

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

LUANA CARVALHO DOS SANTOS

**POLIMORFISMOS DO GENE *HLA-E* EM UMA AMOSTRA DE AFROPARANAENSES
DOADORES DE MEDULA ÓSSEA**

Curitiba

2011

LUANA CARVALHO DOS SANTOS

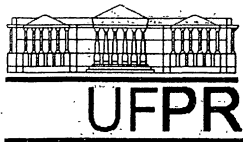
**POLIMORFISMOS DO GENE *HLA-E* EM UMA AMOSTRA DE AFROPARANAENSES
DOADORES DE MEDULA ÓSSEA**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Valéria Maria Munhoz Sperandio Roxo.

CURITIBA

2011



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **LUANA CARVALHO DOS SANTOS** 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 “B”.

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

Curitiba, 18 de março de 2011

Professora Doutora Karin Braun-Prado
UFPR – Membro Titular (*ad-hoc*)

Professor Doutor João Carlos Marques Magalhães
UFPR – Membro Titular

Professora Doutora Lupe Furtado Alle
UFPR – Membro Titular

Professora Doutora Valéria Maria Munhoz Sperandio Roxo
Orientadora e Presidente da Banca Examinadora



Visto

Professor Doutor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética

Tudo posso Naquele que me fortalece

AGRADECIMENTO

A Deus por ter me dado capacidade para a realização deste trabalho.

A toda a minha família e, em especial, aos meus pais, por me mostrarem o valor de uma conquista, do conhecimento e do amor, sempre me incentivando a crescer.

A minha amiga Luciane, pela amizade e companheirismo, sem os quais seria impossível ter chegado até aqui. Muito obrigada, você é muito mais que uma amiga!!!

Ao meu namorado Ricardo Weber que me ajudou muito em todo meu mestrado e que eu amo verdadeiramente.

A minha orientadora Valéria Maria Sperandio Roxo, pela paciência e incentivo na realização desta pesquisa.

Aos professores João Carlos Marques Magalhães, Roseli Wassem e Maria da Graça Bicalho, pela paciência, disposição e contribuições.

A todo pessoal do LIGH pelo apoio na execução do trabalho.

Aos meus amigos, por sempre confiarem em mim.

RESUMO

O *HLA-E* é um gene do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I não clássico, o qual apresenta limitado polimorfismo e baixos níveis de expressão tecidual. Atualmente estão descritos na literatura nove alelos, sendo que somente três produtos protéicos com diferentes sequências de aminoácidos são codificados. Suas variantes polimórficas estão frequentemente associadas a vários distúrbios, como por exemplo, defesa do organismo contra infecções virais e bacterianas, abortamento recorrente, transplantes de células tronco-hematopoiéticas e órgãos sólidos. As moléculas de *HLA-E* podem interagir tanto com os receptores da imunidade inata quanto adaptativa, promovendo assim a inibição das células NK através de seus receptores CD94/NKG2A ou a ativação das células TCD8⁺. No presente estudo foram investigado pela técnica de sequenciamento de DNA, os polimorfismos do gene *HLA-E*, bem como suas frequências alélicas, genotípicas, haplotípicas e desequilíbrio de ligação, numa amostra composta de indivíduos negróides paranaenses. Observou-se que o alelo com maior frequência na amostra analisada foi o *E*01:01* (59.21%). Por sua vez o alelo *E*01:04* apresentou frequência igual a zero. Sendo assim, não foi possível confirmar sua existência, sugerindo que este alelo pode ser um artefato de sequenciamento e seu predomínio na lista de alelos conhecidos terá que ser questionado. As frequências genotípicas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg e foram achados cinco haplótipos mais prováveis na população. Verificar-se-á a importância deste estudo a partir dos dados gerados, os quais darão embasamento para a elucidação do efeito do polimorfismo do gene *HLA-E* na prática clínica.

ABSTRACT

HLA-E is a gene of major histocompatibility complex (MHC) class I nonclassical, which has limited polymorphism and low levels of tissue expression. Currently are described in the literature nine alleles, only three products with different protein sequences of amino acids are codified. Its variants polymorphic are frequently associated with several disorders, such as for example, defense against viral and bacterial infections, miscarrying applicant, stem cell transplantation-hematopoietic and solid organ transplants. The molecules of HLA-E can interact with both receptors innate immunity as adaptive, thus promoting the inhibition of NK cells through its receptors CD94/NKG2A or the activation of cells TCD8+. In this study was investigated by the technique of DNA sequencing, the polymorphism of HLA-E gene, as well as their allelic frequencies, genotypic, haplotypes and imbalance of connection, a composite sample of individuals negroids paranaenses. Observed the allele with greater frequency in the sample analyzed *E*01:01* (59.21 %). In turn the allele *E*01:04* presented frequency equal to zero. Thus, it was not possible to confirm its existence, suggesting that this allele may be an artifact of sequencing and its predominance in the list of alleles known will have to be questioned. The genotypic frequencies are in Hardy-Weinberg and five haplotypes were found more likely in the population. Check will be the importance of this study from the data generated, which will give a better basis for the elucidation of the effect of the polymorphism of HLA-E in clinical practice.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 01 - COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE HUMANO – HLA | 5 |
| FIGURA 02 - LIGAÇÃO DO PEPTÍDEO NA MOLÉCULA HLA DE CLASSE I..... | 9 |
| FIGURA 03 - MOLÉCULA MHC DE CLASSE II | 10 |
| FIGURA 04 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MHC DE CLASSE III | 11 |
| FIGURA 05 - LOCALIZAÇÃO DOS GENES NÃO CLÁSSICOS DE <i>HLA Ib</i> : <i>HLA-G</i> , <i>-F e -E</i> , NO BRAÇO CURTO DO CROMOSSOMO 6..... | 14 |
| FIGURA 06 - REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA PROTÉICA DA MOLÉCULA HLA-E | 15 |
| FIGURA 07 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROMOTOR DO GENE <i>HLA-E</i> .. | 19 |

LISTA DE TABELAS, QUADROS E GRÁFICOS

| | |
|---|----|
| TABELA 01 - DIFERENÇAS ALÉLICAS NO GENE <i>HLA-E</i> | 22 |
| TABELA 02 – FREQUÊNCIA ALÉLICA DE <i>HLA-E</i> EM UMA AMOSTRA DE CAUCASÓIDES DINAMARQUESES (n=150)..... | 23 |
| TABELA 03 - FREQUÊNCIA ALÉLICA DE <i>HLA-E</i> EM UMA AMOSTRA DE AFROAMERICANOS DOS ESTADOS UNIDOS (n=54 INDIVÍDUOS)..... | 23 |
| TABELA 04 - FREQUÊNCIA ALÉLICA DE <i>HLA-E</i> NAS AMOSTRAS AMERÍNDIAS DO MÉXICO, COLÔMBIA E CHILE | 24 |
| TABELA 05 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE <i>HLA-E</i> EM DIFERENTES PAÍSES..... | 24 |
| TABELA 06 - DISTRIBUIÇÃO DOS SNPs <i>DE HLA-E</i> EM TRÊS DIFERENTES GRUPOS ÉTNICOS: CAUCASÓIDE; AFROCARIBENHO E ASIÁTICO | 25 |
| TABELA 07 - DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS PARA OS SNPs DAS POSIÇÕES 1114 E 1446 DE <i>HLA-E</i> EM TRÊS DIFERENTES GRUPOS ÉTNICOS | 26 |
| GRÁFICO 01 - NÚMEROS DE ANTÍGENOS E ALELOS DE CLASSE I E II IDENTIFICADOS DESDE 1968..... | 12 |
| QUADRO 01 - WORKSHOPS INTERNACIONAIS DE HISTOCOMPATIBILIDADE | 7 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MHC do inglês (Major Histocompatibility Complex) Complexo Principal de Histocompatibilidade

HLA - (Human Leukocyte Antigen) Antígenos Leucocitários Humanos

Cell NK – Célula Natural Killer

DNA - Ácido desoxirribonucléico

β 2m – β 2-microglobulina

HLA-G – Antígeno Leucocitário Humano-G

HLA-E – Antígeno Leucocitáriuom Humano – E

HCMV – Citomegalovírus

MHC - I – Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe I

MHC - II – Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe II

MHC - III – Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe III

SNP – (Single Nucleotide Polymorphism) Polimorfismo de nucleotídeo único

3'UTR - (Untranslated Region) Região 3' transcrita e não traduzida.

Ile- Isoleucina

Leu – Leucina

Ser – Serina

TAP- Proteína de membrana do retículo endoplasmático

Thr - Triptofano

RNA_m – RNA mensageiro

ISRE – Sequência consenso do Interferon gama

SXY – Módulo S, X1, X2 e Y

NF- κ B - fator transcricional Kb

Sp1 – Fator transcricional mediador das rotas de transativação constitutivas e induzidas por citocinas

STAT – Tradutor de sinal transcrição

CIITA – Transativador de classe II

SUMÁRIO

| | |
|--|------|
| RESUMO | v |
| ABSTRACT | vi |
| LISTA DE FIGURAS | vii |
| LISTA DE TABELAS, QUADROS E GRÁFICOS | viii |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS | ix |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 <i>HLA-E</i> | 1 |
| 2. OBJETIVO | 2 |
| 2.1 Objetivos Gerais..... | 2 |
| 2.2 Objetivos Específicos..... | 2 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 3 |
| 3.1 Variação genética - Polimorfismos..... | 3 |
| 3.2 Exemplos de polimorfismos de DNA e suas aplicações..... | 3 |
| 3.3 Região MHC | 5 |
| 3.3.1 Definição..... | 5 |
| 3.3.2 Histórico do MHC e a descoberta do sistema gênico HLA..... | 6 |
| 3.3.3 Estrutura do MHC humano..... | 7 |
| 3.3.3.1 MHC de classe I..... | 8 |
| 3.3.3.2 MHC de classe II..... | 9 |
| 3.3.3.3 MHC de classe III..... | 10 |
| 3.3.4 Polimorfismo do MHC..... | 11 |

| | |
|--|-----------|
| 3.3.5 Evolução e diversificação da região MHC..... | 12 |
| 3.4 HLA-E | 14 |
| 3.4.1. Estrutura protéica <i>HLA-E</i> e do seu peptídeo ligante | 14 |
| 3.4.2. Receptores celulares ligantes a molécula de <i>HLA-E</i> | 16 |
| 3.4.3. Expressão e função do <i>HLA-E</i> | 18 |
| 3.4.4 Região reguladora de <i>HLA-E</i> | 19 |
| 3.4.5 Polimorfismo de <i>HLA-E</i> | 20 |
| 3.4.6 Aspectos populacionais..... | 22 |
| 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 27 |
| ARTIGO | 33 |
| DISCUSSÃO | 48 |
| CONCLUSÃO | 53 |
| APÊNDICE 01 | 54 |
| APÊNDICE 02 | 59 |
| APÊNDICE 03 | 61 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 *HLA-E*

O *HLA-E* é um gene do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I não clássico, o qual apresenta limitado polimorfismo e baixos níveis de expressão tecidual (LE BOUTEILLER *et al.*, 1996). Atualmente estão descritos na literatura nove alelos, sendo que somente três produtos protéicos com diferentes sequências de aminoácidos são codificados (ANTOUN *et al.*, 2008).

As variantes polimórficas do gene *HLA-E* estão frequentemente associadas a alguns eventos, como por exemplo, defesa do organismo contra infecções virais e bacterianas, transplantes, bem como abortamento recorrente (PIETRA *et al.*, 2010).

As moléculas de HLA-E podem interagir tanto com os receptores da imunidade inata quanto adaptativa, promovendo assim a inibição das células NK através de seus receptores CD94/NKG2A ou a ativação das células TCD8⁺ (JIANG *et al.*, 2010). Este mecanismo de ativação ou inibição dependerá da molécula com a qual o HLA-E se ligará, podendo ser peptídeos de sequências líderes de moléculas do MHC de classe I ou peptídeos virais e bacterianos (TOMASEC *et al.*, 2000).

Uma das razões que legitimam a relevância desta pesquisa é a contribuição para a caracterização da população afroparanaense para o gene *HLA-E*, pois nota-se que faltam estudos, principalmente no âmbito populacional, envolvendo este gene.

Neste trabalho foram investigados os polimorfismos das regiões exônicas 2 e 3 do gene *HLA-E*, através da técnica do sequenciamento de DNA, em uma amostra de 152 (cento e cinquenta e dois) potenciais doadores voluntários de medula óssea provenientes de uma população afrodescendente do Paraná. Para proceder com a pesquisa foi utilizado o banco de amostra do Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade da Universidade Federal do Paraná (LIGH).

O trabalho proposto servirá de base para posteriores estudos de associação que se realizarem nesta área

2. OBJETIVO

2.1 Objetivos Gerais

O presente estudo teve por objetivo analisar a variabilidade genética dos éxons 2 e 3 do gene *HLA-E* em uma amostra de afrodescendente do Paraná. Para tanto, foi utilizada uma amostra composta por 152 (cento e cinquenta e dois) afrodescendentes doadores voluntários de medula óssea do Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade da Universidade Federal do Paraná.

2.2 Objetivos Específicos

- Estimar as frequências alélicas e genotípicas na amostra estudada para o gene *HLA-E*.
- Estimar as frequências haplotípicas na amostra estudada.
- Estimar e verificar a existência de desequilíbrio de ligação entre os haplótipos analisados.
- Averiguar a conformidade das distribuições genotípicas dos alelos estudados para o equilíbrio de Hardy-Weinberg.
- Estudos caso-controle associados às doenças ligadas ao *HLA-E* poderão ser melhor referenciados com dados populacionais mais próximos aos das amostras caso-controle brasileiras
- Investigar a existência de alelos ainda não descritos na literatura.
- Comparar os dados obtidos neste estudo com aqueles de outras populações mundiais anteriormente investigadas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Variação genética – Polimorfismos

O campo da genética de populações mudou dramaticamente desde a sua origem. A transformação veio por meio da abundância de dados experimentais gerados pelo uso dos métodos moleculares no estudo dos polimorfismos genéticos. Deste modo, a genética de populações procura entender as causas das diferenças genéticas dentro e entre as espécies e a biologia molecular fornece um rico repertório de técnicas para a identificação dessas diferenças.

Em seu sentido mais amplo, a genética de populações é o estudo de diferenças genéticas que ocorrem naturalmente nos organismos. As diferenças genéticas que são comuns entre os indivíduos são denominadas de polimorfismos. Para um gene ser polimórfico, ele deve possuir dois ou mais alelos, onde a frequência do alelo mais comum não ultrapasse 99%.

O estudo da diversidade dos polimorfismos em populações possui uma série de aplicações, por exemplo, auxiliando no entendimento da evolução, da origem e história demográfica das populações e da ação de fatores evolutivos em sequências genômicas. Alguns polimorfismos que melhor caracterizam grupos étnicos podem ser utilizados como marcadores genéticos na definição da ancestralidade de indivíduos e de populações, possibilitando assim, a reconstrução da história da fundação ou migração e investigação da estrutura genética das populações.

Os polimorfismos encontrados nos genes envolvidos com o sistema imunológico apresentam uma importância adicional, pois com emergentes estudos de associação, é de notória importância ter o conhecimento exato dos polimorfismos presentes nesses genes.

3.2 Exemplos de polimorfismos de DNA e suas aplicações

Existe um grande número de diferentes variações a nível de DNA, denominadas de polimorfismos. O acrônimo SNP significa polimorfismo de nucleotídeo único (*single-nucleotide polymorphism*), sendo um polimorfismo no qual os indivíduos na população podem diferir quanto à identidade do par de nucleotídeos presentes em um sítio definido específico no DNA.

Um polimorfismo não-sinônimo é um polimorfismo de nucleotídeo único em uma

região codificante que altera o códon e resulta na substituição de um aminoácido na cadeia polipeptídica. Por sua vez, um polimorfismo sinônimo é um polimorfismo de nucleotídeo único presente na região codificante que produz um códon sinônimo e, portanto, não resulta em uma substituição de aminoácido na cadeia polipeptídica.

Um polimorfismo de sítio de restrição é aquele no qual algumas moléculas de DNA de alguns indivíduos contêm um sítio de restrição específico, enquanto outros não o têm. Já os polimorfismos microsatélites e minissatélites são baseados em sequências curtas que se repetem em tandem em um ou mais lugares no genoma. Um polimorfismo microsatélite tem um núcleo de repetição muito curto que varia de 2 a 9 pares de bases, enquanto o minissatélite tem seu núcleo de repetição tipicamente variando de 10 a 60 pb.

Há inúmeras justificativas para estudar polimorfismos de DNA, entre elas está à possibilidade de estimar o nível de variação genética em diversas populações, bem como examinar e entender os padrões nos quais diferentes tipos de variação genética (ex., polimorfismos sinônimos e não sinônimos) ocorrem no genoma.

Outra notória importância que podemos citar está baseada na utilização dos polimorfismos como um meio de “impressão digital do DNA”, podendo ser capaz de identificar de maneira única e exclusiva indivíduos diferentes em uma população, para finalidades de investigação criminal, identificação pessoal, determinação do grau de parentesco genético e para verificar a compatibilidade genética entre os indivíduos no âmbito dos transplantes.

3.3 Região MHC

3.3.1 Definição

O MHC do inglês *Major Histocompatibility Complex* ou Complexo Principal de Histocompatibilidade é uma região cromossômica que compreende um conjunto de genes expressos de forma codominante, altamente polimórficos e polialélicos e que expressam seus produtos na superfície de uma variedade de células (JONES, 1997). Mais de 200 genes estão localizados nesta região, apresentando importantes funções imunológicas (TROWSDALE e CAMPBELL, 1997). Nos seres humanos este complexo gênico é conhecido como HLA (*Human Leucoyte Antigens* ou Antígenos Leucocitários Humanos). Este sistema de 4Mb está localizado no braço curto do cromossomo 6, mais especificadamente na região 6p21.3 (FIGURA 01). As moléculas de HLA são de notória importância na apresentação de antígenos para os linfócitos T (ABBAS e LICHTMAN *et al.*, 2005). Para que os linfócitos T possam realizar o reconhecimento de antígenos é necessário que estes sejam processados na forma de peptídeos e apresentados por moléculas HLA.

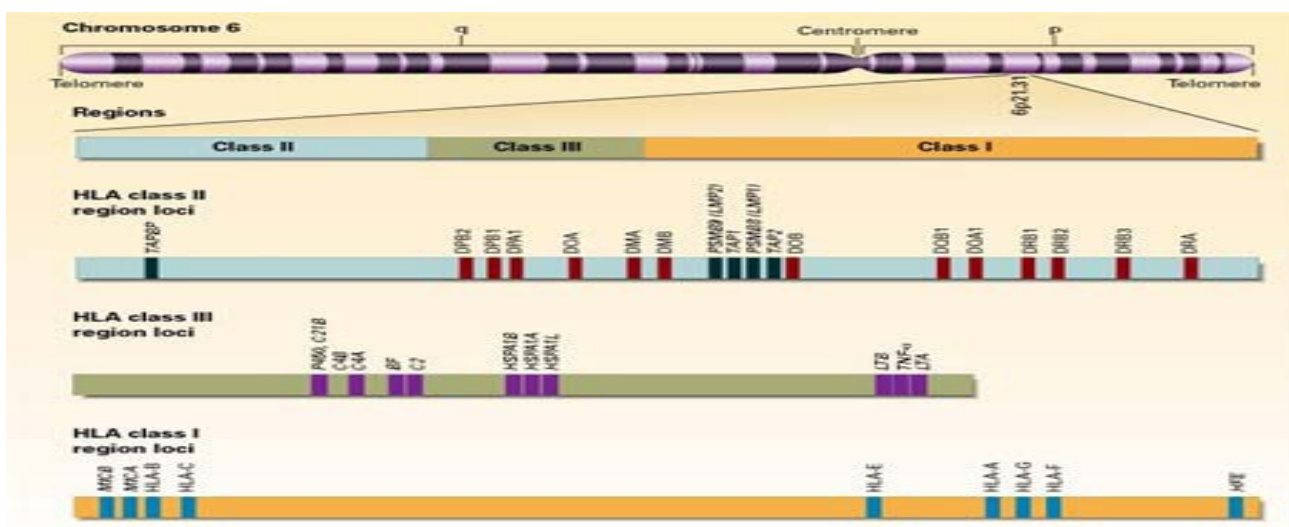


FIGURA 01 - COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE HUMANO – HLA

Fonte: (www.ufpe.br/biolumol/).

