBERTSON, A.; RUNGE, A. Population genetic studies of HLA-G: allele frequencies and linkage disequilibrium with HLA-A . **Journal Reproductive Immunology**, Shannon, v.32, p. 111-123, 1996.

OLIVEIRA, M. Imigração e diferença em um estado do sul do Brasil: o caso do Paraná. **Nuevo Mundo Mundos Nuevos**, Debates, 2007.

PARHAM, P. **O Sistema Imune**, Artmed Editora, 2001. PARHAM, P.; ADAMS, E. G.; ARNETT, K. G. The origins of HLA-A, B, C polymorphism. **Immunology**, v 143, p. 141-180, 1995.

PETZL-ERLER M. L. MHC polymorphism evolution (of the highly polymorphic genes as seen in the human species). In: SIMPÓSIO DE IMUNOGENÉTICA, 2., 2009, Curitiba.

PAUL, P.; CABESTRE, F.A.; IBRAHIM, E.C.; LEFEBVRE, S.; KHALIL-DAHER, I.; VAZEUX, G.; QUILES, R.M., BERMOND, F.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D. Identification of HLA-G7 as a new splice variant of the HLA-G mRNA and expression of soluble HLA-G5, -G6, and -G7 transcripts in human transfected cells. **Human Immunology**, v. 61, n. 11, p. 1138–1149, 2000.

PFEIFFER, K. A.; FIMMERS, R.; ENGELS, G.; VAN DER VEN, H.; VAN DER VEN, K. The HLA-G genotype is potentially associated with idiopathic recurrent spontaneous abortion. **Molecular Human Reproduction**, v. 7, p. 373-378, 2001.

PIRRI, A. **Polimorfismos de HLA-G e sua relação com o transplante renal**. Curitiba, 2006. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

POOL, J. E.; HELLMANN, I.; JENSEN, J. D.; NIELSEN, R. Population genetic inference from genomic sequence variation. **Genome Research**, v.20, p.291-300, 2010.

PROBST, C. M.; BOMPEIXE, E. P.; PEREIRA, N. F.; DE O DALALIO M. M.; VISENTAINER, J. E.; TSUNETO, L. T.; PETZL-ERLER, M. L. HLA polymorphisms and evaluation of European, African, and Amerindian contribution to the white and mulatto populations from Parana, Brazil. **Human Biology**, v. 72, p. 597-617, 2000.

PYO, C. W.; WILLIAMS, L. M.; MOORE, Y.; HYODO, H.; LI, S. S.; Z, L. P.; SAGESHIMA, N.; ISHITANI, A.; GERAGHTY, D. E. HLA-E, HLA-F and HLA-G polymorphism: genomic sequence defines haplotype structure and variation spanning the nonclassical class I genes. **Immunogenetics**, v.58, p. 241-251, 2006.

QIU, J.; TERASAKI, P.I.; MILLER, J.; MIZUTANI, K.; CAI, J.; CAROSELLA, E.D. Soluble HLA-G expression and renal graft acceptance. **American Journal Transplants**, v. 6, n. 9, p. 2152-2156, 2006.

REBMAN, V.; VAN DER VEN, K.; PASSLER, M.; PFEIFFER, K.; KREBS, D.; GROSSE-WILDE, H. Association of soluble HLA-G plasma levels with HLA-G alleles. **Tissue Antigens**, v.57, p. 15-21, 2001.

RITEAU, B.; FAURE, F.; MENIER, C.; VIEL, C.; CAROSELLA, E. D.; AMIGORENA, S.; ROUAS-FREISS, N. Exosomes bearing HLA-G are released by melanoma cells. **Human Immunology**, v. 64, p. 1064-1072, 2003.

ROUAS-FREISS, N.; MOREAU, P.; MENIER, C.; LE MAOULT, J.; CAROSELLA, E.D. Expression of tolerogenic HLA-G molecules in cancer prevents antitumor responses. **Seminars in Cancer Biology**, v. 17, n. 6, p. 413-421, 2007.

ROUAS-FREISS, N.; MOREAU, P.; FERRONE, S.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D. HLA-G proteins in cancer: do they provide tumor cells with an escape mechanism? **Cancer Research**, v. 65, n. 22, p. 10139-10144, 2005.

ROUSSEAU, P.; LE DISCORDE, M.; MOUILLOT, G.; MARCOU, C.; CAROSELLA, E.D.; MOREAU, P. The 14 bp deletion-insertion polymorphism in the 3' UTR region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. **Human Immunology**, v.64, p.1005–1010, 2003.

SARTURI, P. R. **Variação genética nos exons 2, 3 e 8 de HLA-G e sua relação com o abortamento recorrente**. Curitiba, 2004. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

SCOTT, V. E.; PHILIP, W. H. Evolution and ecology of MHC molecules: from genomics to sexual selection. **Tree**, v.13, p 305 – 311, 1998.

SHIINA, T.; INOKO, H.; KULSKI, J. K. An update of HLA genomic region, locus information and disease associations. **Tissue Antigens**, v.64, p. 631-649, 2004.

SILVA-ALVES, T. G. **Antígenos Leucocitários Humanos Não- Clássicos HLA-G e HLA-E em lesões benignas, pré-malignas e malignas de laringe associadas à infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV)**. Araraquara, 2009. Dissertação (Biotecnologia e Biotecnologia Aplicados à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP).

SILVA, J. S. **Regiões Reguladoras, Promotora e Deleção de 14 Pares de Bases no Éxon 8 no Gene HLA-G em casais com histórico de abortamento recorrente**. Curitiba, 2009. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

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

SNELL, G.D. Methods for the study of histocompatibility genes. **Journal Genetics**, v. 49, p. 87-108, 1948.

SOLIER, C.; MALLET, V.; LENFANT, F.; BERTRAND, A.; HUCHENQ, A.; LE BOUTEILLER, P. HLA-G unique promoter region: functional implications. **Immunogenetics**, v. 53, p. 617–625, 2001.

SUAREZ, M. B.; MORALSE, P.; CASTRO, M. J.; FERNANDEZ, V.; VARELA, P.; ALVAREZ, M.; MARTINEZ-LASO, J.; ARNAIZ-VILLENA, A. A new HLA-G allele (HLA-G \*0105N) and its distribution in the Spanish population. **Immunogenetics**, v.45, p. 464-465, 1997.

SULLIVAN, L.C.; HOARE, H.L.; McCLUSKEY, J.; ROSSJOHN, J.; BROOKS, A.G. A structural perspective on MHC class Ib molecules in adaptive immunity. **Trends Immunology**, v. 27, n. 9, p. 413-420, 2006.

TAN, Z.; SHON, A. M.; OBER, C. Evidence of balancing selection at the *HLA-G* promoter region. **Human molecular genetics**, v.14, p. 3619-3628, 2005.

TING, J. P.; TROWSDALE, J.; Genetic Control of MHC Class II Expression. **Cell**, v. 109, p. s21-s33, 2002.

VAN DER VEN, K.; PFEIFFER, K.; SKRABLIN, S. HLA-G polymorphisms and molecule function – Questions 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**. Curitiba, 2009. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná; 2009.

ZARKHIN, V.; TALISETTI, A.; LI, L.; WOZNIAK, L. J.; MCDIARMID, S. V.; COX, K.; ESQUIVEL, C.; SARWAL, M. M. Expression of Soluble HLA-G Identifies Favorable Outcomes in Liver Transplant Recipients. **Transplantation**, v.90, n.09, p. 1000-1005, 2010.

WEIR, B. Genetic data analysis. 2.ed. Sunderland: Sinauer Associates, p.144, 1996.

WIENDL, H.; FEGER, U.; MITTELBRONN, M.; JACK, C.; SCHREINER, B.; STADELMANN, C.; ANTEL, J.; BRUECK, W.; MEYERMANN, R.; BAR-OR, A.; KIESEIER, B.C.; WELLER, M. Expression of the immune-tolerogenic major histocompatibility molecule HLA-G in multiple sclerosis: implications for CNS immunity. **Brain**, v. 128; n. 11, p. 2689-2704, 2005.

YAMASHITA, T.; FUJII, T.; TOKUNAGA, K.; Analysis of human leukocyte antigen-G polymorphism including íntron 4 in Japanese couples with habitual abortion. **American Journal Reproduction Immunology**, v. 41; p. 159-163, 1999.

## 5. ARTIGO

### **Polimorfismos na região promotora e 3'UTR de HLA-G em uma amostra Afro Brasileira do Paraná**

Luciane Viater Tureck<sup>2</sup>, Luana Carvalho dos Santos<sup>2</sup>, Pryscilla Fanini Wowk<sup>2</sup>, Joandrei dos Santos Silva<sup>2</sup>, Sibelle Mattar<sup>2</sup>, João Carlos Marques Magalhães<sup>1</sup>, Maria da Graça Bicalho<sup>1</sup>.

1 – Departamento de Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

2 – Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH)

## RESUMO

O *HLA-G* é um gene classificado como MHC Classe I não clássico, de notória importância em contextos reprodutivos e auto-imunes. Exibe 27 polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) descritos até o momento em sua região reguladora e promotora, localizados em sítios de ligação a fatores transcricionais, os quais podem estar influenciando seus mecanismos regulatórios (Moreau *et al.*, 1997). Estudos envolvendo o polimorfismo *Ins/Del de 14 pb* localizado no éxon 8 de *HLA-G* sugerem associação com distúrbios da reprodução (Ober *et al.*, 2003), além de patologias auto-imunes (LeMaoult *et al.*, 2004) e cardiológicas (LIN *et al.*, 2007). Foi realizada a investigação de 15 SNPs da região reguladora/promotora, e a variação *Ins/Del de 14 pb* no éxon 8 de *HLA-G* em uma amostra de 150 indivíduos de ancestralidade afro-brasileira residentes no estado do Paraná. Os SNPs localizados na região promotora 5' URR exibiram desequilíbrio de ligação entre eles, exceto para com o polimorfismo localizado no éxon 8. Foi possível estimar as composições haplotípicas mais comuns e suas frequências nas amostras, sendo caracterizados 3 haplótipos diferentes com frequência superior a 5%. Tais haplótipos se mostraram bastante semelhantes na sua composição com haplótipos encontrados em uma amostra euro-brasileira (SILVA, 2009) recentemente investigada pelo mesmo grupo de estudo, e também entre as configurações haplotípicas da região promotora obtidas por LARSEN e HVIID, (2009) as quais foram associadas aos alelos de *HLA-G*. Os haplótipos da amostra afro-brasileira parecem estar associados aos alelos G\*01:01:01, G\*01:04:01 e com G\*01:01:02, tendo a posição -486 C/A apresentado não conformidade entre a amostra de origem africana quando comparada com as amostras de origem europeia (LARSEN e HVIID, 2009; SILVA, 2009). O teste AMOVA realizado através da comparação das composições haplotípicas observadas entre a amostra afro-brasileira e a euro-brasileira (SILVA, 2009) apresentou o valor de 1,93% entre as amostras populacionais, indicando pouca variação ( $0 < F_{st} < 0,05$ ). Já quando as composições haplotípicas da amostra afro-brasileira do presente estudo foram comparadas com dados disponíveis da população de Hutterites (OBER *et al.*, 2003), tais índices se mostraram mais significativos. O teste de AMOVA indicou variação de 6,46% entre as populações ( $0,05 < F_{st} < 0,15$ ).

## INTRODUÇÃO

O gene *HLA-G* está localizado no *Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC)*, situado no braço curto do cromossomo 6 (6p21.31). Essa região do genoma se estende por aproximadamente 7600kb alojando diversos genes, sendo que um grande número desses genes está envolvido com a resposta imune (LAMM *et al.*, 1985; BELL, 1989). O *HLA-G* é classificado como um gene MHC de classe I não clássico, sendo caracterizado por limitada variação nucleotídica quando comparado com os genes MHC Classe I Clássicos e mecanismos regulatórios bastante

diferenciados, acarretando numa distribuição tecidual restrita (KOVATS *et al.*, 1990; YAMASHITA *et al.*, 1996; BLASCHITZ *et al.*, 1997; HVIID *et al.*, 1997; ISHITANI *et al.*, 1999; LE BOUTEILLER, 1999).

