

RAFAEL GUSTAVO VARGAS



**REPERTÓRIO DOS GENES *KIR* E POLIMORFISMOS DOS GENES *HLA-Cw*,
KIR2DL4 E *HLA-G* NO ABORTAMENTO RECORRENTE**

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

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

CURITIBA

2009

RAFAEL GUSTAVO VARGAS

**REPERTÓRIO DOS GENES *KIR* E POLIMORFISMOS DOS GENES *HLA-Cw*,
KIR2DL4 E *HLA-G* NO ABORTAMENTO RECORRENTE**

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

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

CURITIBA

2009



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado a que se submeteu **RAFAEL GUSTAVO VARGAS**, para fins de obter o título de Doutor em Ciências Biológicas na área de Genética da Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira ao candidato o conceito "A".

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

Curitiba, 30 de Abril de 2009

Banca Examinadora:

Maria Bicalho

Prof.^a Dr.^a Maria da Graça Bicalho - UFPR
Orientadora e Presidente

Ricardo Alberto Moliterno
Prof. Dr. Ricardo Alberto Moliterno - Depto. Análises Clín. - UEM
Membro Titular

Eni P. Bompeixe
Prof.^a Dr.^a Eni P. Bompeixe - Depto. de Patologia Básica - UFPR
Membro Titular

Iglenir João Cavalli
Prof. Dr. Iglenir João Cavalli - UFPR
Membro Titular

Karin Braun-Prado
Prof.^a Dr.^a Karin Braun-Prado - Universidade Positivo
Membro Titular

Prof. Dr. Marcelo Fernandez Viña - Texas
Membro Titular (*ad hoc*)

Visto: *Ricardo Lehtonen*

Prof. Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética

Centro Politécnico - Caixa Postal 19071 - CEP 81531-980 - Curitiba, PR
Telefone: (41) 3361-1587 - Fax (41) 3361-1793 - ppg-gen@ufpr.br
www.genetica.ufpr.br/posgraduacao

“A história de um homem durante os nove meses que precedem o seu nascimento parecera ser mais interessante e conter mais momentos grandiosos do que todos os anos que a seguem”

SAMUEL TAYLOR COLERIDGE (1885)

AGRADECIMENTOS

Dedico esta tesis a mis padres, que me brindaron en todo momento su apoyo incondicional, antes y durante la realización de este trabajo. También por haberme dado la vida y todo cuanto soy.

À minha queridíssima orientadora, Profa. Dra. Maria da Graça Bicalho, por quem tenho uma grande admiração, pela excelente orientação e dedicação durante todos os anos que convivi no Laboratório LIGH, pela amizade e carinho com que me recebeu me dando a oportunidade de crescimento profissional e pessoal, me mostrando puríssimos valores que vão além dos conhecimentos científicos, que foram muito importantes para a minha formação acadêmica e pessoal e que levarei comigo para sempre.

À Profa. Dra. Eni Piccioni Bompeixe pela grande amizade, carinho e motivação, por tudo que me ensinou e pelas importantes oportunidades que me deu durante todos esses anos,

À todos os amigos do Laboratório LIGH pela ajuda, cooperação e trabalho em equipe, pela troca de conhecimentos, e pelos momentos de descontração e alegria no laboratório. Em especial à Priscila Fanini Wowk, Fabiana Poertner, José Luiz Bila, Samuel da Silva, Gorete Rezende, Marina Xavier, Paulo Costantino, Ivan Luiz Santos, Isabel e Izolde Gaertner.

Agradeço especialmente aos grandes amigos e parceiros do LIGH que participaram ativamente e de forma muito enriquecedora neste trabalho. Eles colaboraram de forma desmedida nas técnicas de laboratório, nos momentos de discutir resultados e com seus atos de companheirismo e amizade com os quais cada um mudou positivamente minha forma de ser e de ver as coisas: Sônia Corrêa Machado, Fernanda Ribas, Clineu Seki Uehara, Sibelle Mattar, Alessandro Pirri, Pablo Carvalho Santos, Márcio Marques de Moraes, Patricia Pinho de França e Joandrei dos Santos Silva.

Aos grandes amigos professores que educam aos seus alunos tanto na sala de aula quanto fora dela, transmitindo de forma espontânea aulas magistrais sobre ética, comportamento, atitudes e valores exemplares: Juarez Gabardo, Remy Lessnau, Erasto Villa Branco, Iglénir João Cavalli, Waldir Antônio da Silva, Fernando Sedor, João Carlos Marques Magalhães e ao Ilustre Professor Euclides Fontoura da Silva Junior que nos acompanha na memória.

À todos os professores e funcionários do Departamento de Genética da UFPR, por tudo o que me ensinaram nesses anos de convivência. É uma grande honra para mim hoje poder chamá-los de meus amigos. Em especial aos professores, Rui Pilotto, Ives Svalquero, Seu Jorge, Margarete Cestari, Nina Pagnan, Chirley Glienke, Mario Pederneiras, Lupe Furtado, Maria Luiza Petzl-Erler, pela grande amizade, discussões e troca de idéias que sempre me deram inspiração e foram marcantes na minha vida acadêmica, além da amizade guardo deles inúmeras felizes lembranças, muitas delas no memorável Cafezinho da Genética.

Uma vez descrito o parágrafo acima gostaria de agradecer também ao Cafezinho da Genética, espaço este que proporciona momentos de interação entre as pessoas do departamento e muitas vezes também com os visitantes. O intercâmbio de informação científica alternado com momentos de descontração e sociabilização entre profissionais de diversas áreas que dificilmente se encontrariam para conversar em outra situação abre inúmeras portas e brinda grandes possibilidades de colaboração em projetos. Além disso, proporciona a oportunidade de fazer novas amizades e de alimentar as que já existem, o que agrega um valor inestimável a este espaço que me traz lembranças que pretendo nunca esquecer. O agradecimento é dirigido ao Cafezinho da Genética já que ele é o símbolo destas vivências, mas formalmente, este agradecimento é dedicado à todos aqueles que mantiveram este espaço vivo durante tantos anos e aos que o defendem até hoje.

À todas as instituições e laboratórios envolvidos nesta pesquisa, UFPR, LIGH, Funpar, CAPES, Laboratório de Genética Molecular Humana, Clínica Genética, Clínica Citogene, Hospital Erasto Gaertner, Hospital de Clínicas da UFPR, Biometrix e Conexio Genomics.

Aos grandes amigos que conquistei durante minha vida acadêmica, aos meus colegas da turma de mestrado e doutorado, pelos ótimos momentos que passamos juntos, momentos de estudo, de trabalho, de festa e principalmente de amizade.

Às pessoas que me ajudaram de forma desmedida e muito pouco comum de se encontrar Rodrigo e Luciano Mengarelli, família Rossi, família Mengarelli, Rafael Noleto, João Fowler, Paulo Sarturi e Marcos Vinicius Mocelin Ferraro, a participação de todos eles durante toda a realização deste trabalho foi fundamental.

Aos grandes amigos da alma, não vou mencioná-los a todos, mas cada um de vocês me ajudou a terminar este trabalho e a crescer como pessoa além de que sempre estão presentes na minha vida.

À Márcia, minha esposa, pelo seu enorme carinho, atenção e apoio incondicional nos momentos difíceis e importantes. Sempre ao meu lado, ela compartilha comigo seu amor e sua vida, me orientando e dando o equilíbrio e persistência necessárias

para poder crescer a cada dia. Sua ajuda e apoio incondicionais foram de enorme valor durante a realização deste trabalho. Por isso e muito mais eu a admiro enormemente, lhe agradeço profundamente e a amo infinitamente.

Aos meus pais que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, que iluminaram os caminhos obscuros com afeto e dedicação para que os trilhásse sem medo e cheio de esperança. Pelo amor e dedicação imensuráveis, pelo esforço e apoio. Agradeço a eles que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, minha irmã e eu pudéssemos realizar os nossos.

Agradeço profundamente à todos aqueles que participaram deste estudo, seja por lutar dia a dia contra a afecção ou por se solidarizar e ajudar aqueles que a padecem.

E a Deus pela saúde, disposição e pela vida.

SUMÁRIO

PARECER	ii
AGRADECIMENTOS	iv
SUMÁRIO	vii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
RESUMO	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. ABORTAMENTO ESPONTÂNEO E SUAS CAUSAS	4
2.1.1. ABORTAMENTO ESPONTÂNEO RECORRENTE	5
2.2 CÉLULAS NATURAL KILLER	8
2.2.1. HIPÓTESE DO “MISSING-SELF” (PERDA DO PRÓPRIO)	9
2.2.2 DIFERENTES ESTRUTURAS DE RECONHECIMENTO DAS CÉLULAS NATURAL KILLER	12
2.2.2.1 Receptores de células NK que reconhecem ligantes não MHC	12
2.2.2.2. Receptores de células NK que reconhecem ligantes relacionados ao MHC	13
2.2.2.3. Receptores de células NK que reconhecem ligantes MHC de Classe I	14
2.3 RECEPTORES KIR	16
2.4 GENES KIR	20
2.4.1 ESTRUTURA DOS GENES <i>KIR</i>	23
2.4.1.1 Genes <i>KIR2D</i> Tipo I	25
2.4.1.2 Genes <i>KIR2D</i> Tipo II	25
2.4.1.3 Genes <i>KIR3D</i>	25
2.4.2 ORDEM E VARIABILIDADE HAPLOTÍPICA DOS GENES <i>KIR</i>	26
2.5 GENE <i>KIR2DL4</i>	28
2.6 NOMENCLATURA KIR	30
2.6.1 NOMENCLATURA DOS GENES <i>KIR</i>	30
2.6.2 NOMENCLATURA DOS HAPLÓTIPOS KIR	31
2.6.3 NOMENCLATURA DOS GENÓTIPOS KIR	34
2.7 LIGANTES DOS RECEPTORES KIR: OS ANTÍGENOS LEUCOCITÁRIOS HUMANOS (HLA)	34
2.7.1 NOMENCLATURA DOS GENES <i>HLA</i>	37
2.7.2 ESTRUTURA DOS COMPLEXOS KIR2D/HLA	38
2.7.2.1 Receptores KIR2D e seus ligantes HLA-Cw	40
2.7.2 HLA EXPRESSOS NA INTERFACE MATERNO-FETAL LIGANTES DOS RECEPTORES KIR	42

2.7.2.1 Genes <i>HLA - Cw</i>	42
2.7.2.2 Gene <i>HLA-G</i>	43
2.8 RECEPTORES KIR E SEUS LIGANTES HLA-Cw E HLA-G EM RELAÇÃO AO ABORTAMENTO ESPONTÂNEO RECORRENTE	46
2.8.1 RECEPTORES KIR E ABORTAMENTO ESPONTÂNEO RECORRENTE	46
2.8.2 INTERAÇÃO KIR2D: HLA-Cw E ABORTAMENTO ESPONTÂNEO RECORRENTE	47
2.8.3 HLA-G E ABORTAMENTO ESPONTÂNEO RECORRENTE	49
2.8.4 INTERAÇÃO KIR2DL4:HLA-G E ABORTAMENTO ESPONTÂNEO RECORRENTE	51
3. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA	53
4 MATERIAL E MÉTODOS	54
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	54
4.2 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO	55
4.2.1 CONCENTRAÇÃO DO DNA	55
4.3 TIPAGEM DOS GENES KIR E HLA-Cw PELA TÉCNICA PCR-SSO MEDIANTE FLUORIMETRIA DE FLUXO	56
4.3.1 DESCRIÇÃO DA TÉCNICA PCR-SSOP	57
4.4 TIPAGEM DOS GENES <i>KIR2DL4</i> E <i>HLA-G</i> PELA TÉCNICA DE SEQUENCIAMENTO AUTOMATIZADO	60
4.5 ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO ÉXON 8 DE HLA-G	70
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	72
4.6.1 ANÁLISE DAS FREQUÊNCIAS	72
4.6.1.1 Frequências gênicas, haplotípicas e genotípicas dos genes <i>KIR</i>	72
4.6.1.2 Frequências alélicas dos genes <i>HLA-C</i> , <i>HLA-G</i> e <i>KIR2DL4</i>	73
4.6.2 ANÁLISES COMPARATIVAS	73
4.6.2.1 Comparação dos genes, haplótipos, genótipos e repertórios KIR	74
4.6.2.2 Comparação das frequências alélicas dos genes <i>HLA-C</i> , <i>HLA-G</i> e <i>KIR2DL4</i>	76
4.6.2.3 Análise comparativa do efeito combinatorial dos genes <i>KIR</i> e alelos do gene <i>HLA-Cw</i>	77
4.6.2.4 Análise comparativa do efeito combinatorial dos alelos do <i>KIR2DL4</i> e alelos do gene <i>HLA-G</i>	77
5. RESULTADOS	79
5.1 GENES <i>KIR</i>	79
5.1.1 FREQUÊNCIAS DOS GENES <i>KIR</i>	79
5.1.2 FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS DOS GENES <i>KIR</i>	82
5.1.3 FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DOS GENES <i>KIR</i>	85
5.1.4 FREQUÊNCIAS DOS HAPLÓTIPOS E GENÓTIPOS KIR REUNIDAS EM BASE AO CONTEÚDO DE GENES (GRUPOS A E B)	87
5.1.5 FREQUÊNCIAS DOS REPERTÓRIOS KIR EM MULHERES	88
5.1.6 FREQUÊNCIAS DOS REPERTÓRIOS KIR DEPENDENTE DA NATUREZA ATIVADORA/INIBIDORA DESTES GENES NO CASAL	92

5.2 GENES <i>KIR2DL4</i>	92
5.2.1 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE <i>KIR2DL4</i>	93
5.2.2 FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DO GENE <i>KIR2DL4</i>	94
5.2.3 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DO GENE <i>KIR2DL4</i> AGRUPADAS SEGUNDO A DELEÇÃO NO NUCLEOTÍDEO 811 DO ÉXON 7	95
5.3 GENES <i>HLA-Cw</i>	97
5.3.1 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE <i>HLA-Cw</i>	97
5.3.2 FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DO GENE <i>HLA-Cw</i>	99
5.3.3 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DO GENE <i>HLA-Cw</i> REUNIDAS NOS GRUPOS C1 E C2	101
5.4 GENES <i>HLA-G</i>	103
5.4.1 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE <i>HLA-G</i>	104
5.4.2 FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DO GENE <i>HLA-G</i>	105
5.4.3 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DA DELEÇÃO DO FRAGMENTO DE 14 PARES DE BASES NO ÉXON 8 DO GENE <i>HLA-G</i>	108
5.5 EFEITO COMBINATORIAL DOS GENES <i>KIR</i> E GENES <i>HLA</i>	110
6. DISCUSSÃO	114
6.1 NÚMERO DE INDIVÍDUOS E ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO	117
6.2 GENES <i>KIR</i>	120
6.3 ALELOS DO GENE <i>KIR2DL4</i>	124
6.4 GENE <i>HLA-Cw</i>	126
6.5 GENE <i>HLA-G</i>	127
6.6 EFEITO COMBINATORIAL DOS GENES <i>KIR</i> E GENES <i>HLA</i>	130
7 CONCLUSÕES	131
8 REFERÊNCIAS	134
ANEXOS	154
ANEXO 1 – APROVAÇÃO DA PESQUISA PELO COMITÊ DE ÉTICA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	155
ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	156
ANEXO 3 – ARTIGOS PUBLICADOS EM REVISTAS INDEXADAS	160

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS E ESTRUTURAIS DOS RECEPTORES KIR (E PSEUDOGENES) E SEUS LIGANTES CONHECIDOS	20
TABELA 2 – CARACTERÍSTICAS DAS MOLÉCULAS HLA DE CLASSE I E II	36
TABELA 3 – NOMENCLATURA DOS GENES <i>HLA</i>	38
TABELA 4 – RECEPTORES KIR E SEUS LIGANTES HLA-CW	41
TABELA 5 – CONVERSÃO SOROLÓGICA DAS TIPAGENS MOLECULARES DE HLA-CW	41
TABELA 6 – CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO PARA A REALIZAÇÃO DA PCR DOS GENES <i>KIR</i> E <i>HLA-CW</i>	57
TABELA 7 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO LOCO <i>KIR2DL4</i>	61
TABELA 8 – REAGENTES UTILIZADOS PARA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>KIR2DL4</i>	62
TABELA 9 – CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO PARA A REALIZAÇÃO DA PCR DOS DOIS SEGMENTOS DO GENE <i>KIR2DL4</i>	62
TABELA 10 – TABELA 10- OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO LOCO <i>HLA-G</i>	63
TABELA 11 – REAGENTES UTILIZADOS PARA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO	64
TABELA 12 – CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO PARA A REALIZAÇÃO DA PCR DO ÉXON 2 E 3 DO GENE <i>HLA-G</i>	64
TABELA 13 – CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO PARA A REALIZAÇÃO DA PCR DO ÉXON 4 DO GENE <i>HLA-G</i>	65
TABELA 14 – REAGENTES UTILIZADOS NA ETAPA DE PURIFICAÇÃO	66
TABELA 15 – CONDIÇÕES DE CICLAGEM UTILIZADAS NA ETAPA DE PURIFICAÇÃO	66
TABELA 16 – REAGENTES UTILIZADOS NA REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO	67
TABELA 17 – CONDIÇÕES DE CICLAGEM UTILIZADAS NAS REAÇÕES DE SEQÜENCIAMENTO DO GENE <i>KIR2DL4</i>	68
TABELA 18 – CONDIÇÕES DE CICLAGEM UTILIZADAS NAS REAÇÕES DE SEQÜENCIAMENTO DO GENE <i>HLA-G</i>	68
TABELA 19 - REAGENTES UTILIZADOS PARA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DO ÉXON 8 DO GENE <i>HLA-G</i>	71
TABELA 20 – CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO PARA A REALIZAÇÃO DA PCR DO ÉXON 8 DO GENE <i>HLA-G</i>	71
TABELA 21 – FREQUÊNCIAS DOS GENES <i>KIR</i> COMPARADAS ENTRE OS GRUPOS PACIENTE E CONTROLE	80
TABELA 22 – FREQUÊNCIAS DOS GENES <i>KIR</i> COMPARADAS ENTRE MULHERES DOS GRUPOS PACIENTE E CONTROLE	81
TABELA 23 – FREQUÊNCIAS DOS GENES <i>KIR</i> COMPARADAS ENTRE HOMENS DOS GRUPOS PACIENTE E CONTROLE	82
TABELA 24 – FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS DOS GENES <i>KIR</i> COMPARADAS ENTRE OS GRUPOS PACIENTE E CONTROLE	83
TABELA 25 – FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS DOS GENES <i>KIR</i> COMPARADAS ENTRE MULHERES DOS GRUPOS PACIENTE E CONTROLE	84

TABELA 26 – FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS DOS GENES <i>KIR</i> COMPARADAS ENTRE HOMENS DOS GRUPOS PACIENTE E CONTROLE	85
TABELA 27 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DOS GENÓTIPOS <i>KIR</i> ENTRE PACIENTES E CONTROLES	86
TABELA 28 - FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS AGRUPADAS COMPARADAS ENTRE PACIENTES E CONTROLES	88
TABELA 29- FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS AGRUPADAS COMPARADAS ENTRE PACIENTES E CONTROLES	88
TABELA 30- FREQUÊNCIA DOS DIFERENTES REPERTÓRIOS <i>KIR</i> AGRUPADOS POR NÚMERO DE GENES <i>KIR</i> INIBIDORES E ATIVADORES EM MULHERES PACIENTES E CONTROLES	91
TABELA 31- COMPARAÇÃO DA IDENTIDADE DOS REPERTÓRIOS <i>KIR</i> ENTRE OS INDIVÍDUOS QUE COMPÕEM OS CASAIS PACIENTES E CONTROLES	92
TABELA 32- FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE <i>KIR2DL4</i> DAS MULHERES PACIENTES E CONTROLES EM ALTA RESOLUÇÃO	93
TABELA 33- FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE <i>KIR2DL4</i> DAS MULHERES PACIENTES E CONTROLES EM BAIXA RESOLUÇÃO	94
TABELA 34- COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE <i>KIR2DL4</i> ENTRE MULHERES PACIENTES E CONTROLES	95
TABELA 35- COMPARAÇÃO ENTRE AS MULHERES PACIENTE E CONTROLE DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE <i>KIR2DL4</i> AGRUPADAS SEGUNDO A DELEÇÃO DA ADENOSINA NO ÉXON 7	97
TABELA 36 - COMPARAÇÃO ENTRE AS MULHERES PACIENTE E CONTROLE DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DO GENE <i>KIR2DL4</i> AGRUPADAS SEGUNDO A DELEÇÃO DA ADENOSINA NO ÉXON 7	97
TABELA 37 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE <i>HLA-CW</i> COMPARADAS ENTRE O GRUPO DE PACIENTES E DE CONTROLES	98
TABELA 38 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE <i>HLA-CW</i> COMPARADAS ENTRE MULHERES DOS GRUPOS PACIENTE E CONTROLE	98
TABELA 39 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE <i>HLA-CW</i> COMPARADAS ENTRE HOMENS DOS GRUPOS PACIENTE E CONTROLE	99
TABELA 40 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DO GENE <i>HLA-CW</i> ENTRE CASAIS PACIENTES COM RSA E CASAIS CONTROLES FÉRTEIS	100
TABELA 41- FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE <i>HLA-CW</i> AGRUPADAS EM C1 E C2 COMPARADAS ENTRE O GRUPO DE PACIENTES E CONTROLES	102
TABELA 42 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE <i>HLA-CW</i> AGRUPADAS EM C1 E C2 COMPARADAS ENTRE AS MULHERES PACIENTES E CONTROLES	102
TABELA 43 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE <i>HLA-CW</i> AGRUPADAS EM C1 E C2 COMPARADAS ENTRE OS HOMENS PACIENTES E CONTROLES	102
TABELA 44- FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DO GENE <i>HLA-CW</i> AGRUPADAS EM C1 E C2 COMPARADAS ENTRE O GRUPO DE PACIENTES E CONTROLES	103
TABELA 45- FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DO GENE <i>HLA-CW</i> AGRUPADAS EM C1 E C2 COMPARADAS ENTRE AS MULHERES PACIENTES E CONTROLES	103
TABELA 46- FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DO GENE <i>HLA-CW</i> AGRUPADAS EM C1 E C2 COMPARADAS ENTRE OS HOMENS PACIENTES E CONTROLES	103
TABELA 47- COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE <i>HLA-G</i>	104

TABELA 48- COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE <i>HLA-G</i> EM MULHERES	105
TABELA 49- COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE <i>HLA-G</i> EM HOMENS	105
TABELA 50- COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DO GENE <i>HLA-G</i>	106
TABELA 51- COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DO GENE <i>HLA-G</i> EM MULHERES	107
TABELA 52- COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DO GENE <i>HLA-G</i> EM HOMENS	108
TABELA 53- FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DA DELEÇÃO DO FRAGMENTO DE 14 PARES DE BASES NO ÉXON 8 DO GENE <i>HLA-G</i>	109
TABELA 54- FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DA DELEÇÃO DO FRAGMENTO DE 14 PARES DE BASES NO ÉXON 8 DO GENE <i>HLA-G</i> EM MULHERES	109
TABELA 55- FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DA DELEÇÃO DO FRAGMENTO DE 14 PARES DE BASES NO ÉXON 8 DO GENE <i>HLA-G</i> EM HOMENS	109
TABELA 56- FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DA DELEÇÃO DO FRAGMENTO DE 14 PARES DE BASES NO ÉXON 8 DO GENE <i>HLA-G</i>	110
TABELA 57- FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DA DELEÇÃO DO FRAGMENTO DE 14 PARES DE BASES NO ÉXON 8 DO GENE <i>HLA-G</i> EM MULHERES	110
TABELA 58- FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DA DELEÇÃO DO FRAGMENTO DE 14 PARES DE BASES NO ÉXON 8 DO GENE <i>HLA-G</i> EM HOMENS	110
TABELA 59- COMPARAÇÃO DOS GENÓTIPOS DE <i>HLA-CW</i> ESPERADOS NA PROGÊNIE HIPOTÉTICA DOS CASAIS EM RELAÇÃO AO GENÓTIPO <i>KIR</i> MATERNO	111
TABELA 60- COMPARAÇÃO DOS GENÓTIPOS DO ÉXON 8 DO GENE <i>HLA-G</i> ESPERADOS NA PROGÊNIE HIPOTÉTICA DOS CASAIS EM RELAÇÃO AO GENÓTIPO DA DELEÇÃO DA ADENOSINA 811 NO ÉXON 7 DO GENE <i>KIR2DL4</i>	112
TABELA 61- FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE <i>HLA-G</i> DOS CASAIS PACIENTE E CONTROLE EM RELAÇÃO AOS DIFERENTES ALELOS DO GENE <i>KIR2DL4</i> MATERNO	113

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Hipótese “ <i>Missing-Self</i> ” revisada.....	11
FIGURA 2 – Receptores KIR ativadores e inibitórios das células NK.....	18
FIGURA 3 – Características estruturais dos receptores KIR (ativadores e inibidores) das células NK.....	19
FIGURA 4 – Localização Cromossômica dos Genes <i>KIR</i> dentro do <i>LRC</i>	22
FIGURA 5 – Organização dos genes <i>KIR3DI</i> e dos genes <i>KIR2D</i> tipo 1 e 2.....	24
FIGURA 6 – Representação de alguns haplótipos <i>KIR A</i> e <i>B</i>	27
FIGURA 7 – Nomenclatura dos genes <i>KIR</i>	31
FIGURA 8 - Nomenclatura dos haplótipos KIR utilizada no presente trabalho.....	33
FIGURA 9 – Localização e estrutura do MHC humano.....	36
FIGURA 10 – Estrutura das moléculas HLA de classe I e de classe II..	37
FIGURA 11 – Estrutura da região extracelular da molécula KIR2D.....	39
FIGURA 12 – Interação molecular entre as proteínas KIR2D e HLA de classe I específicos.....	40
FIGURA 13 – Número de alelos HLA-Cw e HLA-G conhecidos até agosto de 2008.....	43
FIGURA 14 – Organização de exons e introns do gene <i>HLA-G</i> , processamento alternativo e isoformas.....	45
FIGURA 15 – Princípios da técnica PCR-SSOP: Amplificação e desnaturação.....	58
FIGURA 16 – Princípios da técnica PCR-SSOP: Hibridização e Marcação Fluorescente.....	59
FIGURA 17 – Posições de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores da amplificação e do seqüenciamento.....	61
FIGURA 18 – eletroforese confirmatória da amplificação dos segmentos génicos a serem sequenciados.....	65
FIGURA 19 - Fragmentos de diferentes tamanhos produzidos pela incorporação de ddNTPs	68
FIGURA 20 - Estimulação da fluorescência dos nucleotídeos marcados (ddNTPs).	69
FIGURA 21 - Eletroferograma gerado pelo sequenciador	70
FIGURA 22 - Corrida eletroforética do éxon 8 do gene <i>HLA-G</i>	72
FIGURA 23 - Repertórios <i>KIR</i> agrupados por conteúdo de genes <i>kir</i> inibitórios em mulheres pacientes e controle.....	89
FIGURA 24 - Repertórios <i>KIR</i> agrupados por conteúdo de genes <i>kir</i> ativadores em mulheres pacientes e controle	90
FIGURA 25 - Eletroferogramas mostrando os estados de homozigose e de heterozigose da deleção da adenosina na posição 811 da seqüência do gene <i>KIR2DL4</i>	96

LISTA DE ABREVIATURAS

Células NK	- células <i>Natural Killer</i> ;
KIR	- <i>Killer-cell Ig-like Receptors</i> ou Receptores semelhantes à Imunoglobulina das Células <i>Natural Killer</i> ;
MHC	- <i>Major Histocompatibility Complex</i> ou Complexo Principal de Histocompatibilidade;
HLA	- <i>Human Leukocyte Antigen</i> ou Antígeno Leucocitário Humano;
TCR	- <i>T cell Receptor</i> ou Receptor das Células T;
APC ou CAA	- <i>Antigen-presenting Cells</i> ou Células Apresentadoras de Antígenos;
Ig	- Imunoglobulina
LILR	- <i>Leukocyte Ig-like Receptors</i> ou Receptores semelhantes à Ig Leucocitários;
LRC	- <i>Leukocyte Receptor Complex</i> ou Complexo de Receptores Leucocitários;
ITIM	- Imunoreceptor com Motivo Inibidor baseado em Tirosina;
ITAM	- Imunoreceptor com Motivo Ativador baseado em Tirosina;
KARAP	- <i>Killer Cell Activating Receptor Associated Protein</i> ou Proteína Associada ao Receptor Ativador de Células NK;
ILT	- <i>Ig-like transcripts</i> ou Transcritos semelhantes à Ig
LENG	- <i>LRC Encoded Novel Gene</i> ou Novo gene LRC
NKC	- <i>Natural Killer Complex</i> ou Complexo <i>Natural Killer</i> ;
PCR	- <i>Polymerase Chain Reaction</i> ou Reação em Cadeia da Polimerase;
RSA	-Abortamento Espontâneo Recorrente ou Recurrent Spontaneous Abortion
SSP	- <i>Single Sequence Primer</i> ou Iniciador de Seqüência Específica;
SSOP	- <i>Sequence Specific Oligonucleotide Probe</i> ou Sonda Oligonucleotídica de Seqüência Específica;
uNK	-células <i>Natural Killer</i> uterinas

RESUMO

As células natural killer (NK) são linfócitos granulares grandes suspeitos de estarem envolvidos nas causas do abortamento espontâneo recorrente (RSA), dado que estas células constituem a população linfocitária dominante na decidua e suas principais funções efetoras são citotoxicidade e produção de citocinas. A ativação das células NK resulta da integração de sinais induzidas pela interação de um altamente diversificado repertório receptores inibitórios e ativadores das células NK (NKR) que ligam com ligantes expressos nas células alvo. Exemplo destes ligantes são as moléculas HLA de classe I.