3.3.2 Histórico do MHC e a descoberta do sistema gênico HLA

O MHC foi primeiramente descrito nos anos 30 pela observação do fenômeno de rejeição ou aceitação de transplantes de tecidos entre camundongos alogênicos ou singênicos (SNELL, 1948). Em camundongos, esta região está localizada no cromossomo 17 e é denominada região de Histocompatibilidade-2 (H-2) (ABBAS e LICHTMAN *et al.*, 2005).

Em 1958, Jean Dausset publicou as suas observações e conclusões sobre a capacidade de pessoas submetidas a transfusões sanguíneas aglutinarem leucócitos de outros indivíduos. Dausset concluiu que transfusões e transplantes provocavam nos receptores a produção de anticorpos contra os leucócitos dos doadores (DAUSSET, 1958).

Como em humanos a presença de aloantígenos foi identificada em leucócitos, estes receberam a designação de antígenos leucocitários humanos (HLAs – *Human Leucocyte Antigens*) (ABBAS e LICHTMAN *et al.*, 2005). Dausset descobriu o primeiro antígeno leucocitário humano, denominado de MAC, que atualmente corresponde ao antígeno conhecido HLA-A2. Posteriormente, Jon Van Rood e Van Leeuwen (1963) publicaram a descoberta de outro gene da região HLA, que nomearam de FOUR e que agora recebe a denominação de *HLA-B*.

Durante 20 anos após a descoberta dos genes *HLA*, a sua única função ainda era atribuída aos processos de rejeição em transplantes. Tal fato intrigava os imunologistas da época, tendo em vista que o transplante não era considerado um fenômeno natural, e mais, não havia nenhuma razão óbvia para que esse conjunto de genes fosse preservado no processo evolutivo. No entanto, nas décadas de 60 e 70 foi descoberto que os genes do MHC controlam não apenas a rejeição de transplantes, mas também participam das respostas imunológicas a todos os antígenos protéicos (ABBAS e LICHTMAN *et al.*, 2005).

Várias pesquisas e inúmeros encontros técnico-científicos internacionais (workshops), realizados a partir de 1964, contribuíram para o conhecimento adquirido sobre a região *HLA* (QUADRO 01).

QUADRO 01- WORKSHOPS INTERNACIONAIS DE HISTOCOMPATIBILIDADE.

| HLA WORKSHOPS | | |
|----------------------|---------------------------|---------------------------|
| ANO | CIDADE | ORGANIZADORES |
| 1964 | Durham - EUA | Bernar Amos |
| 1965 | Leiden - Holanda | Jon J. Van Rood |
| 1967 | Turin - Itália | Ruggero Cappellini |
| 1970 | Los Angeles - EUA | Paul Terasaki |
| 1972 | Evian - França | Jean Dausset |
| 1975 | Arhus - Dinamarca | F. Kissmeyer -Nielsen |
| 1977 | Oxford - Inglaterra | Walter Bodmer |
| 1980 | Los Angeles - EUA | Paul Terasaki |
| 1984 | Munique - Alemanha | Ekkehard Albert e W. Mayr |
| 1987 | Nova York - EUA | Bo Dupont |
| 1991 | Yokohama - Japão | Kimiyoshi Tsuji |
| 1996 | St. Malo e Paris - França | Dominique Charron |
| 2002 | Victoria - Canadá | Bo Dupont |
| 2005 | Melbourne - Austrália | James McCluskey |
| 2008 | Rio de Janeiro - Brasil | M. Gerbase de Lima/ |

FONTE: INTERNACIONAL HISTOCOMPATIBILITY WORKING GROUP (www.ihwg.org) (2010).

3.3.3 Estrutura do MHC humano

Em seres humanos, o MHC localiza-se no braço curto do cromossomo 6, especificadamente na região 6p21.3, formando um conjunto de genes funcionalmente relacionados com a resposta imune (TROWSDALE e CAMPBELL, 1993). O sistema HLA estende-se ao longo de uma região de 4 Mb, sendo constituído por 224 genes, dos quais 128 são funcionais e 96 são pseudogenes (TROWSDALE e CAMPBELL,1993). Em razão da proximidade entre os genes do MHC e à baixa taxa de permuta entre eles (cerca de 4%), a combinação de alelos de diferentes locos de um único cromossomo costuma ser herdada em conjunto através de uma unidade, denominada de haplótipo. Dessa forma cada indivíduo possui dois haplótipos, um de origem materna e outro de origem paterna.

Este complexo encontra-se dividido em 3 regiões: MHC classe I, II e III.

3.3.3.1 MHC classe I

A região de classe I possui extensão de 1,8 Mb, apresentando mais de 122 locos e cerca de 41 deles são genes que se expressam e transcrevem algum produto funcional (SHIINA et al., 2004). Os genes de classe I são divididos em clássicos: *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C*; e não clássicos: *HLA-E*, *-F*, *-G* (KLEIN e SATO, 2000). Nesta região há também os locos *HLA-H*, *HLA-J*, *HLA-K* e *HLA-L*, os quais são considerados pseudogenes (CAMPBELL e TROWSDALE et al., 1991).

Os locos clássicos do MHC classe I (*HLA-A*, *-B*, *-C*) codificam uma grande diversidade de glicoproteínas de membrana, envolvidas em importantes mecanismos de resposta imune celular.

As moléculas de MHC de classe I são polipeptídios heterodímeros que consistem em uma cadeia pesada variável transmembrana hidrofóbica (α), ligada a uma molécula $\beta 2$ microglobulina (pequena proteína extracelular solúvel codificada fora da região do MHC, no cromossomo 15), chamada de cadeia leve invariante, com cerca de 12.000 (doze mil) Daltons (JONES, 1997). A cadeia α é dividida em três domínios extracelulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$) e apresenta cerca de 44.000 (quarenta e quatro mil) Daltons.

Os dois domínios aminoterminais ($\alpha 1$, $\alpha 2$) ligam antígenos intracelulares (proteínas virais ou antígenos tumorais) e contêm aminoácidos que são reconhecidos pelas células T CD8⁺. Por sua vez, o segmento $\alpha 3$ da cadeia se dobra para formar um domínio semelhante à Ig cuja sequência de aminoácidos é a mesma em todas as moléculas da classe I. Esse segmento contém uma alça que serve de sítio para a ligação ao receptor CD8 das células T (ABBAS e LICHTMAN et al., 2005).

As moléculas de classe I são expressas na superfície de quase todas as células nucleadas do corpo, bem como nas plaquetas, e sua principal função é apresentar em sua superfície antígenos que são gerados no citoplasma da própria célula aos linfócitos T CD8⁺ citotóxicos, que por sua vez eliminam as células infectadas através da liberação de substâncias citotóxicas.

As extremidades da fenda de ligação de peptídeos das moléculas da classe I são fechadas, impedindo a ligação de peptídeos maiores, com mais de 12 aminoácidos (FIGURA 02). Assim, proteínas globulares nativas precisam ser “processadas” para gerar

fragmentos pequenos que possam se ligar às moléculas do MHC e para serem reconhecidas pelas células T (ABBAS e LICHTMAN *et al.*, 2005). Uma célula sem infecção e de crescimento normal apresenta constantemente peptídeos próprios aos linfócitos TCD8⁺. Porém, estes só são ativados quando reconhecem um peptídeo como estranho, por exemplo, nas infecções virais.

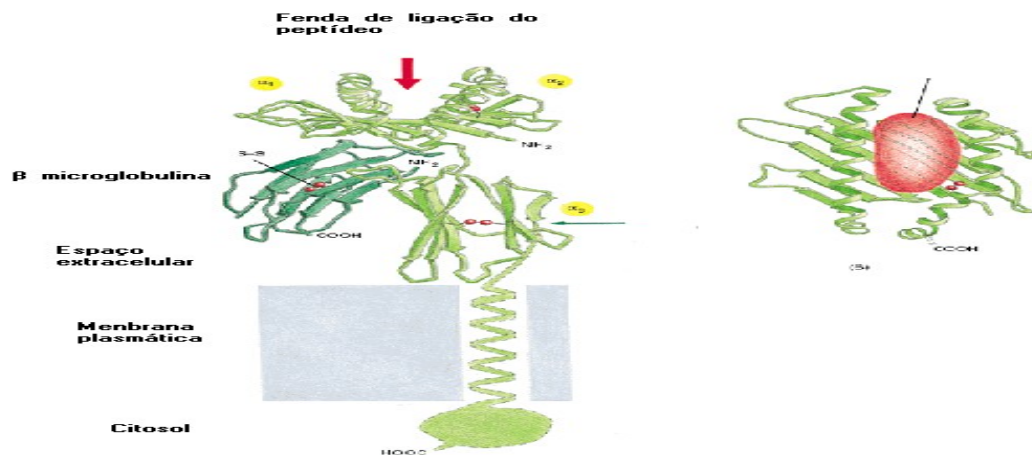


FIGURA 02 – LIGAÇÃO DO PEPTÍDEO NA MOLÉCULA HLA DE CLASSE I.

Adaptado: ALBERTS *et al.*, 2002 (www.ncbi.nlm.nih.gov/books)

3.3.3.2 MHC classe II

Os genes dessa região encontram-se na porção mais centromérica do MHC, ocupando cerca de 700 Kb. Nota-se que na literatura já foram descritos cerca de 34 locos nesta região, onde são encontrados genes clássicos, como os *HLA-DQ*, *-DP* e *-DR*, e genes não clássicos: *HLA-DM* e *-DO* (KLEIN e SATO, 2000).

As moléculas de classe II são heterodímeros constituídos por duas cadeias glicoprotéicas, uma cadeia α , com cerca de 34.000 (trinta e quatro mil) Daltons e uma cadeia β , com 29.000 (vinte e nove mil) Daltons, em associação não covalente (FIGURA 03). As cadeias α e β são compostas de 229 e 237 aminoácidos respectivamente, e são formadas por três regiões: uma região extracelular hidrofílica, uma região transmembrana hidrofóbica e uma região intracelular hidrofílica. A região hidrofílica extracelular da cadeia α contém dois domínios (resíduos 1 a 84 e 85 a 178), designados de $\alpha 1$ e $\alpha 2$, respectivamente. A região hidrofílica extracelular da cadeia β também contém dois domínios (resíduos 1 a 91 e 92 a 192) designados de $\beta 1$ e $\beta 2$, respectivamente (BRODSKY *et al.*, 1996).

A expressão das moléculas de classe II pode ser induzida por citocinas e manifesta-se em uma variedade de células, conferindo a estas capacidade de apresentarem antígenos para linfócitos T-CD4, ativando dessa maneira as células B (KLEIN e SATO, 2000).

.As cadeias α e β são codificadas por genes diferentes. A nomenclatura desses genes é designada por A ou B, segundo a codificação dessas respectivas cadeias. Por exemplo, *HLA-DRA* codifica cadeias α , bem como, *HLA-DRB* codifica cadeias β (KLEIN e SATO, 2000).

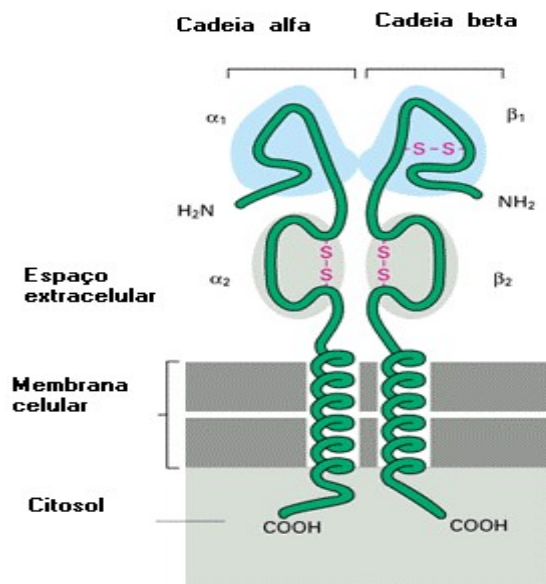


FIGURA 03 – MOLÉCULA MHC DE CLASSE II
Adaptado: ALBERTS *et al.*, 2002 (www.ncbi.nlm.nih.gov/books)

3.3.3.3 MHC classe III

A região MHC de classe III localiza-se entre os genes classe I e classe II e estende-se por uma região de 900 Kb, codificando cerca de 70 polipeptídeos diferentes (BAHRAM *et al.*, 1994). Apesar de não ser tão polimórfica quanto às regiões de classe I e II, esta região constitui o segmento do genoma humano com maior densidade de genes, apresentando também alguns pseudogenes (SHIINA *et al.*, 2004). Os genes de classe III possuem funções variadas, destacando-se o seu papel na codificação de proteínas solúveis importantes na modulação e regulação da resposta imune (SHIINA *et al.*, 2004), como os genes que codificam moléculas relacionadas aos componentes do sistema complemento (Bf, C2, C4A, C4B) e os genes da *21-hidroxilase*, *TNF* (fator de necrose tumoral) e *LTA* (Linfotoxina), os quais codificam as citocinas TNF- α e LTA- α , respectivamente (MATSUZAKA *et al.*, 2001). A FIGURA 04 mostra o mapa molecular da

região III do MHC humano.

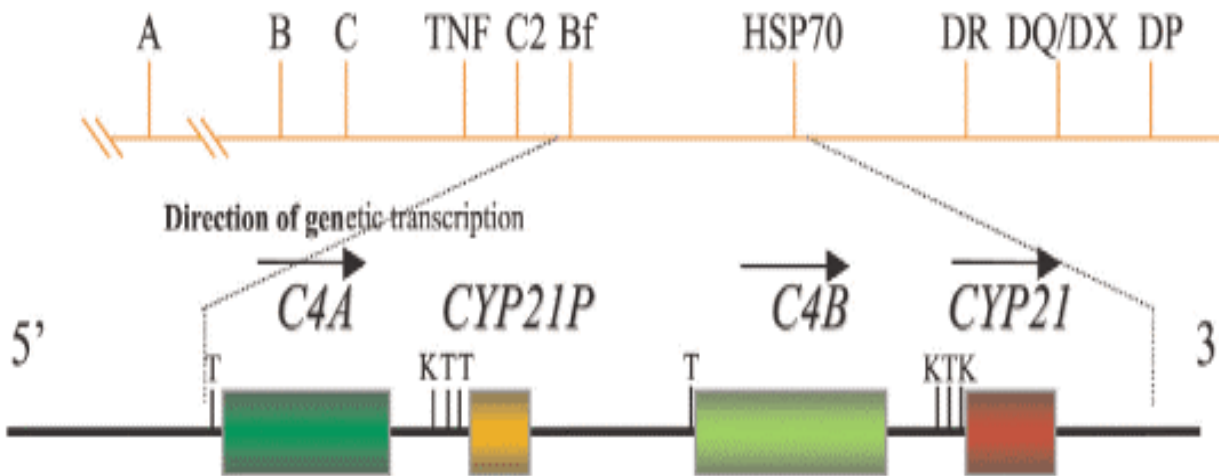


FIGURA 04 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MHC DE CLASSE III

ALBERTS *et al.*, 2002 (www.ncbi.nlm.nih.gov/books).

3.3.4 Polimorfismo do MHC

A região do HLA é a mais polimórfica encontrada no genoma humano (CAVALLI-SFORZA e FELDMAN, 2003). Pesquisadores na década de 80 estimaram que a heterozigose pudesse chegar a 90% em alguns locos deste complexo em seres humanos (HUGHES e NEI, 1988). No site www.anthonynolan.com, estão disponibilizados dados atuais sobre os alelos da região MHC, conforme demonstrado no GRÁFICO 01. Um dos aspectos de interesse pelo seu estudo deve-se ao fato de que numerosas doenças apresentam evidências de associação com os genes deste sistema (TIWARI E TERASAKI, 1985).

Os diversos genes do MHC humano possuem a peculiar característica de serem extremamente polialélicos, como por exemplo, o caso do gene *HLA-A* que possui mais de 1000 (um mil) alelos frequentes descritos até os dias atuais. Entretanto, esse elevado polialelismo não é válido para todos os genes, como por exemplo, o *HLA-DRA* que possui somente 3 formas alélicas diferentes.

A variabilidade alélica presente na região MHC pode ser atribuída a vários fatores, tais como: alta taxa mutacional; conversão gênica; migrações humanas e seleção sobredominante (HUGHES e NEI, 1988). O extremo polialelismo do MHC também é explicado pela provável resposta evolucionária dos vertebrados à invasão de

microrganismos, assegurando assim a continuidade da espécie mesmo na presença de pandemias. Alguns indivíduos de uma espécie sobrevivem a uma pandemia pelo efeito protetor do polimorfismo genético do MHC, garantindo assim a perpetuação da espécie mesmo que a maioria dos indivíduos sucumba à doença (HUGHES e NEI, 1988).

Porém, toda essa variação traz certas dificuldades nos transplantes, pois é muito raro que dois indivíduos expressem moléculas MHC idênticas, dificultando, assim, a combinação entre doadores e receptores para transplantes de órgãos em humanos.

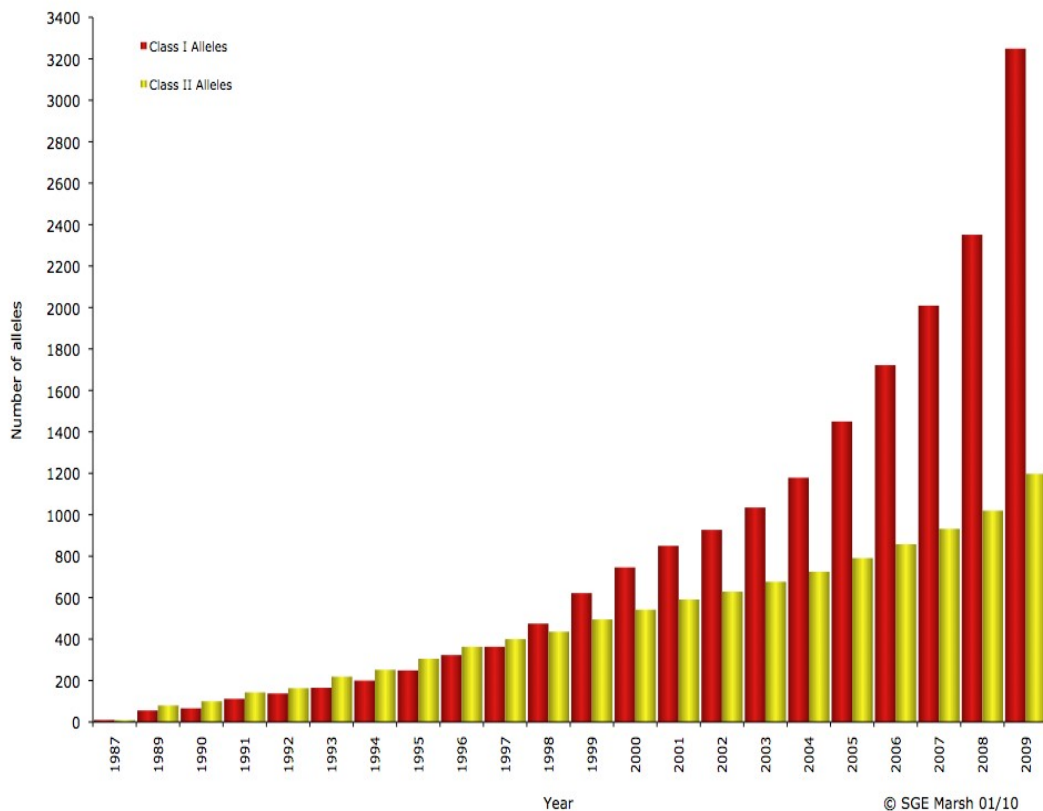


GRÁFICO 01 – NÚMEROS DE ANTÍGENOS E ALELOS DE CLASSE I E II IDENTIFICADOS DESDE 1968. Adaptado: IMGTA/ HLA <http://www.anthonynolan.com>

3.3.5 Evolução e diversificação da região MHC

O MHC, cujo correspondente humano é o sistema HLA, surgiu através de repetidas duplicações e conversões de genes ao longo de milhões de anos no decorrer da evolução dos vertebrados desde a divergência dos ciclóstomos (KASAHARA *et al.*, 1997).