O produto protéico de HLA-G pode ser expresso em diferentes isoformas, sendo 4 ligadas à membrana, e 3 formas solúveis (CAROSELLA *et al.*, 2008). Assim como as outras proteínas HLA, o HLA-G possui estrutura para apresentar peptídeos, porém sua expressão bastante acentuada no trofoblasto e células da placenta (KOVATS *et al.*, 1990; ISHITANI *et al.*, 2003) o torna protagonista em contextos reprodutivos, parecendo atuar na modulação do sistema imune materno durante a gravidez e deste modo contribui para a aceitação materna do feto semialogênico (HVIID, 2006).

Estudos populacionais envolvendo os genes HLA são bastante comuns, já que são muito informativos na caracterização de diferentes populações, devido ao seu elevado polimorfismo. Sendo assim, caracterizamos a variação genética de 15 SNPs da região 5'URR e do polimorfismo *Ins/Del 14pb* na região 3'UTR de *HLA-G* em uma amostra composta por 150 indivíduos Afro-Brasileiros do Paraná, visando referenciar de forma mais robusta estudos de associação em diferentes contextos clínicos que se utilizam de *HLA-G* como gene candidato, com dados populacionais mais próximos aos das amostras caso controle brasileiras. As variações nucleotídicas na região reguladora/promotora, e na região 3'UTR podem influenciar na expressão protéica diferenciada de *HLA-G*, já que tais regiões demonstram possuir sítios alvo *cis* importantes para a ligação de fatores transcricionais (SCHMIDT *et al.*, 1993; MOREAU *et al.*, 1997). A expressão aberrante de *HLA-G* parece estar associada com casos de abortamento recorrente (OBER *et al.*, 2003), pré-eclampsia (HYLENIUS *et al.*, 2004), processos de aceitação de aloenxertos (LILA *et al.*, 2002; CREPUT *et al.*, 2003), e doenças auto-imunes (LE MAOULT *et al.*, 2004).

A genotipagem, obtida por meio do seqüenciamento direto de DNA e corrida eletroforética, permitiu calcular as frequências alélicas, genotípicas e compará-las com as frequências encontradas em estudos anteriores de uma amostra euro-brasileira (SILVA, 2009), e uma amostra do isolado populacional Hutterites (OBER *et al.*, 2003). Os parâmetros de desequilíbrio de ligação ( $p$ ,  $D'$  e  $r^2$ ) foram estimados, assim como a configuração e frequência dos haplótipos mais comumente encontrados na amostra afro-brasileira, sendo que através destes dados, foi possível

aplicar o teste AMOVA para estimar a diferenciação existente entre as amostras de ancestralidade europeia e a amostra de ancestralidade africana.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### AMOSTRAS

A pesquisa contou com 150 indivíduos (75 homens e 75 mulheres) de ancestralidade africana, não aparentados cadastrados em um banco de doadores voluntários de medula do Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH), foram selecionadas as amostras obtidas entre os anos de 2007 e 2010.

### GENOTIPAGEM DOS SNPS DA REGIÃO PROMOTORA 5'URR DE HLA-G

Foram investigadas duas regiões diferentes do gene *HLA-G* (região reguladora/promotora e região 3'UTR), usando-se DNA extraído do sangue periférico através da técnica de *salting out* descrita por Lahiri e Nurnberger em 1991.

Através do sequenciamento direto do DNA foram genotipados 15 SNPs compreendidos entre as posições -1447 e -304 da região reguladora e promotora do gene *HLA-G*. Os fragmentos da região promotora foram amplificados com protocolos diferenciados: Fragmento 1 (-1446F/ -830R), oligonucleotídeos iniciadores na concentração de 7,5pM/cada por reação (5'ACATTCTAGAAGCTTCACAAGAATG/3'CGTAGCCCTAAGTTTCCGTGTG), DNA molde na concentração 100ng por reação; tampão BUFFER 10X na quantidade de 1x; dNTPs na concentração de 0,10mM; MgCl<sub>2</sub> 2 mM; *Taq Platinum Invitrogen* 2U, e água ultrapura q.s.p. 50µl. Fragmento 2 (-919F/ - 304R), oligonucleotídeos iniciadores na concentração de 5 pM/cada por reação(5'CTGTGAGGTGAATAAAGTTTGTGC/3'GCCAAGCGTTCTGTCTCAGTGT), DNA molde na concentração 100ng por reação; tampão BUFF 10X na quantidade de 1x; dNTPs na concentração de 0,10mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; *Taq Platinum Invitrogen* 2U, e água ultrapura q.s.p. 50µl.

Em seguida, os produtos amplificados seguiram para procedimentos de purificação com acetato de amônio, e logo após com purificação enzimática (ver anexo).

Os produtos purificados foram submetidos à reação de seqüenciamento de acordo com o procedimento: amostra de DNA amplificada e purificada na concentração de 100ng por reação; *primer* de seqüenciamento na concentração de 1,6 pM – 1,6 µL; *Big Dye* v3.1 - 1µL; *save* tampão – 0,5 µL.

Após o processo de precipitação, a genotipagem da região reguladora/promotora (Figuras 6 e 7- Apêndice) se deu por meio do seqüenciamento direto do DNA através do aparelho ABI-310 Applied Biosystems.

### GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO *INS/DEL 14PB* NO EXON 8 NA REGIÃO 3'UTR DE *HLA-G*

A amplificação da região 3'UTR seguiu o protocolo: DNA molde na concentração 100ng por reação; tampão BUFF 10X na quantidade de 1x; dNTPs na concentração de 0,10mM; oligonucleotídeos iniciadores na concentração de 10pM/cada por reação (5' GTGATGGGCTGTTTAAAGTGTCACC/3' GGAAGGAATGCAGTTCAGCATGA), MgCl<sub>2</sub> 1 mM; *Taq Platinum Invitrogen* 2U, e água ultrapura q.s.p. 50µl.

O protocolo para a reação de PCR: passos de desnaturação a 96°C por 5', 35 ciclos a 96°C por 30'', 64°C por 1'30'' e 72°C por 1' e uma etapa final de anelamento a 72°C por 5'. Após isto os produtos foram submetidos a uma corrida eletroforética em gel de poliacrilamida a 8% com solução estoque de 29:1, durante 150' a amperagem 60. O gel foi corado com coloração de prata, que permitiu a atribuição dos três diferentes genótipos. O polimorfismo *Ins/Del14pb* presente no éxon 8 de *HLA-G* foi analisado através da análise deste gel (Figura 5-Apêndice). O alelo *Ins14pb* (+14pb) originou um produto de PCR de 214pb enquanto o alelo *Del14pb* (-14pb) originou um produto de PCR de 210pb (Figura 5 - Apêndice).

### ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As freqüências genótípicas e alélicas foram obtidas por contagem direta. As estimativas das freqüências dos haplótipos foram obtidas com o programa ARLEQUIN Versão 3.11 *Software* (EXCOFFIER *et al.*, 1992) através do algoritmo de maximização da expectativa (EM), com 1000 repetições (*bootstrap*). Os parâmetros de medida do desequilíbrio de ligação ( $p$ ,  $D'$ ,  $r^2$ ) foram também calculados com

auxílio do programa ARLEQUIN 3.11.

O teste do  $\chi^2$ , utilizado para testar a hipótese da segregação independente entre os *locus* da região promotora e 3'UTR, foi utilizado por meio do programa GENE POP. Quando a probabilidade dos desvios (valor de  $p$ ) encontrada foi menor que 0,05, o  $H_0$  foi rejeitado, portanto o desequilíbrio de ligação pode estar ocorrendo entre eles.

Outro parâmetro calculado foi o  $F_{st}$ , este índice que faz parte da Estatística F de Wright, 1951 permite estimar a diferenciação genética entre sub-populações e mede o grau de isolamento das mesmas. As medidas de  $F_{st}$  foram obtidas pelo teste AMOVA, a partir da comparação entre as configurações e as frequências dos haplótipos mais comuns observados nas amostras populacionais que foram comparadas. Tais testes foram realizados através do programa ARLEQUIN com probabilidades calculadas por 1000 permutações ao acaso.

O tipo de métrica utilizada pelo ARLEQUIN para gerar este tipo de dado, segundo EXCOFFIER *et al.*, (1992) pode ser utilizada quando a identidade dos sítios polimórficos é bem definida, e quando alguns haplótipos são claramente diferentes dos outros. O teste AMOVA divide a variação observada em componentes atribuíveis a diferentes fontes de variação, tornando-o bastante confiável, sendo eficaz para verificar a significância estatística das diferenças entre amostras populacionais.

## RESULTADOS

Foram calculadas as frequências alélicas para cada SNP da região promotora de HLA-G e também para o polimorfismo *Ins/Del 14pb* da região 3'UTR na amostra afro-brasileira (Tabela 11- Apêndice). As frequências genotípicas de cada SNP da região promotora, e também do polimorfismo *Ins/Del 14pb* da região 3'UTR de HLA-G, encontradas na amostra Afro-Brasileira, encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 12 – Apêndice).

A distribuição não aleatória (preferencial) entre dois alelos de *loci* diferentes em um mesmo cromossomo sugere a ocorrência de desequilíbrio de ligação entre eles (WEIR, 1996). Sendo assim, a ocorrência de desequilíbrio de ligação (LD) entre os SNPs da região promotora e também entre o polimorfismo *Ins/Del 14pb* da região 3'UTR de HLA-G foi testada (Tabela 13 - Apêndice). Em todas as combinações entre

os *locus* onde  $p$  assumiu valores  $>0,05$  foram consideradas estatisticamente não significativas, sendo assim, o polimorfismo +14pb/-14pb encontra-se em equilíbrio com praticamente todos os SNPs da região reguladora/promotora do gene *HLA-G*, (exceto com o SNP -1140 T/A). Esta condição pode estar relacionada com a distância física existente entre a região promotora do gene e a sua região 3'UTR, favorecendo, desta forma, a recombinação entre os SNPs localizados nestas duas regiões, já que a ligação física entre os *locus* é um dos fatores responsáveis pela ocorrência do desequilíbrio de ligação.

Situação diferente ocorreu entre os SNPs da região promotora, os quais apresentaram desequilíbrio de ligação uns com os outros, possivelmente devido à proximidade dos sítios polimórficos.

Além de testar se os *locus* estão em desequilíbrio de ligação ou não, foi possível mensurar a magnitude deste desequilíbrio, por meio de parâmetros como o  $D'$  (Tabela 14 - Apêndice), definido como o coeficiente de desequilíbrio de ligação normalizado pelo valor máximo que ele pode assumir, dadas às frequências alélicas (LEWONTIN,1964).

Outro parâmetro convencional de medida do desequilíbrio entre pares de alelos em dois *locus* é o quadrado do coeficiente de correlação entre as frequências alélicas ( $r^2$ ) (Tabela 15 - Apêndice), que pode ser expresso como função da medida do desequilíbrio de ligação ( $D$ ).

A configuração e as frequências haplotípicas foram estimadas na amostra Afro-Brasileira (Tabela 16 – Apêndice). Frequências acima, ou próximas (0,04) a 0,05 foram consideradas. Frequências abaixo de 0,05 foram desconsideradas, já que a possibilidade do respectivo haplótipo ser duvidoso é bastante alta. O baixo número de amostras pode ter influenciado na apresentação de haplótipos duvidosos, e a confirmação destes só seria possível por meio da clonagem das amostras onde os SNPs são heterozigotos. A estimativa da configuração dos haplótipos na amostra afro-brasileira permitiu a análise comparativa destes, com os encontrados na amostra euro-brasileira (SILVA, 2009) e também com aqueles descritos por LARSEN e HVIID, 2009, cujo estudo também forneceu configurações haplotípicas para a região promotora de *HLA-G* e alelos associados (Tabela 17).