O trofoblasto não expressa moléculas HLA-A, HLA-B nem HLA de classe II, as principais estimuladoras da resposta imune dependente de células T. Contudo, estas células trofoblásticas expressam uma única combinação de moléculas HLA-Cw, HLA-G e HLA-E que são os ligantes específicos de NKR como são os membros da família dos receptores tipo imunoglobulina das células NK (KIR), codificados por genes localizados no complexo de receptores leucocitários (LRC) no cromossomo 19q13.4. Dos 16 genes *KIR* conhecidos, sete codificam para os receptores inibitórios KIR2DL1-3, KIR2DL5 e KIR3DL1-3, seis codificam para os receptores ativadores KIR2DS1-5 e KIR3DS1, um codifica para o receptor ativador/inibitório que se encontra presente em todos os indivíduos e dois, *KIR2DP1* e *KIR3DP1* são pseudogenes, que não codificam para nenhum receptor funcional. Foi relatado que as interações entre as moléculas HLA de classe I expressas no trofoblasto e os receptores KIR estão intimamente envolvidas em diversos mecanismos regulatórios da reprodução tais como a iniciação da menstruação, o estrito controle da invasão do trofoblasto durante o desenvolvimento da placenta e na angiogênese e estabilidade vascular do endométrio.

Em vista da evidencia apresentada acima, o objetivo do presente trabalho foi investigar a associação entre os genes *KIR*, os genes de seus ligantes HLA de classe I com expressão trofoblástica (*HLA-Cw* e *HLA-G*) e o abortamento espontâneo recorrente em 68 casais pacientes com RSA e 68 casais controles férteis, todos de etnia caucasóide-brasileira. Os genes *KIR* e *HLA-Cw* foram tipados pela técnica PCR-SSO e os genes *KIR2DL4* e *HLA-G* pela técnica de seqüenciamento automatizado. Com as freqüências obtidas foi realizado um estudo caso-controle.

Nossos resultados indicam que os repertórios *KIR* com número elevado de genes *KIR* ativadores causariam predisposição ao RSA em mulheres. Subseqüentemente foi elaborado um modelo biológico do sistema de imuno-vigilância das células NK na interface materno-fetal, onde o mecanismo fisiológico que relaciona as células NK e o RSA depende de um alto grau de ativação das células NK (devido à existência de uma alta quantidade de receptores KIR ativadores) ou a um menor grau de inibição destas células (devido a uma menor variedade de receptores inibitórios).

O alelo de HLA-G HLA-G*010103 e o agrupamento alélico HLA-G*0101^a (HLA-G*010101 e HLA-G*010106) e o genótipo homocigótico para a presença do fragmento de 14 pares de bases (14/14) no éxon 8 de este gene mostraram um efeito protetor contra o RSA.

ABSTRACT

Natural killer (NK) cells are large granular lymphocytic cells that are suspected of being involved in the causes of recurrent spontaneous abortion (RSA), since these cells constitute the dominant decidual cell population and their main effectors functions are cytotoxicity and cytokine production. NK cell activation results from integration of signals induced by the interaction of a highly diversified repertoire of inhibitory and activating NK cell receptors (NKR) with ligands, such as HLA class I molecules, expressed on target cells.

Trophoblast does not express HLA-A, HLA-B or HLA class II molecules, the main stimulator of T cell dependent immune responses. Nevertheless, these trophoblastic cells express a unique combination of HLA-Cw, HLA-G and HLA-E molecules that are specific ligands for NKR, such as the killer immunoglobulin-like receptor (KIR) family, encoded by genes located in the leukocyte receptor complex (LRC) on chromosome 19q13.4. Of the 16 known KIR genes, seven encode the inhibitory receptors KIR2DL1-3, KIR2DL5 and KIR3DL1-3, six encode the activating receptors KIR2DS1-5 and KIR3DS1, one encodes the activating/inhibitory receptor KIR2DL4 that is present in all the individuals, and two are pseudogenes *KIR2DP1* and *KIR3DP1* that do not encode any functional KIR receptor. The interactions between trophoblastic HLA class I molecules and NK cell receptors on uNK cells have been reported to be closely involved in several reproductive regulatory mechanisms such as in the initiation of menstruation, in the strict control of trophoblast invasion during placental development and in endometrial angiogenesis and in vascular stability.

In view of the evidence presented above, the aim of the present study was to investigate the association between *KIR* genes, their HLA ligands expressed on trophoblast genes (*HLA-Cw* and *HLA-G*) and recurrent miscarriages in 68 patient couples with RSA and 68 fertile control couples all from Brazilian-Caucasian ethnicity. The *KIR* and *HLA-Cw* genes were typed by PCR-SSO and the *KIR2DL4* and *HLA-G* by sequenced-based typing. With the frequencies obtained a matched case-control study was carried out.

Our results indicate that *KIR* genes may play a major role throughout pregnancy and an elevated number of different activating *KIR* genes may predispose women to RM. Therefore we suggest, as a model, that the NK physiological mechanism that could be related with RSA depends in a higher rate of NK activation (due to a higher quantity of activating receptors) or in a lesser NK inhibition rates (due to a lower variety of inhibitory receptors).

The HLA-G alleles HLA-G*010103, the allelic set HLA-G*0101A (HLA-G*010101 e HLA-G*010106) and the genotype homozygous for the presence of the 14 bp fragment (14/14) in exon 8 of this gene showed a protective effect against RSA.

1 INTRODUÇÃO

O sistema imune materno pode estimular ou inibir o crescimento e sobrevivência da unidade fetoplacentária, mas o mecanismo preciso envolvido, os mediadores-chave, seus modos de ação e a extensão da influência do sistema imune sobre a gestação ainda são bastante obscuros.

Sendo a frequência de um aborto espontâneo em torno de 15%, a chance de que um casal tenha dois abortos consecutivos seria $(15\%)^2$ ou 2,3%, enquanto três perdas poderiam ocorrer em $(15\%)^3$ ou 0,3% dos casais, considerando-se a independência dos eventos. No entanto, a frequência de casais com três abortamentos espontâneos recorrentes (RSAs, do inglês: *Recurrent Spontaneous Abortion*) varia de 0,4% a 1%, uma incidência mais alta do que aquela esperada ao acaso (WARBURTON e FRASER, 1964; COULAM e STERN, 1994; FORBES, 1997).

As células NK (do inglês: Natural Killer) compõem a população linfóide dominante na decídua desde os primeiros estágios da gravidez (HSU *et al.*, 2002; DOSIOU e GIUDICE, 2006). Sua presença e seu contato direto com o trofoblasto conferem às células NK um papel crucial na gravidez (CLARK *et al.*, 1996) mediado pelos receptores KIR (do inglês: Killer cell Immunoglobulin-like Receptors: receptores tipo imunoglobulina das células natural killer) específicos para se ligar às moléculas HLA de classe I (HLA-A, HLA-B, HLA-Cw e HLA-G) (KING *et al.* 2000a; 2000b; NIOKOU *et al.*, 2003).

Na decídua, as células do trofoblasto extraviloso não expressam moléculas HLA-A, HLA-B ou HLA de classe II, expressas na maioria das células somáticas e que são os principais estimuladores das respostas de rejeição de enxerto mediadas por células T, mas expressam moléculas HLA-Cw e HLA-G (KING *et al.*, 2000b; KING *et al.*, 2000c). A associação destes receptores KIR com os ligantes HLA expressos no trofoblasto media a comunicação entre as células embrionárias e as células NK maternas (KING, BURROWS e LOKE; 1996) com a função de proteger, desde o momento da concepção, o trofoblasto do dano mediado pelas células NK maternas, e de controlar o crescimento do trofoblasto e da placenta (YOKOYAMA, 1993).

Os receptores KIR se unem a ligantes HLA de classe I, e regulariam a função das células NK mediante um balanço entre KIRs de sinalização

positiva, que iniciam a ativação celular, e KIRs de sinalização negativa, que suprimem tal ativação.

Nos humanos o número de locos de genes *KIR*, assim como também o número de locos com produtos protéicos com função ativadora ou inibitória da citotoxicidade celular varia entre diferentes indivíduos. Portanto, a combinação do número de locos e a função das proteínas codificadas nesses locos que se encontram numa determinada pessoa é denominada repertório *KIR* ou “perfil *KIR*” (UHRBERG *et al*, 2001).

A hipótese do presente trabalho é, portanto, examinar a possibilidade da existência de um sistema de aloreconhecimento do feto, mediado por receptores KIR e seus ligantes HLA expressos no trofoblasto. Esta hipótese será testada mediante a análise, pela técnica de amplificação PCR-SSO (Reação em Cadeia da Polimerase- Sondas-Oligonucleotídicas Seqüência Específicas) e tipagem por fluorimetria de fluxo de tecnologia Luminex[®] (ONE LAMBDA, INC.), do repertório dos locos dos genes *KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DL5*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*, *KIR3DS1* e dos pseudogenes *KIR2DP1* e *KIR3DP1* de ambos os parceiros dos casais com história de aborto espontâneo recorrente, e sua comparação com o repertório desses genes *KIR* de ambos os parceiros dos casais férteis e sem história de aborto.

Também será testada a possível relação entre as variáveis alélicas do gene *KIR2DL4* e as do seu ligante HLA-G, assim como o polimorfismo dos genes *HLA-Cw* em contraste com a presença ou ausência dos genes dos receptores KIR que interagem com eles. A metodologia de sequenciamento automático será utilizada para a tipagem dos alelos dos locos *KIR2DL4* e *HLA-G* e a tipagem dos genes *HLA-Cw* será feita pela mesma tecnologia de PCR-SSO utilizada na tipagem dos genes KIR.

O presente trabalho pretende investigar a existência de uma relação entre o polimorfismo dos genes *KIR*, *HLA-Cw*, *HLA-G* e as variantes alélicas do gene *KIR2DL4* e o RSA, tendo como hipótese o fato de que as combinações entre alguns alelos paternos e maternos podem conferir predisposição ao aborto enquanto outras podem atribuir proteção.

Devida à grande diversidade alélica dos genes analisados e principalmente à inclusão nesta pesquisa dos genes *KIR* que até o momento

foram pouco estudados, investigações sobre o polimorfismo desses genes em casais brasileiros com RSA podem contribuir para o conhecimento dessa afecção e para a perspectiva do desenvolvimento de imunoterapias que resultem no sucesso reprodutivo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ABORTAMENTO ESPONTÂNEO E SUAS CAUSAS

Muitos estudos têm demonstrado que vários processos celulares de regulação genética, imunológica, metabólica, vascular e endócrina são necessários para a manutenção de uma gravidez normal. A regulação anormal desses processos pode causar abortos espontâneos, que se referem à perda da gravidez antes da vigésima semana de gestação, na ausência de procedimentos médicos ou cirúrgicos que interrompem uma gravidez (GRIEBEL *et al.*, 2005). Dá-se o nome de natimorto ao feto que morre após a vigésima semana de gestação, distinguindo essa ocorrência dos nascidos vivos e dos abortos espontâneos (GEARY *et al.*, 1997).

O abortamento espontâneo é a complicação mais comum da gravidez (BAEK, 2004), ocorrendo em 10-15% das concepções humanas (TULPPALA e YLIKORKALA, 1999), podendo essa taxa ser significativamente maior (31-57%) quando gestações detectadas sorologicamente pela gonadotrofina coriônica humana- β são incluídas (EDMONDS *et al.*, 1982; WILCOX *et al.*, 1988; MOORE, 1994; GRIEBEL *et al.*, 2005). Além disso, em mulheres com idade superior a 40 anos o número de abortos pode atingir 41% (TULPPALA e YLIKORKALA, 1999).

Existem vários fatores de risco para os abortos espontâneos, como idade materna avançada, uso de álcool e de outras drogas, infecções maternas, anormalidades uterinas, aberrações cromossômicas, entre outros (GRIEBEL *et al.*, 2005). As aberrações cromossômicas ocorrem em 49% dos abortos espontâneos, sendo que as trissomias são as principais anomalias encontradas (52%), seguidas por poliploidias das quais as triploidias são responsáveis por cerca de 20% dos abortos e 6% são causados por tetraploidias, monossomia do cromossomo X (13%) e menos freqüentemente aberrações cromossômicas estruturais (pouco mais que 3%) (GUERRA, 1988; GODDIJN e LESCHOT, 2000).

2.1.1 ABORTAMENTO ESPONTÂNEO RECORRENTE

Abortamento espontâneo recorrente (RSA) é um importante problema clínico do começo da gravidez que apresenta diversas etiologias (COULAM *et al.*, 1997) e define-se como duas ou mais perdas espontâneas e consecutivas, que ocorrem até a vigésima semana do período gestacional, não apresentando o casal nenhuma gestação a termo (COULAM, 1986; BYRNE e WARD, 1994; COULAM e STERN, 1994, GRIEBEL *et al.*, 2005). Uma definição mais rigorosa considera três ou mais abortamentos espontâneos consecutivos ocorridos até a vigésima semana da gestação. Na prática muitos especialistas utilizam o termo abortamento espontâneo recorrente a partir de duas perdas gestacionais consecutivas, uma vez que a partir desse ponto os casais começam a ficar preocupados e a procurar os centros médicos em busca de tratamento e portanto, é uma responsabilidade da medicina atender a essas inquietudes (STIRRAT, 1990; CHRISTIANSEN *et al.*, 2005).

Sendo a frequência de um aborto espontâneo em torno de 15%, a chance de que um casal tenha dois abortos consecutivos seria de $(15\%)^2$ ou 2,25%, enquanto três perdas consecutivas poderiam ocorrer em $(15\%)^3$ ou 0,34% dos casais, considerando-se a independência dos eventos. No entanto, a frequência de casais com três RSAs varia de 0,4% a 1%, uma incidência mais alta do que aquela esperada ao acaso (WARBURTON e FRASER, 1964; COULAM e STERN, 1994; FORBES, 1997; RAI e REGAN, 2006). Dados derivados de pesquisas epidemiológicas indicam que o risco de um terceiro abortamento espontâneo depois do segundo consecutivo é de 30% e de um quarto depois do terceiro consecutivo é de 45%, estas proporções são pelo menos duas vezes maiores daquelas esperadas estocasticamente (RAI e REGAN, 2006;). Portanto fatores repetitivos de risco encontram-se associados ao RSA (LAMBROPOULOU *et al.*, 2006).

As causas de perda gestacional recorrente podem ser divididas em quatro grandes categorias: (1) citogenéticas 25%; (2) anatômicas 25%; (3) hormonais 10%; e (4) outras 40%. Sob a denominação de "outras" estão: causas imunológicas 50%; infecciosas 10%; outros fatores 40% e muito raramente causas exógenas (ANSARI e KIRKPATRICK, 1998).

Anormalidades citogenéticas podem ser encontradas em mais de 50-60% de perdas gestacionais no primeiro trimestre, principalmente aquelas com menos de 6-8 semanas de gestação (KAJII *et al.*, 1980; STIRRAT, 1990a; b). As causas citogenéticas, entretanto, declinam com o avanço da gravidez, e, em torno da oitava semana de gestação, com atividade cardíaca detectável, é menor que 5% (CARP, TADER e MASHIACH, 1990).

Algumas anomalias anatômicas do corpo uterino (malformações, leiomiomas e sinéquias) podem resultar em perda gestacional precoce, mas, em geral são causas de aborto no segundo/terceiro trimestre. Alterações do útero (corpo e cérvix) podem também resultar em parto prematuro ou imaturo, que ocasionam a morte fetal (CARP, TADER e MASHIACH, 1990).

Anormalidades do ducto Mülleriano, como útero bicorno ou septado e leiomiomas, são as mais importantes alterações anatômicas associadas à perda gestacional recorrente (HASSIAKOS e ZOURLAS, 1990). Sinéquia uterina pode ser um fator que contribui com aproximadamente 5% dos casos, e são devidos normalmente a algum tipo de instrumentação uterina, como curetagem, dispositivo intrauterino ou miomectomia. Os fatores apontados como determinantes da perda da gravidez quando há mal formação uterina, leiomiomas submucosos ou cicatriz intrauterina, são o comprometimento do suprimento sanguíneo para a implantação e crescimento fetal, bem como fatores de restrição espacial (ROCK e ZACUR, 1983; ROCK e MURPHY, 1986; HEINONEN e PYSTYNEN, 1983).

Perdas gestacionais recorrentes no segundo trimestre são altamente sugestivas de incompetência istmo-cervical. Enquanto defeitos congênitos podem contribuir para um número reduzido de casos (<5%), nos casos restantes (>95%), a incompetência cervical é o resultado de trauma prévio, como diagnóstico traumático ou dilatação cervical terapêutica, conização cervical agressiva e laceração cervical durante um parto prévio (LEES e SUTHERST, 1974).

Com relação às causas hormonais, a principal causa de perda gestacional recorrente são anomalias de fase lútea, também conhecida como fase lútea inadequada, na qual o nível de progesterona por ocasião da ovulação é menor que 10 ng/mL (HENSLEIGH e FAINSTAT, 1979). Outras alterações endócrinas que podem afetar a gravidez são a diabetes não

controlada, hipotireoidismo e hipercortisolemia (ANSARI e KIRKPATRICK, 1998).

Muitas doenças infecciosas causadas por patógenos como, por exemplo: *Listeria*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Brucella*, *Clamídia*, *Toxoplasma gondii*, *Treponema pallidum*, *Varicella*, citomegalovírus, vírus da rubéola, vírus do herpes, micoplasma, têm sido associadas às perdas gestacionais, no entanto, seus efeitos sobre o abortamento recorrente não foram conclusivos (ANSARI e KIRKPATRICK, 1998).

Várias toxinas ambientais, como cigarro e álcool podem contribuir para o abortamento espontâneo (HARLAP e SHIONO, 1980; McDONALD, ARMSTRONG e SLOAN, 1992). Exposição à radiações ionizantes e algumas drogas quimioterápicas, têm sido relacionadas como fatores de risco na gravidez (POLIFKA e FRIEDMAN, 1991).

Com relação às causas imunológicas, fatores autoimunes, incluindo anticorpos antifosfolipídeos, como anticorpos anticardiolipina e anticoagulante lúpico estão relacionados às perdas gestacionais. Anticorpos antifosfolipídeos ligam-se à fosfolipídeos e clinicamente podem resultar em eventos tromboembólicos, incluindo infarto placentário. Estudos demonstram que mulheres com estes anticorpos apresentam 70% de risco de perda gestacional recorrente (INFANTE-RIVARD *et al.*, 1991; BRANCH *et al.*, 1992).

Ainda com relação às causas imunológicas, mecanismos aloimunes foram propostos como mediadores de perdas gestacionais recorrentes (FRASER, GRIMES e SCHULZ, 1993; COULAM, 1995). Nesse contexto, vários estudos investigaram o papel dos antígenos HLA (Antígenos Leucocitários Humanos) do casal, sem resultados conclusivos (HVIID *et al.*, 2002; SBRACIA *et al.*, 1996; CHRISTIANSEN *et al.*, 1989). Mais recentemente mudou-se o foco para outros parâmetros tais como a atividade das células NK através de seus receptores KIR, os quais podem modular a citotoxicidade destas células em relação às células e tecidos circundantes (VARLA-LEFTHERIOTI *et al.*, 2003; KING, BURROWS e LOKE, 1996).

2.2 CÉLULAS NATURAL KILLER

As células NK (*Natural Killer*) são linfócitos derivados da medula óssea que possuem importantes funções na regulação da resposta imune inata. Entretanto, baseado em sua linhagem de origem, repertório de receptores e funções efectoras, as células NK parecem ser um tipo celular transicional, que seria uma ponte entre o sistema imune inato e o adaptativo (LANIER, 2005).

Depois das células T e B as células NK constituem o terceiro maior subgrupo linfocitário no sangue, representado aproximadamente de 10 a 15% de todos os linfócitos circulantes (RAVET *et al.*, 2007). Nos humanos, estas células são encontradas nos tecidos linfóides, baço, pulmões, fígado, intestino e também no endométrio. As células NK uterinas (uNK) caracterizadas fenotipicamente como CD56^{bright}, CD16⁻ e CD3⁻ compõem a população celular dominante na decídua compreendendo aproximadamente o 70% da população leucocitária total na mucosa uterina (STARKEY, SARGENT e REDMAN, 1988; GEISELHART *et al.*, 1995; KING, BURROWS e LOKE, 1996; KING *et al.*, 1998).

As funções conhecidas das células NK são eliminar células infectadas, transformadas ou estressadas pela via de perforinas/granzimas, Fas ou TRAIL (ligante indutor de apoptose associado ao fator de necrose tumoral), assim como secretar citocinas e quimiocinas capazes de influenciar a resposta imune do indivíduo (TRIPP, WOLF e UNANUE, 1993; BERKE, 1995; KIM *et al.*, 2000; MOCIKAT *et al.*, 2003; SMYTH *et al.*, 2005).

O interferon gamma (IFN- γ) é uma das principais citocinas produzidas pelas células NK, que direciona às células a aumentar a expressão de moléculas HLA de classe I, ativa os macrófagos a fagocitar células com patógenos intracelulares e inibe a proliferação de células infetadas por vírus ou malignas (WALLACH, FELLOUS, REVEL, 1982; FILIPE-SANTOS *et al.*, 2006).

A habilidade de combater este tipo de células contraproducentes ocorre de forma conjunta com a tolerância às células normais (tolerância ao próprio), propriedade das células NK essencial para prevenir autoimunidade. Para isto, as células NK são educadas durante o desenvolvimento, criando populações de células NK maduras auto-tolerantes e sensíveis à células

alteradas ou infectadas. Assim esta auto-tolerância é mantida mediante a presença de uma grande quantidade de receptores inibitórios da citotoxicidade que reconhecem as células normais próprias, principalmente através da interação com as moléculas HLA de classe I na superfície destas células. (RAULET, VANCE e MCMAHON, 2001).

O reconhecimento de células alvo por células NK envolve a ligação e interação entre receptores ativadores e inibidores presentes em sua membrana celular com moléculas ligantes na superfície da célula alvo, além da integração de sinais transmitidos por estes receptores determinando se a célula deve ou não ser ativada. No caso de ativação, a célula NK responde com a reorganização e liberação de grânulos citotóxicos, além da transcrição e secreção de citocinas (LANIER, 2005). Os mecanismos, envolvidos na ativação e na inibição destas células, estão aos poucos sendo elucidados, sendo a hipótese do “*missing-self*” (perda do próprio) (KÄRRE, 1985; KÄRRE, 2002) a mais aceita atualmente.

2.2.1. HIPÓTESE DO “MISSING-SELF” (PERDA DO PRÓPRIO)

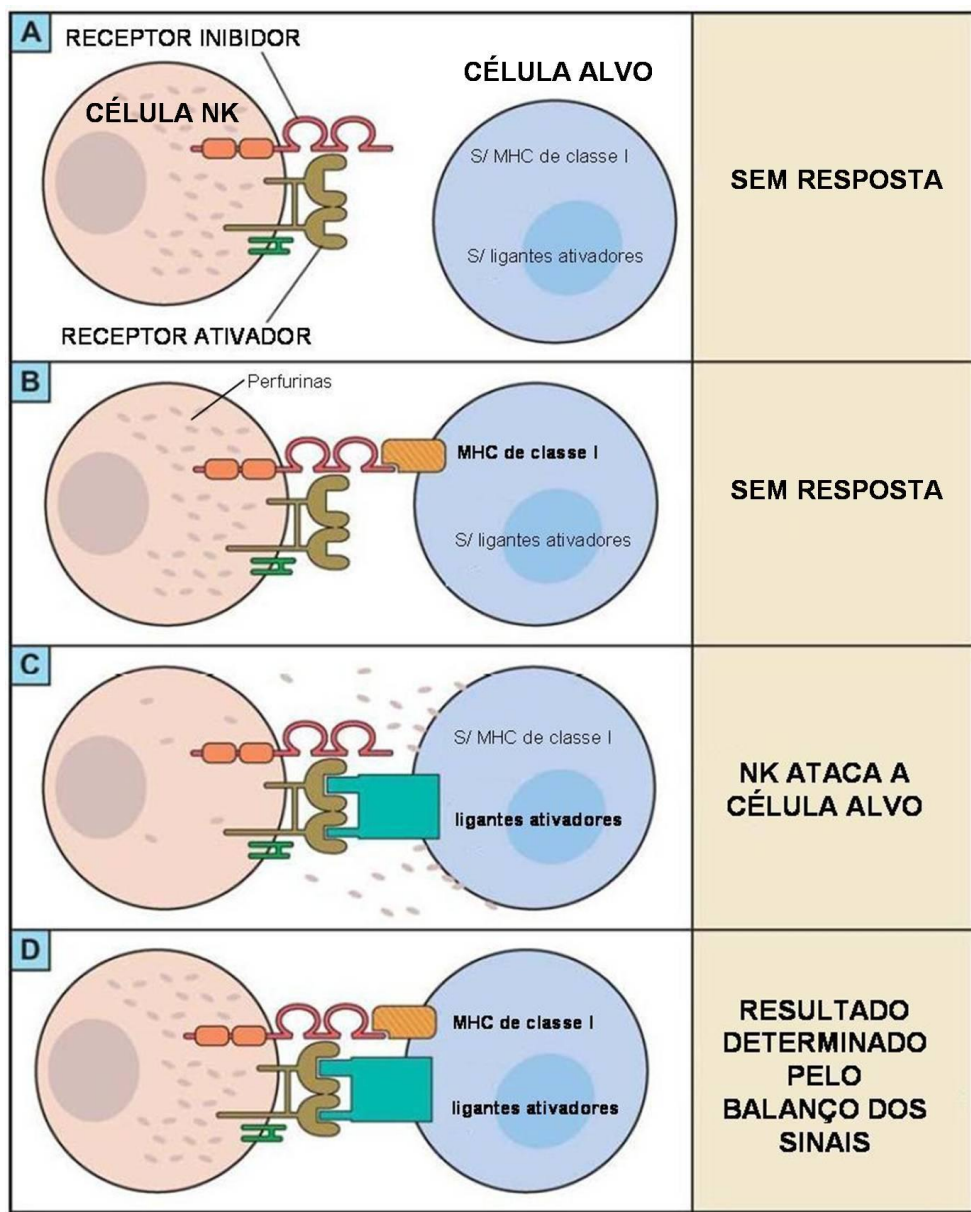
Inicialmente as células NK foram descritas como não restritas ao MHC em seu processo de reconhecimento de células alvo, devido a sua capacidade de lisar células que não expressavam moléculas MHC ou que expressavam várias moléculas alogênicas. Contudo, Kärre e colaboradores notaram que, mais do que ignorar o MHC, as células NK participam da imunovigilância, reconhecendo epítopos presentes em certas moléculas HLA. Estas células parecem ser ativamente inibidas de uma resposta citotóxica quando encontram células tumorais que expressam certas moléculas MHC de classe I (KÄRRE, 1985). Subseqüentemente, foi demonstrada a habilidade das NK em reconhecer e eliminar células hematopoiéticas normais que não expressam moléculas MHC de classe I, em um estudo de rejeição de células da medula óssea dependente de células NK de camundongos singênicos deficientes de β_2 -microglobulina (BIX, *et al.* 1991; HOGLUND, *et al.* 1991). De acordo com a hipótese “*Missing-self*” (LJUNGGREN & KÄRRE, 1990), as células NK fornecem a imunovigilância para células que tenham diminuição da expressão de moléculas MHC de classe I, um evento freqüentemente

resultante da transformação celular ou infecção por vírus. Até recentemente, aceitava-se que as células NK lisavam quaisquer células que não expressavam ligantes MHC de classe I para receptores inibidores das NK (LANIER, 2005). Uma modificação contemporânea dessa hipótese “*missing-self*” indica que células NK patrulham por células anormais, as quais não expressam ou possuem uma expressão reduzida de moléculas MHC de classe I, ou uma expressão aumentada de ligantes para receptores ativadores das células NK (FIGURA 1).

Evidências experimentais têm permitido sugerir que receptores inibidores para MHC de classe I possam servir somente para atenuar, mais do que inibir completamente, as funções efetoras das células NK e que, a quantidade de proteínas MHC I na superfície celular do alvo é proporcional ao grau de inibição.

Modelos experimentais permitiram prever que, quando múltiplos receptores ativadores de células NK são engajados simultaneamente (LANIER, *et al.* 1997) ou quando apenas um potente receptor ativador é adequadamente estimulado (CERWENKA *et al.*, 2001; DIEFENBACH *et al.*, 2001), as células NK são capazes de eliminar células alvo mesmo existindo interação de seus receptores inibidores com ligantes específicos MHC de classe I.

FIGURA 1. HIPÓTESE “MISSING-SELF” REVISADA



Hipótese “Missing-self” revisada. Representação do encontro entre uma célula NK e a célula alvo e possíveis resultados. A) Em algumas circunstâncias, receptores inibidores da célula NK (diferentes dos KIR) reconhecendo outros ligantes que não as proteínas MHC de classe I podem suprimir respostas das células NK. B) A expressão de moléculas MHC de classe I ligantes para os receptores inibidores KIR desabilita a resposta, além da não expressão de ligantes ativadores. C) A não expressão da molécula MHC I ligante do receptor inibidor KIR conjuntamente com a expressão de ligantes para receptores ativadores resultam em mecanismos responsivos efetores. D) Quando interagem com células alvo expressando ligantes para ambos receptores ativadores e inibidores, o resultado é determinado pela soma da extensão dos sinais. A quantidade dos receptores ativadores e inibidores nas células NK e a quantidade de ligantes nas células alvo, tanto quanto diferenças qualitativas nos sinais transduzidos, determinam à extensão da resposta das células NK. FONTE: LANIER, L.L. NK cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 23: 225-274; 2005.

Por outro lado, uma das características marcantes dessa hipótese admite que a falha na resposta das células NK a alvos potenciais, pode ser devido à ativa inibição mediada por receptores inibidores ou alternativamente, devido à ausência de sinais de ativação suficientes para iniciar a resposta

(LANIER, 2005). Um exemplo dessa situação seria a não resposta das células NK aos eritrócitos, sabendo-se que estes não expressam moléculas MHC I em sua superfície. Uma explicação seria que junto a não expressão de MHC I, existiria também a falta de ligantes capazes de se ligarem com receptores ativadores das NK. Uma outra explicação alternativa para a incapacidade das células NK de danificar tecidos normais, com baixos níveis de expressão de MHC I (ex. tecidos neurais) ou nenhuma expressão (ex. eritrócitos), é a possibilidade de que esta proteção da célula alvo seja mediada por receptores inibidores que reconhecem ligantes não MHC I (LANIER, 2005).