A análise do MHC de alguns vertebrados mostra diferenças notórias, principalmente ao nível da inclusão, ordem e sequências nucleotídicas dos genes, mas, por outro lado, revela a existência de uma estrutura comum, principalmente entre os mamíferos (YUHKI *et al.*, 2003). Ao contrário do que ocorre nos mamíferos, em outros

vertebrados, como aves e peixes, os *loci* MHC nem sempre estão reunidos num único conjunto, dispersando-se no mesmo cromossomo ou em cromossomos diferentes (WITZELL *et al.*, 2006).

A variação nos *loci* HLA está essencialmente concentrada nas regiões envolvidas na codificação dos sítios de ligação aos antígenos dos receptores das membranas (HEDRICK, 2004). O maior acúmulo de substituições não sinônimas nas regiões que codificam para os sítios de ligação aos antígenos, revela também a atuação da seleção natural, privilegiando o aumento da variação, que neste caso é funcionalmente relevante (HUGHES e NEI, 1988).

O mecanismo que parece ter maior efeito na manutenção dos elevados níveis de polimorfismo e polialelismo encontrados nos genes da região HLA, e que fazem deles os mais variáveis do genoma humano, é a seleção sobredominante (HEDRICK, 2004).

A seleção sobredominante refere-se a um dos mecanismos de seleção natural que conduzem à manutenção de polimorfismos genéticos numa população, em oposição à seleção direcional que favorece um único alelo. Entre os diferentes mecanismos inerentes à seleção sobredominante destacam-se como os mais estudados a “vantagem dos heterozigotos” e a “seleção dependente de frequência”. A “vantagem dos heterozigotos” é baseada na idéia de que eles são capazes de reconhecer um maior número de epítomos, apresentando uma vantagem adaptativa em relação aos homozigotos (SPENCER e MARKS, 1988). A “seleção dependente de frequência” baseia-se no pressuposto de que os alelos mais raros possuem uma forte vantagem seletiva superior aos alelos mais comuns, para os quais os parasitas podem ter já desenvolvido resistência.

3.4 HLA-E

No final da década de 80 três novos genes *HLA-I* foram descobertos e denominados como genes *HLA-Ib*, estes por sua vez foram designados: *HLA-E*, *HLA-F* e *HLA-G* (GERAGHTY *et al.*, 1987; KOLLER *et al.*, 1988).

Algumas características distinguem os genes não clássicos de classe *Ib* *HLA-G*, *-E* e *-F*, dos genes clássicos de classe *Ia*, como por exemplo, o baixo grau de polialelismo e expressão tecidual restrita (LE BOUTEILLER *et al.*, 1996; POOK *et al.*, 1991).

O gene *HLA-E* se localiza no braço curto do cromossomo 6 (seis), entre os genes *HLA-C* e *-A*, enquanto *HLA-G* situa-se entre o *-A* e o *-F* (FIGURA 05).

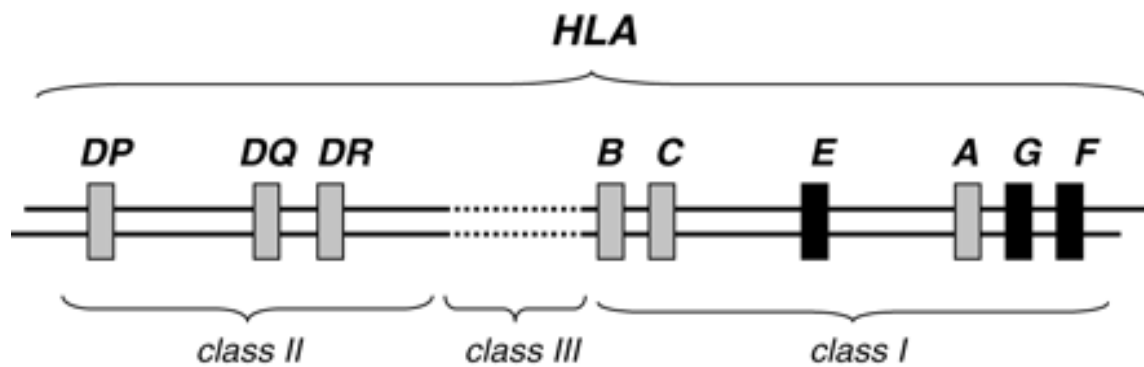


FIGURA 05 – LOCALIZAÇÃO DOS GENES NÃO CLÁSSICOS DE *HLA Ib*: *HLA-G*, *-F* e *-E*, NO BRAÇO CURTO DO CROMOSSOMO 6 (www.ncbi.nlm.nih.gov/books).

A expressão e a função de *HLA-E* em processos fisiológicos e patológicos ainda permanecem pobremente estabelecidas. Mais estudos precisam ser realizados para elucidação completa dessas questões.

3.4.1. Estrutura protéica do HLA-E e do seu peptídeo ligante

A estrutura protéica da molécula de HLA-E é heterodímera, sendo constituída por uma cadeia leve e uma cadeia pesada, a qual está ancorada na membrana celular (FIGURA 06) (ULBRECHT *et al.*, 1992). A cadeia pesada têm aproximadamente 45 kDa. Nota-se que o primeiro éxon codifica a sequência do peptídeo líder, os éxons dois e três codificam o domínio $\alpha 1$ e o domínio $\alpha 2$ respectivamente, o éxon quatro codifica o domínio $\alpha 3$, o éxon cinco codifica a região transmembrânica, e os éxons seis e sete codificam o

domínio citoplasmático (ISHITANI *et al.*, 2006). Ainda, HLA-E pode ser encontrado também na forma solúvel (HLA-Es) (COUPEL *et al.*, 2007).

A molécula HLA-E apresenta menos variação na sua sequência de aminoácidos quando comparada a outras moléculas de HLA de classe I. O único aminoácido que difere entre os dois alelos não sinônimos de *HLA-E* (*E*01:01* e *E*01:03*), está localizado no códon 107, que corresponde ao domínio $\alpha 2$ da cadeia pesada, onde uma arginina (*E*01:01*) é substituído por uma glicina (*E*01:03*) (SULLIVAN *et al.*, 2008).

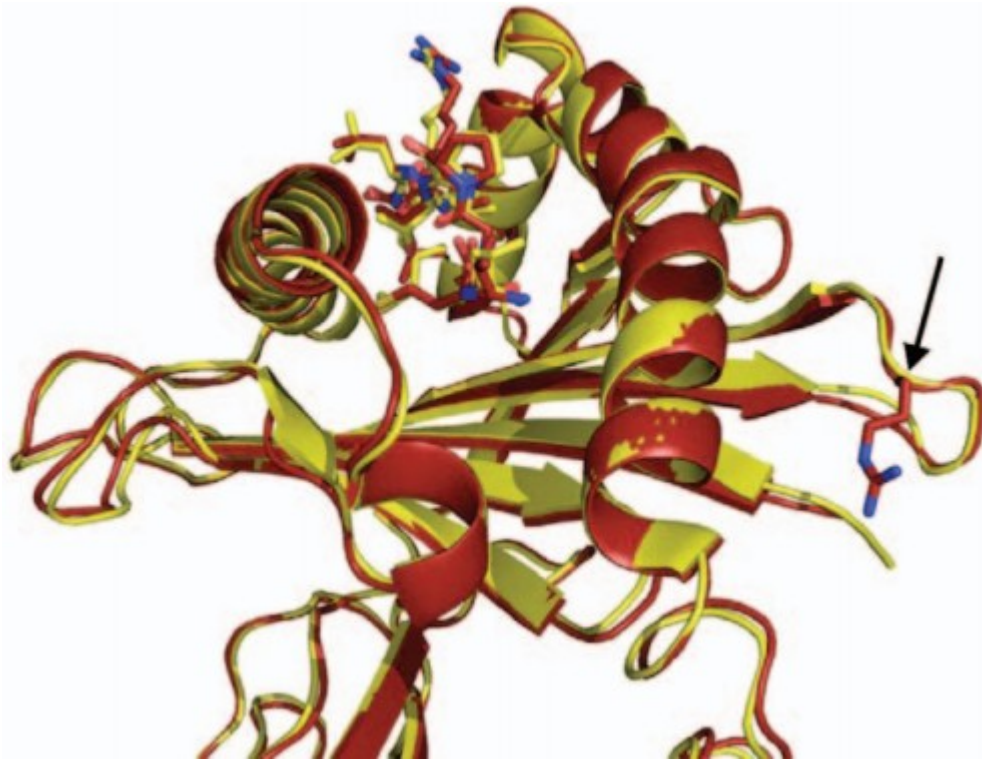


FIGURA 06 - REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA PROTÉICA DA MOLÉCULA HLA-E. Sobreposição de *HLA-E *01:01* (vermelho) e *HLA-E *01:03* (amarelo). A flecha indica o único resíduo polimórfico entre os alelos, que pode ser uma arginina ou glicina (SULLIVAN *et al.*, 2008).

Estudos que se propunham a elucidar os peptídeos que se ligam na molécula de HLA-E, indicaram que, para ocorrer a estabilização da molécula na superfície celular, é requerida a disponibilidade de peptídeos derivados da sequência líder de várias moléculas HLA de classe I clássicas e não clássicas, incluindo, HLA-A, HLA-B, HLA-C e HLA-G. A conexão desses peptídeos na fenda da molécula de HLA-E é dependente de TAP, sendo uma proteína localizada na membrana do retículo endoplasmático (RE), que tem a função de transportar os peptídeos degradados no citosol para o lúmen do RE, onde se ligam na fenda das moléculas do HLA-E (SULLIVAN *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 1998).

A estrutura do complexo da molécula de HLA-E com a sequência líder de HLA-B,

revelou a natureza altamente restritiva do sulco de ligação ao peptídeo da molécula de HLA-E e forneceu uma explicação plausível para a ligação preferencial com as sequências líderes (STRONG *et al.*, 2003). Ao contrário das moléculas de MHC de classe I que normalmente são restritas a 2 ou 3 posições do peptídeo, chamado de âncora de resíduos, os peptídeos de ligação com o HLA-E são compostos por 5 resíduos de ancoragem o que impõem restrições severas às sequências de peptídeos que são capazes de se ligarem ao sulco do HLA-E (SULLIVAN *et al.*, 2008).

Embora a molécula HLA-E tenha sido descrita originalmente como ligante apenas de peptídeos de sequências líderes de HLA de classe I, recentes pesquisas sugerem que as moléculas de HLA-E podem também se ligar aos peptídeos virais bem como bacterianos. Tomasec (2000) demonstrou que a expressão de HLA-E na superfície celular é regulada pela infecção do citomegalovírus (HCMV). A sequência líder do HCMV denominada de glicoproteína VL40 (gpVL40) é muito similar às sequências líderes de HLA de classe I. Esta sequência gpVL40 pode se ligar à molécula de HLA-E, proporcionando a ativação das células TCD8⁺ ou a inibição das células NK através do receptor CD94/NKG2A.

3.4.2. Receptores celulares ligantes a molécula HLA-E

O antígeno leucocitário humano HLA-E age como ligante para os receptores de células que atuam no sistema imunológico inato e adaptativo.

A molécula de HLA-E tem sido identificada como ligante para os receptores CD94/NKG2A e CD94/NKG2C expressos em células NK, as quais fazem parte da imunidade inata (BRAUD *et al.*, 1998). As famílias gênicas *NKG2* e *CD94* estão situadas no complexo NK localizado no cromossomo 12 (12p12.3p-13.2). Em humanos um único gene *CD94* está intimamente ligado a quatro genes da família *NKG2* (*NKG2A*, *NKG2C*, *NKG2E* e *NKG2F*) (BRAUD *et al.*, 1998). Diferentemente de outros genes codificantes de receptores, os genes *CD94* e *NKG2* possuem pouca variação alélica (SHUM *et al.*, 2002). Ambos os genes codificam proteínas transmembrânicas do tipo II, da família semelhante à lectina do tipo C. Os receptores CD94/NKG2 são expressos na maioria das células NK e células T CD8 com TCR $\alpha\beta$ e em um subgrupo de células T TCR $\gamma\delta$ (TOYAMA-SORIMACHI *et al.*, 2001).

Apesar da similaridade da sequência de aminoácidos entre *NKG2A* e *NKG2C* (cerca de 92%), a interação de HLA-E com CD94/NKG2C tem uma afinidade de ligação oito vezes menor quando comparado ao receptor CD94/NKG2A, resultado de variação de

uma sequência de resíduos na hélice $\alpha 2$ (PIETRA *et al.*, 2010).

A ligação do HLA-E com peptídeos de sequência líder oriundas das moléculas de HLA-C, interage com o receptor inibitório CD94/NKG2A presente na célula NK, resultando na inibição da lise por estas células (MILLER *et al.*, 2003). Por outro lado, quando o HLA-E interage com peptídeo sinal oriundo da molécula de HLA-G, esse complexo pode interagir tanto com o receptor inibitório CD94/NKG2A, quanto com o receptor ativador CD94/NKG2C, promovendo a inibição ou ativação das células NK (HILARY *et al.*, 2008).

As sequências líderes de peptídeos que se ligam nas moléculas de HLA-E exibem limitados polimorfismos, todavia sutis diferenças nessas moléculas ligantes afetam o reconhecimento do HLA-E pelos seus receptores CD94/NKG2. O peptídeo HLA-Cw*07 unido ao HLA-E é reconhecido de maneira não específica por seu receptor correspondente das células NK. Por outro lado, o peptídeo líder de HLA-G*01 apresenta uma alta afinidade pelo receptor CD94/NKG2 (AKIKO *et al.*, 2005).

Isto deve-se ao fato de que as moléculas de HLA-Cw*07 contêm uma substituição do aminoácido alanina para um triptofano na posição 6. Como alanina é menor, o peptídeo se encaixa mais profundamente na fenda de ligação, dificultando o reconhecimento pelo receptor CD94/NKG2. No caso do peptídeo de HLA-G a presença do aminoácido fenilalanina na posição 8 cria uma maior hidrofobia na superfície do complexo, podendo favorecer o reconhecimento pelo receptor das células NK (AKIKO *et al.*, 2005).

A subunidade CD94 domina completamente as interações com os peptídeos. O resíduo P5 Arginina é o único contato com a subunidade NKG2A, porém é crucial. Se substituído por resíduos quimicamente semelhantes (por exemplo, Lisina), faz um completo cancelamento da ligação ao receptor (SULLIVAN *et al.*, 2008). Em resumo, os resultados indicam que o receptor CD94/NKG2 é particularmente suscetível a pequenas alterações na conformação dos peptídeos (SULLIVAN *et al.*, 2008).

Além de interagir com os receptores de células que atuam na imunidade inata, recentes estudos comprovam que a molécula de HLA-E também pode interagir com células que atuam no sistema imunológico adaptativo, como o linfócito T CD8⁺ (JIANG *et al.*, 2010). O exemplo mais caracterizado é o vínculo que o HLA-E forma com o peptídeo gpVL40 do citomegalovírus, já citado anteriormente (PIETRA *et al.*, 2010). Este complexo pode interagir com os receptores TCR das células TCD8⁺ e ativar a lise de células infectadas, sendo, portanto relevante nas defesas imunes contra o HCMV (PIETRA *et al.*, 2010).

3.4.3. Expressão e função do *HLA-E*

HLA-E é expresso de forma constitutiva em linfócitos T, linfócitos B, células NK e macrófagos (COUPEL *et al.*, 2007). Em órgãos não linfóides de indivíduos normais, *HLA-E* é expresso nas células endotélias destes órgãos.

Uma das funções de *HLA-E* está correlacionada com a regulação da imunidade antiviral. As doenças crônicas como hepatite C estão associadas com uma maior expressão intra-hepática de *HLA-E* (CUI *et al.*, 2010). Em particular, os pesquisadores mostraram que um peptídeo originado do vírus da hepatite C se liga e estabiliza a expressão de *HLA-E* na superfície celular, protegendo este complexo da citotoxicidade mediada pelas células NK, caracterizando então um escape viral da imunidade (PIETRA *et al.*, 2010). Porém, além dessa interação com os receptores CD94/NKG2A, estes complexos de peptídeos com o *HLA-E* podem também ser reconhecidos pelas células TCD8⁺ (JIANG *et al.*, 2010). Assim, esse tipo adicional de interação pode desempenhar um papel importante na defesa contra os vírus da hepatite C que eventualmente escapam do reconhecimento pelas células NK (PIETRA *et al.*, 2010).

Mecanismo similar ocorre com o citomegalovírus, onde os complexos peptídeos virais/*HLA-E* podem inibir as células NK através de seus receptores CD94/NKG2A ou ativar os linfócitos TCD8⁺ (SULLIVAN *et al.*, 2008). Embora a sequência do peptídeo gpVL40 seja idêntica à observada em muitos peptídeos de sequência líder de *HLA-C*, alguns indivíduos, em especial aqueles que apresentam os genótipos *HLA-Cw2*, -7, -15 e -18, apresentam peptídeos bastante diferentes quando comparados às moléculas codificadas pelos outros genótipos de *HLA-Cw*. Assim, nesses indivíduos, o complexo *HLA-E/gpVL40* é considerado estranho pelo organismo, podendo ser reconhecido pelas células TCD8⁺ (PIETRA *et al.*, 2010).

Os produtos protéicos deste gene também se expressam no trofoblasto extraviloso que invade a decídua materna. Na decídua, o *HLA-E* pode interagir com os peptídeos originados dos genes *HLA-G* e -C (HILARY *et al.*, 2008).

Pesquisas recentes revelaram que o sucesso reprodutivo humano está intimamente relacionado com a quantidade de citocinas secretadas pelas células NK (ISHITANI *et al.*, 2003). Estas, quando são demasiadamente ativadas, podem lisar muitas células do trofoblasto, comprometendo assim o desenvolvimento fetal. Por outro lado, quando as células NK estão muito inibidas, elas não secretam citocinas necessárias para

o remodelamento das artérias uterinas, podendo assim ocorrer a pré-eclâmpsia (HILARY *et al.*, 2008).

Os complexos de HLA-E/G no trofoblasto podem contribuir para uma correta secreção de citocinas pelas células NK, pois estes interagem com os receptores CD94/NKG2A (receptor inibidor) e NKG2C (receptor ativador), favorecendo assim o equilíbrio da ativação e inibição das células NK (HILARY *et al.*, 2008; OBER, 1998).