TABELA 17 – COMPARAÇÃO ENTRE AS CONFIGURAÇÕES HAPLOTÍPICAS DAS AMOSTRAS AFRO-BRASILEIRAS E EURO-BRASILEIRAS (LARSEN e HVIID, 2003) (SILVA, 2009), E OS ALELOS ASSOCIADOS SEGUNDO LARSEN e HVIID, 2003.

	HAPLÓTIPO	N. OBSERVADO	FREQUÊNCIA	-1306	-1179	-1155	-1140	-1138	-1121	-964	-762	-725	-716	-689	-666	-633	-486	-477
				A/G	G/A	A/G	T/A	G/A	T/C	A/G	T/C	C/G/T	G/T	G/A	T/G	A/G	A/C	G/C
Amostra Afro-Brasileira	1	33	0,2075	G	A	G	A	A	C	G	C	C	T	A	G	G	C	C
	2	30	0,1886	A	G	A	A	A	C	A	T	C	G	G	T	A	A	G
	3	28	0,1761	A	G	G	T	A	C	A	T	C	G	G	T	A	A	G
Amostra Euro-Brasileira (SILVA, 2009)	1C	84	0,3043	G	A	G	A	A	C	G	C	C	T	A	G	G	A	C
	2C	71	0,2572	A	G	G	T	A	C	A	T	C	G	G	T	A	C	G
Alelos associados a configuração haplotípica descrita por LARSEN e HVIID, 2003	Haplótipo	Alelo																
	a1	G*01:01:01		G	A	G	A	A	C	G	C	C	T	A	G	G	A	C
	a2	G*01:01:02		A	G	G	T	A	C	A	T	C	G	G	T	A	C	G
a	G*01:04:01		A	G	A	A	A	C	A	T	C	G	G	T	A	C	G	

Nota: A posição -486 A/C está em destaque por diferir nas composições haplotípicas de origem européia.

De acordo com a comparação visualizada na Tabela 17 os haplótipos mais frequentemente observados na amostra afro-brasileira se assemelham com os haplótipos mais comumente observados na amostra euro-brasileira estudada por SILVA, 2009, exceto na posição -486 A/C. A mesma observação é válida quando comparamos tais haplótipos da amostra Afro-Brasileira com os haplótipos configurados por LARSEN e HVIID, 2003 os quais associaram estes dados com os alelos de *HLA-G*. Estas análises são sugestivas de que existam pelo menos dois haplótipos bem característicos para as amostras Euro-Brasileiras, sendo associados aos alelos G\*01:01:01 e G\*01:01:02, enquanto que na amostra Afro-Brasileira estudada, as três configurações haplotípicas mais frequentes parecem estar associadas aos alelos G\*01:01:01, G\*01:04:01 e G\*01:01:02 respectivamente.

As não conformidades observadas para a posição do SNP -486 são bastante intrigantes, uma vez que tal posição diz respeito ao sítio de ação *cis* HSE, que é um elemento ligado as proteínas de choque térmico, onde se ligam os fatores de ação *trans* HSF1.

## DISCUSSÃO

Os resultados obtidos através da genotipagem dos SNPs das regiões promotora e 3'UTR de HLA-G permitiram a aplicação de análises estatísticas para descrever e caracterizar uma amostra populacional, de 150 indivíduos afro-brasileiros, selecionados aleatoriamente do banco de dados do LIGH. Foi possível traçar um perfil da variabilidade genética e configurações haplotípicas de suas regiões reguladoras e comparar com as poucas informações disponíveis na literatura obtidas em estudos similares com outras amostras populacionais, como por exemplo, com os Hutterites. Esse isolado populacional tem sido alvo de estudos sobre genes HLA desde 1982 onde OBER *et al.*, em 2003, investigaram 42 indivíduos dessa população, identificando 18 SNPs na região promotora de HLA-G, com os quais comparamos nossos resultados e observamos uma diferenciação significativa nas frequências dos SNPs entre estas duas amostras populacionais ( $p = 0,0325$ ) (Tabela 18 – Apêndice). A comunidade Hutterites foi fundada por aproximadamente 90 pessoas que vieram de Tirol na Áustria para os Estados Unidos em 1874 e se estabeleceram em pequenas comunidades agrícolas, no que hoje é o Sul de Dakota. Os indivíduos desta comunidade possuem um genoma parecido, mas não idêntico, resultado do seu pequeno número de fundadores e pouca miscigenação, resultando num grupo geneticamente isolado (OBER, *et al.*, 2003).

As comparações das configurações haplotípicas encontradas na amostra afro-brasileira, com aquelas descritas na amostra Hutterite (OBER, *et al.*, 2003), através do parâmetro  $F_{st}$  permitiu concluir que 93,5% do total de variação observada poderia ser atribuída a variação intra-populacional (entre os indivíduos da mesma população), enquanto 6,4% do total foi relacionada à variação entre as populações. Deste modo, conclui-se que há diferenciação moderada entre as populações Afro-brasileira e Hutterite ( $0,05 < F_{st} < 0,15$ ) (Tabela 19 – Apêndice).

Nossos resultados foram também comparados com aqueles obtidos de outra amostra populacional de 125 indivíduos euro-brasileiros do Estado do Paraná, genotipada para os mesmos marcadores (SILVA, 2009).

Os SNPs que apresentaram diferenciação em frequências alélicas e genotípicas foram aqueles das posições -1170 ( $p=0,033$ ); -1155 ( $p=0,000$ ), e -1138 ( $p=0,000$ ) (Tabelas 20 e 21 – Apêndice). Estes SNPs parecem estar situados em um

importante sítio regulador tecido específico (SCHMIDT *et al.*, 1993; SCHMIDT e ORR, 1995) . As conseqüências funcionais das variações nucleotídicas dentro deste sítio poderiam estar relacionadas com a afinidade diferencial a ligação de fatores transcricionais que teriam estas sequências *cis* como região alvo, sendo assim, os níveis de transcrito poderiam estar variando em diferentes tecidos. Este polimorfismo pode conferir um valor adaptativo, levando a diferenciação nas amostras populacionais afro-brasileiras e euro-brasileiras, porém estudos específicos sobre a ligação diferencial de fatores transcricionais nestes sítios são necessários para elucidar esta questão. Para os demais SNPs, inclusive o polimorfismo *Ins/Del* no éxon 8 de *HLA-G*, não observou-se diferenciação significativa entre as amostras populacionais comparadas.

A variação observada através do parâmetro  $F_{st}$ , quando das comparações entre as amostra euro (SILVA, 2009) e afro brasileiras representou 1,93% da variação total observada, enquanto que a variação atribuída aos indivíduos dessas populações ficou em 98,03% (Tabela 22 – Apêndice). Tais valores ( $0 < F_{ST} < 0,05$ ) sugerem que as amostras afro e euro brasileiras possuem pouca diferenciação e fixaram alelos semelhantes com relação a esta região do genoma.

Também as frequências alélicas e genotípicas relacionadas ao polimorfismo *Ins/Del14pb* localizado no éxon 8 de *HLA-G* da amostra afro brasileira foram comparadas com amostra euro-brasileira (Tabelas 23 e 24 – Apêndice), não observando-se diferenciação entre essas variações nucleotídicas.

Tais análises sugerem que, quanto aos polimorfismos na região promotora de *HLA-G*, a amostra populacional afro-brasileira se encontra mais diferenciada da amostra de Hutterites do que da amostra euro-brasileira, como seria de se esperar.

Entre os Hutterites os casamentos ocorrem preferencialmente entre indivíduos da mesma comunidade, sendo assim, é provável que o fluxo gênico esteja bem reduzido nesta população, e do ponto de vista genético ela permaneça isolada. O Brasil possui uma diversidade genética e cultural ímpar, característica de uma população que vem sofrendo um processo prolongado de miscigenação cuja intensidade varia ao longo do tempo e depende também da região geográfica. A amostra populacional euro-brasileira (Curitiba/PR 25°25'51.30''S 49°17'3.47''W) miscigenou-se com a contribuição genética de várias etnias e grupos raciais, alemães, italianos, poloneses, italianos, ameríndios e afro descendentes (NADALIN 2001; OLIVEIRA, 2007).

Essa miscigenação poderia atuar no sentido de minimizar diferenças entre as frequências dos SNPs na região promotora de *HLA-G* observadas, quando das comparações entre as amostras populacionais euro-brasileiras e afro-brasileiras. Por outro lado, a diferenciação entre as populações euro e afro brasileiras na sua condição inicial poderiam também ser mínimas.

As configurações haplotípicas dos SNPs da região promotora de *HLA-G* na amostra afro-brasileira estudada se assemelham as encontradas por SILVA, 2009 em uma amostra euro-brasileira, e também às encontradas por LARSEN e HIIVD, 2003 em uma amostra de ancestralidade também européia. Porém foi observado uma não concordância na composição nucleotídica da posição -486 A/C entre estas amostras populacionais (Tabela 17). Esta posição está localizada dentro do elemento de choque térmico (HSE), que se encontra entre as posições -487 e -475 pb do sítio de início da transcrição do gene *HLA-G* (IBRAHIM *et al.*, 2000). Esta sequência é responsiva ao fator de choque térmico HSF1 de ação *trans*, e foi demonstrado por IBRAHIM *et al.*, (2000) que HSF1 aumenta os níveis de transcrito de *HLA-G* em linhagens celulares tumorais humanas (melanoma) *HLA-G*-negativas sob condições de stress. Sendo assim, *HLA-G* é um gene que pode ter sua transcrição induzida pelo stress (IBRAHIM *et al.*, 2000), além de responder também a citocinas e modificações epigenéticas, dentre outros fatores, sendo que no caso das linhagens tumorais a situação de stress é representada pela hipóxia que existe no microambiente em torno dos tumores de crescimento rápido (MENIER *et al.*, 2008).

Segundo IBRAHIM *et al.*, (2000) mecanismos regulatórios específicos foram selecionados para atuar seletivamente na ativação induzida pelo stress de um subgrupo de genes Classe I não clássicos, dentre eles o *HLA-G*. Esta expressão pode permitir o ajuste fino no reconhecimento de células sob stress. No caso de células tumorais, a indução de *HLA-G* pelo stress (aumento da temperatura, e inúmeros fatores que podem estar atuando no seu microambiente) pode fornecer a estas células um mecanismo adicional para escapar da imunovigilância (IBRAHIM *et al.*, 2000). Sendo assim, é provável que polimorfismos na sequência nucleotídica de HSE (elemento de choque térmico) venham a ter consequências funcionais na transativação do gene *HLA-G* em células sob condições de stress, o que pode ser corroborado pelo fato de haver diferenças na posição -486 nos haplótipos encontrados nas amostras de ancestralidade européia quando comparados com a

amostra afro-brasileira, podendo ser indicativo de que mecanismos seletivos estejam atuando nesta região genômica.

Com a descrição dos SNPs da região promotora e 3'UTR de *HLA-G* na amostra afro-brasileira, foi possível verificar que as frequências genótípicas encontram-se em equilíbrio de Hardy e Weinberg, e que existe desequilíbrio de ligação entre os SNPs da região promotora, mas não entre os estes e o polimorfismo de *Ins/Del* de 14 pb do éxon 8 de *HLA-G*. Através dos dados obtidos por AMOVA, dentre eles o valor de  $F_{st}$ , foi possível verificar que a amostra afro-brasileira parece estar menos diferenciada da amostra euro-brasileira que da amostra de Huterittes.