2.2.2 DIFERENTES ESTRUTURAS DE RECONHECIMENTO DAS CÉLULAS NATURAL KILLER

2.2.2.1 Receptores de células NK que reconhecem ligantes não MHC

As células NK possuem vários sistemas de receptores de membrana que evoluíram para detecção de moléculas MHC de classe I e moléculas relacionadas ao MHC I, as quais regulam suas respostas citolíticas. Contudo, estas células possuem mecanismos adicionais que regulam seu comportamento quando se trata de alvos potenciais que não expressam proteínas MHC ou relacionadas (LANIER, 2005). Não está claro ainda se receptores com ligantes não MHC possam servir como receptores “coestimulatórios”, aumentando a sinalização de outros receptores, ou independentemente iniciar uma resposta. Dois destes receptores com ligantes não MHC estão abaixo relacionados, receptores 2B4 e DNAM-1.

Receptor **2B4**

O receptor 2B4 (também denominado CD244) e seu ligante CD48 (BROWN *et al.*, 1998; LATCHMAN *et al.*, 1998) são membros da família CD42 de proteínas relacionadas à Imunoglobulinas (Ig), codificadas por um grupo de genes localizados no cromossomo 1 humano (1q22). Estes receptores estão presentes em todas as células NK, na maioria das células T TCR⁺ $\gamma\delta$ e das células T CD8⁺ (tipicamente o grupo de células com o fenótipo efetor/memória) (GARNI-WAGNER *et al.*, 1993; VALIANTE E TRINCHIERI,

1993; PERITT *et al.*, 1999; SPEISER *et al.*, 2001), além de monócitos e basófilos (NAKAJIMA *et al.*, 1999). A proteína 2B4 possui dois domínios extracelulares tipo Ig e caudas citoplasmáticas contendo 4 motivos Thr-x-Tyr-x-x-Leu/Ile (onde cada x denota um aminoácido qualquer). Em células NK maduras humanas, estes receptores comportam-se como receptores ativadores. Entretanto, se este receptor 2B4 é capaz de ativar funções efetoras independentemente ou servir como um receptor “coestimulador”, não está ainda definido (VALIANTE E TRINCHIERI, 1993; KUBIN *et al.*, 1999; NAKAJIMA *et al.*, 1999; SIVORI *et al.*, 2000).

Receptor **DNAM-1**

O receptor DNAM-1 (também denominado CD226) é membro da superfamília das Ig, sendo codificado por um gene localizado no cromossomo 18 humano (18q22.3), que se expressa em células NK, células T, um grupo de células B, monócitos e plaquetas (BURNS *et al.*, 1985; SCOTT *et al.*, 1989; SHIBUYA *et al.*, 1996). Seus ligantes foram identificados como sendo o CD112 (também conhecido por Receptor do Vírus da Pólio (PVR)) e CD155 (também chamado de Nectina-2) (BOTTINO *et al.*, 2003; TAHARA-HANAOKA *et al.*, 2004). Interações entre DNAM-1 em células NK e CD112 e CD155 em células tumorais, aumentam a citotoxicidade mediada por NK e produção de citocinas. Estes ligantes possuem uma expressão aumentada em células tumorais humanas (MASSON *et al.*, 2001; BOTTINO *et al.*, 2003; TAHARA-HANAOKA *et al.*, 2004).

Além disso, a migração de monócitos, através de junções intracelulares de células endoteliais, envolve o DNAM-1 (em monócitos) e CD155 em células endoteliais vasculares (REYMOND, *et al.*, 2004), sugerindo a possibilidade de um papel similar para estes receptores no tráfego das células NK (LANIER, 2005).

2.2.2.2. **Receptores de células NK que reconhecem ligantes relacionados ao MHC**

São receptores, dentre os quais o NKG2D, que reconhecem proteínas de superfície celular estruturalmente relacionadas com o MHC I, sendo a

maioria destes ligantes não codificados por genes situados no complexo MHC e não possuem estruturas de ligação a peptídeos para a apresentação de antígenos às células T.

Receptor **NKG2D**

O receptor NKG2D reconhece glicoproteínas de superfície celular estruturalmente relacionadas ao MHC I. Diferentemente de outros receptores das células NK, o NKG2D é codificado por apenas um gene não polimórfico localizado no cromossomo 12 (12p12.3-p13.2) (HOUCHINS *et al.*, 1991; SHUM *et al.*, 2002) que codifica um receptor essencialmente ativador. Todas as células T CD8+, incluindo células T *naive* presentes no cordão umbilical, constitutivamente expressam o NKG2D (BAUER *et al.*, 1999). Este receptor liga-se a uma família de proteínas com homologias estruturais às moléculas MHC I, como MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3 e ULBP4 (BAUER *et al.*, 1999; COSMAN *et al.*, 2001; JAN *et al.*, 2003). Destes, apenas os MICA e MICB são codificados por genes localizados no complexo MHC (ligados ao HLA-B) (BAHRAM *et al.*, 1994).

A estimulação de células NK através do NKG2D ativa a citotoxicidade mediada por célula e, em alguns casos, induz a produção e a secreção de citocinas e quimiocinas (LANIER, 2005). Os receptores NKG2D têm sido implicados na imunidade contra vírus e células tumorais.

2.2.2.3. **Receptores de células NK que reconhecem ligantes MHC de Classe I**

Receptores reconhecendo moléculas MHC de classe I “clássicas” e “não clássicas” codificadas por genes localizados no complexo MHC têm sido identificados, como a família de receptores CD94/NKG2, os Receptores semelhantes à Ig Leucocitários - LILR (do inglês, *leukocyte Ig-like receptors*) e os Receptores semelhantes à Ig das células *Natural Killer* – KIR (do inglês, *Killer-cell Ig-like Receptors*).

Não existem ainda evidências aceitáveis de que células NK reconheçam moléculas MHC de classe II, baseadas em análises de camundongos deficientes de MHC II e em estudos funcionais *in vitro*, usando

células alvo humanas e murinas expressando MHC de classe II (LANIER, 2005).

Receptor **CD94/NKG2**

As famílias gênicas NKG2 e CD94 codificam receptores que reconhecem ligantes MHC I “não convencionais” (ex. HLA-E). Estes genes estão situados no complexo NK localizados no cromossomo 12 humano (12p12.3-p13.2). Em humanos um único gene *CD94* está intimamente ligado a quatro genes da família NKG2 (*NKG2A*, *NKG2C*, *NKG2E* e *NKG2F*) (HOUCHINS *et al.*, 1991). Diferente de outros genes codificantes de receptores, os genes *CD94* e *NKG2* possuem pouca variação alélica, o que tem demonstrado não afetar as funções destes receptores (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 TCR⁺ $\gamma\delta$ e em um subgrupo de células T CD8⁺ TCR⁺ $\alpha\beta$ (ARAMBURU *et al.*, 1990; TOYAMA-SORIMACHI *et al.*, 2001). Diferentemente dos receptores KIR, que são estavelmente mantidos uma vez expressos, a expressão dos receptores CD94/NKG2 nas células NK e células T é modulada por citocinas do ambiente. A IL-15 (MINGARI *et al.*, 1998), TGF- β (BERTONE *et al.*, 1999) e IL-12 (DERRE *et al.*, 2002) têm induzido a expressão de CD94/NKG2 nas células T *in vitro*.

Receptor **LILR**

A família dos genes *LILR* (também conhecidos por LIR, ILT e CD85) está localizado no LRC (Complexo de Receptores Leucocitários, do inglês *Leukocyte Receptor Complex*) no cromossomo 19 (19q13.4), próxima aos genes *KIR*. Dos três genes *LILR*, dois, *LILRB1* (ILT2/LIR1) e *LILB2* (ILT4 LIR2), codificam receptores inibidores que ligam moléculas MHC I (COLONNA *et al.*, 1997; COSMAN *et al.*, 1997). Entretanto, *LILB2* não é expresso em células NK.

O receptor *LILB1* é uma glicoproteína de superfície celular com quatro domínios semelhantes à Ig na região extracelular e quatro ITIMs (Motivo Inibidor baseado em Tirosina) no domínio citoplasmático. É variavelmente

expresso em células NK do sangue periférico (variando de níveis indetectáveis até 75% das células NK) e em um subgrupo de células T, mas é uniformemente e altamente expresso em células B e monócitos (COLONNA *et al.*, 1997; COSMAN *et al.*, 1997). Esta expressão aumentada do receptor LILB1 em células B, sugere que este receptor tenha um papel significante na regulação destes leucócitos, uma vez que as células B não expressam receptores KIR e nem CD94/NKG2 (LANIER, 2005).

2.3 RECEPTORES KIR

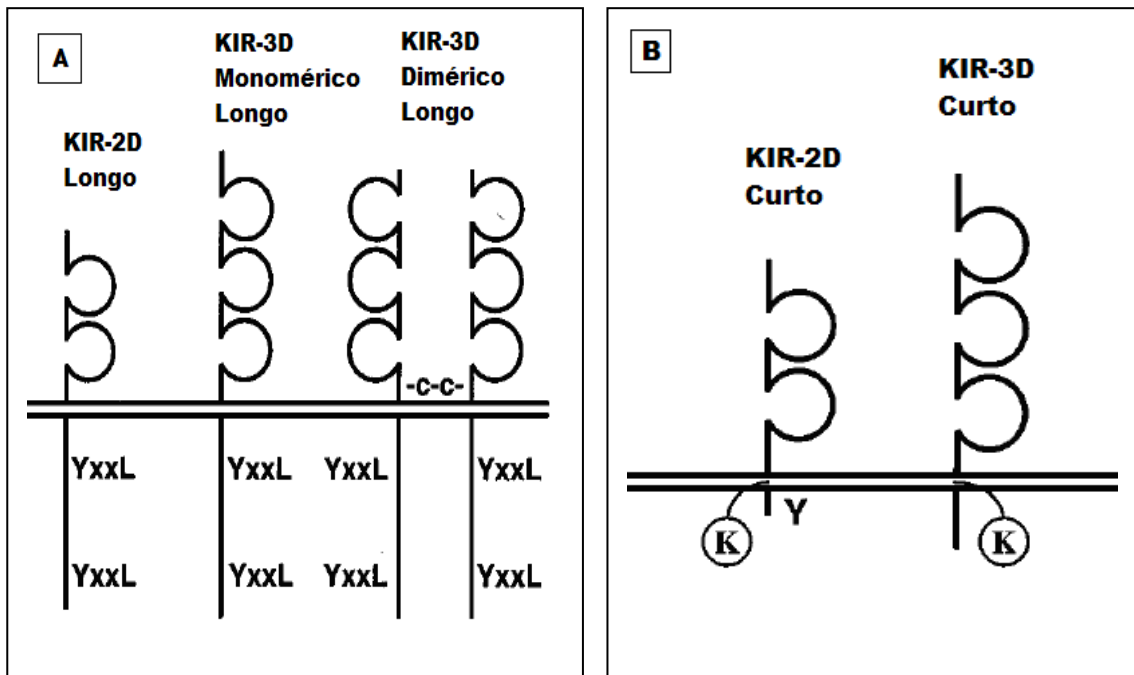
Baseados na habilidade das células NK (natural killer) de eliminar células tumorais que perderam a expressão de moléculas MHC de classe I, KARRE e LJUNGGREN, nos meados da década de 80 propuseram a existência de um mecanismo de supervisão imune com a função de eliminar as células com expressão aberrante das moléculas MHC de classe I (LJUNGGREN e KARRE, 1985, 1990; PIONTEK *et al.*, 1985; KARRE *et al.*, 1986). Subseqüentemente, foi observado nessas células deficientes, que a lise causada pelas células NK é abolida depois da transfecção de genes MHC de classe I funcionais (SHIMIZU e DEMARS, 1989; STORKUS *et al.*, 1989).

Na procura das moléculas efetoras desse mecanismo de supervisão, foram descritas pela primeira vez as moléculas KIR (do inglês: Killer cell Immunoglobulin-like Receptors: receptores tipo imunoglobulina das células natural killer) no ano 1990 por MORETTA *et al.* (1990). O descobrimento dos KIRs concede uma função adicional às moléculas HLA de classe I, dado que a expressão dessas moléculas de classe I pode ser regulada negativamente em infecções virais ou em células transformadas, conferindo resistência contra a citólise mediada por linfócitos T citotóxicos. Entretanto níveis aberrantes de expressão de moléculas de classe I podem resultar na destruição espontânea pelas células NK, conceito denominado originariamente como “missing-self hypothesis” (SHIMIZU e DEMARS, 1989; LJUNGGREN e KARRE, 1990). Por outro lado, as células normais encontram-se protegidas da destruição mediada pelas células NK quando apresentam um ligante apropriado para o receptor expressado nestas células citotóxicas.

As proteínas KIR são membros da super-família das imunoglobulinas (Ig) e se estruturam em dois ou três domínios extracelulares tipo Ig (D₀, D₁ e D₂) (FIGURA 2 e FIGURA 3). As moléculas KIR com domínios citoplasmáticos longos têm função inibitória das células NK (inibem a ação citolítica da célula *Natural Killer*), em virtude de seus motivos de inibição baseados em tirosina (ITIM: do inglês: Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motifs), presentes em seus domínios citoplasmáticos (FIGURA 2, A e FIGURA 3). As moléculas KIR com função ativadora das células NK apresentam domínios citoplasmáticos curtos (FIGURA 2, B e FIGURA 3), os quais não têm motivos de inibição baseados em tirosina (ITIMs) e sim possuem, em seus domínios transmembrânicos, um resíduo de lisina que contribui para associação do receptor KIR com a molécula DAP-12 (esta molécula é também conhecida como KARAP do inglês: Killer cell Activating Receptor Associated Protein), um homodímero de 12 kD com Imuno-receptores com Motivos Ativadores baseados em Tirosina (ITAM: do inglês: Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs). Assim, os receptores KIR ativadores transmitem sinais de ativação através de sua interação com a molécula adaptadora DAP-12 (FIGURA 3) (OLCESE *et al.*, 1997; RAJAGOPALAN e LONG, 1999).

Os receptores KIR se unem a ligantes HLA de classe I, e regulam a função das células NK mediante um balanço entre KIRs de sinalização positiva que iniciam, e KIRs de sinalização negativa que suprimem, a ativação celular (TABELA 1). Este significativo papel no controle da resposta imune poderia explicar as associações observadas entre alguns genes *KIR* e algumas doenças como artrite reumatóide (WARRINGTON *et al.*, 2001), artrite psoriática (MARTIN *et al.*, 2002a) e com o controle da progressão do HIV (MARTIN *et al.*, 2002b).

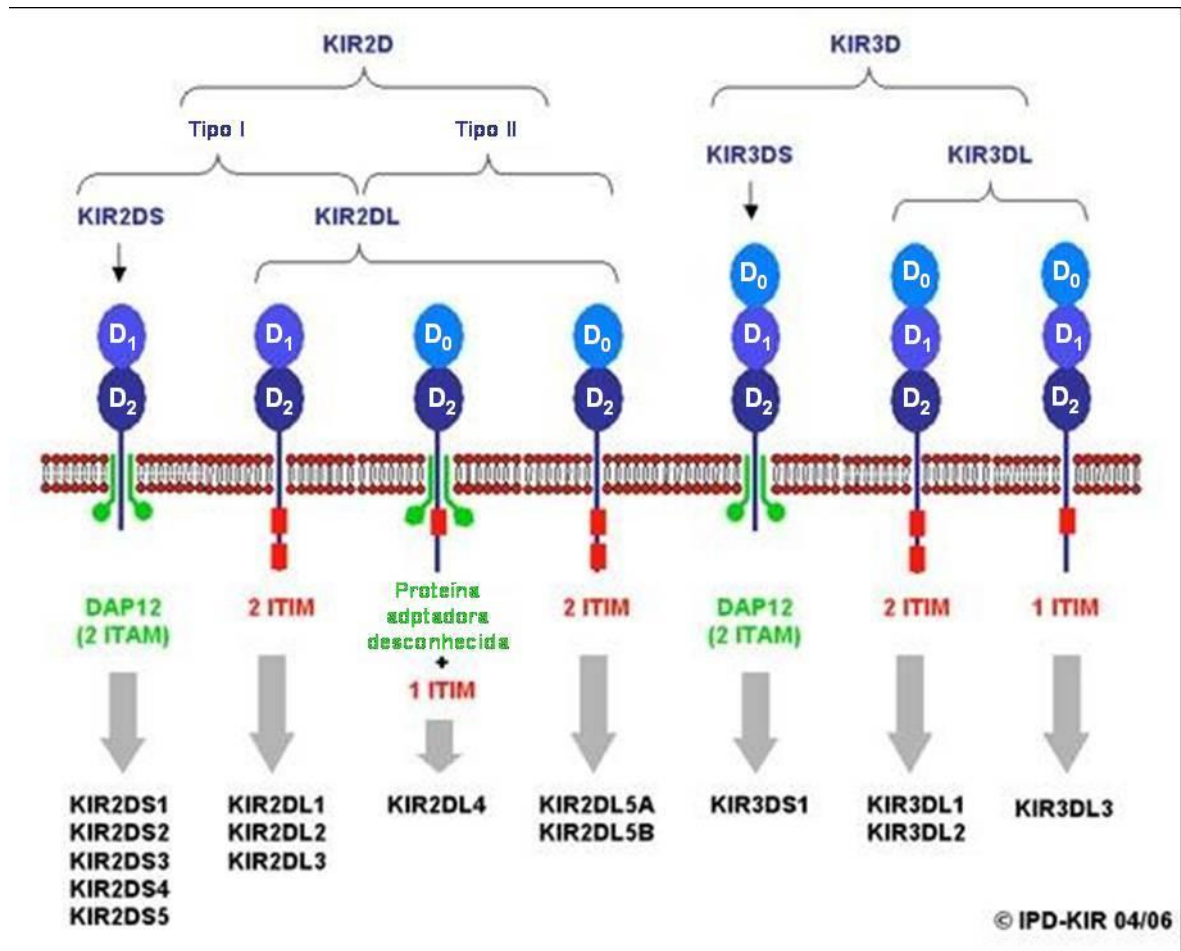
FIGURA 2. RECEPTORES KIR ATIVADORES E INIBITÓRIOS DAS CÉLULAS NK



Todos os receptores KIR são membros da superfamília das imunoglobulinas, e podem conter dois ou três domínios Ig na região extracelular. A) Receptores KIR inibitórios, todos os membros da família apresentam seqüências de aminoácidos inibitórias da ativação celular (ITIM) (I/VxYxxL/V) no domínio citoplasmático. B) Os receptores KIR ativadores não apresentam domínios inibitórios ITIM, porém apresentam aminoácidos carregados no domínio transmembrana.

FONTE: Modificado de: LANIER, L. NK cell receptors. **Annual Review of immunology**, Baltimore, v. 16, p. 359-393, 1998.

FIGURA 3. CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DOS RECEPTORES KIR (ATIVADORES E INIBIDORES) DAS CÉLULAS NK



Estrutura das proteínas KIR. Características estruturais das proteínas KIR com 2 (KIR2D) ou 3 (KIR3D) domínios extracelulares semelhantes à Ig. A associação dos KIRs ativadores com as proteínas adaptadoras é mostrado em verde, enquanto que os ITIMs dos receptores inibidores são mostrados em vermelho. A letra D seguida dos números 0, 1 e 2 indicam os domínios extracelulares semelhantes à Ig.

FONTE: Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/index.html> Acesso em: março de 2009

TABELA 1. CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS E ESTRUTURAIS DOS RECEPTORES KIR (E PSEUDOGENES) E SEUS LIGANTES CONHECIDOS

KIR	Função	Domínios Ig extracelulares	Ligantes conhecidos
KIR2DL1	Inibitória	D ₁ -D ₂	HLA-Cw apresentando Asn77, Lys80 (Cw2,4,5,6,15) ^{20, 21}
KIR2DL2	Inibitória	D ₁ -D ₂	HLA-Cw apresentando Ser77, Asn80 (Cw1,3,7,8) ^{20, 21}
KIR2DL3	Inibitória	D ₁ -D ₂	HLA-Cw apresentando Ser77, Asn80 (Cw1,3,7,8) ^{20, 21}
KIR2DL4	Ativadora/ Inibitória	D ₀ -D ₂	HLA-G ²²
KIR2DL5	Inibitória	D ₀ -D ₂	Desconhecido, provavelmente HLA-G ²³
KIR2DS1	Ativadora	D ₁ -D ₂	HLA-Cw apresentando Asn77, Lys80 (Cw2,4,5,6,15) ^{20, 24}
KIR2DS2	Ativadora	D ₁ -D ₂	HLA-Cw apresentando Ser77, Asn80 (Cw1,3,7,8) ²⁵
KIR2DS3	Ativadora	D ₁ -D ₂	Desconhecido ¹⁷
KIR2DS4	Ativadora	D ₁ -D ₂	HLA-Cw4 ²⁶
KIR2DS5	Ativadora	D ₁ -D ₂	Desconhecido ¹⁷
KIR3DL1	Inibitória	D ₀ -D ₁ -D ₂	HLA-Bw4 ²⁷
KIR3DL2	Inibitória	D ₀ -D ₁ -D ₂	HLA-A*3, HLA-A*11 ^{17, 27}
KIR3DL3	Inibitória	D ₀ -D ₁ -D ₂	Desconhecido ¹⁷
KIR3DS1	Ativadora	D ₀ -D ₁ -D ₂	Desconhecido ^{17, 27}
<i>KIR2DP1</i>	Nenhuma (pseudogene)	D ₁ -D ₂	Nenhum ¹⁵
<i>KIR3DP1</i>	Nenhuma (pseudogene)	D ₀ -D ₁ -D ₂	Nenhum ¹⁵

FONTE: Autor

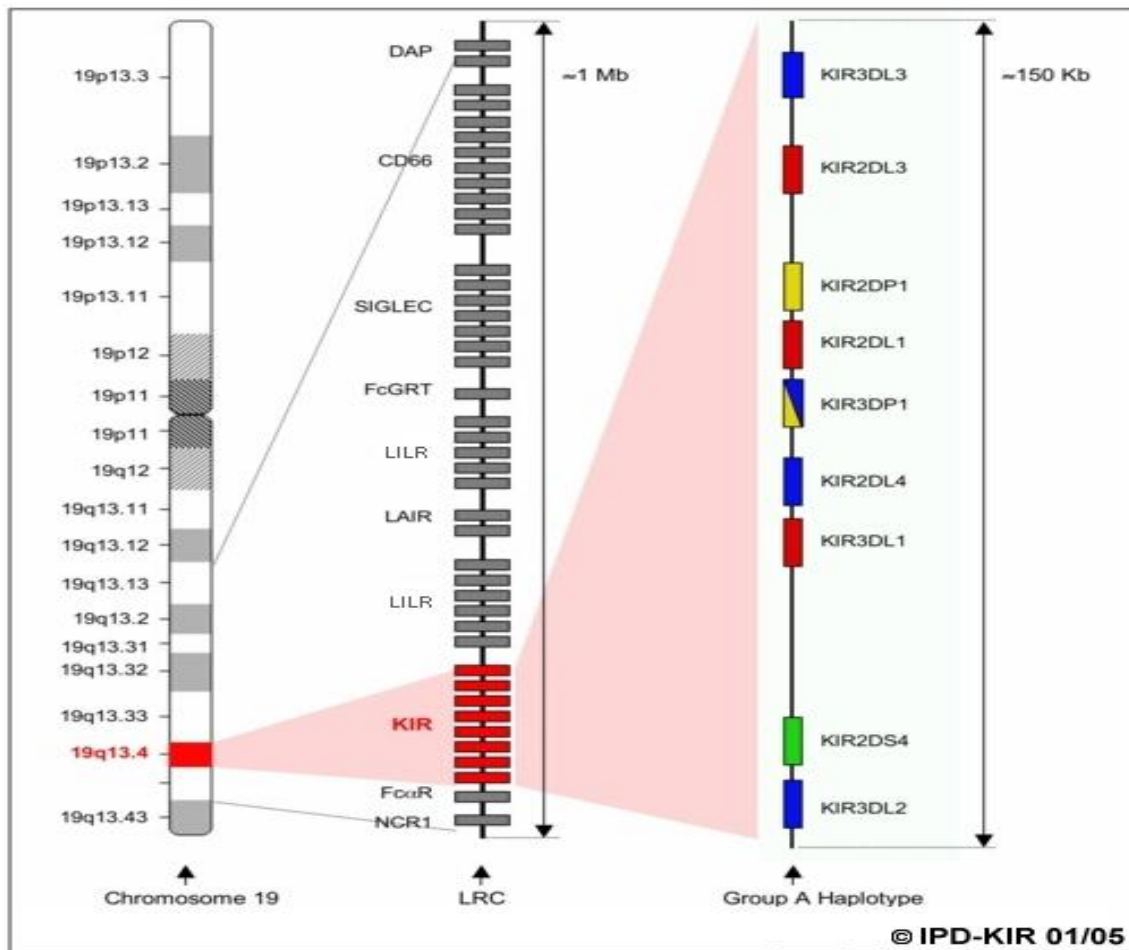
2.4 GENES *KIR*

Em humanos, os genes *KIR* codificam para glicoproteínas da superfamília das imunoglobulinas (COLONNA e SAMARIDIS, 1995; WAGTMANN *et al.*, 1995; D'ANDREA *et al.*, 1995), e estão localizados no cromossomo 19q13.4, dentro do Complexo de Receptores Leucocitários (LRC: *do inglês: Leukocyte Receptor Complex*) (DUPONT, SELVAKUMAR e STEFFENS, 1997), distribuídos em tandem através de 150 kb (FIGURA 4), com a característica de que o conteúdo gênico varia entre haplótipos (UHRBERG *et al.*, 1997). Nos humanos o número de locos de genes *KIR*,

assim como também o número de locos com produtos protéicos com função ativadora ou inibitória da citotoxicidade celular varia entre diferentes indivíduos. Por tanto a combinação do número de locos e a função das proteínas codificadas nesses locos que se encontram numa determinada pessoa é denominada repertório *KIR* ou “*KIR* profile” (UHRBERG *et al*, 2001).

Estudos realizados nos últimos anos têm revelado uma extensa diversidade dos múltiplos locos *KIR*, os quais são também multialélicos (UHRBERG *et al.*, 1997). Como consequência disso, existe uma baixa probabilidade de que duas pessoas escolhidas ao acaso tenham o mesmo genótipo *KIR* (SHILLING *et al.*, 2002). Além disso, os padrões de expressão dos genes *KIR* podem variar clonalmente, adicionando um outro nível de complexidade ao sistema (VALIANTE *et al.*, 1997).

FIGURA 4. LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DOS GENES *KIR* DENTRO DO *LRC*



Localização cromossômica do *LRC* (Complexo dos Receptores Leucocitários) destacando os genes *KIR* que se situam no cromossomo 19 (19q13.4). Dentro do *LRC*, encontram-se várias famílias gênicas, dentre elas estão: os LILRs (leukocyte Ig-like receptors); os ILTs (Ig-like transcripts); os KIRs (Killer-cell Ig-like Receptors); os GPVI (platelet collagen receptor glycoprotein VI); os receptores de IgA Fc, FCAR e NKp46; além dos LAIRs (Leukocyte-associated Ig-like Receptors) e dos genes das proteínas adaptadoras transmembrânicas DAP.

Fonte: Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/index.html> Acesso em: março de 2009

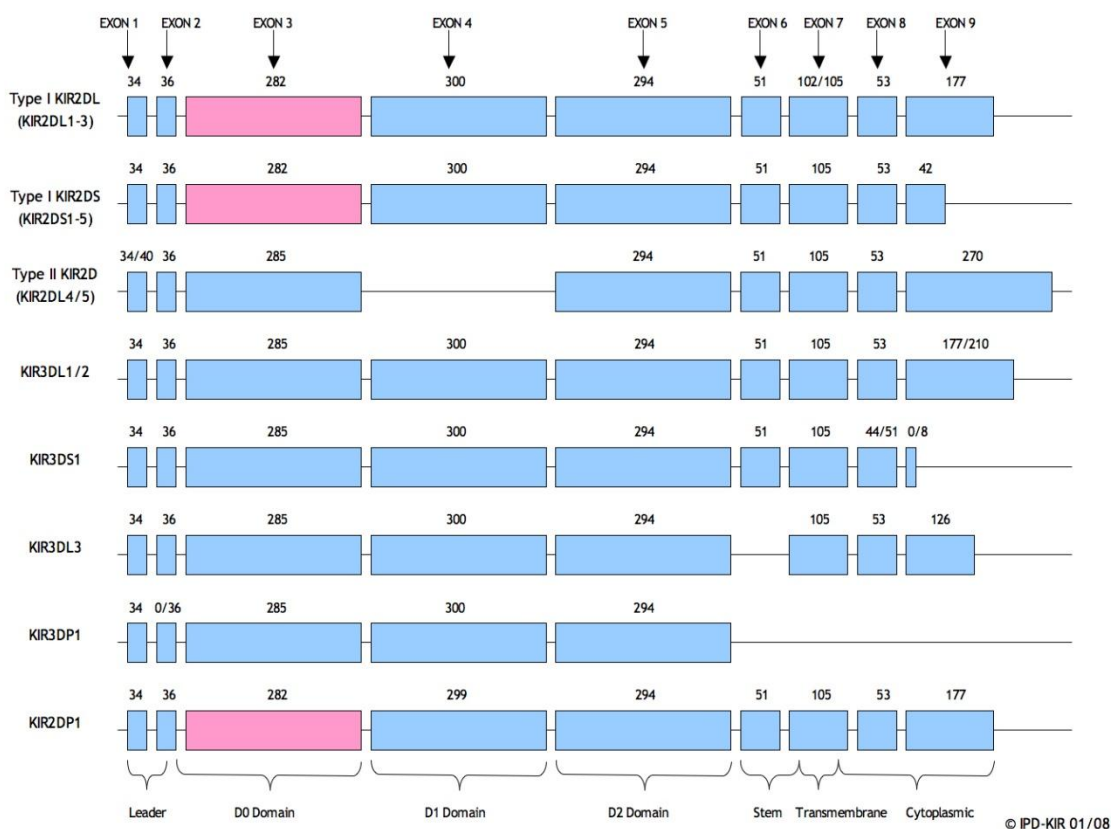
2.4.1 ESTRUTURA DOS GENES *KIR*

O arranjo estrutural da maioria dos genes *KIR* é consistente com a seguinte organização (WILSON, TORKAR e TROWSDALE, 1997) (FIGURA 5):

- A seqüência sinal ou líder é codificada pelos dois primeiros exons,
- Cada domínio Ig (D_0 , D_1 e D_2 , começando pelo extremo N-terminal) corresponde a um exon simples (exons 3-5, respectivamente),
- Os domínios de união e transmembrana são codificados, respectivamente, pelos exons 6 e 7,
- O domínio citoplasmático é codificado pelos dois exons finais.