O gene *HLA-E* têm um papel importante em transplantes (CUI *et al.*, 2010). A expressão aumentada do alelo *E*01:03* em indivíduos que sofreram transplantes de células tronco hematopoiéticas pode ser benéfica para sua sobrevivência, pois estes apresentaram níveis significativamente mais baixos da doença aguda contra o hospedeiro quando comparado ao alelo *E*01:01* (SULLIVAN *et al.*, 2008). O HLA-E parece ser capaz de produzir respostas inibitórias, por meio da interação com o receptor CD94/NKG2A, bem como ativação de respostas contra infecções virais, através de interações com os receptores ativadores das células NK e CTLs, sendo que o equilíbrio entre a ativação e a inibição pode ser alterado (SULLIVAN *et al.*, 2008). Qualquer imunoterapia específica destinada à modulação do *HLA-E* terá de levar em conta a complexa integração desses sinais, a fim de ser eficaz (CUI *et al.*, 2010).

3.4.4 Região reguladora de *HLA-E*

O promotor do gene *HLA-E* possui sequências CAAT box e TATA box, as quais são elementos envolvidos na ligação do complexo basal de iniciação da transcrição. A montante do promotor existem sequências que desempenham papel crucial na regulação da expressão. Estas sequências incluem o sítio alfa, o elemento intensificador A dividido em $\kappa\beta 1$ e $\kappa\beta 2$, elemento de resposta ao interferon (ISRE) e o módulo SXY (FIGURA 07). A aglomeração destes elementos sugere que eles poderiam atuar tanto de forma sinérgica como de forma aditiva (GOBIN e VAN DEN ELSEN, 2000).

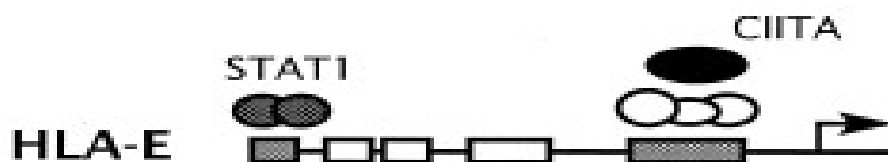


FIGURA 07 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROMOTOR DO GENE *HLA-E* (GOBIN e VAN DEN ELSEN, 2000)

O elemento intensificador A possui dois sítios de ligação ao NF- κ B (κ B1 e κ B2). Devido às pequenas variações nucleotídicas encontradas nestes sítios, quando comparadas à sequência consenso, o *HLA-E* não é induzido por membros da família NF- κ B (GOBIN e VAN DEN ELSEN, 2000).

O elemento de resposta estimulado pelo interferon (ISRE) apresenta um papel notório na regulação basal da transcrição (KIRISITIS *et al.*, 1992). Semelhante ao intensificador A, um número de ligantes ao ISRE pode ser observado. Estes incluem o IRF-1, IRF-2, ICSBP e ISGF3. O fator 1 regulador de interferon (IRF-1) atua como ativador da transcrição, enquanto o IRF-2 e ICSBP atuam como repressores da transcrição (GOBIN e VAN DEN ELSEN, 2000).

O IFN- γ (interferon gama) induz a expressão gênica através da via JAK/STAT de transdução de sinal.

O interferon liga-se aos receptores que usam vias de sinalização rápida e direta para efetuar mudanças na transcrição. A ligação do interferon a tais receptores ativa as tirosinas quinases associadas aos receptores da família das quinases Janus (JAKS), assim chamadas por terem dois domínios simétricos, assemelhando-se a figura de duas cabeças da mitologia romana, o Deus Janus. Essas quinases fosforilam proteínas citosólicas chamadas sinais tradutores e ativadores de transcrição (STAT). A fosforilação das proteínas STAT leva à sua heterodimerização. Este dímero pode se translocar até o núcleo e ativar os genes IRF-1 (ABBAS e LICHTMAN *et al.*, 2005). A molécula IRF-1 ativadora pode então se ligar na sequência ISRE e promover a ativação do gene *HLA-E*.

3.4.5 Polimorfismo de *HLA-E*

Ao contrário dos genes de MHC de classe *Ia*, o *HLA-E* é altamente conservado na evolução e o significado biológico de seu polimorfismo é incerto (CAROSELLA *et al.*, 2000). Atualmente, estão descritos na literatura 9 alelos de *HLA-E* (*E*01:01:01:01*, *E*01:01:01:02*, *E*01:01:01:03*, *E*01:03:01:01*, *E*01:03:01:02*, *E*01:03:02*, *E*01:03:03*, *E*01:03:04*, *E*01:04*), os quais codificam somente 3 produtos protéicos com diferentes sequências de aminoácidos, de acordo com os dados presentes na página eletrônica do Instituto de Pesquisa Anthony Nolan disponível em <<http://www.anthonynolan.org>>, até fevereiro de 2011.

O grau de polimorfismo do equivalente *HLA-E* (*MHC-E*) em todas as espécies de

primatas também é restrito, com geralmente apenas 1 ou 2 alelos presentes (SULLIVAN *et al.*, 2008). Curiosamente, os polimorfismos do *MHC-E* dentro de todas as espécies de primatas, estão fora da região de ligação com o peptídeo, talvez indicando que todas as moléculas de *MHC-E* são capazes de se ligar a peptídeos semelhantes (SULLIVAN *et al.*, 2008; EDING *et al.*, 1999). Além disso, o *HLA-E* é capaz de se ligar ao protótipo da sequência líder de *MHC* de classe I de murino (QDM), e o equivalente da molécula de *HLA-E* nos murinos (Qa-1b) pode também se ligar a peptídeos de sequência líder de *MHC* de classe I de humanos (JIANG *et al.*, 2010). Assim, o *HLA-E* e seus homólogos funcionais parecem ter evoluído numa modalidade comum de vinculação, que foi conservada ao longo da evolução (HU *et al.*, 2004).

Nos seres humanos existem três variações alélicas não sinônimas, que correspondem aos alelos *E*01:01*, *E*01:03* e *E*01:04* (ANTOUN *et al.*, 2008). O alelo *HLA-E* 01:01* nomeado de *HLA-ER*, apresenta, no éxon 3, o códon 107 que irá codificar um aminoácido arginina (AGG), o qual é integrante da cadeia pesada no domínio $\alpha 2$. O alelo *HLA-E* 01:03* que corresponde ao *HLA-EG*, têm no códon 107, uma trinca codificante para o aminoácido asparagina (GGG), sendo esta a única diferença entre estes dois alelos não sinônimos (MATTE *et al.*, 2000). Verifica-se que estes dois alelos têm diferentes níveis de expressão, sendo que as moléculas de *HLA-EG* têm concentração mais elevada na superfície celular quando comparadas com as moléculas de *HLA-ER* (PAQUAY *et al.*, 2009). A diferença na expressão de superfície dos dois alelos não reflete apenas na afinidade maior de *HLA-E107G* para os peptídeos, mas também a maior estabilidade do complexo na superfície celular (STRONG *et al.*, 2003). Estes dois alelos são encontrados com frequências semelhantes em diferentes populações, provavelmente em decorrência da seleção equilibrada (ANTOUN *et al.*, 2008).

O alelo *E*01:04* têm duas substituições nucleotídicas, a primeira está localizada no códon 107, o qual codifica uma glicina (GGG) ao invés de uma arginina (AGG). A segunda está no códon 157, polimorfismo este que distingue o alelo *HLA-E* 01:04* dos alelos *HLA-E*01:01* e *HLA-E*01:03*, por apresentar uma substituição sinônima AGA para GGA, ambas trincas codificantes para o aminoácido glicina (MATTE *et al.*, 2000). As diferenças alélicas podem ser observadas na TABELA 01.

TABELA 01 – DIFERENÇAS ALÉLICAS NO GENE *HLA-E*

| Alelos | Códons | Éxon 2 | | Éxon 3 | | | Éxon 4 |
|--------------------------|--------|-----------|-------------|-------------|------------|-------------|----------------|
| | | 77 C/T | 82 CG/GC | 107 A/G | 150 C/T | 157 A/G | 211 G/A |
| <i>E*01:01</i> | | AAC | CGC GGC | AGG | GCC | AGA | GCG |
| <i>E*01:03:01</i> | | AAC | CGG GGC | G GG | GCC | AGA | GCG |
| <i>E*01:03:02</i> | | AAT | CGC GGC | G GG | GCC | AGA | GCG |
| <i>E*01:03:03</i> | | AAT | CGC GGC | G GG | GCT | AGA | GCG |
| <i>E*01:03:04</i> | | AAT | CGC GGC | G GG | GCC | AGA | GCA |
| <i>E*01:04</i> | | *** | *** *** | G GG | GCC | G GA | GCG |

Há uma substituição sinônima no éxon 2, no códon 77, sendo bastante útil como marcador genético, a qual separa o alelo *E*01:03:01* dos demais *E*01:03:02*, *E*01:03:03* e *E*01:03:04* (GOMEZ-CASADO *et al.*, 1997). Estes últimos apresentam uma trinca AAT ao invés de AAC (ANTOUN *et al.*, 2008). No códon 150 presente no éxon 3, o alelo *E*01:03:03* apresenta uma trinca GCT, diferenciando-o dos demais alelos. Por sua vez no códon 211 do éxon 4, o alelo *E*01:03:04* apresenta uma trinca GCA ao invés de GCG.

3.4.6 Aspectos populacionais

As frequências alélicas do gene *HLA-E* apresentam variações entre os diferentes grupos étnicos.

Várias pesquisas contemplando os polimorfismos do *HLA-E* no grupo dos caucasóides foram realizadas. Dentre elas, um estudo feito na Dinamarca com uma amostra de 150 indivíduos caucasóides (STEFFENSEN *et al.*, 1998), constatou-se a presença de 3 alelos, *E*01:01*, *E*01:03:01* e *E*01:03:03*, com frequências de 56.7%, 9.6% e 33% respectivamente, como mostra a TABELA 02.

TABELA 02 – FREQUÊNCIA ALÉLICA DE *HLA-E* EM UMA AMOSTRA DE CAUCASÓIDES DINAMARQUESES ($n=150$)

| Alelo | Frequência alélica | % |
|-------------------|--------------------|---------|
| <i>E*01:01</i> | 170 | (56.7%) |
| <i>E*01:03:01</i> | 29 | (9.6%) |
| <i>E*01:03:03</i> | 101 | (33%) |
| <i>E*01:04</i> | 0 | (0.0%) |

FONTE: Modificado STEFFENSEN *et al.*, 1998.

Nos Estados Unidos, pesquisadores analisaram uma amostra composta de 54 indivíduos afroamericanos (MATTE *et al.*, 2000) e observaram-se a existência de 3 polimorfismos *E*01:01*, *E*01:03:01* e *E*01:03:03* com frequências alélicas de 89%, 8,84% e 2,16% respectivamente (TABELA 03). O alelo *E*01:04* não foi encontrado na amostra estudada, sendo considerado um alelo raro, relatado com maior frequência em populações espanholas e japonesa (GRIMSLEY *et al.*, 2002; GRIMSLEY e OBER, 1997). Algumas pesquisas ainda sugerem que o alelo *E*01:04* é um artefato de sequenciamento (ARNAIZ-VILLENA *et al.*, 2007) .

TABELA 03 – FREQUÊNCIA ALÉLICA DE *HLA-E* EM UMA AMOSTRA DE AFROAMERICANOS DOS ESTADOS UNIDOS ($n=54$ INDIVÍDUOS).

| Alelo | Frequência alélica ($n=54$) | % |
|-------------------|-------------------------------|---------|
| <i>E*01:01</i> | 96 | (89%) |
| <i>E*01:03:01</i> | 10 | (8,84%) |
| <i>E*01:03:03</i> | 02 | (2,16%) |

FONTE: MATTE *et al.*, 2000.

Recentemente um estudo analisou as frequências alélicas nas populações ameríndias do México (Mazatecas), Colômbia (Wayu) e Chile (Mapuches). *HLA-E*01:01* é o alelo mais frequente nas populações estudadas, exceto na Wayu onde o alelo mais comum é o *E*01:03:03*. Os Mazatecas e os Mapuches apresentam similar frequência

alélica do *HLA-E*, como mostra a TABELA 04 (ARNAIZ-VILLENA *et al.*, 2007).










TABELA 04 – FREQUÊNCIA ALÉLICA DE *HLA-E* NAS AMOSTRAS AMERÍNDIAS DO MÉXICO, COLÔMBIA E CHILE.

| Alelo | Mazatecas (n=86) | | Wayu (n=47) | | Mapuche (n=58) | |
|-------------------|------------------|-------|-------------|-------|----------------|-------|
| | México | % | Colômbia | % | Chile | % |
| <i>E*01:01</i> | 96 | 55.81 | 39 | 41.48 | 80 | 68.96 |
| <i>E*01:03:01</i> | 39 | 22.67 | 13 | 13.82 | 20 | 17.24 |
| <i>E*01:03:03</i> | 37 | 21.51 | 42 | 44.68 | 16 | 13.79 |

FONTE: Modificado ARNAIZ-VILLENA *et al.*, 2007.

A TABELA 05 mostra as diferentes frequências alélicas relatadas para vários países nos diferentes continentes.

TABELA 05 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE *HLA-E* EM DIFERENTES PAÍSES

| País | População | Alelo mais frequente | Alelo menos frequente | N |
|------------|--|----------------------|-------------------------|-----|
| USA |  Dakota | <i>E*01:01</i> 56% | <i>E*01:04</i> 0% | 38 |
| Colômbia |  Negróide | <i>E*01:01</i> 28% | <i>E*01:03:02</i> 1% | 38 |
| Chile |  Mapuche | <i>E*01:01</i> 75% | <i>E*01:03:02</i> 1,40% | 34 |
| México |  Mestiço | <i>E*01:01</i> 56% | <i>E*01:03</i> 1,30% | 70 |
| Índia |  NE | <i>E*01:01</i> 70% | <i>E*01:04</i> 0% | 120 |
| Inglaterra |  NE | <i>E*01:01</i> 29% | <i>E*01:04</i> 0% | 82 |
| Espanha |  NE | <i>E*01:01</i> 57% | <i>E*01:04</i> 2% | 60 |
| Japão |  NE | <i>E*01:01</i> 32% | <i>E*01:04</i> 3% | 50 |
| Korea |  NE | <i>E*01:01</i> 49% | <i>E*01:04</i> 0% | 486 |

NE – Não especificado; N – Número amostral

Fonte: Adaptado www.allelefreqencies.net

O alelo mais frequente em todas as populações presentes na tabela 05 foi o *E*01:01*, sendo que o alelo menos frequente na maioria das populações foi o *E*01:04*. Este alelo pode ser um artefato de sequenciamento, por isso em várias populações sua frequência é igual a zero.

A TABELA 06 mostra a distribuição dos SNPs em três diferentes grupos étnicos, caucasóides; afrocaribenhos e asiáticos. No SNP 1114 pode estar presente uma citocina ou guanina, caracterizando uma substituição sinônima, no códon 77 do éxon 2. O SNP contendo a base citocina, apresentou maior frequência em todas as populações analisadas. Os outros dois SNPs se localizam no éxon três, nas posições 1446 (códon 107) e 1596 (códon 157), onde a adenina na posição 1446 prevaleceu nas amostras e a arginina na posição 1596 teve 100% de frequências em todas as populações.

TABELA 06 – DISTRIBUIÇÃO DOS SNPs *DE HLA-E* EM TRÊS DIFERENTES GRUPOS ÉTNICOS: CAUCASÓIDE; AFROCARIBENHO E ASIÁTICO.

| Posição dos SNPs | Substituição amino ácidos | Frequências | | | |
|--------------------------------|---------------------------|-------------|-------|----------|-------|
| | | <i>n</i> | % | <i>n</i> | % |
| 1114C/T - Éxon 2 Códon 77 | Sinônimos | 197 | 64,8 | 107 | 35,2 |
| 1446 A/G - Éxon 3 Códon 107 | arginina, glicina | 180 | 59,21 | 124 | 40,79 |
| 1596 A/G - Éxon 3 Códon 157 | arginina, glicina | 304 | 100 | 0 | 0 |
| 1577 C/T - Éxon 3 Códon 150 | sinônimos | 283 | 93,09 | 21 | 6,91 |

A TABELA 07 mostra a distribuição dos genótipos para os SNPs das posições 1114 e 1446 de *HLA-E* em três diferentes grupos étnicos.

TABELA 07 – DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS PARA OS SNPs DAS POSIÇÕES 1114 E 1446 DE *HLA-E* EM TRÊS DIFERENTES GRUPOS ÉTNICOS

| SNP | ADP | | EC | | ACB | | AS | |
|-----------------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|
| | <i>n</i> | Freq. % | <i>n</i> | Freq. % | <i>n</i> | Freq. % | <i>n</i> | Freq. % |
| 1114 C/C | 66 | 43 | 105 | 47 | 38 | 63 | 39 | 75 |
| C/T | 65 | 42 | 88 | 39 | 16 | 26 | 11 | 21 |
| T/T | 21 | 13 | 30 | 13 | 6 | 10 | 2 | 4 |
| 1446 A/A | 56 | 37 | 78 | 35 | 19 | 31 | 20 | 39 |
| A/G | 68 | 45 | 95 | 42 | 26 | 43 | 19 | 36 |
| G/G | 28 | 18 | 50 | 22 | 15 | 25 | 13 | 25 |

Fonte: ANTOUN *et al.*, 2008.

ADP, Afro-descendentes do Paraná; EC, Euro-Caucasóides; ACB, Africo- Caribenhos; AS, Asiáticos

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AKIKO, I.; NORIKO, S.; KATSUHIKO, H. The involvement of HLA-E and -F in pregnancy. **The journal immunology**, v. 69, p. 101-113, 2005.

ALBERTS, B.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, T.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell. 4th edition**. New York: Garland Science Publishing. p. 1400, 2002.
Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>. Acesso em: 10 junho de 2009.

ALLELES FREQUENCY. Disponível < www.allelesfrequency.net>. Acesso em: 15 de agosto de 2010.

ANTHONY NOLAN RESEARCH INSTITUTE. **HLA Informatics Group**. Disponível em: <<http://www.anthonynolan.org.uk/HIG/index.html>>. Acesso em: 03 junho 2010.

ANTOUN, A.; JOBSON, S.; COOK, M.; MOSS, P.; BRIGGS, D. Ethnic Variability in Human Leukocyte Antigen – E haplotypes. **Tissue Antigens**, n.73, p. 39-45, 2008.

ARNAIZ-VILLENA, A.; VARGAS-ALARCON, G.; SERRANO-VELA, J.I.; REGUERA, R.; MARTINEZ-LASO, J.; SILVEIRA-REDONDO, C.; GRANADOS, J.; MOSCOSO, J. HLA-E polymorphism in Amerindians from Mexico (Mazatecans), Colombia (Wayu) e Chile (Mapuches): evolution of MHC-E gene. **Tissue Antigens**, n.69, p. 132-135, 2007.

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

BRAUD, V. M.; ALLAN, D. S.; CALLAGHAN, C. A.; SODERSTROM, K.; ANDREA, D.; OGG, G. S.; LAZETIC, S.; YOUNG, N. T.; BELL, J. I.; PHILLIPS, J. H. HLA-E binds to natural killer receptor CD94/NKG2A, B and C. **Nature**, n. 391, p. 795-799, 1998.

BRODSKY, F.M.; LEM, L.; BRESNAHAN, P.A.- Antigen processing and presentation. **Tissue Antigens**, n. 7, p. 20-32, 1996.

CAMPBELL, R. D.; RAGOISSIS, J.; TROWSDALE, J. - Map of the human MHC. ***Immunology Today***. 12: 445, 1991.

CAROSSELA, E. D.; PAUL, P.; MOREAU, P.; ROUAS, F.; HLA-G and HLA-E: fundamental and Pathophysiological aspects. ***Immunol Today***, n. 21, p. 532-534, 2000.