Em estudo publicado por TAN *et al.*, (2005) onde as variações de sequência, e a estrutura dos haplótipos da região promotora do *HLA-G* foram analisadas em afro-americanos, caucasóides americanos, e Han chineses, foi proposto que um mecanismo de seleção balanceadora manteve duas linhagens alélicas na região promotora no locus *HLA-G*. Essa observação, resultou em investigações sobre a origem e função dessas linhagens alélicas na região promotora, que por sua vez poderiam resultar em variações temporais e espaciais na expressão do gene, atendendo a diferentes necessidades imunológicas do tecido e/ou estágio de desenvolvimento. Tais aspectos ainda carecem de mais estudos para a elucidação destas questões e os resultados de nosso estudo podem trazer subsídios que permitam interpretar as hipóteses propostas para a estrutura de haplótipos de regiões reguladoras de *HLA-G*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BLASCHITZ, A.; LENFANT, F.; MALLET, V.; HARTMANN, M.; BENSUSSAN, A.; GERAGHTY, D. E.; LE BOUTEILLER, P.; DOHR, G. Endothelial cells in chorionic fetal vessels of first trimester placenta express HLA-G. **European Journal of Immunology**, v.27, p. 3380–3388, 1997.

CAROSELLA, E.D.; FAVIER, B.; ROUAS-FREISS, N.; MOREAU, P.; LEMAULT, J. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. **Blood**, v. 111, n. 10, p. 4862-4870, 2008.

CREPUT, C.; LE FRIEC, G.; BAHRI, R.; AMIOT, L.; CHARPENTIER, B.; CAROSELLA, E.; ROUAS-FREISS, N.; DURRBACH, A. Detection of HLA-G in serum and graft biopsy associated with fewer acute rejections following combined liver-kidney transplantation: possible implications for monitoring patients. **Human Immunology**, v. 64, p.1033–1038, 2003.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE P. E.; QUATTRO J. M. Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. **Genetics**, v.131, p. 479-491, 1992.

HVIID, T. V.; MELDGAARD, M.; SORENSEN, S.; MORLING, N. Polymorphism of exon 3 of the HLA-G gene. **Journal Reproduction Immunology**, v. 35, p.31–42, 1997.

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

HVIID, T. V. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. **Human Reproduction Update**. v.12, p.209–32, 2006.

HYLENIUS, S.; NYBO ANDERSEN, A. M.; MELBYE, M.; HVIID, T. V. Association between HLA-G genotype and risk of pre-eclampsia: a case-control study using family triads. **Molecular Human Reproduction**, v.10, p.237–246, 2004.

IBRAHIM, E. C.; MORANGE, M.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E. D.; PAUL, P. Heat shock and arsenite induce expression of the nonclassical class I histocompatibility HLA-G gene in tumor cell lines. **Cell Stress Chaperones**, v. 5, p.207–218, 2000.

ISHITANI, A.; KISHIDA, M.; SAGESHIMA, N.; YASHIKI, S.; SONODA, S.; HAYAMI, M.; SMITH, A. G.; HATAKE, K. Re-examination of HLA-G polymorphism in African Americans. **Immunogenetics**, v.49, p.808–811, 1999.

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

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

LARSEN, M. H.; HVIID, T. V. Human leukocyte antigen-G polymorphism in relation to expression, function, and disease. **Human Immunology**, v. 70, p. 1026-1034, 2009.

LE BOUTEILLER, P.; BLASCHITZ, A. The functionality of HLA-G is emerging. **Immunology Review**, v. 167, p.233–244, 1999.

LEMAOULT, J.; KRAWICE-RADANNE, I.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E. D. HLA-G1-expressing antigen-presenting cells induce immunosuppressive CD4+ T cells. **Proceedings National Academy Science**, v.101, p.7064–7069, 2004.

LEWONTIN, R. C. The interaction of selection and linkage. I. General considerations; heterotic models. **Genetics**, v. 49, p. 49-67, 1964.

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 rejection. **Circulation**, v.105, p.1949–1954, 2002.

LIN, A.; YAN, W.H.; XU, H.H.; TANG L.J.; CHEN, X.F.; ZHU, M. 14 bp deletion/insertion polymorphism in the HLA-G gene is a risk factor for idiopathic dilated cardiomyopathy in a Chinese Han population. **Tissue Antigens**. v. 70, p. 427–431, 2007.

MENIER, C.; ROUAS-FREISS, N.; CAROSELLA, E. D. The HLA-G non classical MHC class I molecule is expressed in cancer with poor prognosis. Implications in tumour escape from immune system and clinical applications. **Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology**. July, 2008.

MOREAU, P.; PAUL, P.; GOURAND, L.; PROST, S.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D.; KIRSZENBAUM, M. HLA-G gene transcriptional regulation in trophoblasts and blood cells: differential binding of nuclear factors to a regulatory element located 1.1 kb from exon 1. **Human Immunology**, v.52, p.41–46, 1997.

NADALIN, S. Paraná: ocupação do território, população e migrações. Curitiba, **SEED**, 2001.

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- 1434, 2003.

OLIVEIRA, M. Imigração e diferença em um estado do sul do Brasil: o caso do Paraná. **Nuevo Mundo Mundos Nuevos**, Debates, 2007.

SCHMIDT, C. M.; EHLENFELDT, R. G.; ATHANASIOU, M. C.; DUVICK, L. A.; HEINRICH, H.; DAVID, C. S.; ORR, H. T. Extraembryonic expression of the human MHC class I gene HLA-G in transgenic mice. Evidence for a positive regulatory region located 1 kilobase 5'-to the start site of transcription. **Journal Immunology**, v.151, p.2633–2645, 1993.

SCHMIDT, C. M.; ORR, H. T. Maternal/fetal interactions: the role of the MHC class I molecule HLA-G. **Critical Reviews in Immunology**, v.13, p.207–224, 1993.

SCHMIDT, C. M.; ORR, H.T. HLA-G transgenic mice: a model for studying expression and function at the maternal/fetal interface. **Immunology Review**, v.147, p.53–65, 1995.

SILVA, J. S. **Regiões Reguladoras, Promotora e Deleção de 14 Pares de Bases no Éxon 8 no Gene HLA-G em casais com histórico de abortamento recorrente.**

Curitiba, 2009. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

TAN, Z.; SHON, A. M.; OBER, C. Evidence of balancing selection at the *HLA-G* promoter region. **Human molecular genetics**, v.14, p. 3619-3628, 2005.

YAMASHITA, T.; FUJII, T.; WATANABE, Y.; TOKUNAGA, K.; TADOKORO, K.; JUJI, T.; TAKETANI, Y. HLA-G gene polymorphism in a Japanese population. **Immunogenetics**, v. 44, p.186–191, 1996.

WEIR, B. Genetic data analysis. 2.ed. Sunderland: Sinauer Associates, p.144, 1996.

## 6. CONCLUSÃO GERAL

A descrição dos polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) localizados na região reguladora/promotora, e o polimorfismo *Ins/Del* 14pb no éxon 8 de *HLA-G* em uma amostra Afro-Brasileira, bem como as comparações com outros extratos populacionais de origem europeia (SILVA, 2009) (OBER *et al.*,2003) permitiram chegar às seguintes conclusões:

- As frequências alélicas e genotípicas dos SNPs da região reguladora/promotora, e 3'UTR de *HLA-G* na amostra afro-brasileira estudada encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

-Os SNPs da região promotora de *HLA-G* encontram-se em desequilíbrio de ligação.

-As configurações haplotípicas mais comuns encontradas na amostra afro brasileira foram bastante parecidas com as encontradas na amostra euro-brasileira

- A posição polimórfica -486C/A difere nos haplótipos mais frequentes encontrados na amostra afro-brasileira, quando comparamos com os mesmos dados obtidos de amostras populacionais de ancestralidade europeia (SILVA, 2009) (OBER *et al.*,2003).

-A amostra populacional afro-brasileira está mais próxima, quanto a variantes polimórficas na região promotora de *HLA-G*, da amostra euro-brasileira (SILVA, 2009) que da amostra de Hutterites (OBER *et al.*,2003).

## 7. APÊNDICE

### 7.1 MATERIAIS E MÉTODOS DETALHADOS

#### CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra foi constituída por 150 indivíduos saudáveis, sendo 75 mulheres e 75 homens, residentes em Curitiba e Região Metropolitana e também em outras cidades do Estado do Paraná e, que fazem parte do banco de dados do Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade da Universidade Federal do Paraná (LIGH). As amostras já haviam sido genotipadas em baixa resolução para o *locus HLA-B* e em média/alta resolução para os *loci HLA-DRB1* e *HLA-DQB1* como procedimento de rotina do laboratório LIGH.

Os indivíduos foram selecionados aleatoriamente do banco de dados do Sistema LIGH, mediante alguns critérios para que este grupo escolhido fosse representativo de uma amostra populacional paranaense. Os critérios foram: indivíduos não aparentados, para isso foram excluídos pessoas residentes no mesmo endereço, e com sobrenomes iguais. Foram incluídos indivíduos de naturalidade paranaense, e a proporção sexual foi a mesma, ou seja, 50% homens, 50% mulheres.

Os indivíduos selecionadas se auto-classificaram como pertencendo ao grupo racial negro, conforme consta na ficha individual de dados, que adota os critérios do IBGE para definição do grupo racial.

## GENOTIPAGEM DA REGIÃO PROMOTORA, E AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO DE 210 pb E 224 pb DA REGIÃO 3' UTR DE HLA – G

- CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DO DNA

O DNA estocado e utilizado para esta pesquisa foi quantificado pela leitura de densidade ótica, utilizando o aparelho *Nano drop*, um espectrofotômetro de espectro completo (190 a 840 nm) de alta acurácia e reprodutibilidade, utilizando somente 1 µL de cada amostra.

- AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 3' NÃO TRADUZIDA DO ÉXON 8 DO *HLA-G*

O processo de amplificação da região 3' UTR localizada no éxon 8, contou com os mesmos oligos iniciadores, abaixo relacionados, utilizados por SARTURI, 2005 o qual investigou a variação nos éxons 2, 3 e 8 de *HLA-G*, e sua relação com o abortamento recorrente, em estudo realizado pelo grupo de pesquisa do também realizada no Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH).

posição 5' GTGATGGGCTGTTTAAAGTGTCACC;

posição 3' GGAAGGAATGCAGTTCAGCATGA.

As reações de PCR, para cada amostra, seguiram de acordo com as seguintes condições: DNA molde na concentração 100ng por reação; tampão BUFFER 10X na quantidade de 1x; dNTPs na concentração de 0,10mM; oligonucleotídeos iniciadores na concentração de 10pM/cada por reação, MgCl<sub>2</sub> 1 mM; *Taq Platinum Invitrogen* 2U, e água ultrapura q.s.p. 50µl.

As condições de ciclagem a que foram submetidas as amostras são as seguintes: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos; desnaturação também a 94°C por 30 segundos; anelamento dos *primers* a 64°C por 1 minuto; alongamento por 2 minutos a 72°C, e alongamento final também a 72°C por 10 minutos. Foram 35 ciclos utilizando o aparelho Termociclador GeneAmp PCR System 9700 (P.E.).

- ANÁLISE DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS DA REGIÃO 3' NÃO TRADUZIDA DO ÉXON 8 DO *HLA-G*

Após a amplificação dos fragmentos, os mesmos foram separados por corrida eletroforética em gel de poliacrilamida a 8%. O procedimento seguiu o seguinte protocolo para a síntese do gel: 8 ml de poliacrilamida; 22 ml de tampão TBE 1x; 250 µL de persulfato de amônia, e 30µL de TEMED.