Os genes *KIR* com dois domínios Ig são denominados de tipo 1, quando contêm o exon 3 como um pseudoexon, o que resulta num produto proteico *KIR* tipo 1 com dois domínios Ig que não contém o domínio D_0 (VILCHES e PARHAM, 2002; VILCHES, PANDO, PARHAM, 2000). Exemplos desta classe são os genes *KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, e todos os *KIR2DS*. Os genes *KIR* tipo 2, com dois domínios Ig, são caracterizados pela ausência do exon 4 (SELVAKUMAR *et al.*, 1997), em conseqüência, seus produtos protéicos não contêm o domínio D_1 . Exemplos desta classe são os genes *KIR2DL4* e *KIR2DL5*. Os três domínios Ig dos genes *KIR* “3D” são codificados pelos três exons D_0 , D_1 e D_2 (VILCHES e PARHAM, 2002). Um Exemplo desta classe é o gene *KIR3DL1*.

FIGURA 5. ORGANIZAÇÃO DOS GENES *KIR3DL* E DOS GENES *KIR2D* TIPO 1 E 2



Caixas azuis: exons; **Caixas cinza:** pseudoexons; **Líneas:** introns. Acima de cada exon encontra-se o comprimento da sua seqüência em pares de bases, embaixo a função do produto peptídico codificado por ele. **D₀**, **D₁** e **D₂** são domínios Ig extracelulares.

A maioria dos receptores KIR humanos apresentam dois domínios Ig e podem ser de dois tipos: tipo 1: Apresentam dois domínios homólogos aos domínios D₁ e D₂ do KIR3DL (o exon 3 é um pseudoexon); Tipo2: Apresentam dois domínios homólogos aos domínios D₀ e D₂ do KIR3DL (não apresentam exon 4). Um aspecto distintivo destes genes é que sua seqüência sinal (líder) hidrofóbica é codificada por 2 exons e que cada domínio Ig encontra-se num exon separado. O domínio de junção une os domínios Ig extracelulares ao domínio transmembrana.

Fonte: Disponível em <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/introduction.html#references>
Acesso em março de 2009

2.4.1.1 Genes *KIR2D* Tipo I

Neste grupo incluem-se os genes *KIR2DS1-5*, *KIR2DL1-3* e o pseudogene *KIR2DP1*. Estes genes possuem 8 exons, sendo o exon 3 não codificante (COLONNA & SAMARIDIS, 1985; WAGTMANN, *et al.*, 1995; VILCHES, *et al.*, 2000A e 2000B). Os genes *KIR2DL1* e *KIR2DL2* compartilham uma deleção comum no exon 7, o que os distingue dos demais genes *KIR*. Já os genes *KIR2DS1-5* e os *KIR2DL1-3* diferem entre si pelo comprimento de sua cauda citoplasmática codificada pelo exon 9.

Alguns alelos do gene *KIR2DS4* apresentam uma deleção de 22 pb, a qual resulta em uma molécula truncada, geralmente denominada KIR1D (MAXWELL *et al.*, 2002).

O gene *KIR2DS2* encontra-se associado com vasculite reumatoide (YEN *et al.*, 2001) e também ao igual que o gene *KIR2DS1* se encontra associado com artrite psoriática, quando seu ligante está ausente no indivíduo (MARTIN *et al.*, 2002a; 2002b).

2.4.1.2 Genes *KIR2D* Tipo II

Inclui os genes *KIR2DL4* e *KIR2DL5*, que possuem uma deleção característica do exon 4 e diferem do grupo *KIR2D* Tipo I pelo exon 3 ser codificante. O *KIR2DL4* tem o exon 1 cerca de 6 nucleotídeos maior do que o exon 1 dos demais *KIR*, além de possuir um códon iniciador diferente dos outros genes.

Existem dois locos do gene *KIR2DL5* dentro da região genômica *KIR*, o loco *KIR2DL5A* na posição telomérica e o loco *KIR2DL5B* na posição centromérica (GOMEZ-LOZANO *et al.*, 2002).

2.4.1.3 Genes *KIR3D*

Estes genes possuem os 9 exons e incluem os genes estruturalmente relacionados *KIR3DS1*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2* e *KIR3DL3*. Dentro deste grupo os 4 genes diferem no comprimento de sua região codificante da cauda citoplasmática no exon 9 (COLONNA & SAMARIDIS, 1985; DOHRING, *et al.*,

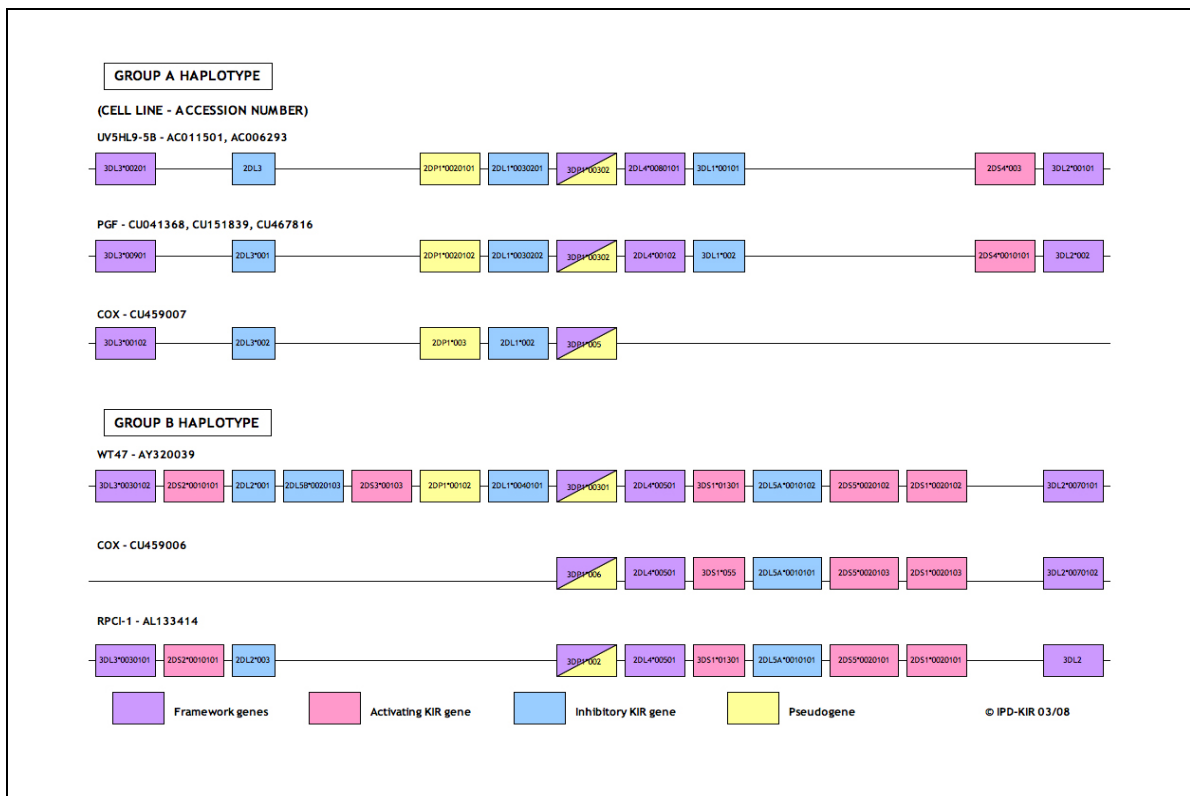
1996; TORRAR, *et al.*, 1998). Este comprimento da cauda citoplasmática pode variar de 23 resíduos de aminoácido (codificados por alguns alelos do gene *KIR3DS1*) até 96 resíduos (codificados por alelos do gene *KIR3DL2*). O gene *KIR3DS1* difere dos genes *KIR3DL1* e *KIR3DL2* apresentar uma seqüência mais curta do exon 8. Já o *KIR3DP1* difere dos demais por não possuir o exon 6. A mais notável característica de um gene *KIR* se refere ao gene *KIR3DP1*, cujo segmento gênico do exon 6 ao 9 foi deletado, e ocasionalmente também o exon 2 (VILCHES, *et al.*, 2000C).

2.4.2 ORDEM E VARIABILIDADE HAPLOTÍPICA DOS GENES *KIR*

Os genes *KIR* encontram-se situados dentro de um segmento de DNA que tem sofrido expansão e contração através do tempo, e das análises dos haplótipos *KIR* tem sido sugerido como explicação, eventos de sucessivas duplicações e permutação gênica desigual nessa região gênica (VILCHES e PARHAM, 2002). Cada um dos genes *KIR* contém entre 10 a 16 kb de comprimento com uma seqüência espaçadora de aproximadamente 2 kb entre cada um deles, exceto uma de 14 kb que se encontra em posição 5' do loco *KIR2DL4*. A variação no complexo gênico *KIR* encontra-se em função do polimorfismo alélico dos locos *KIR* e do número variável e tipos de genes presentes num determinado haplótipo (UHRBERG *et al.*, 1997; SHILLING *et al.*, 2002; SELVAKUMAR *et al.*, 1997). Os diferentes haplótipos *KIR*, então, se diferenciam pelo número e tipo de genes presentes, porém, os genes *KIR2DL4*, *KIR3DP1*, *KIR3DL2* e *KIR3DL3* acham-se presentes virtualmente em todos os haplótipos e foram, portanto, denominados locos constitucionais ("framework loci") (WILSON *et al.*, 2000). Todos os outros locos existem somente numa fração do acervo haplotípico total. O número de genes *KIR* presentes num haplótipo simples pode variar entre 7 e 12. Baseado no conteúdo gênico, os haplótipos podem ser divididos em dois conjuntos primários, denominados A e B, os quais foram originariamente diferenciados pela presença de um fragmento *HindIII* de 24 kb no análise de *Southern blot* (UHRBERG *et al.*, 1997). O haplótipo A contém só um gene *KIR* ativador, enquanto o haplótipo B contém aproximadamente seis e, além disso, apresenta uma maior variedade de subtipos (HSU *et al.*, 2002) (FIGURA 6).

Em relação à variabilidade da região promotora, observa-se que a maioria dos genes *KIR* compartilha >91% de similaridade da seqüência e devem, portanto, estar regulados por mecanismos similares. No caso dos locos *2DL4* e *3DL3*, existe uma maior divergência das seqüências promotoras (69% e 89% de similaridade, respectivamente), dando a entender mecanismos de regulação diferenciais (VALIANTE *et al.*, 1997).

FIGURA 6. REPRESENTAÇÃO DE ALGUNS HAPLÓTIPOS *KIR* A E B



Fonte: Disponível em <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/introduction.html#references>
 Acesso em março de 2009

2.5 GENE *KIR2DL4*

O receptor *KIR2DL4*, que tem como ligante (conhecido) a molécula HLA-G, combina estrutural e funcionalmente características de receptor inibidor e ativador (FAURE e LONG, 2002; SANTOURLIDIS *et al.*, 2002).

O repertório de receptores *KIR* funcionais de um indivíduo depende diretamente do complemento de genes *KIR* herdado e os genes *KIR* constitucionais (*KIR3DL3*, *KIR2DL4* e *KIR3DL2*) estão presentes em todos os haplótipos, porém cada linhagem clonal de célula NK expressa um subconjunto diferente de genes inibitórios e ativadores, podendo ir desde um até a totalidade dos genes *KIR* presentes no genótipo. Uma vez que a célula NK adquire a expressão de um conjunto de receptores *KIR* específico, esta expressão permanece estável em todos os clones NK da mesma linhagem através das divisões celulares (VALIANTE *et al.*, 1997; LANIER, 1998; TROMPETER *et al.*, 2005; UHRBERG, 2005). O receptor *KIR2DL4* é o único que apresenta expressão ubíqua em todas as células NK da maioria dos indivíduos (SELVAKUMAR, STEFFENS e DUPONT, 1996; VALIANTE *et al.*, 1997; SANTOURLIDIS *et al.*, 2002). Evidências sugerem que esta diferença no padrão de expressão está relacionada com a divergência existente entre a região promotora do gene *KIR2DL4* e a dos demais genes *KIR*.

É importante ressaltar a ausência em todos os genes *KIR*, de seqüências promotoras clássicas como são as caixas TATA e CAAT à montante, e que a exceção do gene *KIR2DL4*, existe uma alta homologia compartilhada (>91% de identidade nucleotídica) pelas regiões promotoras dos genes *KIR*. As atividades transcricionais destes promotores observaram-se muito similares, o que sugiere que estes genes são regulados de modos semelhantes. O promotor do gene *KIR2DL4* apresenta uma identidade nucleotídica significativamente menor (67%) e um poder transcricional maior em relação aos demais genes *KIR*, contando com mais e diferentes sítios de união a diversos fatores de transcrição (Nkx, AP-1, TCF-2, MYC-MAX, GATA-3, CREB e RUNX entre outros) e uma menor propensão a inativação epigenética por metilação do DNA (STEWART *et al.*, 2003; TROMPETER *et al.*, 2005).

Outra considerável diferença recai sobre o exon 1, que normalmente apresenta 34 pares de bases nos genes *KIR* com exceção do gene *KIR2DL4* que conta com 40 pares de bases nesta região. Estes seis nucleotídeos a mais constituem uma seqüência consenso de iniciação diferente às dos outros genes *KIR* denominada “seqüência de iniciação da transcrição Kozac” que tem como consenso “ACCATGG”, onde **ATG** é o códon de início da transcrição e foi identificada como a seqüência ótima para o início da tradução por parte dos ribossomos eucarióticos (uma vez transcrita no mRNA como ACCAUGG). Transcritos com seqüências consenso do tipo Kozac podem ter níveis de expressão 20 vezes maior que um transcrito semelhante que somente difere nesta seqüência consenso (KOZAC, 1986; SELVAKUMAR, STEFFENS e DUPONT, 1996).

Esta característica diferencial da molécula *KIR2DL4* poderia ser reflexo da grande importância fisiológica deste receptor.

Os alelos do gene *KIR2DL4* podem ser divididos em dois grupos dependendo o número de adeninas no final do éxon 6 que codifica o domínio transmembrânico, sendo um grupo com 10 adeninas que codifica o receptor completo o qual pode ser detectado na superfície da célula NK e o outro grupo com 9 adeninas, o que resulta numa alteração no marco de leitura que acaba gerando um códon de parada da tradução no quarto códon do éxon 7, codificador do primeiro domínio intracitoplasmático. Esta alteração daria lugar a uma proteína *KIR2DL4* secretada (GOODRIDGE *et al.*, 2007). Foi observado que somente as proteínas codificadas pelos alelos com 10 adeninas poderiam ser detectadas na superfície celular (GOODRIDGE *et al.*, 2003).. De qualquer modo a falta de *KIR2DL4* detectável na superfície celular não deve ser tomada como evidência de falta de função, dado que foi documentado que este receptor pode ser expresso constitutivamente dentro de vesículas endossomais onde seriam capazes de iniciar cascatas de transdução de sinais a partir do contato com moléculas de HLA-G solúvel endocitadas (RAJAGOPALAN *et al.*, 2006).

Até o momento foram descritos 25 alelos do gene *KIR2DL4*, nove deles apresentando 9 adeninas no exon 7.

2.6 NOMENCLATURA KIR

2.6.1 NOMENCLATURA DOS GENES *KIR*

Mais de 15 genes e 2 pseudogenes *KIR* foram identificados e dois sistemas de nomenclatura foram gerados. O sistema de nomenclatura da Human Genome Organization (HUGO) é o mais comumente utilizado e consiste em quatro subdivisões maiores, baseadas em duas características, a primeira é o número de domínios de imunoglobulina extracelulares (quando tem dois domínios Ig a molécula é designada como “2D” e quando tem três domínios é designada como “3D”). A segunda característica é a constituição do segmento citoplasmático, o qual pode ser longo (designado “L”) ou curto (designado “S”). Em seguida à nomenclatura descritiva, coloca-se o número que identifica o nome do gene ou proteína, por exemplo: o gene *KIR2DL1* é um loco *KIR* que codifica para dois domínios extracelulares de imunoglobulina (“2D”), um segmento citoplasmático longo (“L”) e é o primeiro loco *KIR* descrito (“1”) com essas características (PROW, HUGO) (TABELA 1). Com a finalidade de nomear os alelos dos genes KIR, o Comitê de Nomenclatura KIR designou depois do nome do gene, um asterisco como separador antes do código numérico que designará o alelo. Os três primeiros números deste código designam os alelos que diferem nas seqüências aminoacídicas das proteínas que codificam. Os dois números subseqüentes são utilizados para distinguir alelos que somente diferem entre si por uma ou mais mudanças sinônimas dentro da região codificante do gene (estas diferenças sinônimas não alteram as seqüências aminoacídicas das proteínas que codificam). Os dois últimos números têm a finalidade de distinguir alelos que somente diferem entre si por mudanças nucleotídicas (podendo ser estas tanto sinônimas quanto não sinônimas) na região promotora, intrônica ou outras regiões não codificantes da seqüência do gene (MARSH *et al.*, 2003) (FIGURA 7).

Também foram nomeados de acordo com o sistema de nomenclatura CD, como CD158a, CD158b, e assim por diante, baseado na ordem desde o centrômero até o telômero dos genes no cromossomo 19 (ANDRE *et al.*, 2001). Desafortunadamente, a nomenclatura do sistema CD não reflete a

estrutura, função, expressão ou localização e, além disso, apresenta confusão com os anticorpos monoclonais CD158a e CD158b. Por essas razões o sistema CD não é utilizado rotineiramente.

Mais de 100 seqüências nucleotídicas de genes *KIR* têm sido depositadas nos bancos de dados GenBank e EMBL.

FIGURA 7. NOMENCLATURA DOS GENES *KIR*



Nomenclatura adotada pelo HUGO (*Human Genome Organization*).

FONTE: Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/index.html> Acesso em: março de 2009

2.6.2 NOMENCLATURA DOS HAPLÓTIPOS *KIR*

Além do polimorfismo alélico, existe uma extensa variabilidade haplotípica devida ao diferente número e tipo de genes *KIR* que podem conformar um haplótipo. Esta importante diversidade levantou a necessidade, por parte do Comitê de Nomenclatura *KIR*, de compor um sistema de nomenclatura robusto e versátil que possa descrever claramente o conteúdo de genes *KIR* presentes nos diferentes haplótipos *KIR*. Foi sugerido que cada haplótipo *KIR* seja designado pela sigla “KH” seguida de um hífen e depois deste um único número de três dígitos, assinado seqüencialmente em decorrência dos diferentes haplótipos que fossem sendo descritos. Este sistema permitiria nomear até 999 haplótipos *KIR* (MARSH *et al.*, 2003).

Dois tipos de haplótipos *KIR* foram descritos em base ao conteúdo de genes que apresentam, e foram designados A e B. Não existe um critério

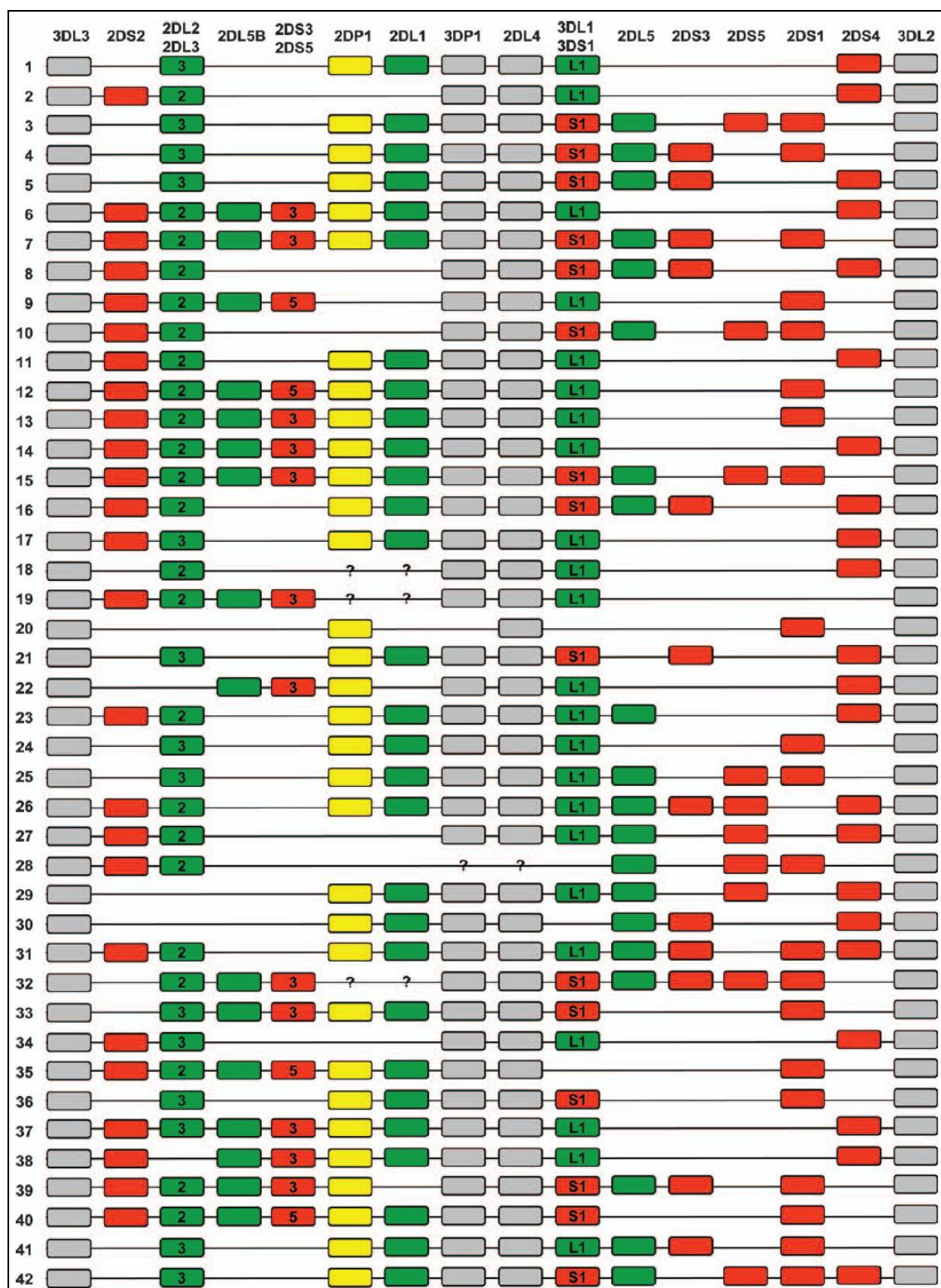
único específico que possa ser utilizado para distinguir todos os haplótipos. A e B e a definição funcional mais recente é a seguinte:

- Haplótipos do grupo B são caracterizados por um ou mais dos seguintes genes: *KIR2DL5*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5* e *KIR3DS1*.
- Contrariamente, os haplótipos do grupo A são caracterizados pela ausência de qualquer um dos genes mencionados acima.

Como consequência destas diferenças os haplótipos B contêm mais genes KIR ativadores que os haplótipos A. Diferentes investigadores tem aplicados critérios distintos para diferenciar os haplótipos A e B (UHRBERG *et al.*, 1997; HSU *et al.*, 2002). O Comitê de Nomenclatura KIR qualificou a divisão entre haplótipos A e B como útil e de grande significância biológica e médica e para estabelecer um conjunto de critérios lógicos para distingui-los propus, como parte da nomenclatura, que a letra A ou B poderia seguir o número de três dígitos já mencionado. Deste modo um haplótipo poderia ser chamado KH-001A ou KH-024B (MARSH *et al.*, 2003). Para complementar o nome do haplótipo e providenciar mais informação foi sugerido que após o nome de designação do haplótipo seja inserido um código binário de 17 dígitos que indicaria a presença ou a ausência dos genes no haplótipo. Cada dígito no código representa um determinado gene KIR diferente: o número “1” indica a presença do gene e o 0 a ausência do mesmo. Assim o nome completo de um haplótipo seria, por exemplo KH-001A-11100010011011011. Este sistema acomodaria o descobrimento de novos genes KIR mediante a incorporação de novos dígitos na seqüência numérica. Sempre que possível a ordem dos genes no código de nomenclatura refletirá a ordem deles no genoma. De todos modos quando mais dígitos sejam incorporados (para representar genes recentemente descobertos), serão colocados ao final do código, na ordem do seu descobrimento (MARSH *et al.*, 2003).

A nomenclatura para os haplótipos KIR até o momento não foi implementada. No presente trabalho será utilizada a nomenclatura haplotípica proposta por KAKHOO e CARRINGTON e os haplótipos descritos são mostrados na FIGURA 8 (KAKHOO e CARRINGTON; 2006).

FIGURA 8. NOMENCLATURA DOS HAPLÓTIPOS KIR UTILIZADA NO PRESENTE TRABALHO



Nomenclatura proposta por KAKHOO e CARRINGTON. Os números da esquerda indicam o código do respectivo haplótipo. FONTE: KAKHOO e CARRINGTON. KIR and disease: a model system or system of models? Immunological Reviews 2006 Vol. 214: 186–201

2.6.3 NOMENCLATURA DOS GENÓTIPOS *KIR*

O Comitê de Nomenclatura *KIR* recomendou a implementação de uma nomenclatura para designar os diferentes genótipos e sugeriu que cada genótipo *KIR* seja designado pela sigla “KG” seguida de um hífen e depois deste um único número de quatro dígitos, assinado seqüencialmente em decorrência dos diferentes genótipos que fossem sendo descritos. Este nome poderia opcionalmente ser seguido de um hífen e de um código binário de 17 dígitos que indicariam a presença (1) ou ausência (0) do genes *KIR* no genótipo, de modo semelhante ao indicado para nomear os haplótipos. Desta forma um genótipo *KIR* poderia ser escrito da seguinte forma: KG-0202-1110101101101111 (MARSH *et al.*, 2003).

A nomenclatura para os genótipos *KIR* até o momento não foi implementada. No presente trabalho os genótipos serão descritos como a combinação de haplótipos, utilizando a nomenclatura haplotípica proposta por KAKHOO e CARRINGTON e os haplótipos descritos são mostrados na FIGURA 8 (KAKHOO e CARRINGTON; 2006).

Dado que a maioria dos genes *KIR* podem estar presentes em alguns haplótipos e ausentes em outros torna-se difícil demonstrar pelas técnicas de tipificação convencionais, o estado de homozigose ou hemizigose dos diferentes genes *KIR* que constituem um genótipo, por tanto na prática o conceito de genótipo *KIR* é pouco aplicado sendo o mais utilizado o de “repertório *KIR*” (também chamado “perfil *KIR*”) o qual descreve a presença de todos os genes *KIR* observados num indivíduo, sem detalhar se estes locos *KIR* encontram-se em estado homozigótico (presentes nos dois cromossomos) ou hemizigótico (presente somente num dos dois cromossomos).