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

COUPEL, S.; MOREAU, A.; HAMIDOU, M.; HOREJSI, V.; SOULILLOU, J.; CHARREAU, B. Expression and release of soluble HLA-E is an immunoregulatory feature of endothelial cell activation. ***Blood***, n.7, v.109, p. 2806-2814, 2007.

CUI, C-H.; MIYOSHI, S.; TSUJI, H.; MAKINO, H.; KANZAKI, S.; KAMI, D.; TERAJ, M.; SUZUKI, H.; UMEZAWA, A. Dystrophin conferral using human endothelium expressing HLA-E in the non-immunosuppressive murine model of Duchenne muscular dystrophy. ***Human Molecular Genetics***, n. 8, p. 1-10, 2010.

DAUSSET, J. Iso-leuco-anticorps. ***Acta haematologica***, WARSZAMA, v.20, p. 156-166, 1958.

EDING, J. H., G. LAVAL. Measuring genetic uniqueness in livestock. In: Genebanks and the conservation of farm animal genetic resources. **Lelystad: Ed. J.K. Oldenbroek**. ID.DLO, p. 33-58, 1999.

GERAGHTY, D.E.; KOLLER, B.H.; ORR, H.T. A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA***, v. 84, p. 9145-9149, 1987.

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

GOMEZ-CASADO, E.; MARTINEZ-LASO, J.; VAGAS, A.G. Description of new HLA-E (*E*01:03:01*) allele and its frequency in the Spanish population. ***Human Immunol***, n. 54, p. 69-73, 1997.

GRIMSLEY, C.; OBER, C. Population Genetic Studies of HLA-E. ***Human Immunology***, n. 52, p. 33-40, 1997.

GRIMSLEY, C.; GASSNER, C.; SAGESHIMA, N.; NOSE, Y.; HATAKE, K.; GERAGHTY, D, E.; ISHITANI. Definitive high resolution typing of HLA-E allelic polymorphisms: Identifying potential errors in existing allele data. **Tissue Antigens**, v. 60, p. 206-212, 2002.

HEDRICK, P. – Evolutionary genomics: Foxy MHC selection story: **Nature**, v. 93, p. 237-238, 2004.

HILARY, L.; LUCY, C.; CRAIG, S.C.; LAUREN, K.E.; TRAVIS, B.; KATE, N, H.; JIE, L.; HUGH, H, R.; ANDREW, G, B.; JAMIE, R.; Subtle Changes in Peptide Conformation Profoundly Affect Recognition of the Non-Classical MHC Class I Molecule HLA-E by the CD94-NKG2 Natural Killer Cell Receptors: **Science Direct**, v. 377, p. 1297-1303, 2008.

HU, D.; IKIZAWZ, K.; LU, L.; SANCHIRICO, M. E.; SHINOHARA, M. L.; CANTOR, H. Analysis of regulatory CD8 T cells in Qa -1 deficient mice. **Nat. Immunol**, n. 5, p. 516-523, 2004.

HUGHES, A.L.; NEI, M. Pattern of nucleotide at the major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection: **Nature**, v. 335, p. 167-170, 1988.

INTERNACIONAL HISTOCOMPATIBILITY WORKING GROUP. Disponível em <www.ihwg.org>. Acesso em: 10 de Dezembro de 2010.

ISHITANI, A; SAGESHIMA, N; HATAKE, K. The involvement of HLA-E and -F in pregnancy. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 5, p. 634-645, 2006.

ISHITANI, A.; SAGESHIMA, N.; LEE, NI.; DOROFEEVA, N.; HATAKE, K.; MARQUARDT, H.; GERAGHTY, D.E.; Protein expression and peptide binding suggest unique and interacting functional roles for HLA-E, F e G in maternal - placental immune recognition. **J Immunol**, n.171, p. 1376-1384, 2003.

JIANG, H.; CANFIELD, M. S.; GALLAGHER, P, M.; JIANG, H.H.; JIANG, Y.; ZHENG, Z.; CHESS, L.; HLA-E restricted regulatory CD8+ T cells are involved in development and control of human autoimmune type 1 diabetes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, p. 3432-3442, 2010.

JONES, E. Y. MHC class I and class II structures: **Curr Opin Immunol**, v. 9:75-9, 1997.

KASAHARA, M.; KANDIL,E.; SATER-CID,L.; FLAJNIK, F.M. – Origin and evolution of the class I gene family: why are some of the mammalian class I genes encoded outside the major hiscocompatibility complex ? **Science Direct**, v.147, p. 278-285, 1997.

KIRISITIS, M.J.; KUNS, H.W.; GILL, T.J. – Analysis of sequence similarities of classical and non-classical class genes I: **Oxford University Press**, v.01, p. 1021-1030, 1992.

KLEIN J., SATO, A.; The HLA system. Second of two parts. *Advances in immunology*. **New England Journal of Medicine**, Oxford, v.343, n.10, p. 782-786, 2000.

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

LE BOUTEILLER, P.; LENFANT, F. Antigen-presenting function(s) of the non-classical HLA-E, -F and -G class I molecules: the beginning of a story. **Res Immunol**, p. 147-301, 1996.

LEE, N.; GOODLETT, D.R.; ISHITANI, A.; MARQUARDT, H.; GERAGHTY.; HLA-E surface expression depends on binding of TAP-dependent peptides derived from certain HLA class I signal sequences. **J Immunol**, n.56, p. 1150-1155, 1998.

MATSUZAKA, Y., MAKINO, S., NAKAGIMA, K., TOMIZAWA, M., OKA, A., BAHRAM, S., KULSKI, J.K., TAMIYA, G., INOKO, H. New polymorphic microsatellite markers in the human MHC class III region. **Tissue Antigens** v. 57, p. 397-404, 2001.

MATTE, C.; LACAILLE, J.; ZIJENAH, L.; WARD, B.; ROGER, M.; HLA-G and HLA-E Polymorphisms in an African population. **Hum. Immunol**, v.61, p. 1150-1156, 2000.

MILLER, J.D.; WEBER, D.A.; IBEGBU, C.; POHL, J.; ALTMAN , J.D.; JENSEN, P.E.; Analysis of HLA-E peptide-binding specificity and contact residues in bound peptide for recognition by CD94/NKG2. **Journal Immunol**, n. 171, p. 1369-1375, 2003.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível <www.ncbi.nlm.nih.gov/mhc>. Acesso em: 25/08/2010.

OBER, C.; HLA and pregnancy : the paradox of fetal allograft. **Human Genetic**, n. 62, 1998.

PAQUAY, M. M.; SCHELLEKENS, J.; TILANUS, M. G. J. A high-throughput Taqman approach for the discrimination of HLA-e alleles. **Tissue Antigens**, n. 74, p. 514-519, 2009.

PIETRA, GABRIELLA., ROMAGNANI,C.; MANZINI, CLAUDIA.; MORETTA, L.; MINGARI M.C. The Emerging Role of HLA-E Restricted CD8+ T Lymphocytes in the Adaptive

Immune Response to Pathogens and Tumors. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Genova, v.10, n.4, p. 207-221, 2010.

POOK, M.A.; WOODCOCK, V.; TASSABEHJI, M.; CAMPBELL, R.D.; SUMMERS, C.W.; TAYLOR, M.; STACHAN, T.; Characterization of an expressible nonclassical class I hla gene. **Human Immunol**, n. 32, 1991.

ROOD, V.; LEEUWEN, V. A. Leukocyte grouping. A method and its application. **Journal of Clinical Investigation** v.42, p. 1382-1390, 1963.

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

SHUM, P. B.; FLODIN, R. L.; MUIR, G. D.; RAJALINGAM, R.; CLEAND, S.; GUETHLEIN, A. L.; UHRBERG, M.; PARHAM, P. Conservation and Variation in Human and Common Chimpanzee CD94 and NKG2 Genes. **The Journal of Immunology**, v.168, p. 240-252, 2002.

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

SPENCER H.G, MARKS RW. The Maintenance of Single-Locus Polymorphism. I. Numerical Studies of a Viability Selection Model. **Genetics**. p. 605–613, 1988.

STEFFENSEN, R.; CHIRSTIANSEN, O. B.; BENNETT, E.P.; JERSILD, C. HLA-E polymorphisms in patients with recurrent spontaneous abortion. **Tissue antigens**, n. 52, p. 569-572, 1998.

STRONG, K, R.; HOLMES, A, M.; LI, P.; BRAUN, L.; LEE,N.; GERAGHTY, D. *HLA-E* Allelic Variants. Correlating differential expression peptide affinities, crystal structures, and thermal stabilities. **The Journal of Biological Chemistry**, n.7, p. 5082-5090, 2003.

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 Immunol**, v. 27, n. 9, p. 413-420, 2008.

TIWARI, J.L.; TERASAKI, P.I. – **HLA and disease association**. 1.ed. New York, Springer Verlag, 1985.

TOMASEC, P.; BRAUD, M. V.; RICKARDS, C.; POWELL, B. M.; MCSHARRY, P. B.; GADOLA, S.; CERUNDOLO, V.; BORYSIEWICZ, K. L.; MCMICHAEL, A. J.; WILKINSON,

G. W. G. Surface Expression of HLA-E, an Inhibitor of Natural killer Cells, Enhanced by Human Cytomegalovirus gpUL40. **Science**, v. 287, n.11, 2000.

TOYAMA-SORIMACHI, N.; TAGUCHI, Y.; YAGITA, H.; KITAMURA, F.; KAWASAKI, A.; KOYASU, S.; KARASUYAMA. Mouse CD94 Participates in Qa -1 –Mediated Self Recognition by NK cells and Delivers Inhibitory Signals Independent of Ly-49. **The Journal immunology**, v.166, p. 2771-3779, 2001.

TROWSDALE, J.; CAMPBELL, R.D.-The 12th International MHC map.- In: Charron, D. (ed)-Genetic diversity of HLA Funcional and Medical Implication – **Medical and Scientific International Publisher**, Paris, v.1, p. 499-504, 1997.

TROWSDALE, J.; CAMPBELL, R.D. - Map of the human MHC. **Immunol. Today 14**: p. 349-352, 1993.

ULBRECHT, M.; HONKA, T.; PERSON, S.; JONHSON, J. P.; WEISS, E. H.; The HLA-E gene encodes two differentially regulated transcripts and cell surface protein. **Journal Immunol**, n. 149, p. 2945-2953, 1992.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO. Disponível <<http://www.ufpe.br/biolmol>>. Acesso em: 15 de agosto de 2010.

WITZELL, H.; MADSEN, T.; WESTERDAHL, H.; SHINE, R.; SCHANTZ, V. T. – MHC variation in birds and reptiles, **Biomedical and Life Sciences**, v.104, n.3, 2006.

YUHKI, N.; BECK, T.; STEPHENS, M. R.; NISHIGAKI, Y.; NEWMANN, K.. O'BRIEN, J.S. – Comparative Genome Organization of Human, Murine, and Feline MHC Class II Region. **Genome Research**, p. 1169-1179, 2003.

ARTIGO

POLIMORFISMOS DO GENE *HLA-E* EM UMA AMOSTRA DE AFROPARANAENSE DOADORES DE MEDULA ÓSSEA

Luana Carvalho dos Santos¹, Maria da Graça Bicalho¹, Luciane Viater Tureck¹, João Carlos M. Magalhães¹, Joandrei dos Santos Silva², Pryscilla Fanini Wowk², Valéria M. Sperandio Roxo¹.

¹Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná

²Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade da Universidade Federal do Paraná

RESUMO

O *HLA-E* é um gene do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I não clássico, o qual apresenta limitado polimorfismo e baixos níveis de expressão tecidual. Atualmente estão descritos na literatura nove alelos, sendo que somente três produtos protéicos com diferentes sequências de aminoácidos são codificados. Suas variantes polimórficas estão frequentemente associadas a vários eventos, como por exemplo, defesa do organismo contra infecções virais e bacterianas, abortamento recorrente, transplantes de células tronco-hematopoiéticas e órgãos sólidos. As moléculas de *HLA-E* podem interagir tanto com os receptores da imunidade inata quanto adaptativa, promovendo assim a inibição das células NK através de seus receptores CD94/NKG2A ou a ativação das células TCD8⁺. No presente estudo foram investigados pela técnica de sequenciamento de DNA os polimorfismos do gene *HLA-E*, bem como suas frequências alélicas, genotípicas, haplotípicas e desequilíbrio de ligação, em uma amostra composta de 152 (cento e cinquenta e dois) indivíduos afroparanaenses. Observou-se que o alelo com maior frequência na amostra analisada foi o *E*01:01* (59.21%). Por sua vez o alelo *E*01:04* apresentou frequência igual a zero. Sendo assim, não foi possível confirmar sua existência, corroborando a hipótese que este alelo possa ser um artefato de

sequenciamento e sua presença na lista de alelos conhecidos terá que ser questionado. As frequências genotípicas e alélicas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg e foram achados cinco haplótipos mais frequentes na população. Foram realizadas comparações da amostra analisada com diferentes populações mundiais.

Introdução

O gene não clássico *HLA-E* se localiza no braço curto do cromossomo 6 (seis), mais especificadamente na região 6p21.3, entre os genes *HLA-C* e *-A* (1). Ao contrário dos genes de MHC de classe *Ia*, o *HLA-E* é altamente conservado na evolução e o significado biológico de seu polimorfismo é incerto (2). Atualmente estão descritos na literatura nove alelos de *HLA-E* (*E*01:01:01:01*, *E*01:01:01:02*, *E*01:01:01:03*, *E*01:03:01:01*, *E*01:03:01:02*, *E*01:03:02*, *E*01:03:03*, *E*01:03:04*, *E*01:04*), os quais codificam somente 3 produtos protéicos com diferentes sequências de aminoácidos (3). Existem três variações alélicas não sinônimas, que correspondem aos alelos *E*01:01*, *E*01:03* e *E*01:04* (Tabela 01). O alelo *HLA-E* 01:01*, nomeado de HLA-ER, apresenta no éxon 3 o códon 107 que irá codificar um aminoácido arginina (AGG), o qual é integrante da cadeia pesada no domínio $\alpha 2$ (4). O alelo *HLA-E* 01:03*, que corresponde ao HLA-EG, têm no códon 107 uma trinca codificante para o aminoácido asparagina (GGG), sendo esta a única diferença entre estes dois alelos não sinônimos (5). Verifica-se que estes dois alelos têm diferentes níveis de expressão, sendo que as moléculas de HLA-EG têm concentração mais elevada na superfície celular quando comparadas com as moléculas de HLA-ER (6). A diferença na expressão na superfície dos dois alelos não reflete apenas na afinidade maior de HLA-E107G para os peptídeos, mas também a maior estabilidade do complexo na superfície celular. O alelo *E*01:04* têm duas substituições nucleotídicas, a primeira está localizada no códon 107, o qual codifica uma glicina (GGA) ao invés de uma arginina (AGG). A segunda está no códon 157, polimorfismo este que o distingue dos alelos *HLA-E*01:01* e *HLA-E*01:03*, por apresentar uma substituição sinônima AGA para GGA, ambas trincas codificantes para o aminoácido glicina (7).

TABELA 01 – DIFERENÇAS ALÉLICAS NO GENE *HLA-E*

| Alelos | Códons | Éxon 2 | | Éxon 3 | | Éxon 4 | |
|--------------------|--------|-----------|-------------|-------------|------------|-------------|------------|
| | | 77 C/T | 82 CG/GC | 107 A/G | 150 C/T | 157 A/G | 211 G/A |
| <i>E*01:01</i> | | AAC | CGC GGC | AGG | GCC | AGA | GCG |
| <i>E* 01:03:01</i> | | AAC | CGG GGC | G GG | GCC | AGA | GCG |
| <i>E*01:03:02</i> | | AAT | CGC GGC | G GG | GCC | AGA | GCG |
| <i>E*01:03:03</i> | | AAT | CGC GGC | G GG | GCT | AGA | GCG |
| <i>E*01:03:04</i> | | AAT | CGC GGC | G GG | GCC | AGA | GCA |
| <i>E*01:04</i> | | *** | *** *** | G GG | GCC | G GA | GCG |

A molécula de HLA-E apresenta menor variação na sua sequência de aminoácidos quando comparada a outras moléculas de HLA de classe I (9). O único aminoácido que difere entre os dois alelos não sinônimos de *HLA-E* (*E*01:01* e *E*01:03*), está localizado no códon 107, que corresponde ao domínio $\alpha 2$ da cadeia pesada, onde uma arginina (*E*01:01*) é substituída por uma glicina (*E*01:03*) (Figura 01). Para ocorrer a estabilização da molécula na superfície celular é requerida a disponibilidade de peptídeos derivados da sequência líder de várias moléculas HLA de classe I clássicas e não clássicas, incluindo, HLA-A, HLA-B, HLA-C e HLA-G (10). Embora a molécula HLA-E tenha sido descrita originalmente como ligante de apenas peptídeos de sequências líderes de HLA de classe I, algumas pesquisas sugerem que moléculas de HLA-E podem também se ligar a peptídeos virais, bem como bacterianos (11). A molécula de HLA-E tem sido identificada como ligante para os receptores CD94/NKG2A e CD94/NKG2C expressos em células NK, as quais fazem parte da imunidade inata (12). Peptídeos de sequência líder oriundas das moléculas de HLA-C ligam-se a molécula de HLA-E que interage com o receptor inibitório CD94/NKG2A presente na célula NK, resultando na inibição da lise por estas células (13). Por outro lado, quando o peptídeo sinal oriundo da molécula de HLA-G, liga-se na molécula de HLA-E poderá ocorrer interação tanto com o receptor inibitório CD94/NKG2A, quanto com o receptor ativador CD94/NKG2C, promovendo a inibição ou ativação das

células NK (14). Além de interagir com os receptores de células que atuam na imunidade inata, recentes estudos comprovam que a molécula de HLA-E também pode interagir com células que atuam no sistema imunológico adaptativo, como o linfócito TCD8⁺ (15). O exemplo mais caracterizado é a ligação que o HLA-E forma com o peptídeo gpVL40 do citomegalovírus (16). Este complexo pode interagir com os receptores TCR das células TCD8⁺ e ativar a lise de células infectadas, oferecendo assim particular relevância nas defesas imunitárias contra o HCMV (citomegalovírus humano) (17).

O presente estudo teve por objetivo analisar a variabilidade genética dos éxons 2 e 3 do gene *HLA-E* em uma amostra de afrodescendentes do estado do Paraná, Brasil. Para tanto, foi utilizada a técnica de sequenciamento de DNA. O trabalho proposto contribuirá para a caracterização da população afroparanaense para o gene *HLA-E* e servirá de base para posteriores estudos de associação que se realizarem nesta área

Materiais e Métodos

Caracterização da amostra

A amostra foi constituída de 152 (cento e cinqüenta e dois) indivíduos afrodescendentes do Estado do Paraná/Brasil, os quais se autodenominaram neste grupo étnico. Estes indivíduos são potenciais doadores de medula óssea, devidamente cadastrados no banco de dados do Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade da Universidade Federal do Paraná.