As amostras correram por 2 horas e 30 minutos a uma voltagem de 100V, e foram coradas com coloração de prata. Foram obtidos fragmentos com 210pb e com 224 pb correspondendo a alelos com a inserção de 14pb e alelos com a deleção de 14 pb (Figuras 5 e 6).

FIGURA 5 – GEL DE POLIACRILAMIDA/FRAGMENTOS INS/DEL 14pb REGIÃO 3'UTR DE *HLA-G*.

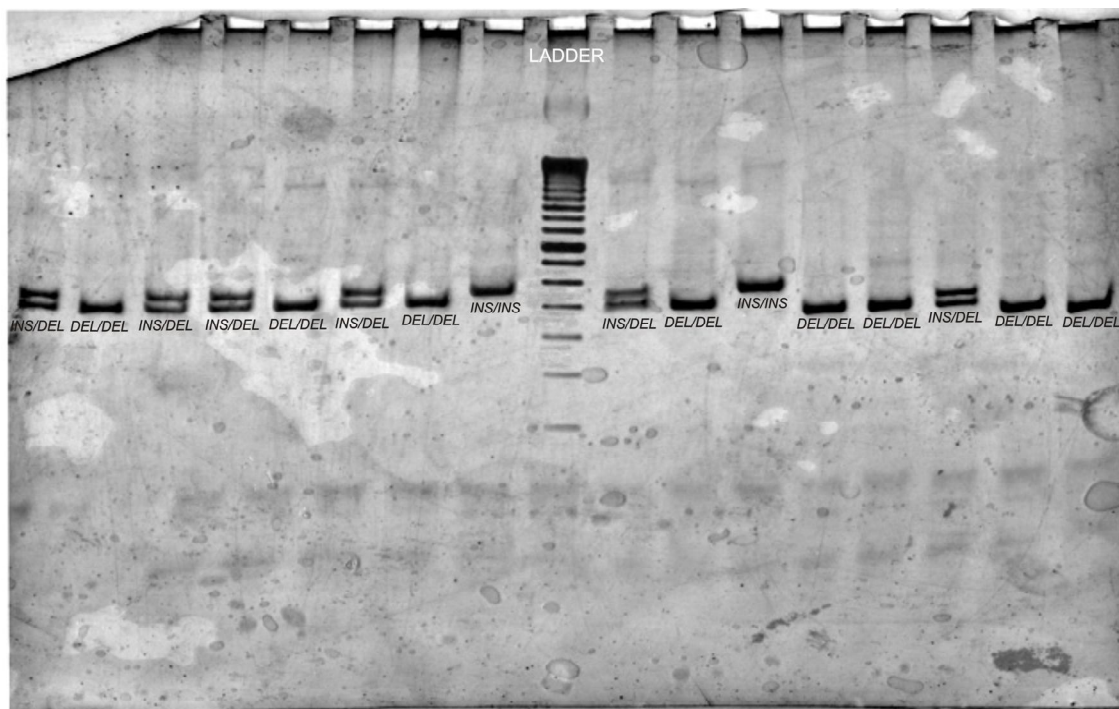


Figura 5. Detecção do polimorfismo 14bp Ins/Del em gel de poliacrilamida. O alelo Ins14pb (+14pb) origina um produto de PCR de 214pb enquanto o alelo Del14pb (-14pb) origina um produto de PCR de 210pb. Atribuição de genótipos: homozigoto (+14pb/+14pb); heterozigoto (+14pb/-14pb); homozigoto (-14/-14pb).

- AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO REGULADORA E PROMOTORA ENTRE AS POSIÇÕES -1446 A - 304 DO GENE *HLA – G*

Primeiramente as amostras foram diluídas para a concentração de 25 µg/µL, em um volume final de 70µL, sendo estas as amostras de uso, permanecendo as amostras na concentração original em estoque.

Após este procedimento, segue a amplificação do segmento de DNA compreendido entre as posições -1446 e – 304 do gene *HLA-G*. Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) selecionados (Tabela 6) para realizar a amplificação, e posterior reação de seqüenciamento da região alvo, foram fundamentados no protocolo utilizado por OBER et al., (2003), o qual estudou os polimorfismos da região promotora do gene *HLA–G* em casais da população Hutterite. O oligonucleotídeo iniciador \*G -830R sofreu modificações na orientação *Forward* para *Reverse* , sendo isto necessário para atender o critério proposto por SILVA, (2009) em estudo similar ao atual, o qual determinava a análise de fragmentos de tamanho e número de pares de bases similares (aproximadamente 600 pb).

O oligonucleotídeo iniciador G\* -919F foi especialmente desenhado para o trabalho desenvolvido por SILVA, (2009), o qual foi também utilizado nesta presente pesquisa. O desenho e a síntese deste último oligo iniciador, permitiu a obtenção de um *padrão de tamanho de fragmentos*” compatível com o equipamento *Genetic Analyser – ABI3110*, usado na rotina laboratorial do LIGH.

TABELA 10 - OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES

Oligos Iniciadores	Sequência	Temperatura de Anelamento	Tamanho do Fragmento	Região Amplificada
G* -1446F	ACATTCTAGAAGCTTCACAAGAATG	60° C	638pb	Reguladora Intensificadora
G* -830R	CGTAGCCCTAAGTTTCCGTGTG	60° C	638pb	Reguladora Intensificadora
G* -919F	CTGTGAGGTGAATAAAGTTTGTGC	65° C	637pb	Reguladora Intensificadora
G* -304R	GCCAAGCGTTCTGTCTCAGTGT	65° C	637pb	Reguladora Intensificadora

Os oligonucleotídeos foram testados utilizando programas disponíveis no site <http://genome.ucsc.edu/>, para certificação de que o anelamento dos mesmos se mostrava específico para a região reguladora de HLA-G:

ACATTCTAGAAGCTTCACAAGAATGagggtggagccactggagtgtttaggtggagaaatgacacactctgactcatagtagc  
aggaccactatagagagaacactcatgtagcagggtcatggaacagtctagagccacaattcaggagtgagaggggtgggggattaagg  
ggagaagagggcctgagggatgagagggacggagggaaaggctggaggagcaggaggtgaggaaaaggagcagaggaagaattc  
caaagcagcggaaactcttaggttaaacacattgtttatagattttattacatctacagagcctcgctgggtgttcttgcagttgaccttaaat  
cttagtgggtctgcctagaaactaattgttttatgtaaatcagggttaaaaaactaagtattcctaaaaatacactccactcacatgtggata  
cttctaaaaacaggcagtgcatgagcactagtggggcattgtgactgactgaacacttacaactgtgaggtgaataaagttgtgctggct  
cctggtgcaacatatagtaacatagtggtacttcttgaggagatgtcctggactcacacggaaacttagggctacggaatgaaggtaaat  
ttaaataaaacaagcgggagtcacagatacattgtctggaaagtgaacttaagagcttctgtgagtcctgttgaaggcttttagatgcattat  
ataccaacgggccaagtcacatttttacctattagattcctgatcattcaggggtaccaagattatgctaccactatagtaataaacaacaaa  
gcaactgtgtctatctatctcatgactcaggcacaactttccagatttaagggggaaaaaacctgtctttacacctacaatcccaggg  
cgagctcactctctggcacaagctccgtgggtgattttctctagaagagtacaggaggacaggcaaggagtgaggagcaggggagtcca  
gttcagggacagggattccgggatgaaaagtgaaggagaggacaggaccttgcgagggttctccctggttctcagacagctcctgg  
gccaagactcagggagacactgagacagaacgcttggcacaagagtagcggggtcaggggcgaagtcccagggcctcaagcgtggctctc

Figura 2-Região reguladora/promotora de *HLA-G*, seqüências nucleotídicas marcadas com cores diferentes correspondem aos oligonucleotídeos presentes na tabela 8 utilizados para a amplificação da região.

A reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foi realizada para cada amostra de DNA, e para cada par de *primer* de forma separada. Para tanto, a técnica foi otimizada partindo-se de um protocolo base sugerido na bula da *Taq Platinum Polymerase*. Após vários ajustes, a fim de utilizar a menor quantidade possível de reagentes e obtendo-se um resultado de alta qualidade na amplificação das amostras, as reações de PCR seguiram de acordo com as seguintes condições, com algumas variações entre estes dois fragmentos: Fragmento 1 (-1446F/ -830R), DNA molde na concentração 100ng por reação; tampão BUFF 10X na quantidade de 1x; dNTPs na concentração de 0,10mM; oligonucleotídeos iniciadores na concentração de 7,5pM/cada por reação, MgCl<sub>2</sub> 2 mM; *Taq Platinum Invitrogen* 2U, e água ultrapura q.s.p. 50µl. Fragmento 2 (-919/ - 304), DNA molde na concentração 100ng por reação; tampão BUFF 10X na quantidade de 1x; dNTPs na concentração de 0,10mM; oligonucleotídeos iniciadores na concentração de 5 pM/cada por reação, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; *Taq Platinum Invitrogen* 2U, e água ultrapura q.s.p. 50µl.

O processo de ciclagem é realizado em seqüência, iniciando-se com a desnaturação inicial a 94° C por 5 minutos; em seguida a desnaturação também a

94°C, porém por 30 segundos; a seguir o anelamento a 60°C (Fragmento 1) e a 65°C (Fragmento 2) por 30 segundos; alongamento a 72° C por 3 minutos; e por fim o alongamento final também a 72° C por 5 minutos. Ao todo são 35 ciclos, utilizando o Termociclador GeneAmp PCR System 9700 (P.E.).

- PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS AMPLIFICADAS PARA A REGIÃO REGULADORA/PROMOTORA DE *HLA-G*.

Os produtos amplificados das regiões -1446/ -830 e -919/-304 passaram por dois processos de purificação. O primeiro foi com base no acetato de amônio, procedendo-se da seguinte forma: 50µL do produto de PCR; 27µL de acetato de amônio 7,5M; 167,5 µL de etanol absoluto. As amostras seguiam para a centrifugação a 14000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante era descartado e então adicionava-se 100µL de etanol 70%, e nova centrifugação por 30 minutos a 14000 rpm; descarte do sobrenadante e secagem em estufa a 40° C.

A seguir as amostras eram ressuspensas em 18 µL de água ultrapura, otimizando desta forma a concentração do produto de PCR.

As amostras passavam por uma nova reação de purificação enzimática para retirada de *primers* e outras impurezas utilizando: *Exonuclease I* (EXO I) – *Amersham Biosciences* – E70073Z (2.500U) e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP), *Amersham Biosciences* – E70092X (5000U). Para cada amostra foram utilizados 6U de EXO; 2,4 U de SAP; 0,3 µL de tampão, e 18 µL de produto de PCR.

Esta preparação era submetida ao termociclador por 1 hora a 37°C, e 15 min a 80°C. Após esta etapa, o produto está pronto para a reação de seqüenciamento.

- REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO REGULADORA/PROMOTORA DE *HLA-G*

As amostras foram então submetidas à reação de seqüenciamento de forma separada para cada *primer*, seguindo-se o procedimento: amostra de DNA amplificada e purificada na concentração de 100ng por reação; *primer* de seqüenciamento na concentração de 1,6 pM – 1,6 µL; *Big Dye v3.1* - 1µL; save tampão – 0,5 µL.

A seguir, a reação de ciclagem ocorria por meio das seguintes etapas: desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto, desnaturação a 96°C por 15 segundos, anelamento dos *primers* a 54°C por 15 segundos, e alongamento a 60°C por 4 minutos. Estas etapas ocorrem 35 vezes (35 ciclos).

## PRECIPITAÇÃO

Após a reação de seqüenciamento, as amostras eram submetidas a um processo de precipitação de acordo com o protocolo: 2 µl de acetato de sódio (TA), 25 µl de etanol absoluto (TA), Vortex intenso por 30 seg., centrifuga em 4000 rpm por 40 min., *spin* invertido 800 rpm por 10 seg. (em papel toalha), 50 µL de etanol 80% (TA); centrifuga 4000 rpm por 10 min; *spin* invertido 800 rpm por 10 seg; secagem 5 min à 60°C em termociclador.