2.7 LIGANTES DOS RECEPTORES *KIR*: OS ANTÍGENOS LEUCOCITÁRIOS HUMANOS (HLA)

A identificação do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) na espécie humana ocorreu na década de 50, por Dausset, Payne e van Rood. (ABBAS & LICHTMAN, 2005). Estes autores descobriram que alguns

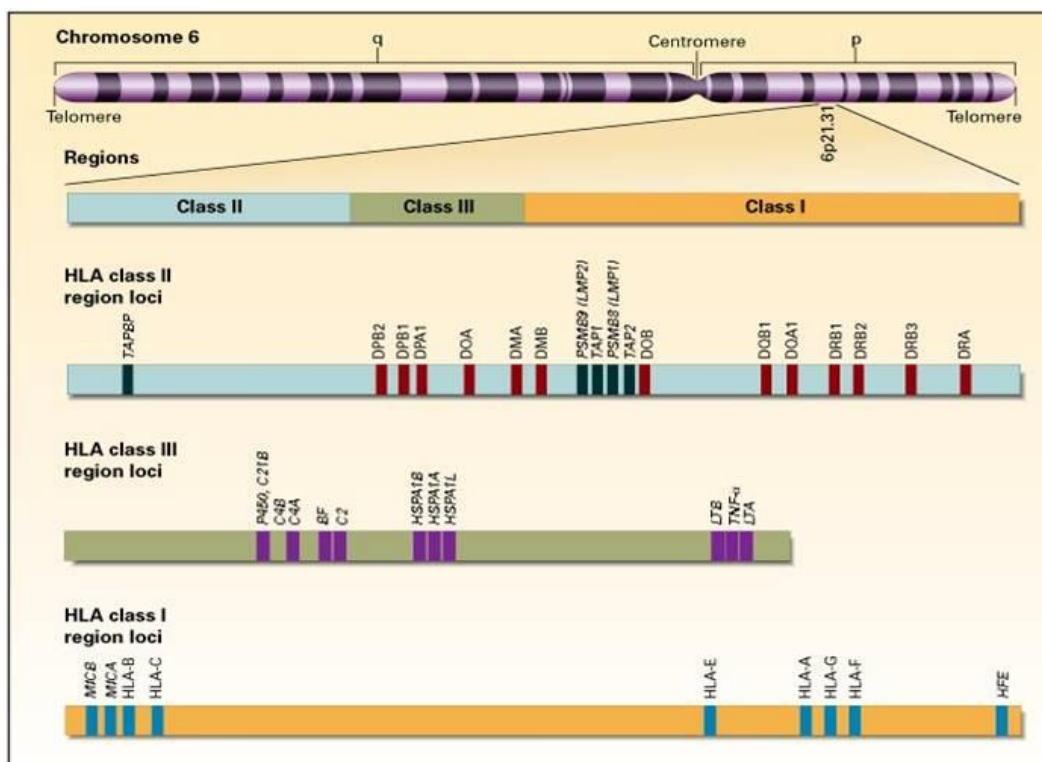
anticorpos, presentes no soro de indivíduos politransfundidos, eram reativos a antígenos presentes em leucócitos. Estudos genéticos relacionados às esses aloantígenos, bem como estudos sorológicos e moleculares realizados em *workshops* internacionais de histocompatibilidade, permitiram a identificação de vários locos gênicos polimórficos e polialélicos situados em uma região do braço curto do cromossomo 6 humano (6p21.31) (FIGURA 9). Essa região do genoma, foi subdividida em regiões de classe I, II e III (FIGURA 9) (LAMM *et al.*, 1985; BELL, 1989; CHRISTANSEN *et al.*, 1994) de acordo com a estrutura e função dos produtos dos genes nela situados. Estes genes codificam aloantígenos expressos na superfície de leucócitos, os quais receberam a designação de Antígenos Leucocitários Humanos (HLA) (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

Durante quase 20 anos após a descoberta do *MHC*, sua única função documentada foi a rejeição a transplantes, porém os transplantes sabidamente não são processos naturais dos organismos e, portanto, não havia nenhuma razão óbvia para que esse conjunto de genes fosse preservado no processo evolutivo. Nas décadas de 60 e 70 foi descoberto por Benacerraf que os genes do *MHC* eram fundamentais para todas as respostas imunológicas contra antígenos protéicos, uma vez que codificam moléculas MHC que têm habilidade de ligar e apresentar peptídeos derivados de várias proteínas antigênicas (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

Cada molécula HLA apresenta uma fenda (ou sulco) extracelular que se liga a peptídeos proteicos, seguido de um par de domínios tipo Imunoglobulina e é ancorada à membrana celular por regiões transmembrânicas e citoplasmáticas. As moléculas HLA são subdivididas em classe I e II (TABELA 2, FIGURA 10). As moléculas de classe I estão presentes em todas as células nucleadas e são heterodímeros constituídos de uma cadeia α (de 45 kD) composta por três domínios ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$) ligada de forma não covalente a uma molécula de β_2 -microglobulina, um polipeptídeo de 12 kD codificado por um gene localizado no cromossomo 15 (FIGURA 10.A). As proteínas de classe II são encontradas apenas em alguns poucos tipos celulares com a denominação comum de células apresentadoras de antígenos (APC), dos quais os mais importantes são as células B, macrófagos, células dendríticas e epitélio tímico (RAMMENSEE, BACHMANN

e STEVANOVIĆ, 1997). As moléculas de classe II são heterodímeros e por tanto consistem em duas cadeias polipeptídicas, uma cadeia α (32 a 34kDa), com domínios α_1 e α_2 e uma cadeia β (29 a 32kDa) que possui domínios β_1 e β_2 (FIGURA 10.B), sendo ambas codificadas por genes do *MHC-II* (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

FIGURA 9. LOCALIZAÇÃO E ESTRUTURA DO MHC HUMANO



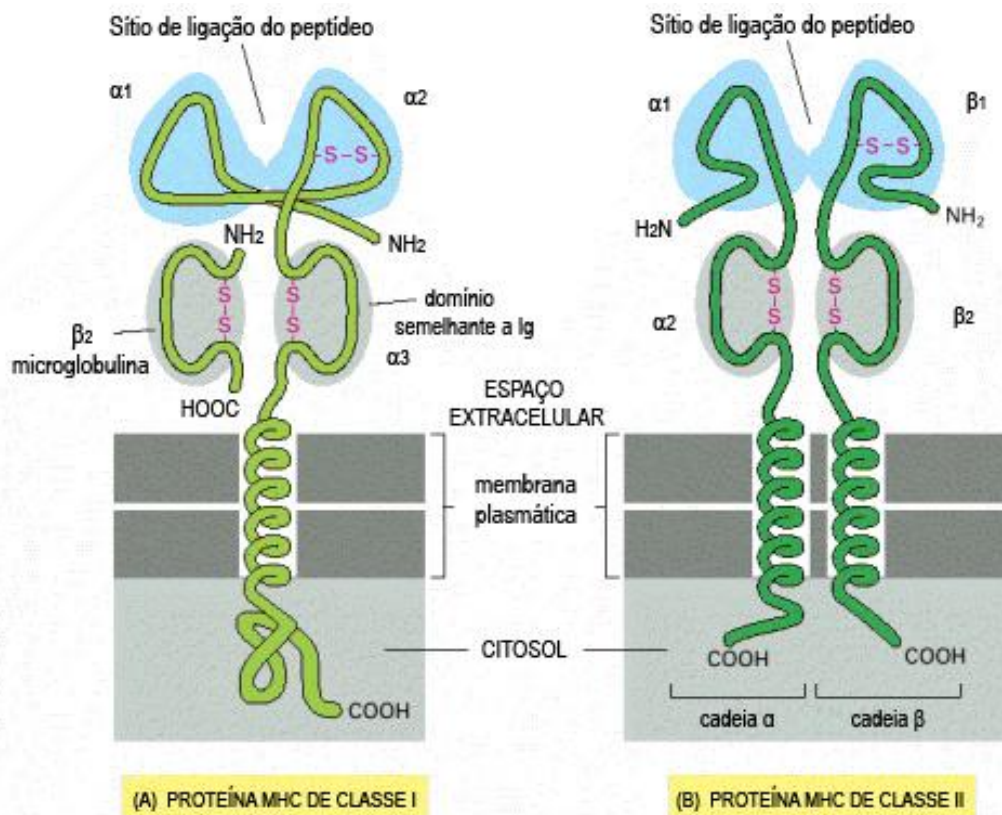
FONTE: Disponível em http://nejm.org/teaching_tools/jpegs_large/klei.fig1.jpg, acesso em Novembro de 2006)

TABELA 2. CARACTERÍSTICAS DAS MOLÉCULAS HLA DE CLASSE I E II

Característica	HLA de classe I	HLA de classe II
Cadeias polipeptídicas	α (44-47 kD) β_2 -microglobulina (12 kD)	α (32-34 kD) β (29-32 kD)
Localização de resíduos de Aác polimórficos	Domínios α_1 e α_2	Domínios β_1 e β_2
Local de ligação para co-receptores da célula T	A região α_3 liga CD8 (de linfócitos T CD8+)	A região β_2 liga CD4 (de linfócitos T CD4+)
Tamanho da fenda de ligação de peptídeos	Acomoda peptídeos com 8-11 Aác	Acomoda peptídeos com 10-30 Aác
Locos	HLA-A, HLA-B, HLA-Cw	HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP

Aác = aminoácidos

FIGURA 10. ESTRUTURA DAS MOLÉCULAS HLA DE CLASSE I E DE CLASSE II



(A) Proteína MHC de Classe I: Domínios α_1 , α_2 e α_3 da cadeia α , codificados por diferentes éxons. Cadeia polipeptídica β_2 -microglobulina não codificada pelo *MHC*, ligada não covalentemente à cadeia α . Ig = imunoglobulina. (B) Proteína MHC de Classe II: Domínios α_1 e α_2 da cadeia α e β_1 e β_2 da cadeia β . As duas cadeias são codificadas por genes do *MHC*.

FONTE: ALBERTS *et al.*, 2002.

2.7.1 NOMENCLATURA DOS GENES *HLA*

Cada alelo *HLA* é descrito com um sistema que compreende letras e números, contendo 4, 6 ou 8 dígitos. A extensão da designação do alelo é dependente de sua seqüência e de alelos com seqüências muito similares a sua. Todo os alelos recebem uma designação de pelo menos 4 dígitos. As designações com 6 ou 8 dígitos são utilizadas apenas quando é necessário para caracterizar a natureza e ou regiões na estrutura do gene onde estão

situadas as variantes nucleotídicas. A nomenclatura para genes do sistema *HLA* é apresentada na TABELA 3.

TABELA 3. NOMENCLATURA DOS GENES *HLA*

Nomenclatura	Significado
HLA	Prefixo para um gene HLA
HLA-Cw	Um loco particular do HLA, neste exemplo: Cw
HLA-Cw*01	Um grupo de alelos que codificam o antígeno Cw01
HLA-Cw*0101	Alelo específico do grupo 01 (ordenados conforme a seqüência do alelo foi determinada)
HLA-Cw*0102	Alelo que difere do anterior em regiões que modificam a seqüência de aminoácidos da proteína
HLA-Cw*010201	Alelo que difere por uma mutação sinônima do alelo anterior
HLA-Cw*01020101	Alelos que diferem em regiões não codificantes do anterior
HLA-Cw*0320N	Alelo nulo (não codificante)
HLA-A*3014L	Alelo que codifica uma proteína com uma significativamente baixa expressão na superfície celular
HLA-A*24020102L	Alelo que codifica uma proteína com uma significativamente baixa expressão na superfície celular, onde a mutação encontra-se fora da região codificante
HLA-B*44020102S	Alelo que codifica uma proteína que é expressa exclusivamente como molécula de secreção
HLA-Cw*0322Q	Um alelo que apresenta uma mutação que afeta significativamente sua expressão na superfície celular porém, esse fato não foi confirmado e sua expressão é questionável

*: separador entre a designação do loco e os dois primeiros dígitos.

FONTE: Disponível em: <http://www.anthonynolan.org.uk/HIG/lists/nomenlist.html>

Acesso em: agosto de 2008

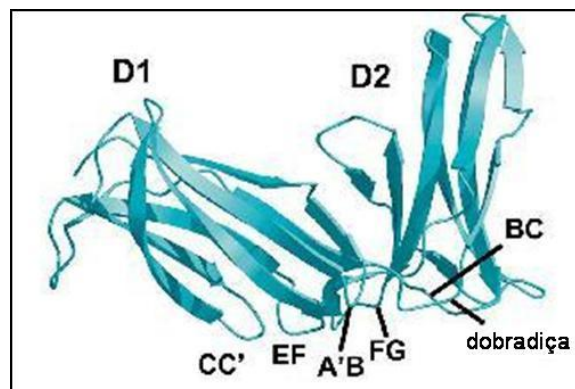
2.7.2 ESTRUTURA DOS COMPLEXOS KIR2D/HLA

O entendimento da estrutura e das relações entre ligantes HLA e os receptores KIR foi obtido com base em estudos de cristalografia das moléculas KIR2D livres (SNYDER *et al.*, 1999; FAN *et al.*, 2001; SAULQUIN *et al.*, 2003;). Contudo, nenhuma estrutura cristalográfica dos receptores KIR3D foi descrita (DENG & MARIUZZA, 2006).

As moléculas KIR2D são formadas por dois domínios N-terminais em tandem (D₁ e D₂), unidos por um conector de 3 a 5 aminoácidos (FIGURA 11).

Cada domínio é constituído por duas folhas β antiparalelas. A angulação entre estes dois domínios varia de 60 a 80 graus de acordo com a variação dos resíduos na interface D₁-D₂, nos diferentes receptores KIR2D (DENG & MARIUZZA, 2006). A interação entre as moléculas KIR2D e HLA de classe I ocorre via: domínios α_1 e α_2 das proteínas HLA de classe I, porções C-terminais do peptídeo ligado à fenda desta que entram em contato com os dois domínios D₁ e D₂ do receptor KIR2D. No complexo formado KIR2D-HLA de classe I, o eixo dos domínios D₁-D₂ da molécula KIR é aproximadamente ortogonal ao eixo do peptídeo ligado ao sulco formado pelas hélices α_1 e α_2 do HLA, alinhando assim o domínio D₁ com a hélice α_1 e o D₂ com a α_2 . Os KIR fazem contato com seus ligantes através de “*loops*” em sua região inter domínios (FIGURA 12).

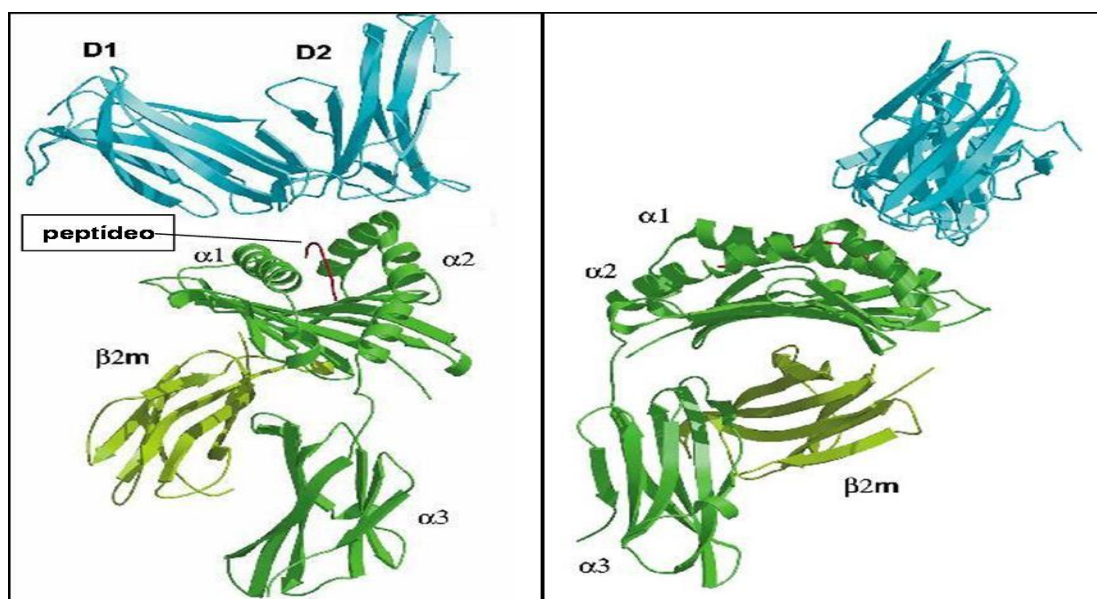
FIGURA 11. ESTRUTURA DA REGIÃO EXTRACELULAR DA MOLÉCULA KIR2D.



Estrutura dos domínios extracelulares D₁ e D₂ de um receptor KIR2D. CC', EF, A'B, FG e BC = “*loops*” que interagem com a molécula HLA.

FONTE: Modificado de BOYINGTON, J.C.; MOTYKA, S.A.; SCHUCK, P.; BROOKS, A.G.; SUN, P.D. Crystal structure of an NK cell immunoglobulin-like receptor in complex with its class I MHC ligand. *Nature* 405: 537-543; 2000.

FIGURA 12. INTERAÇÃO MOLECULAR ENTRE AS PROTEÍNAS KIR2D E HLA DE CLASSE I ESPECÍFICOS



Interação molecular entre receptores KIR2D e moléculas HLA-Cw. Azul = estrutura dos domínios tipo Ig (D₁ e D₂) da molécula KIR; verde = estrutura da molécula HLA de classe I (domínios α_1 , α_2 e α_3 , além da β_2 -microglobulina) HLA-Cw; vermelho = peptídeo na fenda da molécula HLA. FONTE: Modificado de BOYINGTON, J.C.; MOTYKA, S.A.; SCHUCK, P.; BROOKS, A.G.; SUN, P.D. Crystal structure of an NK cell immunoglobulin-like receptor in complex with its class I MHC ligand. *Nature* 405: 537-543; 2000.

2.7.2.1 Receptores KIR2D e seus ligantes HLA-Cw

Epítomos presentes nas moléculas HLA-Cw são os principais ligantes dos receptores KIR2D. Até o momento foi relatado que estas proteínas ligam-se a 3 receptores KIR inibidores e a 3 receptores ativadores (TABELA 1). As relações entre as moléculas HLA-Cw e os receptores KIR inibidores e ativadores são apresentadas na tabela 4.

Se os indivíduos forem molecularmente tipados para o loco *HLA-Cw*, faz-se necessária a conversão destes dados moleculares em dados sorológicos onde se pode prever a estrutura da proteína, a fim de se estabelecer a qual grupo (G1 ou G2) o indivíduo pertence. Tais conversões podem ser estabelecidas a partir da tabela 5.

TABELA 4. RECEPTORES KIR E SEUS LIGANTES HLA-Cw

Epítomos HLA-Cw			Receptores KIR	
			INIBIDORES	ATIVADORES
SER77 e ASN80	Cw1	Grupo1 (G1)	2DL2	2DS2
	Cw3			
	Cw7		2DL3	
	Cw8			
ASN77 e LYS80	Cw4	Grupo2 (G2)	2DL1	2DS4*
	Cw2			2DS1
	Cw5			
	Cw6			
	Cw15			

Relações entre receptores KIR e seus ligantes HLA-Cw. Os epítomos HLA-Cw estão reunidos em dois grupos distintos: Grupo 1 ou G1= a molécula HLA-Cw possui o aminoácido serina na posição 77 (SER-77) e asparagina na posição 80 (ASN-80) e Grupo 2 ou G2= onde a molécula possui o aminoácido asparagina na posição 77 (SER-77) e na lisina posição 80 (ASN-80).

*: O receptor KIR2DS4 somente liga com a molécula HLA-Cw4

TABELA 5. CONVERSÃO SOROLÓGICA DAS TIPAGENS MOLECULARES DE HLA-Cw

HLA-Cw	
Molecular (DNA)	Sorologia (Proteína)
Cw*01	Cw1
Cw*02	Cw2
Cw*03	Cw9(w3), Cw10(w3)
Cw*04	Cw4
Cw*05	Cw5
Cw*06	Cw6
Cw*07	Cw7
Cw*08	Cw8
Cw*12	indef
Cw*14	Cw1/indef
Cw*15	indef
Cw*16	indef
Cw*17	Cw7/indef
Cw*18	Cw6/indef

Nem todos os dados moleculares possuem dados sorológicos, sendo assim identificados por "indef".

2.7.2 HLA EXPRESSOS NA INTERFACE MATERNO-FETAL LIGANTES DOS RECEPTORES KIR

2.7.2.1 Genes *HLA - Cw*

O *HLA-Cw* é um gene HLA classe I clássico e contém 8 exons. O exon 1 codifica o peptídeo líder da proteína, os exons 2 e 3 os domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$, responsáveis pela fenda de ligação ao peptídeo. O domínio $\alpha 3$ é codificado pelo exon 4, e a região transmembrana pelo exon 5. Os exons 6 e 7 codificam a cauda citoplasmática. O polimorfismo dentro dos exons 2 e 3 é responsável pela especificidade de ligação ao peptídeo.

Precedendo a utilização da técnica de PCR na tipagem dos genes *HLA*, a tipagem por sorologia foi bastante empregada. Esta abordagem quando empregada para o *HLA-Cw* apresentava limitações de identificação de especificidades, um problema de superestimativa de *blanks* (um alelo indefinido gerado pela Maximização da Estimativa (EM)). Estas limitações da técnica impediram o real dimensionamento da diversidade do *HLA-Cw*. Contudo, com o desenvolvimento da PCR, o aumento progressivo da descoberta de alelos novos *HLA-Cw* ocorre na ordem de 312 alelos conhecidos até agosto de 2007 para 360 em agosto de 2008, de acordo com relatório disponível em <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/index.html> (FIGURA 13). Tal polimorfismo é amplamente aplicado nas diferentes áreas de estudo, em especial na área da Imunogenética de histocompatibilidade (BUHLER *et al.*, 2006).

FIGURA 13. NÚMERO DE ALELOS HLA-Cw E HLA-G CONHECIDOS ATÉ AGOSTO DE 2008.

Numbers of HLA Alleles							
HLA Class I Alleles							2,215
HLA Class II Alleles							986
HLA Alleles							3,201
Other non-HLA Alleles							105
Number of Confidential Alleles							8
HLA Class I							
Gene	A	B	C	E	F	G	
Alleles	673	1077	360	9	21	36	
Proteins	527	911	283	3	4	14	
Nulls	46	38	8	0	0	1	

No quadro vermelho destaca-se o número de alelos do *HLA-Cw*; no quadro azul destaca-se o número de alelos do *HLA-G*

FONTE: Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html> Acesso em agosto/2008

2.7.2.2 Gene *HLA-G*

O gene *HLA-G* faz parte do sistema gênico *HLA* de classe I e foi primeiramente descrito por GERAGHTY *et al.* (1987), quando realizavam uma análise de ADN genômico. Esta análise revelou genes similares aos bem conhecidos genes do CPH de Classe Ia (*HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-Cw*) (HUNT *et al.*, 2000). ELLIS e colaboradores (1986), já haviam observado uma molécula diferente de HLA de Classe I em seus estudos com células trofoblásticas que Geraghty descreveu e deu o nome de *HLA-6.0* (por estar localizado no interior de um fragmento de restrição gerado por Hind III, com 6.0 Kb). Somente em 1990 foi possível associar *HLA-6.0* como sendo *HLA-G*. Este loco apresenta um polimorfismo discreto de poucos alelos (36), quando comparado às moléculas HLA clássicas (FIGURA 13).

O gene *HLA-G* é composto por oito exons, sete introns e uma região 3' transcrita e não traduzida (3'UTR) que faz parte do exon 8. O exon 6 apresenta um códon de terminação que leva à produção de uma proteína truncada com a perda de 19 resíduos de aminoácidos que nas moléculas HLA clássicas são altamente conservados. A molécula *HLA-G* exibe um alto grau de similaridade com a molécula funcional *HLA-A2* (todas as posições

relevantes para interação com β 2-microglobulina - uma condição básica para a manutenção da conformação nativa das moléculas HLA classe I, são conservadas na seqüência *HLA-G* selvagem) (VAN DER VEN *et al.*, 2000).

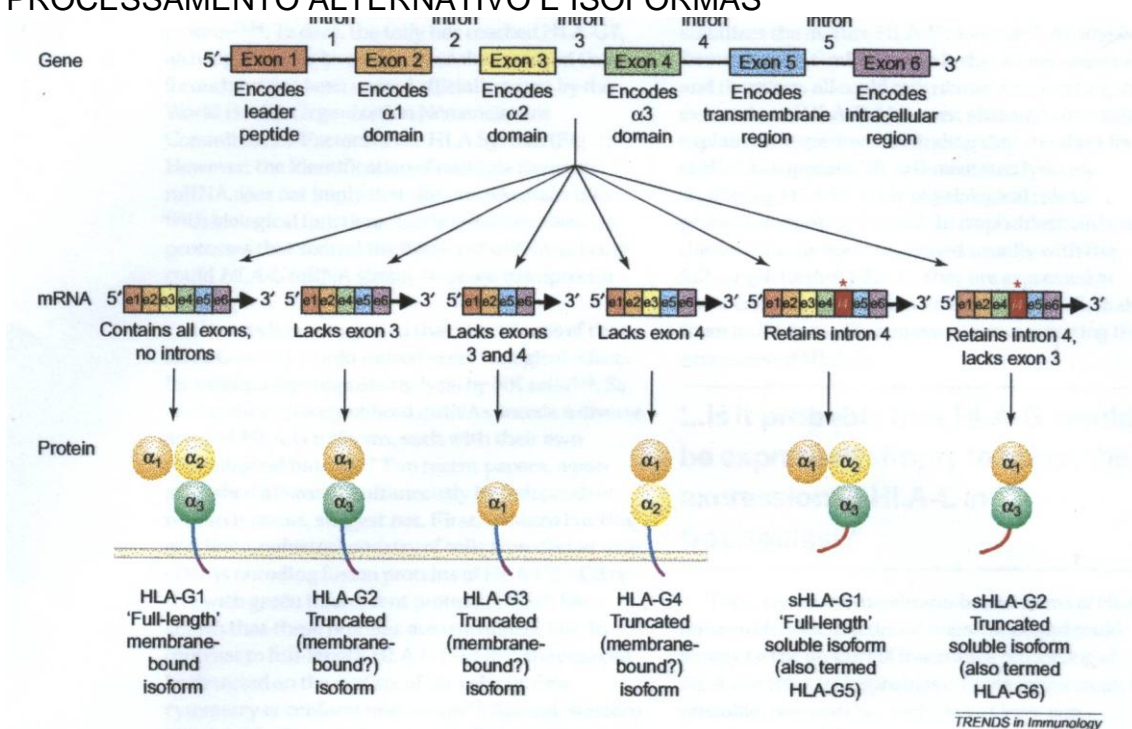
Uma das características dos transcritos primários de *HLA-G* é o processamento alternativo, responsável pela produção de sete isoformas de proteínas distintas. Quatro destas são ligadas à membranas (HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3 e HLA-G4) e outras três isoformas são proteínas solúveis (HLA-G5, HLA-G6 e HLA-G7; (FIGURA 14) (CAROSELLA *et al.*, 2001; BAINBRIDGE *et al.*, 2001; LILA *et al.*, 2002). Também foi observado que diferentes alelos *HLA-G*, embora não divergentes na composição de aminoácidos de suas regiões de ligação a antígenos, podem ser correlacionados com diferentes níveis de HLA-G1 solúvel no plasma (VAN DER VEN *et al.*, 2000). As formas solúveis HLA-G5 e HLA-G6 são devidas à tradução do intron 4, o qual contém um códon de parada, evitando a tradução das seqüências transmembrana e citoplasmática. Já a isoforma solúvel HLA-G7 é decorrente da retenção do intron 2 ao RNAm, produzindo uma molécula com 117 aminoácidos que contém apenas o domínio a1 da molécula ligado a 2 aminoácidos no terminal carboxila codificado pelo intron 2 (PAUL *et al.* 2000).

A presença de uma deleção (14pb) na região 3' UTR (exon 8) do gene *HLA-G* parece exercer influência na estabilidade do ARNm de *HLA-G*. Segundo ROUSSEAU *et al.*, (2004), a deleção e a seqüência de 14pb estão presentes em aproximadamente 58% e 42%, respectivamente, da população caucasiana. Segundo os mesmos autores, tal polimorfismo poderia ter conseqüências funcionais, estando associado a baixos níveis de transcrito de *HLA-G*.

O grupo de ROUSSEAU observou que alelos *HLA-G* que apresentavam a seqüência de 14pb (exon 8) sofriam um processamento alternativo (splicing) que removia 92pb da região 3'UTR, o que tornava a molécula mais estável e, portanto, mais resistente à degradação. Aparentemente, a seqüência de 14pb seria reconhecida pelo mecanismo de processamento como um ponto de clivagem. Em outra possibilidade, a seqüência de 14pb seria um elemento de controle acentuador de processamento (splicing), no qual a ligação de um transativador produziria um

padrão diferenciado de processamento. Portanto, patologias como o abortamento recorrente espontâneo poderiam estar associadas à deleção de 14pb na região 3'UTR do exon 8 presente em alguns alelos (ROUSSEAU *et al.*, 2004). Evidências recentes, obtidas a partir de um estudo feito em 150 indivíduos de origem chinesa, indicam que esta seqüência de 14pb estaria associada com a expressão de HLA-G solúvel dado que foi visto que tanto homens quanto mulheres com o genótipo homozigoto 14pb⁺/14pb⁺ apresentavam níveis de sHLA-G significativamente mais baixos que aqueles indivíduos com os genótipos 14pb⁻/14pb⁻ ($P=0,003$) e 14pb⁺/14pb⁻ ($P=0,004$). A diferença entre os genótipos 14⁻/14pb⁻ e 14pb⁺/14pb⁻ não foi estatisticamente significativa o que estaria indicando uma padrão de expressão codominante (CHEN *et al.*, 2008)

FIGURA 14. ORGANIZAÇÃO DE EXONS E INTRONS DO GENE *HLA-G*, PROCESSAMENTO ALTERNATIVO E ISOFORMAS



FONTE: BAINBRIDGE, 2001.

2.8 RECEPTORES KIR E SEUS LIGANTES HLA-Cw E HLA-G EM RELAÇÃO AO ABORTAMENTO ESPONTÂNEO RECORRENTE

2.8.1 RECEPTORES KIR E ABORTAMENTO ESPONTÂNEO RECORRENTE

As células NK compõem a população linfóide dominante na decídua desde os primeiros estágios da gravidez compreendendo aproximadamente o 70% da população leucocitária total presente na mucosa uterina (KING, BURROWS e LOKE, 1996; KING *et al.*, 1998). Sua presença em quantidades significativamente altas faz com que as células NK sejam consideradas cruciais na gravidez e no aborto, e seu contato direto com o trofoblasto as torna as principais células candidatas para montar uma resposta aloimune onde o feto é reconhecido como estranho e é rejeitado pelo sistema imune materno, (CLARK *et al.*, 1996; VARLA-LEFTHERIOTI, 2003).

Os ligantes da maioria dos receptores das células NK são as únicas moléculas HLA que se expressam no trofoblasto (HLA-Cw, -G, -E) (KING *et al.* 2000a; 2000b), e foi relatado que as interações destas moléculas com os receptores nas membrana das células NK uterinas estão estreitamente envolvidas com diversos mecanismos reguladores da reprodução como são o início da menstruação, o controle estrito do crescimento do trofoblasto durante o desenvolvimento da placenta (KUSUMI *et al.*, 2006), o mecanismo de aloreconhecimento do feto na gravidez (VARLA-LEFTHERIOTI, 2004), a implantação, a manutenção da decídua, a angiogénese do endométrio e a estabilidade vascular (LI *et al.*, 2001; MOFFETT-KING, 2002).

Estudos anteriores têm demonstrado também que mulheres com abortamento espontâneo recorrente apresentam números incrementados de células NK no útero (VASSILIADOU e BULMER, 1996; KWAK *et al.*, 1999). Do mesmo modo, detectou-se em camundongos com casos de reabsorção fetal um aumento de células NK na interface materno-fetal, e quando a atividade destas células NKs foi suprimida por meio da injeção de anticorpos anti-NK a reabsorção fetal foi significativamente reduzida (DE FOUQUEROLE e BAINES, 1987).