Sequenciamento dos éxons inteiros

A extração de DNA das amostras foi realizada através do método *salting-out* (18). Foi realizado posteriormente o cálculo da concentração de DNA através do equipamento *Nanodrop*. Após ser feita a diluição das amostras foi realizada a amplificação dos éxons 2 e 3 de *HLA-E* pela metodologia de PCR, utilizando para isso oligonucleotídeos iniciadores para a fita forward (5'GGGGTCGGGATGGAAACGGC 3') e para a fita reverse (5'GGTTCCGCAGCCTTGGGGTGA3') do éxon 2. Para o éxon 3 os oligonucleotídeos iniciadores foram: forward (5'CGGAACCCGCCAGACCCTA3') e reverse (5'TGAGGTCTGTCAGCTGTGGG3'). A PCR foi realizada de acordo com as seguintes condições: volume final de 50µl contendo: 5 µL PCR buffer, 1.3 µL MgCl₂, 1µL de cada dNTPs [10µL], 0.1 µL de cada primer [50 picomoles], 2 unidade de Taq DNA polimerase

Platinum Invitrogen e 2 µL DNA genômico [50 picomoles], q.s.p de água Mili-Q. O ciclo de desnaturação inicial foi de 94°C por 3 minutos seguidos de 35 ciclos de: 94°C por 30 segundos, 68°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos. O alongamento final foi de 72°C por 4 minutos (Termociclador GeneAmp PCR System 9700 (P.E.)). Foi realizado o procedimento de purificação com acetato de amônio e etanol, posteriormente foi feita a purificação com as enzimas EXO-SAP. Em seguida, os éxons inteiros foram submetidos à reação de sequenciamento (cada fragmento em um tubo separado) com o Kit *ABI PRISM® BIGDYE®*. A precipitação foi realizada com acetato de sódio e etanol absoluto. Posteriormente foi utilizada a formamida para desnaturar as fitas de DNA.

Análise estatística

Durante as atribuições e determinações alélicas procuraram-se novas formas de variantes, porém não foram encontrados novos SNPs nos éxons estudados. Logo, não foram achados alelos não descritos na literatura.

As frequências alélicas, genotípicas, bem como o equilíbrio de Hardy-Weinberg foram obtidos através do programa computacional GENEPOP. Por sua vez, as frequências haplotípicas foram determinadas utilizando o programa ARLEQUIN versão 3.1, através do método da máxima verossimilhança, que usa o algoritmo da maximização da expectativa (EM) (19). Os cálculos da similaridade genética da população afroparanaense com outras populações de diferentes etnias foram realizados através do programa *Biostat* versão 5.0 e da análise de variância molecular (AMOVA), estimando também os valores de FST.

Resultados e Discussão

Frequências dos SNPs

As frequências dos SNPs localizados nos éxons 2 e 3 do gene *HLA-E* foram devidamente analisadas (TABELA 02). O primeiro SNP está no éxon 2, no códon 77, onde o alelo *E*01:03:01* têm uma citosina nesta posição e os demais alelos *E*01:03:02*; *E*01:03:03* e *E*01:03:04* apresentam uma timina. O segundo SNP está no códon 107, no éxon 3, onde pode estar presente uma adenina ou guanina. Este SNP é fundamental para diferenciar os alelos *E*01:01* e *E*01:03*. O terceiro SNP está presente no códon 157, no mesmo éxon, servindo para diferenciar os alelos *E*01:03* e *E*01:04*. Por sua vez, no códon 150, no éxon 3, há um SNP que auxilia na diferenciação do alelo *E*01:03:03*, pois apresenta

uma timina ao invés de uma citosina.

TABELA 02 - FREQUÊNCIA DOS SNPs PRESENTES NOS ÉXONS 2 E 3 DO *GENE HLA-E* NA AMOSTRA AFROPARANAENSE

| Posição dos SNPs | Substituição amino ácidos | Frequências | | | |
|--------------------------------|---------------------------|-------------|-------|----------|-------|
| | | <i>n</i> | % | <i>n</i> | % |
| 1114C/T - Éxon 2 Códon 77 | Sinônimos | 197 | 64,8 | 107 | 35,2 |
| 1446 A/G - Éxon 3 Códon 107 | arginina, glicina | 180 | 59,21 | 124 | 40,79 |
| 1596 A/G - Éxon 3 Códon 157 | arginina, glicina | 304 | 100 | 0 | 0 |
| 1577 C/T - Éxon 3 Códon 150 | sinônimos | 283 | 93,09 | 21 | 6,91 |

As frequências genotípicas encontrados nas posições 1114 e 1446, dos éxons 2 e 3, respectivamente, foram comparadas entre a amostra analisada (afroparanaense) com outras três populações: eurocaucasóide, afrocaribenha e asiática, utilizando para isso o programa *BioStat* versão 5.0, o qual calcula os dados utilizando uma tabela de contingência (TABELA 03) (20). Observou-se que as frequências dos SNPs não diferiram significativamente entre a população afroparanaense e as populações eurocaucasóide e afrocaribenha, com o $P > 0.05$, corroborando assim a igualdade estatística entre esses grupos populacionais. Por sua vez, houve diferença significativa entre a população asiática, onde o valor de $P = 0.040$, demonstrando que ela contribuiu muito pouco para a formação desta população.

TABELA 03 – COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DOS SNPs ENTRE QUATRO AMOSTRAS POPULACIONAIS: AFROPARANAENSE, EUROCAUCASÓIDE, AFROCARIBENHA E ASIÁTICA

| SNP | ADP | | EC | | ACB | | AS | |
|-----------------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|
| | <i>n</i> | Freq. % | <i>n</i> | Freq. % | <i>n</i> | Freq. % | <i>n</i> | Freq. % |
| 1114 C/C | 66 | 43 | 105 | 47 | 38 | 63 | 39 | 75 |
| C/T | 65 | 42 | 88 | 39 | 16 | 26 | 11 | 21 |
| T/T | 21 | 13 | 30 | 13 | 6 | 10 | 2 | 4 |
| 1446 A/A | 56 | 37 | 78 | 35 | 19 | 31 | 20 | 39 |
| A/G | 68 | 45 | 95 | 42 | 26 | 43 | 19 | 36 |
| G/G | 28 | 18 | 50 | 22 | 15 | 25 | 13 | 25 |

Fonte: Modificado ANTOUN *et al.*, 2008

AP, afroparanaense; EC, eurocaucasóide; ACB, afrocaribenho; IA, asiática

Diferença estatística entre AP e EC, $\chi^2 = 1.395$, $P=0.9249$

Diferença estatística entre AP e ACB, $\chi^2 = 8.149$, $P=0.1482$

Diferença estatística entre AP e IA, $\chi^2 = 17.251$, $P=0.0040$

Frequências alélicas

As frequências alélicas encontradas na amostra populacional estudada estão dispostas na TABELA 04.

TABELA 04 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS PARA O GENE *HLA-E*

| Alelos | <i>n</i> = 304 | % |
|------------------------------|----------------|------|
| <i>E*01:01</i> | 180 | 59.1 |
| <i>E*01:01:03</i> | 38 | 12.5 |
| <i>E*01:03:02/E*01:03:04</i> | 76 | 25 |
| <i>E*01:03:03</i> | 10 | 3.4 |
| <i>E*01:04</i> | 0 | 0 |

Constata-se que o alelo que apresentou maior frequência na amostra estudada foi

o *E*01:01*, com 59.10%. No grupo alélico *E*01:03*, a frequência do *E*01:03:01* foi de 12.5%. Não foi possível diferenciar os alelos *E*01:03:02* e *E*01:03:04* devido à ambiguidade da tipagem e por isso é representado apenas um valor de frequência para ambos os alelos (25.00%). Por sua vez, o alelo *E*01:03:03* apresentou a menor frequência 3.40%. Já o alelo *E*01:04* não foi encontrado na amostra analisada, portanto apresenta frequência igual a zero.

Foi comparada a similaridade das frequências dos alelos *E*01:01*; *E*01:03:01* e *E*01:03:03* na amostra analisada (afroparanaense) com outras duas populações: caucasóides da Dinamarca e afroamericana dos Estados Unidos (TABELA 05) (21). Verificou-se que a população caucasóide não apresentou igualdade estatística nas suas frequências alélicas quando comparada com a população afroparanaense, onde $P < 0.0001$. Já as frequências alélicas da população afroamericana são compatíveis com a população afroparanaense, caracterizando, assim, igualdade estatística entre essas duas amostras populacionais.

TABELA 05 – COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS ENTRE TRÊS POPULAÇÕES DIFERENTES: AFROPARANENSE, CAUCASÓIDE DA DINAMARCA E AFROMERICANA DOS ESTADOS UNIDOS

| Alelo | Pop. AP | | Pop. CAD | | Pop. AA | |
|--------------------------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|
| | <i>n</i> | Freq. % | <i>n</i> | Freq. % | <i>n</i> | Freq. % |
| <i>E*01:01</i> | 180 | 79 | 170 | 56 | 96 | 89 |
| <i>E*01:03:01</i> | 38 | 16 | 29 | 09 | 10 | 8,84 |
| <i>E*01:03:03</i> | 10 | 4 | 101 | 35 | 02 | 2,16 |

Fonte: Modificado STEFFENSEN *et al.*, 1998; MATTE *et al.*, 2000.

AP, afroparanaense; CAD, caucasóide – Dinamarca ; AA, afroamericana

Diferença estatística entre AP e CA, $\chi^2 = 67.5316$, $P < 0.0001$

Diferença estatística entre AP e AA, $\chi^2 = 5.014$, $P = 0.0815$

Foi analisada também a semelhança entre as frequências alélicas obtidas da amostra analisada com três populações diferentes ameríndias do México, Colômbia e Chile (TABELA 06) (22). Espera-se que a amostra analisada possua um componente genético dos ameríndios brasileiros, haja vista a notória miscigenação que ocorreu no início do século XVI. Constatou-se que as populações em questão apresentam diferenças significativas, onde o valor de P foi menor que 0.05. Dessa forma não se aceita a hipótese da similaridade das frequências alélicas entre estas amostras. Este resultado,

provavelmente é decorrente das amostras de ameríndios terem origem em regiões da América Norte, como o México e diferentes regiões da América do Sul, não tendo relação com os ameríndios brasileiros.

TABELA 06 – COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS ENTRE A AMOSTRA AFROPARANAENSE COM TRÊS POPULAÇÕES AMERÍNDIAS DO MÉXICO, COLÔMBIA E CHILE.

| Alelo | Pop. AP | | Pop. MAZ | | Pop. WA | | Pop. MAP | |
|-------------------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|
| | <i>n</i> | Freq. % | <i>n</i> | Freq. % | <i>n</i> | Freq. % | <i>n</i> | Freq. % |
| E*01:01 | 180 | 79 | 96 | 56 | 39 | 42 | 80 | 69 |
| E*01:03:01 | 38 | 16 | 39 | 22 | 13 | 14 | 20 | 17 |
| E*01:03:03 | 10 | 04 | 37 | 21 | 42 | 45 | 16 | 14 |

Fonte: Modificado ARNAIZ-VILLENA *et al.*, 2007.

AP, Afroparanaense; MAZ, mazatecas; WA, wayu; MAP, mapuche.

Diferença estatística entre AP e MAZ, $\chi^2 = 33.914$, $P < 0.0001$

Diferença estatística entre AP e WA, $\chi^2 = 80.990$, $P < 0.0001$

Diferença estatística entre AP e MAP, $\chi^2 = 7.109$, $P = 0.0286$

Frequências genotípicas e o equilíbrio de Hardy-Weinberg

As frequências genotípicas, o equilíbrio de H-W e o valor de *P*, para os genótipos do *HLA-E*, são mostrados na TABELA 07.

TABELA 07 – FREQUÊNCIAS GENÓTIPICAS PARA O GENE *HLA-E*

| Genótipos | <i>n</i> | % |
|----------------------------------|----------|--------|
| <i>E*01:01/01:01</i> | 56 | 36.842 |
| <i>E*01:01/01:03:01</i> | 26 | 17.105 |
| <i>E*01:01/01:03:03</i> | 0 | 0 |
| <i>E*01:01/01:03:02*04</i> | 42 | 27.631 |
| <i>E*01:03:01/01:03:01</i> | 5 | 3.289 |
| <i>E*01:03:01/01:03:03</i> | 0 | 0 |
| <i>E*01:03:01/01:03:02*04</i> | 12 | 7.8947 |
| <i>E*01:03:02*04/01:03:02*04</i> | 8 | 5.263 |
| <i>E*01:03:02*04/01:03:03</i> | 3 | 1.973 |
| <i>E*01:03:03/01:03:03</i> | 0 | 0 |

$P = 0.3389$ $S = 0.0020$

Verificou-se que as frequências genotípicas estão de acordo com a hipótese do

equilíbrio de Hardy-Weinberg, com $P=0,3389$. Os genótipos que apresentaram maior frequência na amostra analisada foram o $E^*01:01/01:03$, com 44.736 % e $E^*01:01/01:01$ com 36.842% . Por sua vez três genótipos apresentaram frequência igual à zero: $E^*01:01/01:03:03$; $E^*01:03:01/01:03:03$; $E^*01:03:03/01:03:03$, haja vista que a frequência do alelo $E^*01:03:03$ foi baixa, menos de 10%.

Compararam-se as frequências genotípicas ($E^*01:01/01:01$.; $E^*01:01/01:03$.; $E^*01:03/01:03$) da amostra estudada afroparanaense com outras três populações: afroamericana dos Estados Unidos, hispânica e chinesa (TABELA 08) (23). Foi observado que não houve diferença estatística entre as populações afroparanaense, afroamericana e hispânica. Por sua vez, houve significância dos resultados entre a população chinesa, onde o $P<0.0001$, caracterizando assim, desigualdade estatística entre as frequências genotípicas da amostra estudada com a população chinesa. Este resultado provavelmente deve-se ao fato de que a população chinesa não participou da colonização brasileira no início do século XVI, não contribuindo, dessa forma, para a diversidade genética proveniente da miscigenação brasileira.

TABELA 08 – COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS ENTRE QUATRO POPULAÇÕES DIFERENTES: AFROPARANAENSE, AFROAMERICANA DOS ESTADOS UNIDOS, CAUCASÓIDE HISPÂNICA E CHINESA

| Genótipo | Pop. AP | | Pop. AA | | Pop. HI | | Pop. CH | |
|------------------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|
| | <i>n</i> | Freq. % | <i>n</i> | Freq. % | <i>n</i> | Freq. % | <i>n</i> | Freq. % |
| $E^*01:01/01:01$ | 56 | 37 | 24 | 36 | 14 | 30 | 01 | 4 |
| $E^*01:01/01:03$ | 68 | 45 | 30 | 45 | 26 | 54 | 10 | 40 |
| $E^*01:03/01:03$ | 28 | 18 | 13 | 19 | 08 | 16 | 14 | 56 |

Fonte: GRIMSLEY e OBER, 1997

AP, afroparanaense.; AA, afroamericana.; HI, hispânica; CH, chinesa.

Diferença estatística entre AP e AA, $\chi^2 = 0.037$, $P=0.9816$

Diferença estatística entre AP e HI, $\chi^2 = 1.367$, $P=0.50491$

Diferença estatística entre AP e CH, $\chi^2 = 20.077$, $P<0.0001$

Frequências haplotípicas

A TABELA 09 apresenta os haplótipos que obtiveram frequência acima de 0.04 %. Os haplótipos com frequência menor que 0.04% foram desconsiderados, pois neste caso o erro estatístico torna-se muito grande, sendo que a possibilidade desses haplótipos serem

verdadeiros seria baixo. O pequeno número de amostras pode influenciar na apresentação de haplótipos duvidosos.

TABELA 09 – HAPLÓTIPOS MAIS FREQUENTES OBSERVADOS NA AMOSTRA AFROPARANAENSE

| n° haplótipos | n obs. | freqüência | Posições | 1114 | 1446 | 1577 | |
|---------------|--------|------------|----------|------|------|----------------------------|--|
| 1 | 92 | 30,26 | C | A | C | <i>E*01:01/01:03:01</i> | |
| 2 | 85 | 27,96 | C | G | C | <i>E*01:03/01:03:01</i> | |
| 3 | 83 | 27,3 | T | A | C | <i>E*01:01/01:03:02*04</i> | |
| 4 | 23 | 7,56 | T | G | C | <i>E*01:03/01:03:02*04</i> | |
| 5 | 15 | 4,93 | C | G | T | <i>E*01:03:01/01:03:03</i> | |

Foi utilizado o cálculo da análise de variância molecular (AMOVA) para verificar o quanto à população afroparanaense se aproxima geneticamente das populações de caucasóides e afroamericanas. Para tanto, foram comparadas as frequências haplotípicas mais comuns entre essas amostras.

De acordo com o cálculo da AMOVA, o grau de diferenciação entre as populações afroparanaense e eurocaucasóide foi de 3,874. Este valor ratifica que há moderada diferenciação entre as populações analisadas. Por sua vez, a porcentagem de variação entre as populações afroparanaense e afroamericana foi mais significativa, com o valor de 5,368%. Esses dados demonstram que a população afroparanaense é mais similar geneticamente com a população eurocaucasóide quando comparada a população afroamericana.

Valores de D' entre os *loci* localizados no gene *HLA-E*

Na TABELA 10 são dados os valores de D' entre os loci 1114,1446 e 1577 do gene *HLA-E*.

TABELA 06 – VALOR DO D' ENTRE OS *LOCI* DO *HLA-E*

| Posição dos <i>Loci</i> | 1446 | 1577 |
|-------------------------|---------------|---------------|
| 1114 | 0.2582 | 0.3387 |
| 1446 | | 0.0245 |

O valor de D corresponde á frequência de haplótipos observados menos o esperado. Uma limitação de D como medida do desequilíbrio de ligação é que seus valores possíveis dependem das frequências alélicas, daí a dificuldade de comparar os valores de D de um par de loci em relação ao próximo. Por esta razão, D algumas vezes é expresso como uma porcentagem de valor mínimo (se D for negativo) ou como a porcentagem do seu valor máximo (se D for positivo), o que restringe o intervalo de 0 até 100 por cento. O D' é calculado como a razão do $D/D_{máx}$, então podemos afirmar que na primeira relação do loci 1114 com o 1446, o D é cerca de 25.82% de seu valor máximo possível, dadas as frequências alélicas. O mesmo raciocínio é válido para a relação dos outros loci.

CONCLUSÃO

A análise do polimorfismo genético (éxons 2 e 3) do gene *HLA-E* em uma amostra populacional afroparanaense nos permite as seguintes conclusões:

As frequências dos alelos $E^*01:01$ e $E^*01:03$ são semelhantes provavelmente em decorrência da seleção equilibrada. Não houve a constatação da existência do alelo $E^*01:04$, sendo que sua presença na lista de alelos terá que ser questionada. O genótipo

de maior frequência foi o *E*01:01/01:03* (44.736%) e os de menor frequência foram o *E*01:01/01:03:03*; *E*01:03:01/01:03:03*; *E*01:03:03/01:03:03* (0%). Observou-se que todos os genótipos calculados se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Foram encontrados cinco haplótipos em desequilíbrio de ligação com frequência superior a 0.04. As frequências das variantes encontradas na amostra analisada foram semelhantes com a população afroamericana dos Estados Unidos e do Caribe em todos os aspectos. Já em relação com a população caucasóide houve algumas similaridades e diferenças nas frequências, evidenciando assim que esta população contribuiu em partes para a formação da população afroparanaense. Por sua vez a população asiática apresentou diferenças significativas nas suas frequências quando comparado com a população afroparanaense, demonstrando que ela contribuiu muito pouco para a formação desta população. Através do cálculo do *Fst* foi possível constatar que a população afroparanaense é geneticamente mais similar com a população eurocaucasóide do que a população afrocaribenha.