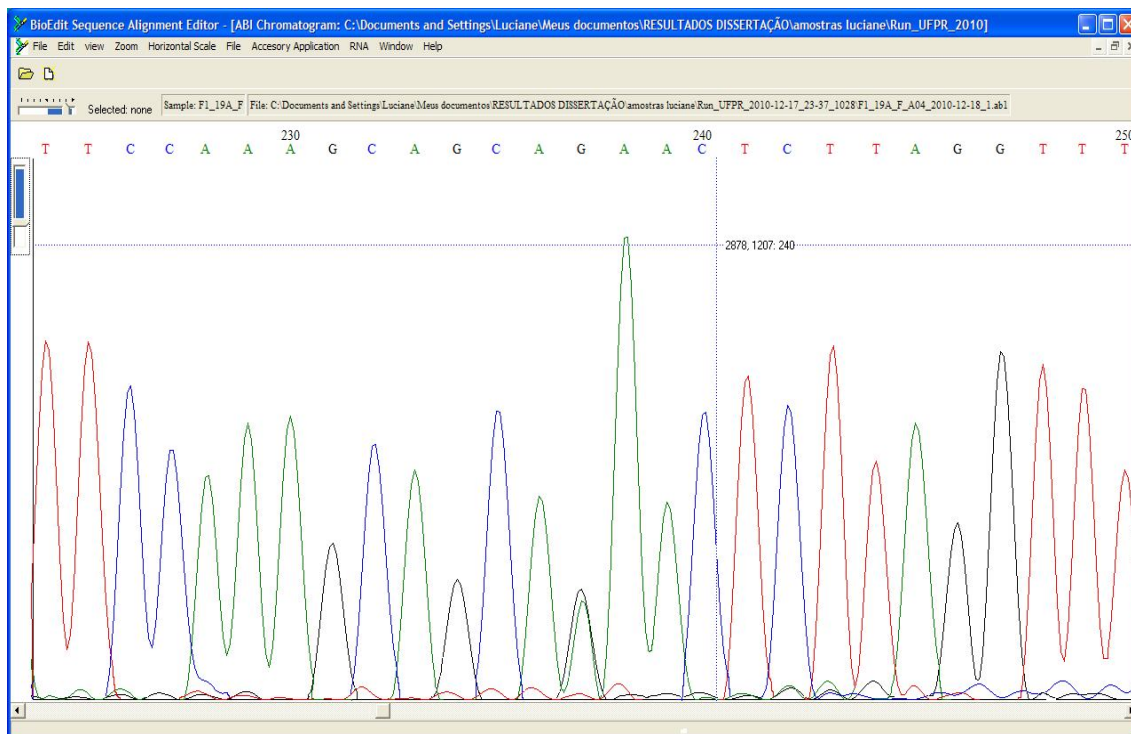
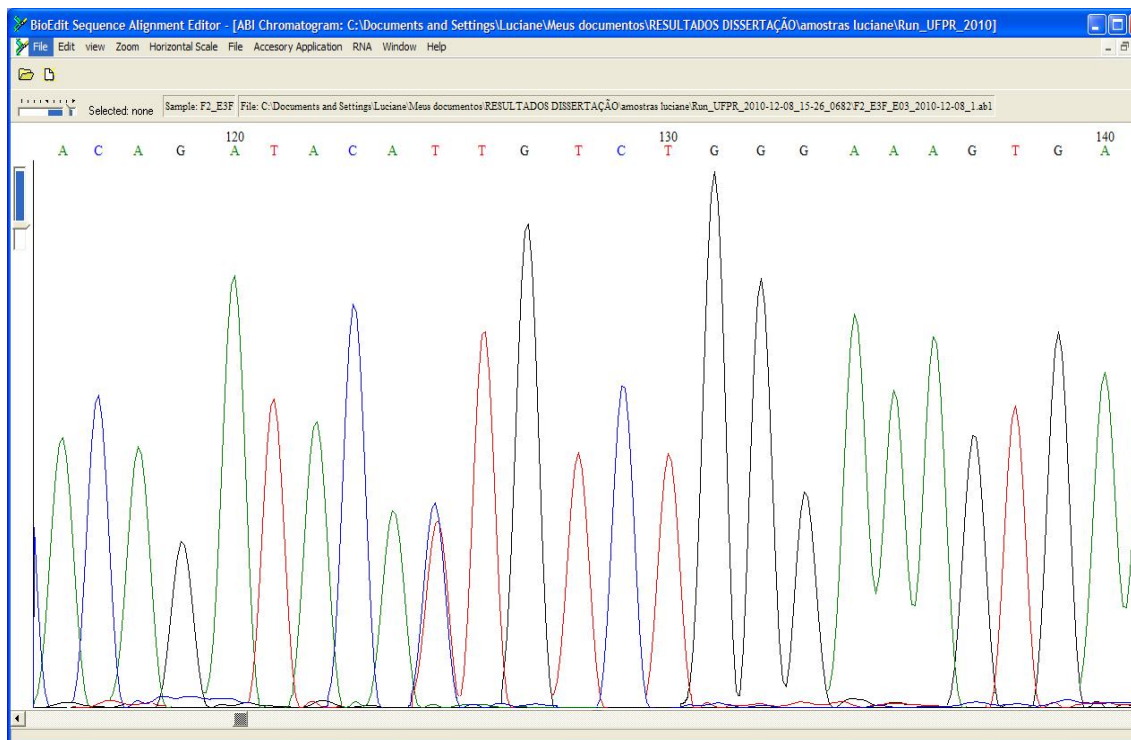
Guardar a -20°C ou descongelar formamida e: 15 µl de formamida – vortex rápido + *spin* de 800 rpm 10 seg; desnaturar por 3 min a 95°C; choque térmico no gelo por 40 seg; levar ao sequenciador.

O produto foi analisado no seqüenciador automático ABI-310 Applied Biosystems.

## **CARACTERIZAÇÃO DAS SNPs DA REGIÃO REGULADORA/ PROMOTORA DE *HLA-G*.**

Através do seqüenciamento de 1200 pb (FIGURAS 6 e 7) da região reguladora e promotora de *HLA-G* foi possível identificar 15 SNPs, todos já descritos por OBER *et al.*, 2003. Novos SNPs foram investigados através do programa ASSIGN SBT 3.2.7, porém não foram encontradas novas variantes.

As amostras foram analisadas com o apoio do programa *Bio Edit Sequence Alignment Editor*.

FIGURA 6 - ELETROFEROGRAMA DO FRAGMENTO1 DE *HLA-G*FIGURA 7 - ELETROFEROGRAMA DO FRAGMENTO 2 DE *HLA-G*

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

As frequências genotípicas foram obtidas por contagem direta, e comparadas com as frequências esperadas de acordo com o Teorema de Hardy – Weinberg. Para tanto, foi utilizado o programa “*Genepop on the Web*” (Genepop 4.0). O qual também gerou as frequências alélicas.

As frequências haplotípicas, e os parâmetros de medida do desequilíbrio de ligação ( $\rho$ ,  $D'$ ,  $r^2$ ) foram calculados com auxílio do programa ARLEQUIN 3.11 (Bootstraps = 10.000 ) (Excoffie et al.,2005). As comparações significativas foram aquelas em que  $p \leq 0,05$ , e que ficaram próximas ao limiar de significância (tendência para os valores  $0,05 \leq p \leq 0,1$ ).

## 7.2 TABELAS REFERENTES AOS RESULTADOS E DISCUSSÃO DO ARTIGO

TABELA 11 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DOS SNPs DA REGIÃO PROMOTORA E 3'UTR DE *HLA-G* NA AMOSTRA AFRO-BRASILEIRA ( $n=150$ ).

POSIÇÃO	BASES	ALEL DE MENOR FREQUÊNCIA	FREQUÊNCIA
-1306	A/G	A	0,373
-1179	G/A	G	0,497
-1155	A/G	A	0,270
-1140	T/A	T	0,340
-1138	G/A	G	0,157
-1121	T/C	T	0,180
-964	A/G	A	0,417
-762	T/C	T	0,427
-725	C/G/T	G	0,087
-716	G/T	G	0,420
-689	G/A	G	0,447
-666	T/G	T	0,427
-633	A/G	A	0,400
-486	A/C	A	0,420
-477	G/C	C	0,490
3'UTR	+14pb/ 14pb	+14pb	0,383

TABELA 12- FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG PARA OS (SNPs) DA REGIÃO PROMOTORA E 3'UTR DE *HLA-G* NA AMOSTRA AFRO-BRASILEIRA ( $n=150$ ).

1306 A/G	A/A	A/G	G/G
Observado	20	72	58
Esperado	20,7893	70,4214	58,7893
Freq Gen	13,33%	48%	38,66%
Valor dep	0,8628		

1179 G/A	G/G	G/A	A/A
Observado	37	75	38
Esperado	36,8763	75,2475	37,8763
Freq Gen	24,66%	50%	25,33%
Valor de $p$	1,0000		

<b>1155 A/G</b>	<b>A/A</b>	<b>A/G</b>	<b>G/G</b>
Observado	14	53	83
Esperado	10,8361	59,3278	79,8371
Freq Gen	9,33%	35,33%	55,33%
Valor de $p$	0,2189		

<b>1140 T/A</b>	<b>T/T</b>	<b>T/A</b>	<b>A/A</b>
Observado	14	73	62
Esperado	17,2274	67,5452	55,2274
Freq Gen	9,33%	48,66%	41,33%
Valor de $p$	0,2681		

<b>1138 G/A</b>	<b>G/G</b>	<b>G/A</b>	<b>A/A</b>
Observado	6	35	109
Esperado	3,6164	39,7692	106,6154
Freq Gen	4%	23,33%	72,66%
Valor de $p$	0,2070		

<b>1121 T/C</b>	<b>T/T</b>	<b>T/C</b>	<b>C/C</b>
Observado	7	40	103
Esperado	4,7860	44,4281	100,7860
Freq Gen	4,66%	26,66%	68,66%
Valor de $p$	0,2671		

<b>964 A/G</b>	<b>A/A</b>	<b>A/G</b>	<b>G/G</b>
Observado	27	71	52
Esperado	25,9197	73,1605	50,9197
Freq Gen	18%	47,33%	34,66%
Valor de $p$	0,7410		

<b>762 T/C</b>	<b>T/T</b>	<b>T/C</b>	<b>C/C</b>
Observado	31	66	53
Esperado	27,1839	73,6321	49,1839
Freq Gen	20,66%	44%	35,33%
Valor de $p$	0,2393		

<b>725 C/G/T</b>	<b>C/C</b>	<b>C/G</b>	<b>C/T</b>	<b>G/G</b>	<b>G/T</b>	<b>T/T</b>
Observado	96	20	26	0	6	2
Esperado	94,3244	20,6957	28,6555	1,0870	3,1304	2,1070
Freq Gen	64%	13,33%	17,33%	0%	4%	1,33%
Valor de $p$	0,3094					

<b>716 G/T</b>	<b>G/G</b>	<b>G/T</b>	<b>T/T</b>
Observado	29	68	53
Esperado	26,3378	73,3244	50,3378
Freq Gen	19,33%	45,33%	35,33%
Valor de $p$	0.4057		

<b>689 G/A</b>	<b>G/G</b>	<b>G/A</b>	<b>A/A</b>
Observado	34	66	50
Esperado	29,8027	74,3946	45,8027
Freq Gen	22,66%	44%	33,33%
Valor de $p$	0,1865		

<b>666 T/G</b>	<b>T/T</b>	<b>T/G</b>	<b>G/G</b>
Observado	28	72	50
Esperado	27,1839	73,6321	49,1839
Freq Gen	18,66%	48%	33,33%
Valor de $p$	0,8671		

<b>633 A/G</b>	<b>A/A</b>	<b>A/G</b>	<b>G/G</b>
Observado	25	70	35
Esperado	23,8796%	72,2408	53,8796
Freq Gen	16,66%	46,66%	23,33%
Valor de $p$	0,7353		

<b>486 A/C</b>	<b>A/A</b>	<b>A/C</b>	<b>C/C</b>
Observado	23	80	47
Esperado	26,3378	73,3244	50,3378
Freq Gen	15,33%	53,33%	31,33%
Valor de $p$	0,3110		

<b>477 G/C</b>	<b>G/G</b>	<b>G/C</b>	<b>C/C</b>
Observado	34	85	31
Esperado	38,8896	75,2207	35,8896
Freq Gen	22,66%	56,66%	20,66%
Valor de <i>p</i>	0,1436		

<b>14 PB INS/DEL</b>	<b>INS/INS</b>	<b>INS/DEL</b>	<b>DEL/DEL</b>
Observado	24	67	59
Esperado	21,9231	71,1538	56,9231
Freq Gen	16%	44,66%	39,33%
Valor de <i>p</i>	0,4884		

TABELA 13 – VALORES DE *p* PARA O DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE CADA SNP DA REGIÃO PROMOTORA E +14pb/-14pb DE *HLA-G* NA AMOSTRA AFRO-BRASILEIRA (n=150).