2.8.2 INTERAÇÃO KIR2D: HLA-Cw E ABORTAMENTO ESPONTÂNEO RECORRENTE

A única molécula altamente polimórfica expressa pelas células do trofoblasto é HLA-Cw, desde que HLA-E e HLA-G são relativamente pouco polimórficas, o que leva a formular a hipótese de que a interação KIR:HLA-Cw pode ser crítica no controle do desenvolvimento da placenta (TROWSDALE e MOFFET, 2008)

Devido a que tanto os genes *HLA-Cw* como *KIR* apresentam um importante grau de variabilidade, as combinações entre estes ligantes e receptores, em relação ao tecido embrionário e materno podem ser potencialmente diferentes em cada gravidez (CARRINGTON E NOMAN, 2003; PARHAM, 2005). Assim, para simplificar a interpretação destas interações pode ser útil agrupar os receptores KIR e seus ligantes HLA-Cw de acordo com as partes das suas seqüências que participam na interação. Deste modo, os receptores KIR com especificidade para ligar com as moléculas HLA-Cw pertencem todos à subfamília KIR2D (com dois domínios tipo Imunoglobulina) podendo estes ser subdivididos segundo sua função em ativadores e inibitórios. Da mesma forma, como foi visto na seção 3.7.2.1 as moléculas HLA-Cw podem ser divididas em dois subgrupos dependendo dos aminoácidos na posição 77 e 80, de esta forma define-se HLA-Cw do grupo 1 a aqueles que possuem um resíduo de serina na posição 77 e outro de asparagina na posição 80 e HLA-Cw de grupo 2 a aqueles que apresentam resíduos de asparagina na posição 77 e de lisina na posição 80 (TABELA 5) (MOESTA *et al.*, 2008)

Existem fortes argumentos que indicam um importante rol das moléculas HLA-Cw na gravidez, como é o fato de que as células uNK (as quais compõem a maior população de linfócitos na decídua) apresentam uma expressão aumentada de receptores KIR que tem como ligantes às moléculas HLA-Cw, quando comparadas com o padrão de expressão de receptores KIR das células NK do sangue periférico. Esta observação leva a propor a existência de um direcionamento do repertório KIR por parte das células uNK, em favor do reconhecimento do HLA-Cw (SHARKEY *et al.*, 2008). É destacável também, o fato de que nas células somáticas a molécula HLA-Cw

é relativamente instável e achada comumente em conformações pregadas em forma incompleta e associada a formas desestruturadas da β_2 -microglobulina, enquanto no trofoblasto a molécula é normalmente achada na sua conformação funcional e estável (APPS *et al.*, 2008). Juntas estas evidências são consistentes com a importância fisiológica da interação KIR:HLA-Cw na manutenção da vida do feto.

Adicionalmente estudos realizados em mulheres com pré-eclampsia observaram que esta afecção está associada a certa combinação de genes *KIR* maternos com genes *HLA-Cw* fetais sendo que foi visto uma frequência aumentada nas mulheres pacientes do genótipo KIR AA (este genótipo estaria conformado por dois haplótipos KIR A) combinado com *HLA-Cw* de grupo 2 no feto (HIBY *et al.*, 2004). Resultados similares foram obtidos num estudo de um pequeno grupo de casais com RSA onde tanto homem quanto a mulher apresentavam uma frequência elevada de *HLA-Cw* do grupo 2 (HIBY *et al.*, 2008). O mecanismo sugerido pelos autores destes trabalhos foi que como o haplótipo A apresenta como único KIR ativador o receptor KIR2DS4, quem tende a induzir a ativação das células NK quando ligado ao gene *HLA-Cw4* do grupo 1, a combinação do genótipo KIR AA materno com o *HLA-Cw* do grupo 2 fetais acaba deixando as células NK maternas carentes de sinais de ativação possivelmente necessárias para se contrapor e gerar um balanço frente à forte inibição causada pelo receptor KIR2DL1 presente no haplótipo A que interage com as moléculas *HLA-Cw* do grupo 2. Assim a ausência de sinais de ativação frente à presença de fortes sinais inibitórios das células NK no começo gravidez poderia ser prejudicial para o desenvolvimento da placenta (HIBY *et al.*, 2004; HIBY *et al.*, 2008; TROWSDALE e MOFFET, 2008).

Outras linhas de pesquisa observaram uma diminuição no número de genes *KIR* inibitórios (principalmente *KIR2DL1*, *KIR2DL2* e *KIR2DL3*) em mulheres com RSA quando comparadas com mulheres férteis (VARLA-LEFTHERIOTI *et al.*, 2003; YAMADA *et al.*, 2004; VARLA-LEFTHERIOTI *et al.*, 2005; FLORES *et al.*, 2007). Assim as células uNK destas pacientes seriam menos responsivas aos estímulos inibitórios provenientes de seus ligantes *HLA-Cw* e por tanto os sinais ativadores acabariam direcionando estas células para um estado ativo de citotoxicidade, que pode levar ao ataque dos

tecidos semi-alogénicos da interface materno-fetal resultando no abortamento.

2.8.3 HLA-G E ABORTAMENTO ESPONTÂNEO RECORRENTE

HLA-G possui uma limitada distribuição tecidual, apresentando pronunciada expressão nas células trofoblásticas da placenta durante o primeiro trimestre de gravidez (HVIID *et al.* 1997) e em outros locais considerados imunologicamente privilegiados, o que indica alta especialização e possível atuação em mecanismos de indução de tolerância (PFEIFFER *et al.*, 2000). São muitas as evidências que sugerem que a modulação da expressão das moléculas HLA-G poderia ser uma condição fundamental para uma gestação sem transtornos, o que estaria, em parte, associada à expressão em níveis elevados da molécula HLA-G solúvel (sHLA-G) (PFEIFFER *et al.* 2000; VINGANO *et al.* 2003). Segundo REBMANN *et al.* (1999), os alelos HLA-G*010103 e HLA-G*0105N estariam associados a baixos níveis de expressão de sHLA-G. O nível de HLA-G solúvel parece modular o perfil materno de citocinas. Baixos níveis são freqüentemente encontrados em conjunto com o perfil Th1 de citocinas: IL-2, TNF- α e IFN- γ (perfil inflamatório), e altos níveis parecem estar associados ao perfil Th2 de citocinas: IL-4, IL-5 e IL-10 (perfil inibidor de inflamação). As moléculas de HLA-G solúvel também poderiam ter uma função na regulação da angiogênese placentária ou poderiam agir como imunossupressores durante a gestação (LE BOUTEILLER; LEGRAND-ABRAVANEL; SOLIER, 2003). Há evidências que indicam que a presença de HLA-G solúvel secretado por embriões concebidos por fertilização *in vitro* está associada a uma maior taxa de gravidez e níveis reduzidos de HLA-G solúvel durante o começo da gestação estão correlacionados com uma maior incidência de pré-eclampsia (FUZZI *et al.*, 2002; YIE *et al.*, 2005; YIE, TAYLOR e LIBRACH, 2005). Estas evidências sugerem um importante papel no sucesso reprodutivo associado ao genótipo de inserção/deleção de 14 pares de bases no éxon 8 desta molécula, dado que se demonstrou relacionada com os níveis de HLA-G solúvel produzidos (CHEN *et al.*, 2008). Os resultados obtidos a partir dos estudos realizados para avaliar a existência de associação entre o

polimorfismo de *HLA-G* no éxon 8 e o RSA são controversos e somente um tem achado o genótipo 14pb⁺/14pb⁺ (baixo produtor de HLA-G solúvel segundo CHEN e colaboradores, 2008) associado ao RSA (HVIID *et al.*, 2004), outro tem identificado o genótipo 14pb⁻/14pb⁻ relacionado positivamente com o abortamento recorrente (HVIID *et al.*, 2002) e dois não tem evidenciado associação entre este polimorfismo e RSA (TRIPATHI *et al.*, 2004). Esta discrepância pode estar relacionada aos diferentes grupos étnicos dos indivíduos que compunham os grupos amostrais nos diferentes trabalhos, o que destaca a importância de que estes estudos sejam realizados nas populações brasileiras.

Contrastando com a expressão acentuada do HLA-G no trofoblasto, existe uma ausência quase total da expressão das moléculas HLA-A, HLA-B e classe II; este fato apresenta-se como aparentemente importante no mecanismo de tolerância imunológica materno-fetal (LE BOUTEILLER; LEGRAND-ABRAVANEL; SOLIER, 2003; VAN DER VEN *et al.*, 2000; GOBIN *et al.* 1999). ROUAS-FREISS *et al.* (1999) demonstraram, usando tecidos fetais e maternos frescos obtidos durante o primeiro trimestre de gravidez, o provável papel das moléculas HLA-G na proteção do feto contra a atividade lítica das células NK maternas do útero. Foram testadas seis combinações semi-alogênicas (células NK uterinas maternas e suas próprias contra-partes trofoblásticas) e 20 combinações alogênicas (células NK uterinas maternas e trofoblastos de diferentes origens maternas). Em todas as combinações, observou-se pronunciado efeito protetor da molécula HLA-G. Foi observado, também, que o tratamento dos trofoblastos com anticorpos monoclonais (W6/32), os quais se ligam e inativam as moléculas de HLA-G e HLA-Cw, removem o efeito protetor de lise por células NK. A hipótese do efeito protetor das células do feto contra a lise mediada por células NK maternas é apoiada no trabalho de VAN DER VEN *et al.* (2000). As células NK são componentes da resposta imune inata (mas estão em constante interação com a resposta imune adaptativa) e têm sua ação regulada através da interação com citocinas e outros fatores. As moléculas HLA-G parecem que interagem com o receptor KIR2DL4 das células NK, protegendo as células trofoblásticas (interface materno-fetal) contra a lise mediada por células NK que ocorreria devido à quase ausência da expressão de moléculas CPH de Classe I nessas

células (EMMER *et al.*, 1999; PAZMANY *et al.*, 1999; ROUSSEAU *et al.*, 2000; RAJAGOPALAN e LONG, 2000).

2.8.4 INTERAÇÃO KIR2DL4:HLA-G E ABORTAMENTO ESPONTÂNEO RECORRENTE

O receptor KIR2DL4 é o receptor específico da molécula HLA-G e é significativamente expresso nas células NK uterinas (uNK), principalmente durante o primeiro trimestre da gravidez e de forma importante porém, menos acentuada nas células uNK de placentas a termo, indicando que estas moléculas apresentam um rol chave na manutenção da imunidade materno-fetal (PONTE *et al.*, 1999; RAJAGOPALAN e LONG, 2000).

Em relação à modulação da citotoxicidade das células NK o receptor KIR2DL4 apresenta as características estruturais dos receptores inibidores e ativadores, o que levanta a questão de que tipo de sinais são transduzidos sob influência das diversas condições fisiológicas (BORREGO *et al.*, 2001). Foi observado, *in vitro*, que quando ligado à molécula HLA-G pode promover a produção de IFN- γ e a proliferação nas células uNK, o que *in vivo* poderia estar contribuindo à vascularização no sítio da implantação e a decidualização durante o começo da gravidez (VAN DER MEER *et al.*, 2004).

Em outro estudo recente observou-se que a taxa de transcrição de mRNA da molécula KIR2DL4 é semelhante em mulheres férteis e em mulheres com RSA porém, a taxa de expressão da molécula na superfície das células uNK é significativamente maior em mulheres férteis ($P < 0,01$) e o mecanismo sugerido pelos autores para explicar esta observação é que a frequência de alelos com 9 adeninas no final do éxon codificante do domínio transmembranico esteja aumentada nas mulheres com RSA dando como resultante uma expressão diminuída do receptor KIR2DL4 na superfície celular das células uNK maternas. Esta diferencia na expressão do receptor KIR2DL4 entre mulheres pacientes e controles poderia estar indicando uma importante função desta molécula no normal desenvolvimento da (YAN *et al.*, 2007). De forma não excludente, RAJAGOPALAN e colaboradores (2006) observaram que o receptor KIR2DL4 pode ser expresso constitutivamente dentro de vesículas endossomais capazes de endocitar moléculas de HLA-G

solúvel, secretadas naturalmente pelas células do trofoblasto. Este grupo de investigadores através de evidências indiretas conseguiram postular que interação entre o receptor KIR2DL4 e seu ligante HLA-G dentro de endosomas é capaz de ativar as células uNK para produzir um perfil de citocinas pro-angiogénico (TNF- α , IL-1 β e INF- γ) que induz as células trofoblásticas a produzir fatores estimulantes do crescimento endotelial que levam a uma remodelação e aumento dos vasos sanguíneos da decídua, necessários para um correto desenvolvimento da placenta (Rajagopalan *et al.*, 2006).

Não existem ainda na literatura trabalhos que tenham analisado o possível efeito do polimorfismo dos alelos dos genes *KIR2DL4* em relação ao RSA sendo o presente o primeiro trabalho em testar a existência de associação neste contexto.

3 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

- Estimar as frequências gênicas, haplotípicas e dos repertórios dos genes *KIR* em casais com aborto espontâneo recorrente idiopático e em casais controles férteis.
- Investigar a relação entre a variabilidade dos genes *KIR* pesquisados e a perda da gestação pelo aborto repetitivo através da análise de associação entre estes genes e a interrupção da gestação.
- Investigar a relação entre a variabilidade dos genes *KIR* pesquisados e dos seus ligantes *HLA-Cw* (expresso no trofoblasto) com a perda da gestação através da análise de associação.
- Investigar a relação entre as variáveis alélicas do gene *KIR2DL4* e de seu ligante *HLA-G* (expresso no trofoblasto) e a perda da gestação através da análise de associação.
- Inferir a respeito da influência dos genes *KIR* e sua provável relação com as interações necessárias para a implantação e desenvolvimento embrionário, examinando a possibilidade da existência de um sistema de aloreconhecimento do feto, mediado por receptores *KIR*.

O presente trabalho se justifica pelo fato de o assunto ter sido pouco investigado, sendo esta a primeira pesquisa a analisar a totalidade dos genes *KIR* conhecidos até o momento, os genes *HLA-Cw* e as variantes alélicas do gene *KIR2DL4* e *HLA-G* simultaneamente e investigar sua relação com Abortamento Espontâneo Recorrente. Não existem ainda na literatura trabalhos que tenham analisado o possível efeito do polimorfismo dos alelos dos genes *KIR2DL4* em relação ao RSA sendo o presente o primeiro trabalho em testar a existência de associação neste contexto.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Foi conduzido um estudo caso-controle, composto por 68 casais pacientes, com RSA idiopático, e 68 casais controle pareados.

A amostra paciente foi composta por 68 casais não aparentados, brasileiros euro-descendentes, com ancestralidade predominantemente caucasóide, que apresentaram aborto recorrente espontâneo de causa desconhecida (pelo menos três abortamentos espontâneos ocorridos até a vigésima semana do período gestacional). O número médio de abortos dos 68 casais foi de 3,43 (min=3; max=10 e o desvio padrão de 1,09) e a idade materna média de ocorrência dos abortos foi de 26,4 anos. Os casais não possuíam gestações bem sucedidas e os abortamentos foram caracterizados como de etiologia desconhecida, sendo excluídas causas citogenéticas, hormonais, anatômicas, doenças infecciosas e doenças auto-imunes. Esses casais foram atendidos na Unidade de Genética Médica e Reprodução Humana do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná e na clínica Genetika, na cidade de Curitiba, no período compreendido entre os anos de 1997 e 2005.

A amostra controle foi constituída por 80 casais devidamente pareados com a amostra paciente atendendo aos critérios de não pertencerem à mesma família, terem tido pelo menos duas gestações bem sucedidas e a termo e pertencerem ao mesmo grupo étnico, etário e mesmo nível sócio-econômico da amostra paciente.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas (Anexo 2), sendo que pacientes e controles assinaram um termo de consentimento informado (Anexo 1) para participação do estudo e para a coleta de amostras sanguíneas.

Com a finalidade de aumentar o número amostral de pacientes e controles disponíveis no LIGH desde o ano de 1996, foi realizado em 2007 um novo levantamento dos dados de casais com abortamento espontâneo de repetição, atendidos pela Clínica Genetika – Centro de Aconselhamento e Laboratório de Genética – conforme caracterização descrita anteriormente.

Esse levantamento resultou em uma lista de 106 casais com RSA, dos quais todos os residentes no estado do Paraná (85,9%) foram contactados para a certificação de que estavam realmente incluídos no grupo amostral desejado e para um convite de participação no presente estudo que se enquadra dentro do Projeto de Pesquisa “Detecção de Marcadores Moleculares Relevantes no Prognóstico e Aceitação do Alo-enxerto”.

Aproximadamente 60% desses casais foram eliminados da amostra paciente deste projeto, pelo fato de terem tido, pelo menos uma gravidez bem sucedida entre o tempo de coleta dos dados. Dentre os demais casais a maioria não concordou em participar do projeto por motivos pessoais, e 6 casais que atendiam aos critérios adotados para a amostra paciente concordaram em participar da pesquisa.

4.2 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Dez mililitros (10 ml) de sangue periférico foram coletados de cada indivíduo, através de punção venosa, em tubos estéreis tipo *vacutainer* com EDTA para coleta sangüínea. Essas amostras foram centrifugadas para obtenção da camada de leucócitos da qual foi extraído o DNA pela técnica de *salting-out* (LAHIRI e NURNBERGER, 1991).

4.2.1 CONCENTRAÇÃO DO DNA

A concentração de DNA das amostras foi medida pela leitura de densidade ótica, utilizando-se o espectrofotômetro Gene Quant^{pro} RNA/DNA calculator.

Para a tipificação dos genes *KIR* e *HLA-Cw* pela técnica PCR-SSO foi utilizada uma concentração de DNA de 50ng por ul. Para as análises de sequenciamento dos genes *HLA-G* e *KIR2DL4* foi utilizada uma concentração de DNA de 25ng por ul.

4.3 TIPAGEM DOS GENES *KIR* E *HLA-Cw* PELA TÉCNICA PCR-SSO MEDIANTE FLUORIMETRIA DE FLUXO

O método para tipificação dos genes *KIR* e *HLA-Cw* utilizado no presente estudo foi a PCR-SSOP (Reação em Cadeia da Polimerase Sonda Oligonucleotídica Seqüência Específica, do Inglês: *Polymerase Chain Reaction Sequence-Specific Oligonucleotide Probe*) empregando-se os “kits” *KIR SSO Genotyping Test* para tipificação dos genes *KIR* e “*LABType SSO Class I C Locus Typing Test*” para a tipificação dos genes *HLA-Cw*, ambos fabricados pela empresa One Lambda Inc. Para os genes *KIR* a amplificação do produto específico foi feita através de três pares de oligonucleotídeos iniciadores (*Primers*) específicos para os exons 3, 5 e 7 até o 9 (7-9) e para os genes *HLA-Cw* é utilizado somente um par de oligonucleotídeos iniciadores específicos para amplificar um fragmento de DNA que começa no códon 1 e se estende até o códon 190 da seqüência do loco. Tais oligonucleotídeos iniciadores estão presentes já no “*kit*” para tipagem de genes *KIR* da empresa fabricante. Para a realização da reação de amplificação foi utilizada a enzima Taq Platinum da empresa Invitrogen sendo que os demais reagentes da Mistura de Reação (dNTPs, tampão da enzima, cofatores da enzima) estão presentes no “*kit*” de tipagem. A realização da amplificação do segmento específico foi realizada no aparelho termociclador Perkin-Elmer 9600 e as condições de amplificação são mostradas na TABELA 6. Após a amplificação, o produto é aplicado em gel de agarose 2,5% e corado com brometo de etídio, com a finalidade de se verificar quais amostras tiveram seus produtos amplificados e quais amostras não.

TABELA 6. CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO PARA A REALIZAÇÃO DA PCR DOS GENES *KIR* E *HLA-Cw*.

N° DE CICLOS	TEMPERATURA	TEMPO
1 ciclo	96°C	3 minutos
5 ciclos	96°C	20 segundos
	60°C	20 segundos
	72°C	20 segundos
30 ciclos	96°C	10 segundos
	60°C	15 segundos
	72°C	20 segundos
1 ciclo	72°C	7 minutos
1 ciclo	4°C	∞

FONTE: ONE LAMBDA, INC. SSO Genotyping Test. Summary and explanation.

www.onelambda.com;http://24.199.4.200/pdf/files/productinserts/labtype_pi_PT.pdf. Acesso em março de 2009

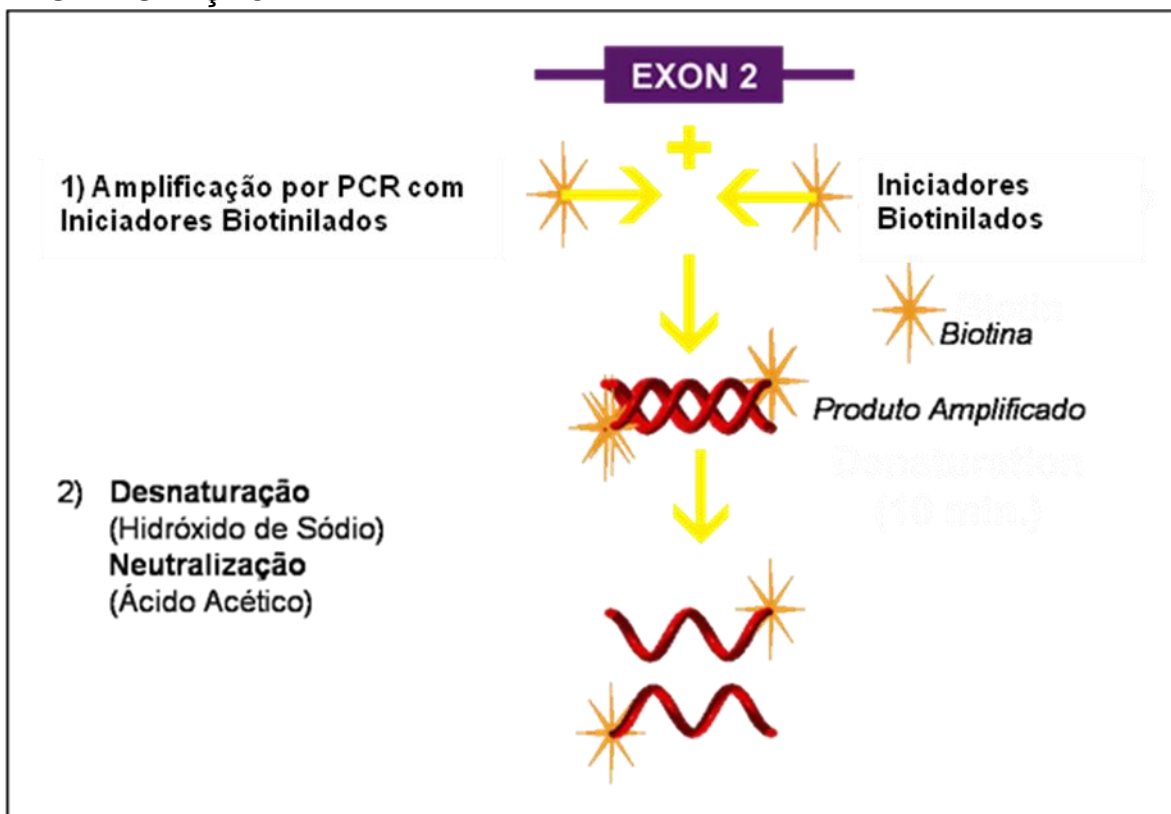
4.3.1 DESCRIÇÃO DA TÉCNICA PCR-SSOP

A técnica de PCR-SSOP baseia-se na desnaturação química da dupla fita de DNA do produto já amplificado com iniciadores marcados com Biotina (reagente fluorescente), seguida por neutralização química de ambas as fitas do DNA abertas e posterior hibridização com sondas oligo-específicas (FIGURA 15.). Tais sondas estão pré-conjugadas em micro-esferas (comumente chamadas pela denominação em inglês: “beads”), sendo que cada micro-esfera possui um tipo de sonda específico. Seguinte à hibridização, as sondas que hibridizaram são marcadas com um produto fluorescente, a SAPE (Estreptavidina conjugada com R-Ficoeritrina - *R-Phycoerythrin-conjugated Streptavidin*) (FIGURA 16). A leitura das micro-esferas marcadas é realizada com a ajuda de um fluorímetro de fluxo (LABScan 100TM), equipamento que através de laser na cor vermelha, comprimento de onda de 633nm, reconhece a cor da micro-esfera e outro laser verde, comprimento de onda 532nm, reconhece se esta micro-esfera está ou não marcada com SAPE, o que determinaria sua positividade. A

interpretação dos resultados é feita através do software *HLA VISUAL* Versão 2.0 (One Lambda) que analisa as combinações de sondas nas micro-esferas detectadas pelo aparelho, o qual consulta um banco de dados interno e sugere quais são os locos presentes. As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores e das sondas oligo-específicas ligadas nas micro-esferas assim como as concentrações dos reagentes utilizados para a tipagem dos genes *KIR* e *HLA-Cw* não são fornecidas pela One Lambda, Inc. Os volumes foram utilizados conforme metade do recomendado pela empresa, colaborando assim para uma substancial redução dos custos de tipagem por amostra.

Todos os procedimentos para seu uso foram realizados de acordo com as instruções do fabricante.

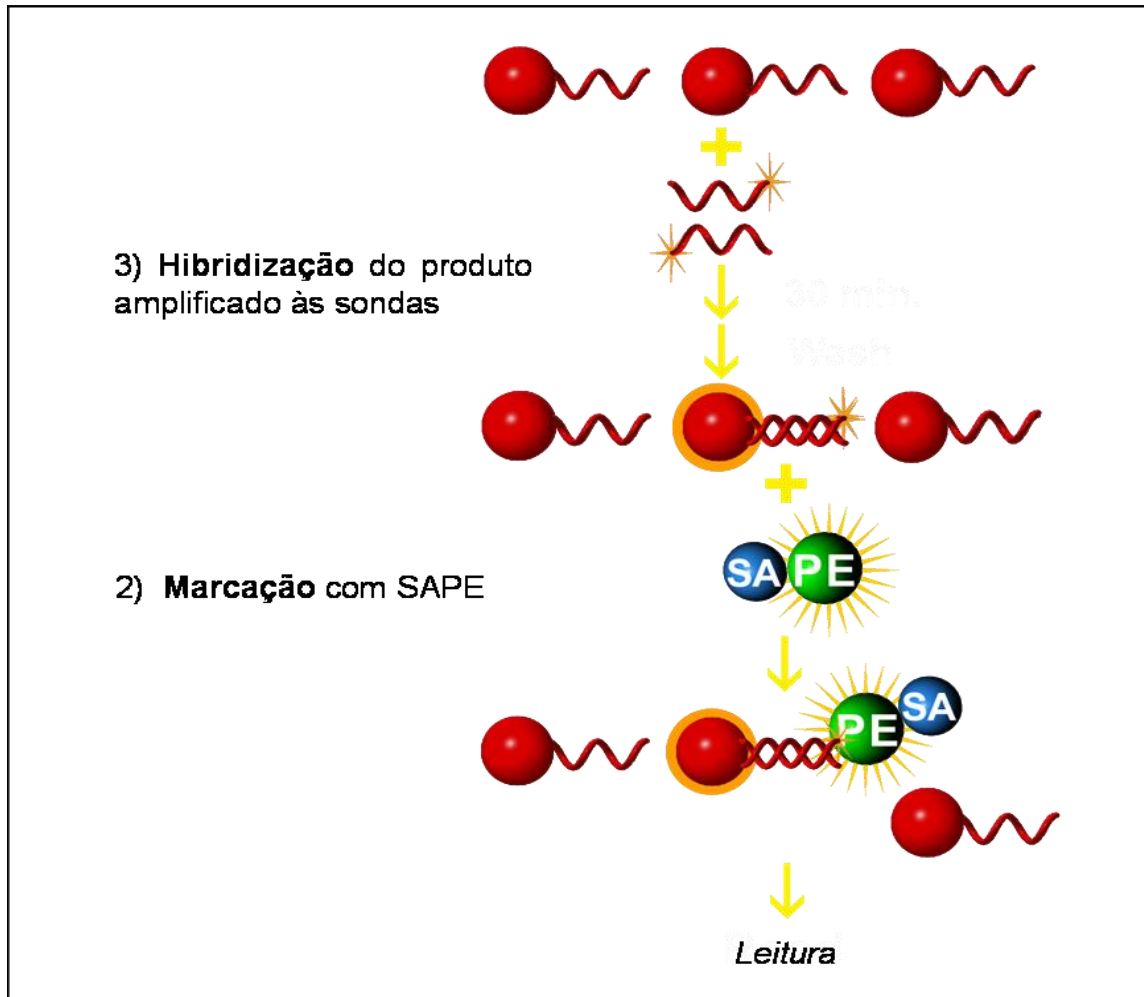
FIGURA 15. PRINCÍPIOS DA TÉCNICA PCR-SSOP: AMPLIFICAÇÃO E DESNATURAÇÃO



Princípios da técnica de tipagem PCR-SSOP. 1) Amplificação do produto desejado com pares de iniciadores marcados com Biotina (reagente fluorescente). 2) Desnaturação química (hidróxido de sódio) da dupla fita do produto amplificado e posterior neutralização também química (ácido acético) a fim de manter ambas as fitas

separadas. FONTE: www.onelambda.com; http://24.199.4.200/pdf/files/productsheets/L_Type_ps_r200711.pdf. Acesso em março de 2009

FIGURA 16. PRINCÍPIOS DA TÉCNICA PCR-SSOP: HIBRIDIZAÇÃO E MARCAÇÃO FLUORESCENTE



Princípios da técnica de tipagem PCR-SSOP. 3) Hibridização do produto amplificado às sondas (processo dependente de elevação de temperatura) ligadas às microesferas. 4) Amplificação do sinal fluorescente pelo reagente SAPE (Estreptavidina conjugada com R-Ficoeritrina).