REFERÊNCIA

1. TROWSDALE, J.; CAMPBELL, R.D. - Map of the human MHC. ***Immunol. Today*** **14**: p. 349-352, 1993.
2. CAROSSELA, E. D.; PAUL, P.; MOREAU, P.; ROUAS, F.; HLA-G and HLA-E: fundamental and pathophysiological aspects. ***Immunol Today***, n. 21, p. 532-534, 2000.
3. ANTHONY NOLAN RESEARCH INSTITUTE. **HLA Informatics Group**. Disponível em: <<http://www.anthonynolan.org.uk/HIG/index.html>>. Acesso em: 03 junho 2010.
4. MATTE, C.; LACAILLE, J.; ZIJENAH, L.; WARD, B.; ROGER, M.; HLA-G and HLA-E Polymorphisms in an African population. ***Hum. Immunol***, v.61, p. 1150-1156, 2000.
5. STRONG, K, R.; HOLMES, A, M.; LI, P.; BRAUN, L.; LEE,N.; GERAGHTY, D. *HLA-E* Allelic Variants. Correlating differential expression peptide affinities, crystal structures, and thermal stabilities. ***The Journal of Biological Chemistry***, n.7, p. 5082-5090, 2003.
6. PAQUAY, M. M.; SCHELLEKENS, J.; TILANUS, M. G. J. A high-throughput Taqman approach for the discrimination of *HLA-E* alleles. ***Tissue Antigens***, n. 74, p. 514-519, 2009.
7. GOMEZ-CASADO, E.; MARTINEZ-LASO, J.; VAGAS, A.G. Description of a new HLA-E

(E*01:03:01) allele and its frequency in the Spanish population. **Human Immunol**, n. 54, p. 69-73, 1997.

8. MATTE, C.; LACAILLE, J.; ZIJENAH, L.; WARD, B.; ROGER, M.; HLA-G and HLA-E Polymorphisms in an African population. **Hum. Immunol**, v.61, p. 1150-1156, 2000.

9. 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 Immunol**, v. 27, n. 9, p. 413-420, 2008.

10. COUPEL, S.; MOREAU, A.; HAMIDOU, M.; HOREJSI, V.; SOULILLOU, J.; CHARREAU, B. Expression and release of soluble HLA-E is an immunoregulatory feature of endothelial cell activation. **Blood**, n.7, v.109, p. 2806-2814, 2007.

11. TOMASEC, P.; BRAUD, M. V.; RICKARDS, C.; POWELL, B. M.; MCSHARRY, P. B.; GADOLA, S.; CERUNDOLO, V.; BORYSIEWICZ, K. L.; MCMICHAEL, A. J.; WILKINSON, G. W. G. Surface Expression of HLA-E, an Inhibitor of Natural killer Cells, Enhanced by Human Cytomegalovirus gpUL40. **Science**, v. 287, n.11, 2000.

12. BRAUD, V. M.; ALLAN, D. S.; CALLAGHAN, C. A.; SODERSTROM, K.; ANDREA, D.; OGG, G. S.; LAZETIC, S.; YOUNG, N. T.; BELL, J. I.; PHILLIPS, J. H. HLA-E binds to natural killer receptor CD94/NKG2A, B and C. **Nature**, n. 391, p. 795-799, 1998.

13. MILLER, J.D.; WEBER, D.A.; IBEGBU, C.; POHL, J.; ALTMAN, J.D.; JENSEN, P.E.; Analysis of HLA-E peptide-binding specificity and contact residues in bound peptide for recognition by CD94/NKG2. **Journal Immunol**, n. 171, p. 1369-1375, 2003.

14. HILARY, L.; LUCY, C.; CRAIG, S.C.; LAUREN, K.E.; TRAVIS, B.; KATE, N, H.; JIE, L.; HUGH, H, R.; ANDREW, G, B.; JAMIE, R.; Subtle Changes in Peptide Conformation Profoundly Affect Recognition of the Non-Classical MHC Class I Molecule HLA-E by the CD94-NKG2 Natural Killer Cell Receptors: **Science Direct**, v. 377, p. 1297-1303, 2008.

15. JIANG, H.; CANFIELD, M. S.; GALLAGHER, P, M.; JIANG, H.H.; JIANG, Y.; ZHENG, Z.; CHESS, L.; HLA-E restricted regulatory CD8+ T cells are involved in development and control of human autoimmune type 1 diabetes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, p. 3432-3442, 2010.

16. PIETRA, GABRIELLA., ROMAGNANI, C.; MANZINI, CLAUDIA.; MORETTA, L.; MINGARI M.C. The Emerging Role of HLA-E Restricted CD8+ T Lymphocytes in the Adaptive Immune Response to Pathogens and Tumors. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Genova, v.10, n.4, p. 207-221, 2010.

17. AKIKO, I.; NORIKO, S.; KATSUHIKO, H. The involvement of HLA-E and -F in pregnancy. **The journal immunology**, v. 69, p. 101-113, 2005.

18. JONH, S.W.M.; WEITZNER, G.; ROZEN, R.; SCRIVER, C.R. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocyte. **Nucleid Acids Research**, London, p. 408, 1990.
19. EXCOFFIER, L.G. LAVAL; SCHNEIDER, S. Arlequin versão 3.1: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v.1, p. 47-50, 2005.
20. ANTOUN, A.; JOBSON, S.; COOK, M.; MOSS, P.; BRIGGS, D. Ethnic Variability in Human Leukocyte Antigen – E haplotypes. **Tissue Antigens**, n.73, p. 39-45, 2008.
21. STEFFENSEN, R.; CHIRSTIANSEN, O. B.; BENNETT, E.P.; JERSILD, C. HLA-E polymorphisms in patients with recurrent spontaneous abortation. **Tissue antigens**, n. 52, p. 569-572, 1998.
22. ARNAIZ-VILLENA, A.; VARGAS-ALARCON, G.; SERRANO-VELA, J.I.; REGUERA, R.; MARTINEZ-LASO, J.; SILVEIRA-REDONDO, C.; GRANADOS, J.; MOSCOSO, J. HLA-E polymorphism in Amerindians from Mexico (Mazatecans), Colombia (Wayu) e Chile (Mapuches): evolution of MHC-E gene. **Tissue Antigens**, n.69, p. 132-135, 2007.
23. GRIMSLEY, C.; OBER, C. Population Genetic Studies of HLA-E. **Human Immunology**, n. 52, p. 33-40, 1997.

DISCUSSÃO

A genética de populações é o estudo da origem e dinâmica da variação genética nas populações, e tem como um de seus objetivos compreender a ação dos fatores que determinam a evolução. Os polimorfismos genéticos são bastante informativos para esse fim. Essas variações ocorrem devido à ação de fatores evolutivos, de acordo com a história de cada população. Para compreender a evolução das populações é necessário estudar um grande número de polimorfismos não ligados (CHAKRAVARTI, 1999). E para compreender a história dos polimorfismos, é necessário estudar um grande número de populações (CAVALLI-SFORZA *et al.*, 2003).

O estudo da diversidade das variantes polimórficas dos genes apresenta uma série de aplicações, o qual compilará em um maior entendimento da origem evolutiva, diversificação da população humana e da ação dos fatores evolutivos nas sequências genômicas. As populações podem diferir quanto às frequências alélicas, e os alelos mais comuns em um grupo podem ser raros, ou mesmo ausentes em outro, especialmente quando as populações analisadas são relativamente isoladas. Alguns polimorfismos que melhor caracterizam grupos étnicos podem ser utilizados como marcadores genéticos na definição da ancestralidade de indivíduos e de populações, possibilitando assim, a reconstrução da história da fundação ou migração e investigação da estrutura genética das populações (CAVALLI-SFORZA *et al.*, 2003).

A população brasileira atual apresenta uma exuberante diversidade genética, resultante da miscigenação entre os três grandes grupos raciais: caucasóides (brancos), negros e ameríndios. Esse processo teve início no século XVI quando os portugueses aportaram no Brasil. Inicialmente com o ameríndio, seguido de negros e, em meados do século XIX, com brancos de diferentes regiões da Europa, notavelmente de Portugal, Itália e Espanha. O estudo de polimorfismos genéticos pode auxiliar na compreensão da origem da nossa população, determinando a contribuição desses povos na formação da população brasileira.

A caracterização de populações para genes que atuam no sistema imune apresenta ainda uma aplicação adicional: a de servir como referência para estudos de associação a doenças, pois esses genes podem ter um papel importante na patogênese, e seus polimorfismos podem estar associados à maior ou menor susceptibilidade de indivíduos ao desenvolvimento dessas doenças. Como as frequências alélicas podem

diferir entre populações, a caracterização das mesmas para esses polimorfismos é essencial para a interpretação dos resultados encontrados em estudos de associação com doenças. A região do *HLA* é a mais polimórfica encontrada no genoma humano e o interesse pelo seu estudo deve-se ao fato de que numerosas doenças apresentam evidências de associação com os genes deste sistema (TIWARI E TERASAKI, 1985).

Ao contrário dos genes de MHC de classe *Ia*, o *HLA-E* é altamente conservado na evolução e o significado biológico de seu polimorfismo é incerto, mas pode estar relacionado com a função de apresentar peptídeos de sequências líderes (PIETRA *et al.*, 2010). A importância do *HLA-E* no âmbito das doenças está relacionado à imunidade antiviral, aos transplantes, bem como aos casos de abortamento recorrente. As pesquisas realizadas envolvendo este gene poderão ser de notória importância para o auxílio da elucidação dessas patologias.

O presente estudo teve por objetivo analisar e comparar as frequências das variantes encontradas no gene *HLA-E*, na população afroparanaense, auxiliando assim para uma melhor compreensão da história evolutiva desses polimorfismos. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2009), a população da região sul do Brasil é composta por 78,7% de brancos, 4,3% de negros, 16,3% de pardos e 0,7% de amarelos e indígenas. Porém, a auto-classificação dos indivíduos em brancos, mulatos e negros não corresponde às mesmas proporções de ancestralidade europeia e africana em diferentes regiões do país, mostrando que a cor da pele é um marcador pouco informativo da ancestralidade genômica de indivíduos (PARRA *et al.*, 2003; SHRIVER *et al.*, 2003).

Atualmente estão descritos na literatura 9 alelos do gene *HLA-E*, os quais codificam apenas 3 produtos protéicos diferentes. O SNP da posição 1446, encontrado no códon 107 do éxon 3, apresenta grande importância biológica, uma vez que define os dois principais alelos (*E*01:01* e *E*01:03*), que diferem na sua expressão celular, bem como, estrutura protéica (STEFFENSEN *et al.*, 1998). Estes dois alelos apresentaram distribuição similar na população estudada, concordando com os relatos anteriores (PIETRA *et al.*, 2010). Vários estudos apontam que o alelo *E*01:03*, está associado com a proteção contra algumas doenças, como por exemplo, a doença do enxerto versus hospedeiro. Verifica-se que a redução do risco é de quatro vezes menor, quando comparada ao alelo *E*01:01* (ANTOUN *et al.*, 2008).

O polimorfismo encontrado no códon 157, do éxon 3, define o alelo *E*01:04*, o qual não foi observado na amostra analisada. Sendo assim, não foi possível confirmar sua existência, sugerindo que este alelo possa ser um artefato de sequenciamento e sua

presença na lista de alelos conhecidos terá que ser questionado.

Os SNPs encontrados nas posições 1114 e 1577, nos éxons 2 e 3, respectivamente, separam o alelo $E^*01:03$ em $E^*01:03:01$; $E^*01:03:02/04$; $E^*01:03:03$. O único alelo que apresentou frequência baixa na população afroparanaense analisada (inferior à 10%) foi $E^*01:03:03$.

As frequências dos polimorfismos encontrados nas posições 1114 e 1446, dos éxons 2 e 3, respectivamente, foram comparadas entre a amostra analisada (afroparanaense) com outras três populações: eurocaucasóide; afrocaribenha; asiática (TABELA 01 do apêndice 03), utilizando para isso o programa *BioStat* versão 5.0, o qual calcula os dados utilizando uma tabela de contingência.

Observou-se que as frequências dos SNPs não diferiram significativamente entre a população afroparanaense e as populações eurocaucasóide hispânicos e afrocaribenha, com o $P > 0.05$, corroborando assim a igualdade estatística entre esses grupos populacionais. Por sua vez, houve diferença significativa entre a população asiática, onde o valor de $P < 0.05$, demonstrando que ela contribuiu muito pouco para a formação da população afroparanaense.

Foi comparada a similaridade das frequências dos alelos $E^*01:01$; $E^*01:03:01$ e $E^*01:03:03$ na amostra analisada (afroparanaense) com outras duas populações: caucasóides da Dinamarca e afroamericana dos Estados Unidos (TABELA 02). Verificou-se que a população caucasóide não apresentou igualdade estatística nas suas frequências alélicas quando comparado com a população afroparanaense, onde $P < 0.0001$. Já as frequências alélicas da população afroamericana são compatíveis com a população afroparanaense, caracterizando assim, igualdade estatística entre essas duas amostras populacionais.

Foi analisada também a distribuição das frequências alélicas obtidas da amostra analisada e de três populações diferentes de ameríndios do México, Colômbia e Chile (TABELA 03). Constatou-se que as populações em questão apresentam diferenças significativas, onde o valor de P foi menor que 0.05, dessa forma não se aceita a hipótese da similaridade das frequências alélicas entre estas amostras. Esse resultado, provavelmente é decorrente da amostra de ameríndio ter origem em regiões da América Norte, como o México e em países diferentes da América do Sul, como Colômbia e Chile.

Compararam-se as frequências genótípicas ($E^*01:01/01:01$.; $E^*01:01/01:03$.; $E^*01:03/01:03$) da amostra estudada afroparanaense com outras três populações: afroamericana dos Estados Unidos, hispânica e chinesa (TABELA 04). Foi observado que não houve diferença estatística entre as populações afroparanaense, afroamericana e

hispânica. Por sua vez, houve significância dos resultados entre a população chinesa, onde o $P < 0.0001$, caracterizando assim, desigualdade estatística entre as frequências genotípicas da amostra estudada com a população chinesa. Este resultado provavelmente deve-se ao fato que a população chinesa não participou da colonização brasileira no início do século XVI, não contribuindo dessa forma, para a diversidade genética proveniente da miscigenação brasileira.

Foi utilizado o cálculo da análise de variância molecular (AMOVA) para verificar o quanto à população afroparanaense se aproxima geneticamente das populações de caucasóides e afroamericanas (TABELA 05). Para tanto, foi comparado as frequências haplotípicas mais comuns entre essas amostras.

De acordo com o cálculo da AMOVA, a porcentagem de variação entre a população afroparanaense e eurocaucasóide foi de 3,87. Este valor ratifica que há moderada diferenciação entre as populações analisadas.

Por sua vez, a porcentagem de variação entre as populações de afroparanaense e afroamericana dos Estados Unidos, foi mais significativa, com o valor de 5,36%.

Esses dados demonstram que a população afroparanaense é mais similar geneticamente com a população eurocaucasóide quando comparada a população afroamericana.

Em resumo, constata-se que as frequências dos alelos $E^*01:01$ e $E^*01:03$, apresentam distribuição similar entre si na amostra analisada, acordando com as outras pesquisas realizadas anteriormente em outros grupos populacionais. A manutenção destas frequências similares provavelmente é mantida por uma seleção equilibrada (PIETRA *et al.*, 2010). Já as diferenças de frequências entre os alelos sinônimos é mais difícil de explicar e necessariamente não são sensíveis a pressão seletiva (PIETRA *et al.*, 2010). Por sua vez, o alelo $E^*01:04$ não foi encontrado na amostra e vários estudos apontam que é um artefato de sequenciamento. Mais pesquisas têm que ser feitas para elucidar esta questão.

Comparando-se as frequências dos SNPs, alélicas e genotípicas da amostra analisada afroparanaense com as outras populações mundiais, verificamos que em muitos aspectos é compatível com a população afroamericana. Com relação à população caucasóide, somente houve diferença significativa com as frequências alélicas, haja vista, que amostra para o cálculo desta frequência foi obtida através de uma população da Dinamarca, e as frequências dos SNPs e genotípicas que foram similares com as frequências da amostra estudada, foram obtidas de uma população de hispânicos

caucasóides. Esta similaridade com os caucasóides hispânicos provavelmente se deve ao fato da colonização do Brasil ter sido feita por eles e pelos portugueses, contribuindo assim para a miscigenação e composição genética brasileira. Já as populações asiáticas e ameríndias do México, Colômbia e Chile apresentaram diferenças significativas em todas as variáveis calculadas, evidenciando dessa forma, a não similaridade dos polimorfismos do gene *HLA-E* com amostra afroparanaense.

Foi analisado o grau de diferenciação entre as populações afrodescendentes e caucasóides, sendo que a população afroparanaense é mais similar com a eurocaucasóide quando comparada com a população afroamericana. Estes dados auxiliam para a refutação do caráter biológico de raça.

Mais estudos populacionais precisam ser realizados nesta área, pois emergentes pesquisas de associação têm sido realizadas, sendo claramente importante ter o conhecimento exato das variantes polimórficas deste gene e de sua composição haplotípica nas diferentes populações.

CONCLUSÃO

A análise do polimorfismo genético (éxons 2 e 3) do gene *HLA-E* em uma amostra populacional afroparanaense, nos permite as seguintes conclusões:

- As frequências dos alelos *E*01:01* e *E*01:03* são similares em decorrência da seleção equilibrada.

- Não houve a constatação da existência do alelo *E*01:04*, sendo que sua presença na lista de alelos haverá de ser questionada.

- Os genótipos de maior frequência foram o *E*01:01/01:03* (44.736%) e *E*01:01/01:01*(36.842%). Observou-se que todos genótipos calculados se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

- Verificou-se que os haplótipos estão em desequilíbrio de ligação.

- Foi encontrado cinco haplótipos com frequência superior a 0.04.

- As frequências das variantes encontradas na amostra analisada foram similares com a população afroamericana em todos os aspectos. Já com a população caucasóide houve algumas similaridades e diferenças nas frequências, evidenciando assim que esta população contribuiu em partes para a formação da população afroparanaense. Por sua vez a população asiática e ameríndia do México, Colômbia e Chile apresentaram diferenças significativas nas suas frequências quando comparado com a população afroparanaense.

- Através da análise de variância molecular (AMOVA) foi possível constatar que a população afroparanaense é mais similar geneticamente com a população eurocaucasóide do que a população afrocaribenha.

APÊNDICE 01

MATERIAIS E MÉTODOS

Caracterização da amostra

A amostra foi constituída de 152 (cento e cinquenta e dois) indivíduos afrodescendentes, os quais se auto intitularam neste grupo étnico. Estes indivíduos são doadores de medula óssea, devidamente cadastrados no banco de dados do Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade da Universidade Federal do Paraná.

Extração do DNA genômico

A extração de DNA das amostras foi realizada através do método *salting-out*, pela equipe do laboratório LIGH, o qual possibilita a obtenção de DNA de alto peso molecular e consiste, basicamente, no rompimento mecânico e/ou enzimático dos tecidos, extração das proteínas e ácidos graxos e precipitação do DNA com etanol (JONH, 1990 modificado por LAHIRI e NURNBERGER Jr, 1991).

A extração de DNA se desenvolve essencialmente em cinco etapas:

- Obtenção da camada de leucócitos por centrifugação do sangue total coletado com anticoagulantes EDTA.
- Lise de eritrócitos através dos detergentes IGEPAL CA630 (SIGMA), SDS 10% e soluções hipotônicas TKMI e TKM2.
- Rompimento da membrana nuclear com SDS a 20% e remoção de enzimas como DNases e RNases por meio de proteinase K e tampão da proteinase K.
- Precipitação de proteínas com NaCl 6M.
- Precipitação de DNA genômico com etanol absoluto.

Cálculo de Concentração de DNA

A concentração de DNA foi determinada através da leitura de densidade ótica (D.O.), utilizando-se o espectrofotômetro *Gene Quantpro RNA/DNA calculator*. Para conferir as concentrações de DNA, as amostras ainda foram analisadas no equipamento *Nano drop*. A diluição das amostras foi feita com água Mili-Q, até obter a concentração desejada dos éxons 2 e 3 do gene *HLA-E*, procedendo assim com a PCR.