	-1306 A/G	-1179 G/A	-1155 A/G	-1140 T/A	-1138 G/A	-1121 T/C	-964 A/G	-762 T/C	-725 C/G/T	-716 G/T	-689 G/A	-666 T/G	-633 A/G	-486 A/C	-477 G/C	+14pb/-14pb
-1306 A/G																
-1179 G/A	0,0000															
-1155 A/G	0,0162	0,0175														
-1140 T/A	0,0000	0,0004	0,0146													
-1138 G/A	0,0761	0,0333	0,0697	0,0543												
-1121 T/C	0,1270	0,0834	0,0952	0,0834	0,0662											
-964 A/G	0,0000	0,0001	0,0004	0,0002	0,0743	0,0000										
-762 T/C	0,0000	0,0000	0,0086	0,0013	0,1092	0,0675	0,0000									
-725 C/G/T	0,2770	0,4001	0,0324	0,2105	0,0000	0,0153	0,0050	0,0007								
-716 G/T	0,0000	0,0001	0,0020	0,0003	0,0543	0,0432	0,0000	0,0000	0,0265							
-689 G/A	0,0000	0,0000	0,0053	0,0002	0,0654	0,5866	0,0000	0,0000	0,0094	0,0000						
-666 T/G	0,0000	0,0000	0,0209	0,0028	0,0678	0,0878	0,0000	0,0000	0,0017	0,0000	0,0000					
-633 A/G	0,0000	0,0000	0,0033	0,0015	0,4420	0,0989	0,0000	0,0000	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000				
-486 A/C	0,0059	0,0007	0,0197	0,0017	0,0712	0,1908	0,0361	0,0000	0,0007	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000		
-477 G/C	0,0366	0,0224	0,4264	0,0521	0,2809	0,1555	0,0216	0,0000	0,0031	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001	0,0000	
+14pb/-14pb	0,6349	0,0806	0,3362	0,0195	0,7969	0,8329	0,8019	0,3509	0,1692	0,1774	0,3872	0,2287	0,4559	0,1960	0,6296	

TABELA 14 – VALORES DE *D'* ENTRE CADA SNP DA REGIÃO PROMOTORA E 3'UTR DE *HLA-G* NA AMOSTRA AFRO-BRASILEIRA (n=150).

	-1306	-1179	-1155	-1140	-1138	-1121	-964	-762	-725	-716	-689	-666	-633	-486	-477	+14pb/-14pb
-1306																
-1179	0,5485															
-1155	0,4709	0,4604														
-1140	0,4696	0,5672	0,1625													
-1138	0,1497	0,5270	0,0215	0,1744												
-1121	0,0642	0,2988	0,0868	0,0541	0,2828											
-964	0,5917	0,5220	0,4677	0,4664	0,0590	0,0137										
-762	0,4838	0,5344	0,5047	0,4819	0,0864	0,1792	0,5228									
-725	0,5522	0,4266	0,8915	0,7180	0,0721	0,3554	0,6707	0,8034								
-716	0,4898	0,5270	0,5317	0,5050	0,0558	0,2563	0,5153	0,8477	0,7655							
-689	0,4524	0,5552	0,5315	0,5169	0,1394	0,2558	0,4701	0,7882	0,7059	0,8279						
-666	0,4559	0,5809	0,5047	0,4819	0,0864	0,2476	0,5369	0,8910	0,7691	0,8616	0,8306					
-633	0,4643	0,5364	0,4650	0,4389	0,1270	0,2810	0,5509	0,8547	0,9090	0,8851	0,8795	0,8837				
-486	0,0239	0,1191	0,1770	0,0099	0,3056	0,3464	0,0758	0,0986	0,2742	0,0537	0,1102	0,0535	0,0705			
-477	0,3970	0,4247	0,4709	0,4948	0,5627	0,4398	0,4323	0,5536	0,5486	0,5951	0,5126	0,6014	0,5748	0,0332		
+14pb/-14pb	0,2236	0,3090	0,1592	0,3899	0,3050	0,2687	0,1877	0,2417	0,3623	0,2804	0,2300	0,2872	0,2319	0,2572	0,3434	

TABELA 15 – VALORES DE  $r^2$  ENTRE CADA SNP DA REGIÃO PROMOTORA E 3'UTR DE *HLA-G* NA AMOSTRA AFRO-BRASILEIRA (n=150).

	-1306	-1179	-1155	-1140	-1138	-1121	-964	-762	-725	-716	-689	-666	-633	-486	-477	+14pb/-14pb
-1306																
-1179	0,2395															
-1155	0,1044	0,0794														
-1140	0,1424	0,1655	0,0192													
-1138	0,0046	0,0458	0,0002	0,0098												
-1121	0,0007	0,0185	0,0042	0,0012	0,0636											
-964	0,3454	0,2199	0,1016	0,1386	0,0007	0,0000										
-762	0,2217	0,2153	0,1266	0,1584	0,0016	0,0088	0,2554									
-725	0,0169	0,0268	0,0351	0,0287	0,0005	0,0058	0,0322	0,0376								
-716	0,2211	0,2038	0,1444	0,1787	0,0007	0,0186	0,2414	0,6993	0,0704							
-689	0,1992	0,2522	0,1294	0,1680	0,0039	0,0166	0,2180	0,5728	0,0671	0,6148						
-666	0,1969	0,2545	0,1266	0,1584	0,0016	0,0169	0,2693	0,7939	0,0730	0,7223	0,6360					
-633	0,1829	0,1944	0,1200	0,1467	0,0039	0,0243	0,2540	0,6543	0,0930	0,7212	0,6389	0,6996				
-486	0,0005	0,0129	0,0107	0,0000	0,0140	0,0227	0,0042	0,0078	0,0122	0,0023	0,0106	0,0023	0,0036			
-477	0,1190	0,1710	0,0788	0,1194	0,0495	0,0381	0,1430	0,2191	0,0503	0,2464	0,2038	0,2586	0,2116	0,0011		
+14pb/-14pb	0,0396	0,0601	0,0151	0,1241	0,0244	0,0238	0,0275	0,0488	0,0140	0,0675	0,0407	0,0689	0,0501	0,0380	0,0704	

TABELA 16 – HAPLÓTIPOS MAIS COMUNS DA REGIÃO PROMOTORA DE *HLA-G* E SUA RESPECTIVA FREQUÊNCIA NA AMOSTRA AFRO-BRASILEIRA (n=150).

HAPLÓTIPO	N. OBSERVADO	FREQUÊNCIA	-1306 A/G	-1179 G/A	-1155 A/G	-1140 T/A	-1138 G/A	-1121 T/C	-964 A/G	-762 T/C	-725 C/G/T	-716 G/T	-689 G/A	-666 T/G	-633 A/G	-486 A/C	-477 G/C
1	33	0,2075	G	A	G	A	A	C	G	C	C	T	A	G	G	C	C
2	30	0,1886	A	G	A	A	A	C	A	T	C	G	G	T	A	A	G
3	28	0,1761	A	G	G	T	A	C	A	T	C	G	G	T	A	A	G
4	12	0,0754	G	A	G	A	A	C	G	C	C	T	A	G	G	C	G
5	7	0,0440	A	G	G	T	A	C	A	C	C	T	A	G	G	C	C
6	7	0,0440	G	A	G	A	A	T	G	C	G	T	A	G	G	C	C

TABELA 18 – COMPARAÇÃO ENTRE AS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE UMA AMOSTRA HUTTERITE (OBER *et al.*,2003) COM A AMOSTRA AFRO-BRASILEIRA

POSICÃO SNP	ALELO DE MENOR FREQUÊNCIA	AFRO BRASILEIROS		HUTTERITES	
		n	%frequência	n	%frequência
-1306 A/G	A	56	6,97%	16	7,92%
-1179 G/A	G	75	9,34%	17	8,42%
-1155 A/G	A	40	4,98%	5	2,48%
-1140 T/A	T	51	6,35%	10	4,95%
-1138 G/A	G	24	2,99%	1	0,50%
-1121 T/C	T	27	3,36%	1	0,50%
-964 A/G	A	63	7,85%	16	7,92%
-762 T/C	T	64	7,97%	15	7,43%
-725 C/G/T	G	13	1,62%	7	3,47%
-716 G/T	G	63	7,85%	15	7,43%
-689 G/A	G	67	8,34%	27	13,37%
-666 T/G	T	64	7,97%	15	7,43%
-633 A/G	A	60	7,47%	15	7,43%
-486 A/C	A	63	7,85%	27	13,37%
-477 G/C	C	73	9,09%	15	7,43%

Os alelos de menor frequência foram selecionados na amostra afro-brasileira.

$$X^2 = 25,218$$

$$P = 0,0325$$

TABELA 19 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA MOLECULAR ENTRE AMOSTRA AFRO-BRASILEIRA E HUTTERITES (OBER *et al.*,2003)

		PORCENTAGEM COMPONENTES DA DE VARIÂNCIA VARIACÃO	
VARIACÃO	ENTRE POPULAÇÕES	0,19164	6,46
	DENTRO POPULAÇÃO	2,77695	93,54

$$P = 0,000$$

As probabilidades foram calculadas por 1000 permutações ao acaso

TABELA 20 – COMPARAÇÃO ENTRE AS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DA AMOSTRA AFRO-BRASILEIRA COM UMA AMOSTRA EURO-BRASILEIRA (SILVA, 2009)

POSICÃO	BASES	ALELO MENOS FREQUENTE	FREQUÊNCIAS ALÉLICAS		VALOR DE P
			AMOSTRA NEGRÓIDE	AMOSTRA CAUCASÓIDE	
-1306	A/G	A	0,373	0,390	0,300
-1179	G/A	G	0,497	0,400	<b>0,033</b>
-1155	A/G	A	0,270	0,070	<b>0,000</b>
-1140	T/A	T	0,340	0,300	0,484
-1138	G/A	G	0,157	0,010	<b>0,000</b>
-1121	T/C	T	0,180	0,120	0,133
-964	A/G	A	0,417	0,380	0,131
-762	T/C	T	0,427	0,440	0,733
-725	C/G/T	G	0,087	0,090	0,358
-716	G/T	G	0,420	0,440	0,627
-689	G/A	G	0,447	0,440	0,932
-666	T/G	T	0,427	0,440	0,747
-633	A/G	A	0,400	0,440	0,310
-486	A/C	A	0,420	0,560	0,070
-477	G/C	C	0,490	0,500	0,934