FONTE: www.onelambda.com;

http://24.199.4.200/pdffiles/productsheets/LType_ps_r200711.pdf

Acesso em março de 2009

4.4 TIPAGEM DOS GENES *KIR2DL4* E *HLA-G* PELA TÉCNICA DE SEQUENCIAMENTO AUTOMATIZADO

Mediante o uso do seqüenciador automatizado ABI Prism 3130 da empresa Applied Biosystems® foram obtidas as seqüências nucleotídicas dos segmentos gênicos necessários para a caracterização alélica dos genes *KIR2DL4* das mulheres pacientes e controle e *HLA-G* de todos os indivíduos dos dois grupos. Para poder realizar este objetivo algumas etapas foram necessárias:

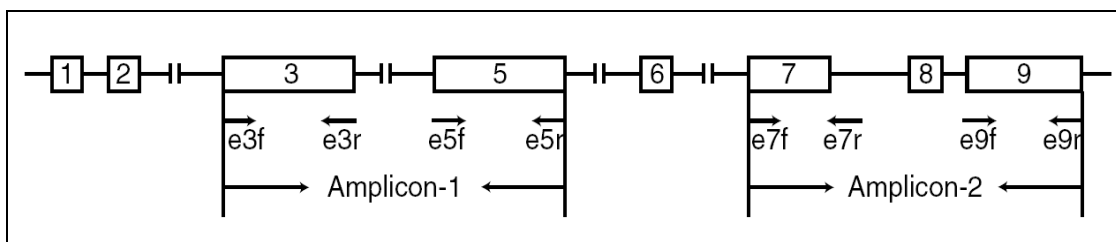
1) Amplificação dos éxons de interesse;

A partir de oligonucleotídeos iniciadores específicos para os éxons de interesse do gene *KIR2DL4* e do gene *HLA-G* foi feita a amplificação via PCR no aparelho termociclador TC-512 da marca Techne®.

Condições de amplificação para o gene *KIR2DL4*

As seqüências nucleotídicas de interesse do gene *KIR2DL4* foram amplificadas por PCR a partir de dois segmentos gênicos, o primeiro se estendendo desde o éxon 3 até o 5 e o segundo desde o éxon 7 até o 9, ambos incluindo as regiões intrônicas intermediárias (ZHU *et al.*, 2006) (FIGURA 17). Os oligonucleotídeos iniciadores, os componentes utilizados para realizar a PCR e as condições de ciclagem estão detalhados nas TABELAS 7, 8 e 9 respectivamente.

FIGURA 17. POSIÇÕES DE ANELAMENTO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DA AMPLIFICAÇÃO E DO SEQUENCIAMENTO



Esquema da região genômica do gene KIR2DL4. Em forma de caixas são mostrados os éxons numerados. As flechas indicam o sitio de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores e o sentido da polimerização. Na amplificação por PCR são gerados dois amplicons (flechas inferiores). Nas reações de seqüenciamento 4 oligonucleotídeos iniciadores anelam dentro de cada amplicon permitindo o sequenciamento das fitas de DNA codificante (5'→3') e molde (3'→5') dos éxons 3, 5, 7, 8 e 9 do gene (flechas superiores).

FONTE: ZHU, F., JIANG, K., LV, Q., HE, J. e YAN, L. Investigation of killer cell immunoglobulin-like receptor KIR2DL4 diversity by sequence-based typing in Chinese population. *Tissue Antigens*, Vol. 67, n. 3, p.214-221, 2006.

TABELA 7. OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO LOCO *KIR2DL4*

Iniciadores para amplificação dos segmentos dos éxons 3 a 5 e 7 a 9	
ÉXON 3-5	e3f' TGGTCAGGACAAGCCCTTCTGC e5r' TCCTCACCTGTGACAGAAACAG
ÉXON 7-9	e7f' CCTGCATGCTGTGATTAGGTA e9r' TCAGATTCCAGCTGCGGTAC
Iniciadores para sequenciamento	
ÉXON 3	Fita codificante: e3f' TGGTCAGGACAAGCCCTTCTGC Fita molde: e3r' CTGTGACCATGATCACCAGGG
ÉXON 5	Fita codificante: e5f' TATATGAGAAACCTTCGCTTA Fita molde: e5r' TCCTCACCTGTGACAGAAACAG
ÉXON 7	Fita codificante: e7f' CCTGCATGCTGTGATTAGGTA Fita molde: e7r' TCTGTGAGCTGAAGGCAGGGG
ÉXON 9	Fita codificante: e9f' TCAGGATTTCCCTCTCTCCAG Fita molde: e9r' TCAGATTCCAGCTGCGGTAC

TABELA 8. REAGENTES UTILIZADOS PARA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DO GENE *KIR2DL4*

Reagentes	Volume/Quantidade
DNA molde	750ng
Tampão Taq 10X	5,0µl
MgCl ₂ (50mM)	1,0µl
dATP (10mM)	0,2µl
dGTP (10mM)	0,2µl
dCTP (10mM)	0,2µl
dTTP (10mM)	0,2µl
Primer 5' (10µM)	1,0µl
Primer 3' (10µM)	1,0µl
Enzima <i>Taq polimerase</i>	0,2µl
Água ultrapura (18,2MΩcm)	q.s.p. 30µl

TABELA 9. CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO PARA A REALIZAÇÃO DA PCR DOS DOIS SEGMENTOS DO GENE *KIR2DL4*

N° DE CICLOS	TEMPERATURA	TEMPO
1 ciclo	95°C	5 minutos
35 ciclos	95°C	30 segundos
	63°C	30 segundos
	72°C	2'40" minutos
1 ciclo	72°C	5 minutos
1 ciclo	4°C	∞

Condições de amplificação para o gene *HLA-G*

Trabalhos anteriores em nosso laboratório analisaram o polimorfismo dos exons 2, 3 e 8 de *HLA-G* em 50 casais pacientes e 68 casais controle, estudados no presente trabalho (SARTURI, 2005). Portanto, os resultados destas tipagens foram obtidos do banco de dados do LIGH, apenas algumas amostras a mais foram analisadas, e amostras com ambiguidades foram esclarecidas pelo seqüenciamento do éxon 4. Os oligonucleotídeos iniciadores, os componentes utilizados para realizar a PCR e as condições de

ciclagem para os éxons 2, 3 e 4 estão detalhados nas TABELAS 10, 11 e 12 respectivamente.

TABELA 10. OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO LOCO *HLA-G*

Iniciadores para amplificação dos éxons 2, 3 e 4

ÉXON 2	G25S' TCCATGAGGTATTTTCAGCGC G23S' AGGTAATCCTTGCCATCGTA
ÉXON 3	G35S' CCCAGACCCTCTACCTGGGAGA G33S' CTCTCCTTGTGCTAGGCCAGGCTG
ÉXON 4	G45S' CCATGAGAGATGCAAAGTGCT G43S' TGCTTTCCCTAACAGACATGAT

Iniciadores para sequenciamento

ÉXON 2	Fita codificante: G25S' TCCATGAGGTATTTTCAGCGC Fita molde: G23S' AGGTAATCCTTGCCATCGTA
ÉXON 3	Fita codificante: G35SEK' GGTGGGTCCGGGCGAGGGCGAGGCT Fita molde: G33S' CTCTCCTTGTGCTAGGCCAGGCTG
ÉXON 4	Fita codificante: G45S' CCATGAGAGATGCAAAGTGCT Fita molde: G43S' TGCTTTCCCTAACAGACATGAT

Iniciadores para a deleção/inserção de 14-pb no éxon 8

ÉXON 8	G85S' GTGATGGGCTGTTTAAAGTGTCACC G83S' GGAAGGAATGCAGTTCAGCATGA
--------	--

TABELA 11. REAGENTES UTILIZADOS PARA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO

Reagentes	Volume/Quantidade
DNA molde	300ng
Tampão Taq 10X	5,0µl
MgCl ₂ (50mM)	1,0µl
dATP (10mM)	0,2µl
dGTP (10mM)	0,2µl
dCTP (10mM)	0,2µl
dTTP (10mM)	0,2µl
Primer 5' (10µM)	2,0µl
Primer 3' (10µM)	2,0µl
Enzima <i>Taq polimerase</i>	0,4µl
Água ultrapura (18,2MΩcm)	q.s.p. 50µl

TABELA 12. CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO PARA A REALIZAÇÃO DA PCR DO ÉXON 2 E 3 DO GENE HLA-G

N° DE CICLOS	TEMPERATURA	TEMPO
1 ciclo	96°C	3 minutos
35 ciclos	96°C	1 minuto
	64°C	1 minuto
	72°C	1 minuto
1 ciclo	72°C	10 minutos
1 ciclo	4°C	∞

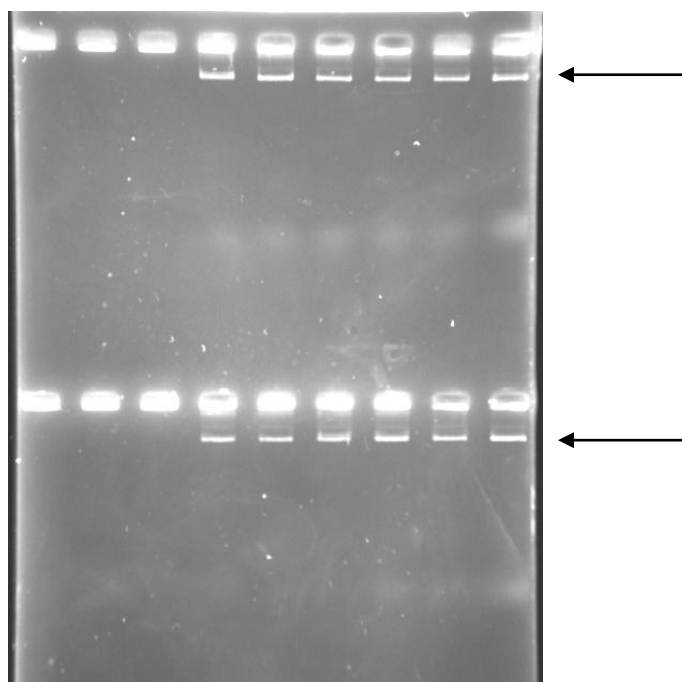
TABELA 13. CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO PARA A REALIZAÇÃO DA PCR DO ÉXON 4 DO GENE HLA-G

N° DE CICLOS	TEMPERATURA	TEMPO
1 ciclo	96°C	3 minutos
35 ciclos	96°C	1 minuto
	64°C	1 minuto
	72°C	1 minuto
1 ciclo	72°C	10 minutos
1 ciclo	4°C	∞

2) Controle da amplificação:

Antes de prosseguir com as etapas subsequentes que demandam o uso de equipamentos e reagentes custosos é importante realizar uma eletroforese em gel de agarose 2,5% durante 9 minutos a 150 Volts, 288 mAmperes e 93 Watts (FIGURA 18). De esta forma é verificado se a amplificação dos éxons de interesse foi bem sucedida para poder passar para a seguinte etapa.

FIGURA 18. ELETROFORESE CONFIRMATÓRIA DA AMPLIFICAÇÃO DOS SEGMENTOS GÊNICOS A SEREM SEQUENCIADOS



As flechas indicam as bandas do segmento amplificado com sucesso

3) Purificação do produto amplificado;

O objetivo desta etapa é a eliminação de primers não hibridizados, desoxi-nucleotídeos (dNTPs) não utilizados e resíduos de DNA de fita simples que possam ter sobrado ou se originado na reação de amplificação anterior dado que a presença destes elementos residuais comprometem a análise do seqüenciamento. Para isto os produtos de PCR obtidos foram purificados através do método enzimático utilizando as enzimas Exonuclease I (EXO I) e Fosfatase Alcalina de Camarão (SAP; *do inglês: Shrimp Alkaline Phosphatase*) da USB Corporation[®]. Esse método consiste na atividade nuclease da EXO I em degradar oligonucleotídeos simples fita e na atividade da SAP de desfosforilar nucleotídeos trifosfatos (dNTPs) não incorporados durante a reação de PCR. Essas enzimas têm atividade ótima na temperatura de 37°C e são desnaturadas a temperatura superior a 65°C por um tempo de 15 minutos. Os reagentes foram utilizados nas concentrações presentes na TABELA 14 e submetidos às condições de ciclagem presentes na TABELA 15 no termociclador TC-512 da marca Techne[®].

TABELA 14. REAGENTES UTILIZADOS NA ETAPA DE PURIFICAÇÃO

Reagentes	Volume/Quantidade
Produto de PCR	20µl
Tampão de Reação SAP 10X	2,0µl
EXO I (10U/µl)	2,0µl
SAP (1U/µl)	4,0µl

TABELA 15. CONDIÇÕES DE CICLAGEM UTILIZADAS NA ETAPA DE PURIFICAÇÃO

N° DE CICLOS	TEMPERATURA	TEMPO
1 ciclo	37°C	1 hora
1 ciclo	80°C	15 minutos

4) Reação de sequenciamento;

Durante a reação de sequenciamento, utiliza-se um único primer *forward* (5' - 3') ou *reverse* (3' - 5') adicionado ao BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, um kit comercial da empresa Applied Biosystems que contém desoxi-nucleotídeos (dNTPs), nucleotídeos terminadores ou di-desoxi-nucleotídeos (ddNTPs) marcados com fluorescência e a enzima DNA polimerase. O protocolo de sequenciamento é descrito na TABELA 16 e as condições de ciclagem para o gene *KIR2DL4* e *HLA-G* são mostradas nas TABELAS 17 e 18 respectivamente. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados em cada reação de seqüenciamento dos genes *KIR2DL4* e *HLA-G* são mostrados nas TABELAS 7 e 10 respectivamente.

Foi realizada então a reação de seqüenciamento, onde a partir do anelamento do primer, os nucleotídeos são incorporados de acordo com a fita molde. Ocorre tanto a incorporação dos nucleotídeos livres não marcados quanto os nucleotídeos marcados terminadores com fluorescência, onde cada tipo de nucleotídeo recebe uma fluorescência de cor diferente (por exemplo: **T**, **A**, **C**, **G**). Os nucleotídeos marcados são denominados de “nucleotídeos terminadores”, pois sua incorporação determina a finalização do alongamento da dupla fita (FIGURA 19). No final da reação são gerados fragmentos de vários tamanhos diferentes e conseqüentemente sobra de primers, ddNTPs, dNTPs, alguns sais entre outros reagentes. Sendo assim se faz necessário o próximo passo de precipitação.

TABELA 16. REAGENTES UTILIZADOS NA REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO

Reagentes	Volume/Quantidade
Terminator Ready Mix	3µl
Produto de PCR purificado	6µl
Primers específico (U ou L)	3,2pmol
Água (18,2MΩcm)	q.s.p. 10µl

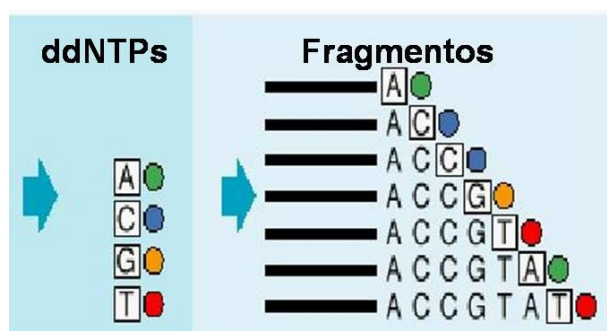
TABELA 17. CONDIÇÕES DE CICLAGEM UTILIZADAS NAS REAÇÕES DE SEQUENCIAMENTO DO GENE *KIR2DL4*

N° DE CICLOS	TEMPERATURA	TEMPO
1 ciclo	96°C	1 minuto
35 ciclos	96°C	15 segundos
	55°C	15 segundos
	60°C	4 minutos
1 ciclo	4°C	∞

TABELA 18. CONDIÇÕES DE CICLAGEM UTILIZADAS NAS REAÇÕES DE SEQUENCIAMENTO DO GENE *HLA-G*

N° DE CICLOS	TEMPERATURA	TEMPO
1 ciclo	95°C	1 minuto
35 ciclos	95°C	30 segundos
	63°C	30 segundos
	72°C	3 minutos
1 ciclo	72°C	5 minutos
1 ciclo	4°C	∞

FIGURA 19. FRAGMENTOS DE DIFERENTES TAMANHOS PRODUZIDOS PELA INCORPORAÇÃO DE ddNTPs.



4) Precipitação do DNA sequenciado;

esta etapa visa eliminar os resíduos da reação anterior aumentando a qualidade das seqüências produzidas. Para isto é utilizado a solução salina AcNoH da USB Corporation® e são realizados sucessivos passos de precipitação por centrifugação em diferentes concentrações de etanol.

O produto purificado foi ressuspendido em 15µl de formamida e desnaturado a 96°C por 8 minutos no termociclador TC-512® da Techne, seguido por choque térmico em freezer -80°C por 40 segundos.

5) Corrida em polímero;

Depois de purificado, o produto da reação de sequenciamento foi submetido a corrida eletroforética em capilar de 30 cm com polímero POP7 no seqüenciador automático ABI Prism 3130 da empresa Applied Biosystems. A detecção dos nucleotídeos é feita com auxílio de um laser que estimula a fluorescência dos nucleotídeos marcados (FIGURA 20) e esta é detectada por uma câmara. A partir deste ponto, os dados brutos obtidos com base nesta detecção dos nucleotídeos foram coletados pelo software Data Collection v.3.0 da Applied Biosystems que digitaliza a informação gerando arquivos de saída com extensão “ab1”.

FIGURA 20. ESTIMULAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DOS NUCLEOTÍDEOS MARCADOS (ddNTPs).

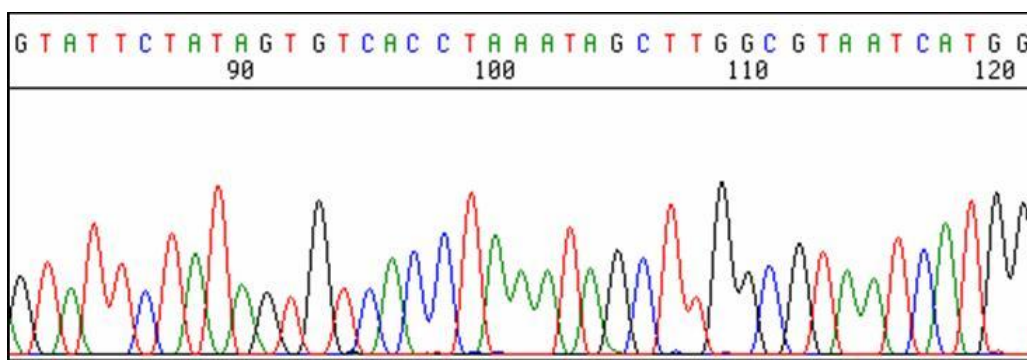


A) Visão geral do seqüenciador automático ABI Prism 3130; B) Estimulação da fluorescência por laser quando os fragmentos marcados atravessam a janela de detecção do capilar de corrida.

6) Caracterização das seqüência obtidas e tipagem dos genes de interesse;

Os dados coletados pelo programa Data Collection v.3.0. provenientes das reações de seqüenciamento foram gravados em CD e transferidos para o computador de análise. Em seguida, os arquivos de extensão “ab1” foram analisados pelo programa Sequencing Analysis v.5.2 da Applied Biosystems o qual gera os eletroferogramas a partir deles (FIGURA 21). Por fim, utilizou-se o programa Assign SBT Versão 3.5+ da Conexio Genomics Pty Ltd.[®] para a identificação alélica por pareamento das seqüências obtidas com as presentes na base de dados do IPD/IMGT/HLA (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>; acesso em março de 2009). As tipagens alélicas foram conferidas utilizando o software LIGH desenvolvido em nosso laboratório pelo Engenheiro Waldir A. da Silva e disponibilizado gratuitamente em <http://200.17.239.140/waldir/pesquisa/> (acesso em março de 2009).

FIGURA 21. ELETROFEROGRAMA GERADO PELO SEQUENCIADOR



4.5 ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO ÉXON 8 DE *HLA-G*

Com o objetivo de identificar a presença ou a deleção do fragmento de 14 pares de bases na região 3'UTR, após a diluição das amostras a 25ng/ul, realizou-se a amplificação do éxon 8 pela metodologia de PCR, utilizando dois oligonucleotídeos iniciadores, um para a posição 5' (G85S) e outro para a posição 3' (G83S) mostrados na TABELA 10. Os componentes utilizados para

realizar a PCR e as condições de ciclagem estão detalhados nas TABELAS 19 e 20.

TABELA 19. REAGENTES UTILIZADOS PARA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DO ÉXON 8 DO GENE *HLA-G*

Reagentes	Volume/Quantidade
DNA molde	300ng
Tampão Taq 10X	5,0µl
MgCl ₂ (50mM)	1,0µl
dATP (10mM)	0,2µl
dGTP (10mM)	0,2µl
dCTP (10mM)	0,2µl
dTTP (10mM)	0,2µl
Primer 5' (10µM)	2,0µl
Primer 3' (10µM)	2,0µl
Enzima <i>Taq polimerase</i>	0,4µl
Água ultrapura (18,2MΩcm)	q.s.p. 50µl

TABELA 20. CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO PARA A REALIZAÇÃO DA PCR DO ÉXON 8 DO GENE *HLA-G*

N° DE CICLOS	TEMPERATURA	TEMPO
1 ciclo	94°C	3 minutos
35 ciclos	94°C	30 segundos
	64°C	1 minuto
	72°C	2 minutos
1 ciclo	72°C	10 minutos
1 ciclo	4°C	∞

Os fragmentos de PCR obtidos para o exon 8 foram analisados por meio de corrida eletroforética em gel de agarose (Invitrogen, 2,5%) por 90V/1h e corados com brometo de etídio. Foram obtidos fragmentos com 210 e 224pb (amostra com deleção e amostra com ausência de deleção, respectivamente), como mostrado na FIGURA 22.

FIGURA 22. CORRIDA ELETROFORÉTICA DO ÉXON 8 DO GENE *HLA-G*



CN: Controle negativo (mix de PCR sem DNA); CP: Controle positivo; LADDER: Escala de referência de peso molecular expresso em pares de bases; NEG: Resultado negativo do CN; POS: Resultado positivo do CP; 14/14: Indivíduo homocigótico para a presença do fragmento de 14 pares de bases; del/del: Indivíduo homocigótico para a deleção do fragmento de 14 pares de bases; 14/del: Indivíduo heterocigótico para presença e deleção do fragmento de 14 pares de bases.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.6.1 ANÁLISE DAS FREQUÊNCIAS

4.6.1.1 Frequências gênicas, haplotípicas e genótípicas dos genes *KIR*

Dado que a maioria dos genes *KIR* podem estar presentes em alguns haplótipos e ausentes em outros torna-se difícil demonstrar pelas técnicas de tipificação convencionais, o estado de homocigose ou hemizigose dos diferentes genes *KIR* que constituem um genótipo. Assim as técnicas de análise mais comumente empregadas somente indicam a presença ou a ausência do gene *KIR*, e quando este está presente não conseguem discriminar se o gene se encontra no cromossomo materno e paterno (duas cópias por genótipo) ou simplesmente num deles (uma cópia por genótipo). Devido a esta complicação conseqüente da natureza biológica dos genes *KIR*, para poder estimar as frequências gênicas, primeiramente assumiu-se

que as freqüências observadas seguem as proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

O método empregado para se calcular a freqüência gênica foi através da fórmula de Bernstein, onde: freqüência gênica = $1 - \sqrt{1-f}$, sendo f a freqüência da presença do gene observada. Se fez necessário pré-assumir que as freqüências se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg dado que a técnica empregada para a tipificação dos genes *KIR* não consegue distinguir entre um indivíduo homozigoto para a presença de um mesmo loco daquele hemizigótico para a presença desse loco.

Esta estimativa das freqüências dos genes *KIR* tem como objetivo aprimorar descritivamente as amostras. Nas comparações entre as amostras paciente e controle foram utilizadas as freqüências observadas para cada gene. Se por um lado, tal estratégia metodológica possa ser menos informativa no que diz respeito às freqüências do gene, os resultados são mais precisos considerando-se que evidencia-se melhor o efeito da presença desse gene, sem introduzir o erro proveniente do artifício do pressuposto das freqüências estarem em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

As freqüências haplotípicas e genotípicas foram calculadas utilizando o software HAPLO-IHP (YOO *et al.*, 2007) que infere os haplótipos de indivíduos não relacionados utilizando como referência tanto haplótipos identificados e padrões haplotípicos obtidos a partir de estudos prévios.

4.6.1.2 Freqüências alélicas dos genes *HLA-C*, *HLA-G* e *KIR2DL4*

Os resultados da tipagem de cada um dos indivíduos, obtidos por contagem direta, serão inseridos no programa estatístico ARLEQUIN v.2000 (SCHNEIDER *et al.*, 2000) com a finalidade de avaliar a condição de equilíbrio de Hardy-Weinberg (utilizando o método de GUO e THOMPSON, 1992).

4.6.2 ANÁLISES COMPARATIVAS

Uma vez obtidos as freqüências dos genes estudados no grupo de casais pacientes e no grupo controle foram realizadas as análises comparativas ou de associação entre as diferentes amostras segundo

diversas abordagens para avaliar a existência de associação entre a distribuição dos genes e RSA.

Todas as comparações foram realizadas através do uso do teste exato de Fisher bilateral em tabelas de contingência 2x2 mediante o uso do programa do programa BioEstat – Aplicações Estatísticas nas áreas das Ciências Biomédicas (AYRES *et al.*, 2005).

As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas (indicando associação) nos casos em que $p \leq 0,05$. Nos casos em que a diferença entre as freqüências gênicas de pacientes e controles apresentou significância estatística, foi calculado “Odds Ratio” (“OR” ou razão de probabilidades) através da fórmula $OR = (A \times D) / (B \times C)$ (WOLF, 1955), sendo os valores A, B, C e D obtidos da tabela:

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

O valor desta OR, em análises de associação, é tomado como sinônimo do valor de risco relativo (RR), que exprime quantas vezes a característica é mais freqüente entre os portadores de um determinado fator comparando com indivíduos sem o fator (SVEJGAARD *et al.*, 1974).

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

Valores de OR acima de 1 indicam que o fator está associado a uma maior probabilidade de se desenvolver a afecção; valores abaixo de 1, a uma menor probabilidade.

4.6.2.1 Comparação dos genes, haplótipos, genótipos e repertórios *KIR*

Em relação aos genes e haplótipos *KIR* foram feitas comparações de pacientes versus controles das freqüências observadas de cada gene. As comparações foram também realizadas entre grupos amostrais estratificados, tais como: somente as mulheres, somente os homens, homens e mulheres ou

o conjunto amostral completo. As comparações dos genótipos e também dos haplótipos foram feitas agrupando-os segundo o conteúdo de genes nas categorias A e B.

Em relação aos repertórios, estes foram agrupados segundo o conteúdo de genes *KIR* inibitórios e ativadores gerando três categorias para cada um destes tipos de genes:

***KIR* Inibitórios:**

- Conteúdo elevado de genes *KIR* inibitórios: Repertórios com 7 genes *KIR* inibitórios.
- Conteúdo intermediário de genes *KIR* inibitórios: Repertórios com 5 ou 6 genes *KIR* inibitórios.
- Conteúdo baixo de genes *KIR* inibitórios: Repertórios com até 4 genes *KIR* inibitórios.

***KIR* ativadores:**

- Conteúdo elevado de genes *KIR* ativadores: Repertórios com mais de 5 genes *KIR* ativadores.
- Conteúdo intermediário de genes *KIR* ativadores: Repertórios com 2 ou 3 genes *KIR* ativadores.
- Conteúdo baixo de genes *KIR* ativadores: Repertórios com 1 gene *KIR* ativador.

As frequências destas categorias foram comparadas entre as mulheres pacientes e controles.

Muitos receptores *KIR* até o momento não apresentam ligantes conhecidos, por esta razão seria interessante considerar que potenciais ligantes paternos destas moléculas poderiam estar sendo expressos nos tecidos fetais, e no momento de entrar em contato com as células NK maternas (as quais apresentam um perfil de receptores *KIR* diferente do paterno), direcionariam a resposta das células NK para um estado de ativação ou de tolerância. Assim, para avaliar a possibilidade de existência de um sistema de alorreconhecimento fetal independente dos ligantes HLA

analisados no presente trabalho, os casais pacientes e controles foram comparados uma vez estratificados da seguinte forma dependente da identidade dos repertórios *KIR* entre os indivíduos que constituem cada casal:

- Mulher com ausência de um ou mais genes *KIR* inibitórios presentes no repertório do seu marido.
- Mulher com ausência de um ou mais genes *KIR* ativadores presentes no repertório do seu marido.
- Homem com ausência de um ou mais genes *KIR* inibitórios presentes no repertório da sua esposa.
- Homem com ausência de um ou mais genes *KIR* ativadores presentes no repertório da sua esposa.

4.6.2.2 Comparação das freqüências alélicas dos genes *HLA-C*, *HLA-G* e *KIR2DL4*

As freqüências observadas dos alelos *HLA-Cw*, *HLA-G* e *KIR2DL4* foram comparados entre pacientes e controles. Considerando em primeira instancia o conjunto amostral completo (homens e mulheres), logo unicamente as mulheres e finalmente os homens (os genes *KIR2DL4* somente foram tipados nas mulheres).

No caso do gene *HLA-Cw* as mesmas comparações destes alelos também foram feitas agrupando-os nos grupos C1 e C2, dependentes das seqüências alélicas que codificam para os aminoácidos das posições 77 e 80 da cadeia polipeptídica da molécula *HLA-Cw*.

Para o caso do gene *HLA-G* as mesmas comparações entre os dois grupos também foram feitas agrupando os alelos dependendo da presença ou ausência deleção de 14 pares de bases no éxon 8 formando dois grupos homozigóticos (14/14 e Del/Del) e um heterozigótico (14/Del)

As análises comparativas do gene *KIR2DL4* também foram feitas agrupando os alelos segundo a presença ou ausência da deleção de uma adenosina no éxon 7.

4.6.2.3 **Análise comparativa do efeito combinatorial dos genes *KIR* e alelos do gene *HLA-Cw***

A partir dos alelos do gene *HLA-Cw* agrupados nas categorias C1 e C2, em cada casal paciente e controle foram projetados os genótipos e a relação de frequência esperada para os possíveis filhos que esse casal poderia ter. Por exemplo, se o marido apresenta o genótipo C1/C2 e a esposa dele apresenta o mesmo genótipo C1/C2 espera-se que de quatro filhos hipotéticos um tenha o genótipo C1/C1, dois o genótipo C1/C2 e um o genótipo C2/C2. Esta projeção foi construída com o intuito de poder agrupar os genes e genótipos *KIR* maternos com os possíveis genótipos *HLA-Cw* da sua progênie hipotética, montada a partir dos genes paternos e maternos para cada casal.