Amplificação dos éxons 2 e 3 do gene *HLA-E*

Após ser feita a diluição das amostras, com água Mili-Q, foi realizada a amplificação dos éxons 2 e 3 de *HLA-E*, pela metodologia de PCR, utilizando para isso, oligonucleotídeos iniciadores para a posição 5' e 3' para cada éxon do gene *HLA-E*, descritos no QUADRO 01.

QUADRO 01 - SEQUÊNCIAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS (FORWARD E REVERSE), PARA A OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS.

| Gene | Éxon | Oligonucleotídeo iniciador (forward) 5' -----> 3' | Oligonucleotídeo iniciador (reverse) 5' -----> 3' | Tamanho do éxon |
|-------|------|---|---|--------------------|
| HLA-E | 2 | GGGGTCGGGATGGAAACGGC | GGTTCCGCAGCCTTGGGGTGA | 502 pb |
| HLA-E | 3 | CGGAACCCGCCAGACCCTA | TGAGGTCTGTCAGCTGTGGG | 490 pb |

pb= pares de base.

A PCR foi realizada de acordo com as seguintes condições: volume final de 50µl contendo: 5 µL PCR buffer, 1.3 µL MgCl₂, 1µL de cada dNTPs [10µL], 0.1 µL de cada primer [50 picomoles], 2 unidade de Taq DNA polimerase Platinum Invitrogen e 2 µL DNA genômico [50 picomoles], q.s.p de água Mili-Q.

O ciclo de desnaturação inicial foi de 94°C por 3 minutos seguidos de 35 ciclos de: 94°C por 30 segundos, 68°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos. O alongamento final foi de 72°C por 4 minutos (Termociclador GeneAmp PCR System 9700 (P.E.)).

Eletroforese em gel de agarose

Os produtos obtidos das PCRs foram analisados por meio de eletroforese em cuba horizontal (68v por 15 min) em gel de agarose a 1,0%, diluído em tampão TBE, corado com brometo de etídeo. As bandas de DNA separadas por meio de eletroforese foram visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta e fotografadas.

Purificação com acetato de amônio

Com o objetivo de aumentar a concentração de DNA amplificado na reação de sequenciamento, foi realizado o procedimento de purificação com acetato de amônio e etanol.

Aos produtos da amplificação da PCR, com o volume igual a 50 μL , foram acrescentados 27 μL de acetato de amônio (AcNH_4) a 7,5 M e 167 μL de etanol absoluto. Os tubos ficaram em temperatura ambiente por 10 minutos e em seguida foram centrifugados por 30 minutos a 14000 rpm. Foram descartados os sobrenadantes gentilmente e os pellets resultantes foram lavados com 100 μL de etanol 70% (recém preparado), centrifugou-se por mais 30 minutos a 14000 rpm e descartou-se o etanol. O pellet foi seco na estufa a 55°C por 30 min e ressuspendidos em 10 μL de água autoclavada. Para confirmação da presença do DNA na amostra, 1 μL foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%.

Purificação e sequenciamento das amostras amplificadas

Purificação Enzimática:

Éxonuclease I (EXO I) – Amersham Biosciences – E70073Z (2.500U)

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

A purificação foi realizada nas seguintes condições: 0,3 μL de EXO; 0,6 μL de SAP; 0,3 μL de Buffer; 0,9 μL de produto de PCR purificado com acetato de amônio. Posteriormente este mix foi levado ao termociclador no período de 1 hora a 37°C mais 15 minutos a 80°C.

Em seguida, as amostras foram submetidas à reação de sequenciamento (cada fragmento em um tubo separado) com o Kit *ABI PRISM® BIGDYE®*. Para tanto foi utilizado: DNA 6,9 µl (100 ng/reação); Primer Sequenciamento 1,6 µl (1,6 pmol); Big Dye 1µl; Save Tampão 0,5 µl.

O ciclo de desnaturação inicial foi de 96°C por 1 minutos e 96°C por 15 minutos seguidos de 35 ciclos. O anelamento se deu na temperatura de 54°C por 30 minutos. O alongamento final foi de 60°C por 7 minutos (Termociclador GeneAmp PCR System 9700 (P.E.)

Precipitação

A precipitação realizou-se nas seguintes condições: 2µl de acetato de sódio, 25 µl de etanol absoluto, vórtex intenso por 30 segundos. Centrifugou-se em 2800 rpm por 40 minutos e depois foi dado um spin invertido 800 rpm por 10 segundos. (em papel toalha). Foi preparado uma solução de etanol a 80% e foi colocado em cada tubo 50 µl, e mais, fora passado no vórtex por 10 segundos. Centrifugou-se em 2800 rpm por 15 minutos. Foi dado um spin invertido a 800 rpm por 10 segundos, sendo que posteriormente realizou-se a secagem de 15 minutos à 45°C, no termociclador.

Foi guardado a -20°C e depois para proceder com as reações foi colocado 15 µl de formamida, passou-se no vórtex rapidamente e, após, deu-se um spin de 800 rpm em 10 segundos. Houve a desnaturação por 2 minutos a 95°C no termociclador, logo em seguida deu-se um choque térmico no gelo por 40 segundos com posterior encaminhamento ao sequenciador.

Os dados de sequenciamento obtidos foram visualizados com a ajuda do software gratuito BIOEDIT. Cada amostra foi alinhada com as sequências genômicas de alelos oficiais (reconhecidos pela WHO e pelo Sistema de Informação Internacional de Imunogenética – IMGT) e cada polimorfismo único de nucleotídeos (SNP) detectado foi individualmente anotado. Após esta etapa os dados foram analisados estatisticamente.

Caracterização dos alelos de *HLA-E* (éxons 2 e 3)

A caracterização do éxon 2 (FIGURA 01) e do éxon 3 (FIGURA 02), foram obtidos através do sequenciamento de DNA, permitindo assim comparações entre as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas. Durante as atribuições e determinações alélicas procurou-se novas formas de variantes, porém não foram encontrados novos SNPs nos

éxons estudados. Logo, não foram achados alelos não descritos na literatura.

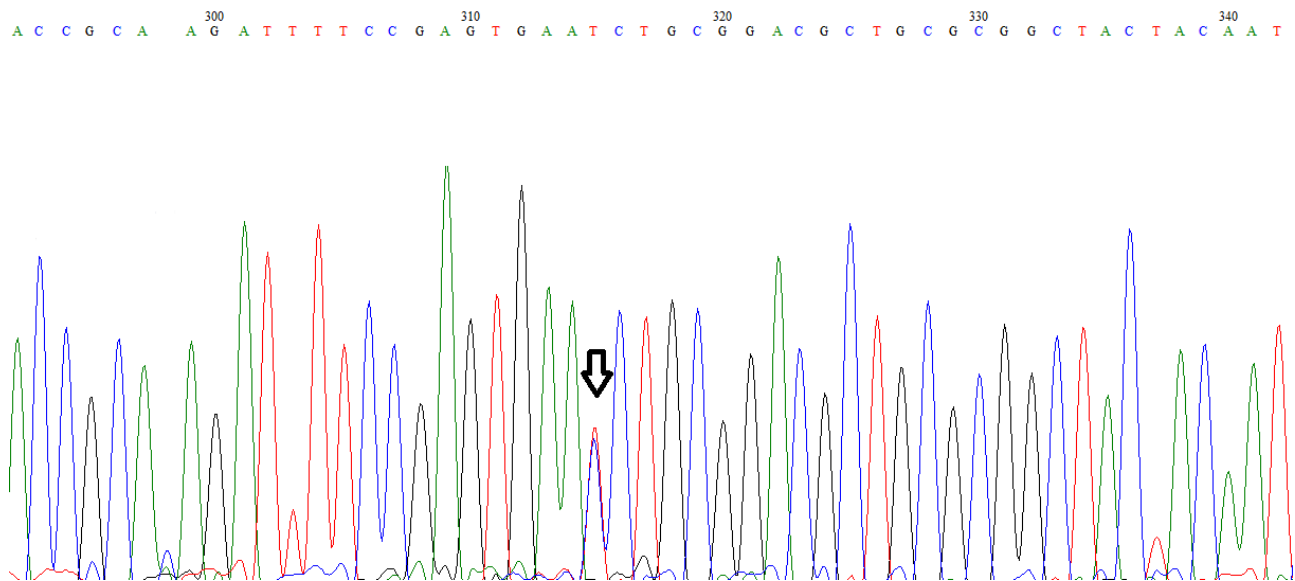


FIGURA 01 - Eletroferograma obtido por sequenciamento mostrando parte do éxon 2 do gene *HLA-E*. A flecha aponta um heterozigoto.

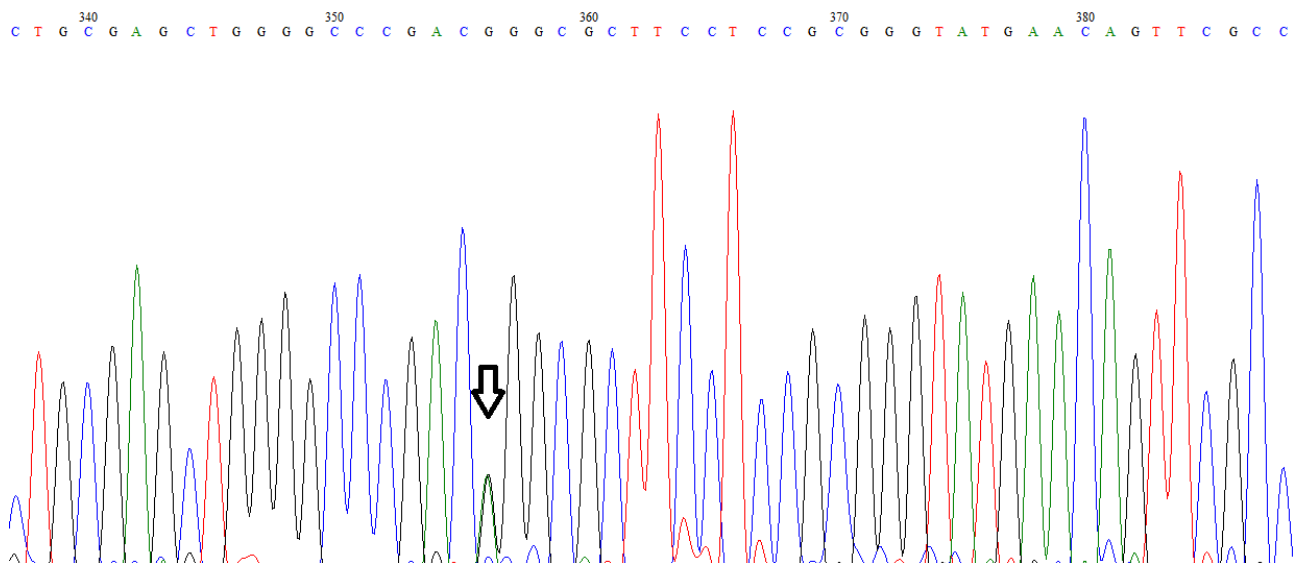


FIGURA 02 - Eletroferograma obtido por sequenciamento mostrando parte do éxon 3 do gene *HLA-E*. A flecha aponta um heterozigoto.

APÊNDICE 02

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Frequências alélicas e genotípicas

As frequências alélicas dos éxons analisados foram obtidas por contagem direta através da fórmula:

$$F_{al} = n/2N$$

Onde:

$F_{al} = n/2N$: frequência alélica (ou de determinado grupo alélico)

n: frequência absoluta de um alelo ou grupo alélico na amostra

N: número de indivíduos na amostra

As frequências genotípicas foram determinadas por contagem direta através da fórmula:

$$F_{gen} = n/N$$

Onde:

F_{gen} : frequência genotípica

n: frequência absoluta de um genótipo na amostra

N: número de indivíduos na amostra

As frequências genotípicas foram obtidas por contagem direta, comparado-as com as frequências esperadas segundo o Teorema de Hardy-Weinberg, utilizando-se para isso o programa ARLEQUIN versão 3.1 (EXCOFFIER e SCHNEIDER, 2005).

Cálculo das frequências haplotípicas

As frequências haplotípicas foram obtidas a partir do método da máxima verossimilhança, utilizando para isso o algoritmo da maximização da expectativa (EM). Tal método foi empregado através do uso do programa ARLEQUIN versão 3.1, estimando-se

as frequências haplotípicas.

Cálculo da similaridade genética da população afroparanaense com outras populações de diferentes etnias.

Para averiguar se a população afroparanaense é similar geneticamente com outras populações étnicas, aplicou-se o teste de contingência, utilizando para isso o programa computacional *BioStat* versão 5.0.

O cálculo da análise de variância molecular (AMOVA) também foi utilizado, para tanto, foram comparadas as frequências haplotípicas da amostra analisada com outras populações mundiais. O valor do F_{ST} foi estimado, contribuindo assim, para analisar o grau de diferenciação entre populações citadas acima.

APÊNDICE 03

TABELAS

TABELA 01 – COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DOS SNPs NAS POSIÇÕES 1114 E 1446 ENTRE QUATRO POPULAÇÕES DIFERENTES: AFROPARANAENSE, EUROCAUCASÓIDE, AFROCARIBENHA E ASIÁTICA

| SNP | ADP | | EC | | ACB | | AS | | |
|-------------|------------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|----|
| | <i>n</i> | Freq. % | <i>n</i> | Freq. % | <i>n</i> | Freq. % | <i>n</i> | Freq. % | |
| 1114 | C/C | 66 | 43 | 105 | 47 | 38 | 63 | 39 | 75 |
| | C/T | 65 | 42 | 88 | 39 | 16 | 26 | 11 | 21 |
| | T/T | 21 | 13 | 30 | 13 | 6 | 10 | 2 | 4 |
| 1446 | A/A | 56 | 37 | 78 | 35 | 19 | 31 | 20 | 39 |
| | A/G | 68 | 45 | 95 | 42 | 26 | 43 | 19 | 36 |
| | G/G | 28 | 18 | 50 | 22 | 15 | 25 | 13 | 25 |

Fonte: Modificado ANTOUN *et al.*, 2008

AP, afroparanaense; EC, eurocaucasóide; ACB, afrocaribenha; IA, asiática

Diferença estatística entre AP e EC, $\chi^2 = 1.395$, $P=0.9249$

Diferença estatística entre AP e ACB, $\chi^2 = 8.149$, $P=0.1482$

Diferença estatística entre AP e IA, $\chi^2 = 17.251$, $P=0.0040$

TABELA 02 – COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE *HLA-E* ENTRE TRÊS POPULAÇÕES DIFERENTES: AFROPARANAENSE, CAUCASÓIDE DA DINAMARCA E AFROAMERICANA DOS ESTADOS UNIDOS.

| Alelo | Pop. AP | | Pop. CAD | | Pop. AA | |
|-------------------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|
| | <i>n</i> | Freq. % | <i>n</i> | Freq. % | <i>n</i> | Freq. % |
| E*01:01 | 180 | 79 | 170 | 56 | 96 | 89 |
| E*01:03:01 | 38 | 16 | 29 | 09 | 10 | 8,84 |
| E*01:03:03 | 10 | 4 | 101 | 35 | 02 | 2,16 |

Fonte: Modificado STEFFENSEN *et al.*, 1998; MATTE *et al.*, 2000.

AP, afroparanaense; CAD, caucasóide – Dinamarca ; AA, afroamericana dos Estados Unidos

Diferença estatística entre AP e CAD, $\chi^2 = 67.5316$, $P < 0.0001$

Diferença estatística entre AP e AA, $\chi^2 = 5.014$, $P = 0.0815$

TABELA 03 – COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS ENTRE A AMOSTRA AFROPARANAENSE COM TRÊS POPULAÇÕES AMERÍNDIAS DO MÉXICO, COLÔMBIA E CHILE.

| Alelo | Pop. AP | | Pop. MAZ | | Pop. WA | | Pop. MAP | |
|-------------------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|
| | <i>n</i> | Freq. % | <i>n</i> | Freq. % | <i>n</i> | Freq. % | <i>n</i> | Freq. % |
| E*01:01 | 180 | 79 | 96 | 56 | 39 | 42 | 80 | 69 |
| E*01:03:01 | 38 | 16 | 39 | 22 | 13 | 14 | 20 | 17 |
| E*01:03:03 | 10 | 04 | 37 | 21 | 42 | 45 | 16 | 14 |

Fonte: Modificado ARNAIZ-VILLENA *et al.*, 2007.

AP, Afroparanaense; MAZ, mazatecas; WA, wayu; MAP, mapuche.

Diferença estatística entre AP e MAZ, $\chi^2 = 33.914$, $P < 0.0001$

Diferença estatística entre AP e WA, $\chi^2 = 80.990$, $P < 0.0001$

Diferença estatística entre AP e MAP, $\chi^2 = 7.109$, $P = 0.0286$

TABELA 04 – COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS ENTRE QUATRO POPULAÇÕES: AFROPARANAENSE, AFROAMERICANA DOS ESTADOS UNIDOS, CAUCASÓIDE HISPÂNICA E CHINESA.

| Genótipo | Pop. AP | | Pop. AA | | Pop. HI | | Pop. CH | |
|----------------------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|
| | <i>n</i> | Freq. % | <i>n</i> | Freq. % | <i>n</i> | Freq. % | <i>n</i> | Freq. % |
| E*01:01/01:01 | 56 | 37 | 24 | 36 | 14 | 30 | 01 | 4 |
| E*01:01/01:03 | 68 | 45 | 30 | 45 | 26 | 54 | 10 | 40 |
| E*01:03/01:03 | 28 | 18 | 13 | 19 | 08 | 16 | 14 | 56 |

Fonte: GRIMSLEY e OBER, 1997

AP, afroparanaense.; AA, afroamericana.; HI, hispânica; CH, chinesa.

Diferença estatística entre AP e AA, $\chi^2 = 0.037$, $P = 0.9816$

Diferença estatística entre AP e HI, $\chi^2 = 1.367$, $P = 0.50491$

Diferença estatística entre AP e CH, $\chi^2 = 20.077$, $P < 0.0001$

TABELA 05 – COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS HAPLÓTIPICAS DA AMOSTRA AFROPARANAENSE COM OUTRAS DUAS POPULAÇÕES: EUROCAUCAÓIDE E AFROAMERICANA DOS ESTADOS UNIDOS.

| nº haplótipos | n obs. | frequência | Posições | 1114 | 1446 | 1577 | |
|---------------|--------|------------|----------|------|------|------|----------------------------|
| 1 | 92 | 30,26 | | C | A | C | <i>E*01:01/01:03:01</i> |
| 2 | 85 | 27,96 | | C | G | C | <i>E*01:03/01:03:01</i> |
| 3 | 83 | 27,3 | | T | A | C | <i>E*01:01/01:03:02*04</i> |
| 4 | 23 | 7,56 | | T | G | C | <i>E*01:03/01:03:02*04</i> |
| 5 | 15 | 4,93 | | C | G | T | <i>E*01:03:01/01:03:03</i> |

Fonte: Modificado ANTOUN *et al.*, 2008

AP, afroparanaense; EC, eurocaucasóide; AA, afroamericana.

TABELA 06 – VARIAÇÃO ENTRE A POPULAÇÃO AFROPARANAENSE COM OUTRAS DUAS POPULAÇÕES

| Amostras | Fonte de variação | G.L. | Porcentagem de variação | FST |
|------------------------------------|---------------------|------|-------------------------|-------------|
| Afroparanaense X Eurocaucasóide | Dentro da população | 2 | 96,13 | 0,0387 4 |
| | Entre Populações | 17 | 3,87 | |
| Afroparanaense X Afrocaribenha | Dentro da população | 1 | 94,64 | 0,0535 8 |
| | Entre populações | 267 | 5,36 | |