TABELA 21 – COMPARAÇÃO ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DA AMOSTRA AFRO-BRASILEIRA COM UMA AMOSTRA EURO-BRASILEIRA (SILVA, 2009)

POSICÃO	GENÓTIPO	AMOSTRA NEGRÓIDE		AMOSTRA CAUCASÓIDE		VALOR DE P
		N	%	N	%	
-1306	A/A	20	13,33%	17	12,32%	0,33472
	A/G	72	48,00%	75	54,35%	
	G/G	48	38,66%	46	33,33%	
-1179	G/G	37	24,66%	17	12,32%	<b>0,02231</b>
	G/A	75	50,00%	77	55,80%	
	A/A	38	25,33%	44	31,88%	
-1155	A/A	14	9,33%	0	0,00%	<b>0,0000</b>
	A/G	53	35,33%	18	13,04%	
	G/G	83	55,33%	120	86,96%	
-1140	T/T	14	9,33%	12	8,70%	0,49323
	T/A	73	48,66%	61	44,20%	
	A/A	62	41,33%	65	47,10%	

-1138	G/G	6	4,00%	0	0,00%	<b>0,0000</b>
	G/A	35	23,33%	3	2,17%	
	A/A	69	72,66%	135	97,83%	
-1121	T/T	7	4,66%	1	0,72%	0,13176
	T/C	40	26,66%	32	23,19%	
	C/C	103	68,66%	105	76,90%	
-964	A/A	27	18,00%	16	11,59%	0,16471
	A/G	71	47,33%	74	53,63%	
	G/G	52	34,66%	48	34,78%	
-762	T/T	31	20,66%	26	18,84%	0,73191
	T/C	66	44,00%	70	70,72%	
	C/C	53	35,33%	42	30,44%	
-725	C/C	96	64,00%	95	68,84%	0,35968
	C/G	20	13,33%	19	13,77%	
	C/T	26	17,33%	20	14,50%	
	G/G	0	0,00%	2	1,45%	
	G/T	6	4,00%	1	0,72%	
	T/T	2	1,33%	1	0,72%	
-716	G/G	29	19,33%	26	18,84%	0,61093
	G/T	68	45,33%	70	50,72%	
	T/T	53	35,33%	42	30,44%	
-689	G/G	34	22,66%	26	18,84%	0,93387
	G/A	66	44,00%	70	50,72%	
	A/A	50	33,33%	42	30,44%	
-666	T/T	28	18,66%	26	18,84%	0,73552
	T/G	72	48,00%	70	50,72%	
	G/G	50	33,33%	42	30,44%	
-633	A/A	25	16,66%	26	18,84%	0,31164
	A/G	70	46,66%	70	50,72%	
	G/G	35	23,33%	42	30,44%	
-486	A/A	23	15,33%	26	18,84%	0,07617
	A/C	80	53,33%	70	50,72%	
	C/C	47	31,33%	42	30,44%	
-477	G/G	34	22,66%	37	26,81%	0,92936
	G/C	85	56,66%	65	47,10%	
	C/C	31	20,66%	36	26,90%	

TABELA 22 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA MOLECULAR ENTRE AMOSTRA AFRO-BRASILEIRA E EURO-BRASILEIRA (SILVA, 2009).

		COMPONENTES DE VARIÂNCIA	PORCENTAGEM DA VARIÂÇÃO
VARIÂÇÃO	ENTRE POPULAÇÕES	0,0563	1,93
	DENTRO POPULAÇÃO	2,86491	98,07

$P=0,03519$


TABELA 23 – COMPARAÇÃO ENTRE AS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DA REGIÃO 3'UTR DE *HLA-G* ENTRE AS AMOSTRAS AFRO E EURO BRASILEIRAS (SILVA, 2009)

SNP	ALELO DE MENOR FREQUÊNCIA	AFRO BRASILEIROS		EURO BRASILEIROS		VALOR DE $P$
		n	frequência	n	frequência	
-14pb/+14pb	+14pb	57	38%	52	40,31%	0,66021

TABELA 24 - COMPARAÇÃO ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DA REGIÃO 3'UTR DE *HLA-G* ENTRE AS AMOSTRAS AFRO E EURO BRASILEIRAS (SILVA, 2009).

POSICÃO	GENÓTIPO	AMOSTRA NEGRÓIDE		AMOSTRA CAUCASÓIDE		VALOR DE $P$
		N	frequência	n	frequência	
3'UTR	-14pb/-14pb	59	39,30%	48	37,20%	0,6769
	-14pb/+14pb	67	44,66%	58	44,96%	
	+14pb/+14pb	24	16%	23	17,82%	

### 7.3 FICHA CADASTRO PARA O BANCO DE DOADORES DE MEDULA ÓSSEA DO LIGH

 <b>ERASTO GAERTNER</b>	<b>LIGA PARANAENSE DE COMBATE AO CÂNCER</b> <b>HOSPITAL ERASTO GAERTNER</b> <b>BANCO DE SANGUE</b>	AMOSTRA Nº _____	COLAR ETIQUETA AQUI
---	--	------------------	------------------------

#### REGISTRO BRASILEIRO DE DOADORES VOLUNTÁRIOS DE MEDULA ÓSSEA - REDOME

FAVOR PREENCHER PREFERENCIALMENTE EM LETRAS DE FORMA, OU LEGÍVEL E SEM ABREVIATURAS

<b>IDENTIFICAÇÃO</b>
Nome: (por extenso) _____ RG: _____ CPF: _____ Cidade de Nascimento: _____ UF: _____ Estado civil: _____ Data de Nascimento: ____/____/____ Idade: _____ Peso: _____ Altura: _____ ABO: _____ Rh: _____ Sexo: M ( ) F ( ) Fumante: SIM ( ) NÃO ( ) E-mail: _____ Escolaridade: _____ Nome da mãe: _____ Nome do pai: _____

<b>ENDEREÇO RESIDENCIAL</b>
Rua/Av: _____ Nº: _____ Ap: _____ Bairro: _____ Cidade: _____ UF: _____ CEP: _____ Telefone: ( ) _____ Celular: ( ) _____
<b>ENDEREÇO COMERCIAL</b>
Rua/Av: _____ Nº: _____ Complemento: _____ Bairro: _____ Cidade: _____ UF: _____ CEP: _____ Telefone: ( ) _____ Profissão: _____
<b>Nome e telefone de duas pessoas para contato, caso haja dificuldades para encontrá-lo:</b>
Nome: _____ Telefone: ( ) _____ Nome: _____ Telefone: ( ) _____
<b>De acordo com a sua descendência, qual seu grupo étnico? (Esta informação pode ajudar na tipagem genética).</b>
<input type="checkbox"/> Branco <input type="checkbox"/> Amarelo (oriental) <input type="checkbox"/> Indígena <input type="checkbox"/> Pardo <input type="checkbox"/> Negro <input type="checkbox"/> Outros

<b>TERMO DE CONSENTIMENTO</b>
<p>Eu, _____, abaixo assinado(a) e acima qualificado(a), pelo presente instrumento <b>CONSENTO</b> que os meus dados cadastrais, o resultado de minha tipagem HLA e os outros resultados de exames de Histocompatibilidade e Imunogenética sejam incluídos no <b>REGISTRO BRASILEIRO DE DOADORES VOLUNTÁRIOS DE MEDULA ÓSSEA – REDOME</b>, coordenado pelo Laboratório de Imunogenética do Instituto Nacional de Câncer – INCA, do Ministério da Saúde. A amostra coletada nesta ocasião poderá ser utilizada em tipagens genéticas adicionais, de maneira sigilosa, para fins de pesquisa.</p> <p>Nesta data, recebi as orientações sobre o que é o transplante de medula óssea e o transplante de células precursoras e estou ciente de que:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• O candidato a doador de medula óssea e/ou tecidos hematopoéticos deve encontrar-se em bom estado de saúde.</li> <li>• Na oportunidade de ser selecionado, o doador deverá passar por exames clínicos e laboratoriais que atestem a inexistência de doenças, especialmente as infectocontagiosas.</li> <li>• Na oportunidade de ser selecionado para doação de medula óssea, o doador passará por internação hospitalar (hospital/dia) sendo necessário submeter-se a procedimento, sob anestesia, para retirada de não mais que 10% de sua medula óssea. O procedimento consiste em punção óssea pela região glútea (4 a 8 punções). A medula do doador é espontaneamente restaurada em poucas semanas.</li> <li>• Na oportunidade de ser selecionado para doação de precursores hematopoéticos, após utilizar por via subcutânea uma medicação estimulante de células hematopoiéticas, o doador será submetido a procedimento semelhante a doação de sangue, sendo este realizado em caráter ambulatorial, não sendo para isso necessários os procedimentos mencionados acima.</li> <li>• Os riscos para os doadores de medula óssea e/ou tecidos hematopoéticos são praticamente inexistente. Nos casos de doação de medula óssea, devido ao procedimento de punção, é comum haver queixa de dor discreta no local da punção.</li> </ul> <p>Tenho também ciência do propósito a que se destina o referido Registro e meu cadastramento nele.</p> <p>Proponho-me assim a ser um eventual doador de medula óssea ou de células precursoras, sabendo que me é reservado o direito da decisão final para a doação, mantendo-se a condição de sigilo acima especificada.</p> <p style="text-align: right;">_____, _____ de _____ de 20____</p> <p>Nome legível: _____ Assinatura: _____</p>

<b>TESTEMUNHAS:</b>
Nome legível: _____ Assinatura: _____ Nome legível: _____ Assinatura: _____



ERASTO GAERTNER

LIGA PARANAENSE DE COMBATE AO CÂNCER  
HOSPITAL ERASTO GAERTNER  
BANCO DE SANGUE

AMOSTRA N°

COLAR ETIQUETA  
AQUI

### AUTORIZAÇÃO DE REALIZAÇÃO DE EXAMES DE HISTOCOMPATIBILIDADE

Hemocentro: LIGA PARANAENSE DE COMBATE AO CÂNCER - BANCO DE SANGUE DO HOSPITAL ERASTO GAERTNER

Endereço: RUA DR.OVANDE DO AMARAL, 201 - JARDIM DAS AMÉRICAS - CURITIBA (PR) - CEP 81520-060

Telefone: 55 41-3361.5037 - [www.erastogaertner.com.br](http://www.erastogaertner.com.br) - E-mail: [bancodesangue@lpcc.org.br](mailto:bancodesangue@lpcc.org.br)

\_\_\_\_\_  
Dr. Eduardo Cilião Munhoz CRM 17871  
Responsável Técnico do Banco de Sangue  
Hospital Erasto Gaertner

CURITIBA, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

O Hemocentro acima identificado autoriza o laboratório de histocompatibilidade abaixo identificado a realizar os exames de histocompatibilidade relativos a 1ª fase de identificação de doador, do voluntário nominado, para fins de cadastro no REDOME, em conformidade com o estabelecido no Artigo 5º da Portaria GM/MS N° 1.314 de 30 de Novembro de 2.000 - procedimento código: 05.01.01.0001-7.

**LABORATÓRIO DE IMUNOGENÉTICA E HISTOCOMPATIBILIDADE DO  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ-LIGH**

CGC 78.350.188/0005-19

Rua Francisco H. dos Santos, s/n

JARDIM DAS AMÉRICAS - CENTRO POLITÉCNICO

SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - DEPARTAMENTO GENÉTICA - Sala 31

CEP 81531-980 - CURITIBA (PR)

Telefone (41) 3361-1729 - Telefax (41) 3266-2042

E-mail: [ligh@ufpr.br](mailto:ligh@ufpr.br)

\_\_\_\_\_  
Responsável pela Distribuição  
Erasto Gaertner

### RESULTADO DOS EXAMES