O enfoque comparativo foi realizado agrupando os genótipos *KIR* maternos formando três categorias: AA, AB e BB. As frequências de *HLA-Cw* hipotéticas da progênie (também agrupadas segundo os sítios de reconhecimento dos receptores *KIR*: C1 e C2) foram distribuídas nas três categorias genotípicas maternas de acordo o esperado em relação aos genes *HLA-Cw* paternos e maternos. Os padrões de genótipos *KIR* maternos e *HLA-Cw* da progênie foram comparados entre os casais pacientes e controles.

4.6.2.4 **Análise comparativa do efeito combinatorial dos alelos do *KIR2DL4* e alelos do gene *HLA-G***

Do mesmo modo que com o gene *HLA-Cw*, foi gerada uma progênie hipotética para estimar os genótipos dos alelos do gene *HLA-G* assim como da deleção de 14 pares de bases do éxon 8 (14/14, Del/14 ou Del/Del) dos possíveis filhos que cada casal possa gerar. A distribuição destas frequências alélicas foi agrupada com a distribuição das frequências alélicas do gene *KIR2DL4* materno e com a distribuição das frequências da deleção da adenosina no éxon 7 do *KIR2DL4* materno (A/A, Del/A ou Del/Del) respectivamente. O padrão formado com as diferentes combinações foi comparado entre o grupo paciente e o controle.

Foi comparada também a distribuição das freqüências alélicas do gene *HLA-G* dos casais em relação aos diferentes alelos maternos do gene *KIR2DL4*.

5. RESULTADOS

5.1 GENES *KIR*

Os 16 genes *KIR* foram tipados em 68 casais do grupo paciente com RSA e em 68 casais férteis que constituem o grupo controle. Todos os indivíduos foram positivos para a presença dos genes *KIR* constitucionais *KIR3DL2*, *KIR3DL3* e *KIR2DL4* e para as reações específicas de controle positivo. Não foi observada sinal de amplificação nas reações específicas de controle negativo.

5.1.1 FREQUÊNCIAS DOS GENES *KIR*

As frequências dos genes *KIR* observadas e as estimadas segundo a fórmula de Bernstein são apresentadas e contrastadas entre os grupos paciente e controle na TABELA 21. Estas mesmas frequências, considerando-se separadamente as mulheres e os homens que compõem os casais, são contrastadas nas TABELAS 22 e 23, respectivamente.

TABELA 21. FREQUÊNCIAS DOS GENES *KIR* COMPARADAS ENTRE OS GRUPOS PACIENTE E CONTROLE

Genes <i>KIR</i>	Pacientes (n=136)			Controles (n=136)			p-value
	n	%	Freq. est	n	%	Freq. est	
<i>KIR2DL1</i>	130	95,52%	0,7884	130	95,59%	0,7900	1,0000
<i>KIR2DL2</i>	80	58,96%	0,3593	75	55,15%	0,3303	0,5411
<i>KIR2DL3</i>	121	88,81%	0,6654	118	86,76%	0,6362	0,7110
<i>KIR2DL4</i>	136	100,00%	1,0000	136	100,00%	1,0000	1,0000
<i>KIR2DL5</i>	78	57,46%	0,3478	72	52,94%	0,3140	0,4655
<i>KIR2DP1</i>	134	98,51%	0,8778	131	96,32%	0,8083	0,4470
<i>KIR2DS1</i>	68	50,00%	0,2929	59	43,38%	0,2476	0,3291
<i>KIR2DS2</i>	82	60,45%	0,3711	78	57,35%	0,3470	0,6227
<i>KIR2DS3</i>	43	31,34%	0,1714	45	33,09%	0,1820	0,7953
<i>KIR2DS4</i>	127	93,28%	0,7408	129	94,85%	0,7731	0,6163
<i>KIR2DS5</i>	56	41,04%	0,2322	45	33,09%	0,1820	0,2077
<i>KIR3DL1</i>	129	94,78%	0,7714	129	94,85%	0,7731	1,0000
<i>KIR3DL2</i>	136	100,00%	1,0000	136	100,00%	1,0000	1,0000
<i>KIR3DL3</i>	136	100,00%	1,0000	136	100,00%	1,0000	1,0000
<i>KIR3DP1</i>	136	100,00%	1,0000	136	100,00%	1,0000	1,0000
<i>KIR3DS1</i>	67	49,25%	0,2876	53	38,97%	0,2188	0,1109

Freq. est.: Frequência gênica estimada mediante a fórmula de Bernstein

($Freq. Est. = 1 - \sqrt{1 - f}$); (onde f é a frequência observada para o gene).

TABELA 22. FREQUÊNCIAS DOS GENES *KIR* COMPARADAS ENTRE MULHERES DOS GRUPOS PACIENTE E CONTROLE

Genes <i>KIR</i>	Mulheres Pacientes (n=68)			Mulheres Controles (n=68)			p-value
	n	%	Freq. est.	n	%	Freq. est.	
<i>KIR2DL1</i>	63	92,65%	0,7288	64	94,12%	0,7575	1,0000
<i>KIR2DL2</i>	43	63,24%	0,3937	37	54,41%	0,3248	0,3031
<i>KIR2DL3</i>	58	85,29%	0,6165	58	85,29%	0,6165	1,0000
<i>KIR2DL4</i>	68	100,00%	1,0000	68	100,00%	1,0000	1,0000
<i>KIR2DL5</i>	37	54,41%	0,3248	33	48,53%	0,2826	0,4990
<i>KIR2DP1</i>	67	98,53%	0,8787	65	95,59%	0,7900	0,6194
<i>KIR2DS1</i>	32	47,06%	0,2724	26	38,24%	0,2141	0,3054
<i>KIR2DS2</i>	45	66,18%	0,4184	39	57,35%	0,3470	0,2972
<i>KIR2DS3</i>	22	32,35%	0,1775	24	35,29%	0,1956	0,8563
<i>KIR2DS4</i>	62	91,18%	0,7030	64	94,12%	0,7575	0,7444
<i>KIR2DS5</i>	30	44,12%	0,2525	19	27,94%	0,1511	0,0736
<i>KIR3DL1</i>	64	94,12%	0,7575	63	92,65%	0,7288	1,0000
<i>KIR3DL2</i>	68	100,00%	0,8787	68	100,00%	1,0000	1,0000
<i>KIR3DL3</i>	68	100,00%	0,7575	68	100,00%	1,0000	1,0000
<i>KIR3DP1</i>	68	100,00%	0,8285	68	100,00%	1,0000	1,0000
<i>KIR3DS1</i>	34	50,00%	0,2929	23	33,82%	0,1865	0,0817

Freq. est.: Freqüência gênica estimada mediante a fórmula de Bernstein

($Freq. Est. = 1 - \sqrt{1 - f}$); (onde f é a freqüência observada para o gene).

TABELA 23. FREQUÊNCIAS DOS GENES *KIR* COMPARADAS ENTRE HOMENS DOS GRUPOS PACIENTE E CONTROLE

Genes <i>KIR</i>	Homens Pacientes (n=68)			Homens Controles (n=68)			p-value
	n	%	Freq. est.	n	%	Freq. est.	
<i>KIR2DL1</i>	67	98,48%	0,8769	66	97,06%	0,8285	0,9791
<i>KIR2DL2</i>	37	54,55%	0,3258	38	55,88%	0,3358	0,5891
<i>KIR2DL3</i>	63	92,42%	0,7248	60	88,24%	0,6570	0,8359
<i>KIR2DL4</i>	68	100,00%	1,0000	68	100,00%	1,0000	0,7277
<i>KIR2DL5</i>	41	60,61%	0,3724	39	57,35%	0,3470	0,9087
<i>KIR2DP1</i>	67	98,48%	0,8769	66	97,06%	0,8285	0,8923
<i>KIR2DS1</i>	36	53,03%	0,3147	33	48,53%	0,2826	1,0000
<i>KIR2DS2</i>	37	54,55%	0,3258	39	57,35%	0,3470	1,0000
<i>KIR2DS3</i>	21	30,30%	0,1652	21	30,88%	0,1686	0,9855
<i>KIR2DS4</i>	65	95,45%	0,7868	65	95,59%	0,7900	1,0000
<i>KIR2DS5</i>	26	37,88%	0,2118	26	38,24%	0,2141	0,9791
<i>KIR3DL1</i>	65	95,45%	0,7868	66	97,06%	0,8285	0,8782
<i>KIR3DL2</i>	68	100,00%	1,0000	68	100,00%	1,0000	0,7037
<i>KIR3DL3</i>	68	100,00%	1,0000	68	100,00%	1,0000	0,9729
<i>KIR3DP1</i>	68	100,00%	1,0000	68	100,00%	1,0000	0,9880
<i>KIR3DS1</i>	33	48,48%	0,2823	30	44,12%	0,2525	0,7387

Freq. est.: Frequência gênica estimada mediante a fórmula de Bernstein ($Freq. Est. = 1 - \sqrt{1 - f}$); (onde f é a frequência observada para o gene).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas quando comparadas as frequências dos genes *KIR* entre o grupo paciente e controle. Também não foram observadas diferenças significativas quando comparadas as mulheres e os homens, de ambos os grupos, por separado.

5.1.2 FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS DOS GENES *KIR*

As frequências haplotípicas dos genes *KIR* foram estimadas com a ajuda do software HAPLO-IHP (YOO *et al.*, 2007) e são apresentadas e contrastadas entre os grupos paciente e controle na TABELA 24. Estas mesmas frequências, considerando-se separadamente as mulheres e os homens que compõem os casais, são contrastadas nas TABELAS 25 e 26 respectivamente. A distribuição das frequências haplotípicas dos genes *KIR* entre pacientes com RSA e mulheres controle foi similar, exceto com relação ao haplótipo 40 que apresentou maior frequência na amostra paciente, tanto nas comparações entre os casais ($P = 0,0304$; O.R: 7,1842; I.C. 95%: [0,87-58,79]) como nas comparações entre os grupos de mulheres ($P = 0,0295$; O.R: 7,3231; I.C. 95%: [0,88-60,34]).

TABELA 24. FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS DOS GENES *KIR* COMPARADAS ENTRE OS GRUPOS PACIENTE E CONTROLE

Haplótipos	Pacientes (n=136)		Controles (n=136)		p-value
	n	%	n	%	
1	126	46,67	135	50,00	0,8611
2	37	13,70	36	13,33	0,2946
3	28	10,37	24	8,89	0,7728
4	3	1,11	3	1,11	1,0000
5	0	0,00	1	0,37	1,0000
6	9	3,33	9	3,33	1,0000
7	10	3,70	9	3,33	0,8076
10	0	0,00	4	1,48	0,2491
14	9	3,33	9	3,33	1,0000
15	9	3,33	8	2,96	1,0000
16	0	0,00	3	1,11	0,2491
17	4	1,48	4	1,48	0,7253
18b	1	0,37	0	0,00	0,4867
21	2	0,74	1	0,37	1,0000
23	1	0,37	2	0,74	1,0000
24	1	0,37	0	0,00	0,2364
25	0	0,00	0	0,00	1,0000
27	0	0,00	1	0,37	0,2364
28a	6	2,22	8	2,96	0,7728
31	1	0,37	1	0,37	1,0000
33	3	1,11	4	1,48	1,0000
36	0	0,00	3	1,11	0,1241
37	2	0,74	0	0,00	0,4867
40	6	2,22	0	0,00	0,0304
C43	0	0,00	1	0,52	1,0000
C5	3	1,11	0	0,00	0,2486
C57	0	0,00	1	0,43	1,0000
H146	2	0,74	0	0,00	0,4991
H17	0	0,00	2	0,74	0,4991
H42	2	0,74	0	0,00	0,4991
H42	3	1,11	0	0,00	0,2486
H60	2	0,74	0	0,00	0,4991
H66	2	0,74	0	0,00	0,4991
H74	0	0,00	1	0,37	0,2491

Em negrito: diferença estatisticamente significativa. Nomenclatura dos haplótipos proposta por KAKHOO e CARRINGTON; 2006.

TABELA 25. FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS DOS GENES *KIR* COMPARADAS ENTRE MULHERES DOS GRUPOS PACIENTE E CONTROLE

Haplótipos	Mulheres Pacientes (n=68)		Mulheres Controles (n=68)		p-value
	n	%	n	%	
1	66	48,53	64	47,06	0,8046
2	19	13,97	19	13,97	1,0000
3	9	6,62	12	8,82	0,4886
4	1	0,74	2	1,47	1,0000
6	4	2,94	5	3,68	1,0000
7	5	3,68	4	2,94	1,0000
10	0	0,00	1	0,74	1,0000
14	4	2,94	5	3,68	1,0000
15	9	6,62	4	2,94	0,2465
16	0	0,00	2	1,47	0,4983
17	2	1,47	2	1,47	1,0000
23	0	0,00	1	0,74	1,0000
24	1	0,74	0	0,00	0,4885
27	0	0,00	1	0,74	1,0000
28a	2	1,47	3	2,21	1,0000
31	0	0,00	1	0,74	1,0000
33	1	0,74	2	1,47	1,0000
36	0	0,00	2	1,47	0,4983
37	2	1,47	0	0,00	0,2377
40	6	4,41	0	0,00	0.0295
C43	0	0,00	1	0,74	1,0000
C5	3	2,21	0	0,00	0,2472
C57	0	0,00	1	0,74	1,0000
H17	0	0,00	3	2,21	0,2475
H60	2	1,47	0	0,00	0,4885
H74	0	0,00	1	0,74	1,0000

Nomenclatura dos haplótipos proposta por KAKHOO e CARRINGTON; 2006.

TABELA 26. FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS DOS GENES *KIR* COMPARADAS ENTRE HOMENS DOS GRUPOS PACIENTE E CONTROLE

Haplótipos	Homens Pacientes (n=68)		Homens Controles (n=68)		p-value
	n	%	n	%	
1	60	44,12	71	52,21	0,1775
2	18	13,24	17	12,50	0,8566
3	19	13,97	12	8,82	0,2441
4	2	1,47	1	0,74	0,6124
5	0	0,00	1	0,74	1,0000
6	5	3,68	4	2,94	0,7433
7	5	3,68	5	3,68	1,0000
10	0	0,00	3	2,21	0,2478
14	5	3,68	4	2,94	0,7433
15	0	0,00	4	2,94	0,1222
16	0	0,00	1	0,74	1,0000
17	2	1,47	2	1,47	1,0000
18b	1	0,74	0	0,00	1,0000
21	2	1,47	1	0,74	0,6124
23	1	0,74	1	0,74	1,0000
28a	4	2,94	5	3,68	1,0000
31	1	0,74	0	0,00	1,0000
33	2	1,47	2	1,47	1,0000
36	0	0,00	1	0,74	1,0000
H146	4	2,94	0	0,00	0,1126
H42	3	2,21	0	0,00	0,2444
H66	2	1,47	0	0,00	0,4963

Em negrito: diferença estatisticamente significativa. Nomenclatura dos haplótipos proposta por KAKHOO e CARRINGTON; 2006.

5.1.3 FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DOS GENES *KIR*

As frequências dos genótipos *KIR* foram comparadas entre os grupos paciente e controle e são mostradas na TABELA 27. A distribuição das frequências dos genótipos *KIR* entre pacientes com RSA e controles férteis foi similar e não se encontraram diferenças estatisticamente significativas.

TABELA 27. COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DOS GENÓTIPOS KIR ENTRE PACIENTES E CONTROLES

Genótipos	Pacientes (n=136)		Controles (n=136)		p-value
	n	%	n	%	
1 /18b	1	0,78	0	0,00	0,4867
1 /40	3	2,21	0	0,00	0,2472
1 /H124	2	1,56	0	0,00	0,2359
1 /1	28	20,31	35	25,74	0,3084
1 /15	7	5,47	8	5,97	1,0000
1 /28a	4	2,94	5	3,73	1,0000
1 /3	15	10,94	11	8,21	0,5297
1 /31	1	0,78	1	0,75	1,0000
1 /36	0	0,00	1	0,75	1,0000
1 /5	0	0,00	1	0,75	1,0000
1 /6	10	7,03	8	5,97	0,8044
11 /H26	1	0,78	0	0,00	0,4867
16 /15	0	0,00	1	0,75	1,0000
17 /1	2	1,56	2	1,49	1,0000
17 /3	0	0,00	1	0,75	1,0000
2 /24	1	0,78	0	0,00	0,4867
2 /40	1	0,78	0	0,00	0,4867
2 /H269	1	0,78	0	0,00	0,4867
2 /1	19	14,06	19	14,18	1,0000
2 /15	2	1,56	2	1,49	1,0000
2 /16	0	0,00	1	0,75	1,0000
2 /2	4	2,94	4	2,99	1,0000
2 /3	0	0,00	5	3,73	0,0606
2 /6	3	2,21	4	2,99	1,0000
2 /H74	0	0,00	1	0,75	1,0000
21 /H44	1	0,78	0	0,00	0,4867
23 /36	0	0,00	1	0,75	1,0000
24 /H83	1	0,78	0	0,00	0,4867
26 /2	0	0,00	1	0,75	1,0000
27 /H124	1	0,78	0	0,00	0,4867
27 /H83	1	0,78	0	0,00	0,4867
27 /H17	0	0,00	1	0,75	1,0000
3 /37	1	0,78	0	0,00	0,4867
3 /3	2	1,47	2	1,49	1,0000
3 /4	0	0,00	1	0,75	1,0000
33 /1	3	2,34	3	2,24	1,0000
33 /3	1	0,78	1	0,75	1,0000
40 /3	1	0,78	0	0,00	0,4867
6 /28a	2	1,56	1	0,75	0,6137
7 /3	2	1,56	0	0,00	0,2359

Continua

TABELA 27 (Continuação). COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DOS GENÓTIPOS KIR ENTRE PACIENTES E CONTROLES

Genótipos	Pacientes (n=136)		Controles (n=136)		p-value
	n	%	n	%	
7/40	1	0,78	0	0,00	0,4867
7/1	8	5,88	8	5,97	1,0000
7/15	0	0,00	1	0,75	1,0000
7/16	0	0,00	1	0,75	1,0000
7/2	3	2,34	1	0,75	0,3592
H17/3	0	0,00	1	0,75	1,0000
H17/C57	0	0,00	1	0,75	1,0000
H26/H26	1	0,78	0	0,00	0,4867
H74/36	0	0,00	1	0,75	1,0000

5.1.4 FREQUÊNCIAS DOS HAPLÓTIPOS E GENÓTIPOS *KIR* REUNIDAS EM BASE AO CONTEÚDO DE GENES (GRUPOS A E B)

Como mencionado na seção 3.6.2, dois tipos de haplótipos *KIR* foram descritos considerando-se o conteúdo de genes que apresentam e designados como *Haplótipos A* e *Haplótipos B*. O haplótipo B caracteriza-se por apresentar um ou mais dos seguintes genes: *KIR2DL5*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5* e *KIR3DS1*, enquanto o haplótipo A caracteriza-se pela ausência de qualquer um destes genes. Os haplótipos do grupo B possuem mais genes codificando receptores *KIR* ativadores que os haplótipos do grupo A.

As frequências haplotípicas no grupo total, paciente e controle, bem como entre mulheres e homens separadamente, foram comparadas e são mostradas na TABELA 28. Da mesma forma, as frequências genotípicas, foram contrastadas na TABELA 29. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em nenhuma das duas abordagens.

TABELA 28. FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS AGRUPADAS COMPARADAS ENTRE PACIENTES E CONTROLES

	Haplótipos	Pacientes (n=136)		Controles (n=136)		p-value
		n	%	n	%	
Grupo Inteiro	A	137	50.37	137	50.37	1.0000
	B	135	49.63	135	49.63	
Mulheres	A	69	50.74	65	47.79	0.7160
	B	67	49.26	71	52.21	
Homens	A	68	50.00	72	52.94	0.6301
	B	68	50.00	64	47.06	

TABELA 29. FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS AGRUPADAS COMPARADAS ENTRE PACIENTES E CONTROLES

	Genótipos	Pacientes (n=136)		Controles (n=136)		p-value
		n	%	n	%	
Grupo Inteiro	A/A	29	21.32	35	25.74	0.4750
	A/B	79	58.09	67	49.26	0.1473
	B/B	28	20.59	34	25.00	0.4701
Mulheres	A/A	17	25.00	17	25.00	1.0000
	A/B	35	51.47	31	45.59	0.4990
	B/B	16	23.53	20	29.41	0.5602
Homens	A/A	12	17.65	18	26.47	0.2241
	A/B	44	64.71	36	52.94	0.2225
	B/B	12	17.65	14	20.59	0.8277

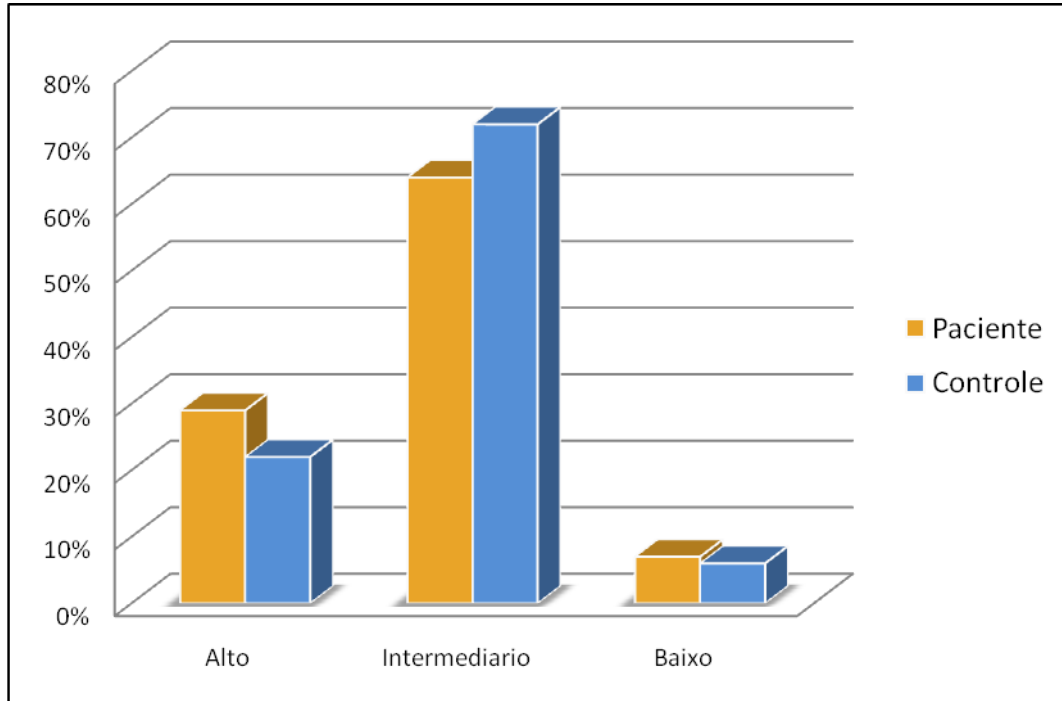
5.1.5 FREQUÊNCIAS DOS REPERTÓRIOS *KIR* EM MULHERES

Dado que as células NK compõem a principal população linfocitária na decídua, foi testado se o perfil de genes *KIR* nas mulheres estaria influenciando o estado de ativação ou de tolerância das mesmas. Para isto os repertórios dos genes *KIR* das mulheres foram agrupados segundo o número de genes inibitórios e ativadores como é mostrado na TABELA 30 e contrastados nas FIGURAS 23 e 24.

Os resultados destas comparações mostraram que os repertórios com elevado número de genes *KIR* ativadores são significativamente mais freqüentes entre mulheres com RSA e, portanto, se encontram associados positivamente com a susceptibilidade a perda recorrente da gravidez ($p =$

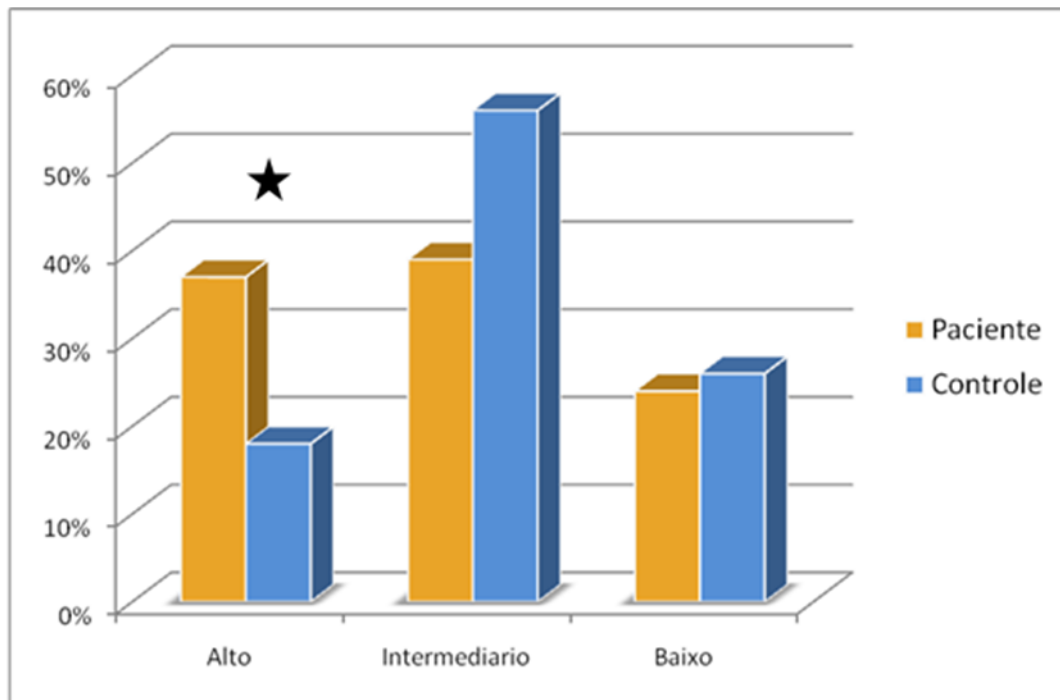
0,0201). O valor da Odds Ratio (ou risco relativo) foi de 2,71 dentro de um intervalo de confiança (I.C) de 95% de [1,23-6,01].

FIGURA 23. REPERTÓRIOS *KIR* AGRUPADOS POR CONTEÚDO DE GENES *KIR* INIBITÓRIOS EM MULHERES PACIENTES E CONTROLE



Alto: Repertórios com 7 genes *KIR* inibitórios; Intermediário: Repertórios com 5 ou 6 genes *KIR* inibitórios; Baixo: Repertórios com até 4 genes *KIR* inibitórios.

FIGURA 24. REPERTÓRIOS *KIR* AGRUPADOS POR CONTEÚDO DE GENES *KIR* ATIVADORES EM MULHERES PACIENTES E CONTROLE



Alto: Repertórios com mais de 5 genes *KIR* ativadores; Intermediário: Repertórios com 2 ou 3 genes *KIR* ativadores; Baixo: Repertórios com 1 gene *KIR* ativador. A estrela indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,021$; O.R=2,71; I.C.95%: [1,23-6,01]).

TABELA 30. FREQUÊNCIA DOS DIFERENTES REPERTÓRIOS KIR AGRUPADOS POR NÚMERO DE GENES *KIR* INIBIDORES E ATIVADORES EM MULHERES PACIENTES E CONTROLES

Repertórios <i>KIR</i> agrupados por conteúdo de genes inibitórios	Mulheres Pacientes (n=68)		Mulheres Controles (n=68)		<i>p</i> -value
	n	%	n	%	
Repertórios com alto conteúdo de genes <i>KIR</i> inibitórios ^a	20	29%	15	22%	0.3360
Repertórios com conteúdo intermediário de genes <i>KIR</i> inibitórios ^b	43	64%	49	72%	0.3595
Repertórios com baixo conteúdo de genes <i>KIR</i> inibitórios ^c	5	7%	4	6%	1.0000
Repertórios <i>KIR</i> agrupados por conteúdo de genes ativadores	Mulheres Pacientes (n=68)		Mulheres Controles (n=68)		<i>P</i> -value
	n	%	n	%	
Repertórios com alto conteúdo de genes <i>KIR</i> ativadores ^d	25	37%	12	18%	0.0201 O.R. = 2,71; I.C.95% [1,23-6,01]
Repertórios com conteúdo intermediário de genes <i>KIR</i> ativadores ^e	27	39%	38	56%	0.0623
Repertórios com baixo conteúdo de genes <i>KIR</i> ativadores ^f	16	24%	18	26%	0.8432

Em negrito: diferença estatisticamente significativa; O.R.: Odds Ratio; I.C.: Intervalo de confiança; ns: diferença sem significância estatística; a: Repertórios com 7 genes *KIR* inibitórios; b: Repertórios com 5 ou 6 genes *KIR* inibitórios; c: Repertórios com até 4 genes *KIR* inibitórios; d: Repertórios com mais de 5 genes *KIR* ativadores; e: Repertórios com 2 ou 3 genes *KIR* ativadores; f: Repertórios com 1 gene *KIR* ativador.

5.1.6 FREQUÊNCIAS DOS REPERTÓRIOS *KIR* DEPENDENTE DA NATUREZA ATIVADORA/INIBIDORA DESTES GENES NO CASAL

Com o intuito de testar o efeito das diferentes combinações dos genes *KIR* dentro dos casais em relação ao abortamento espontâneo recorrente, foram comparados os repertórios *KIR* das mulheres com os repertórios *KIR* dos seus respectivos maridos, tanto nos casais pacientes quanto nos controles. Foi avaliada a existência de diferenças na distribuição das frequências dos dois grupos como é mostrado na TABELA 31.

TABELA 31. COMPARAÇÃO DA IDENTIDADE DOS REPERTÓRIOS *KIR* ENTRE OS INDIVÍDUOS QUE COMPÕEM OS CASAIS PACIENTES E CONTROLES

Tipo de perda de identidade entre os repertórios <i>KIR</i>	Casais Pacientes (n=68)		Casais Controles (n=68)		<i>p-value</i>
	n	%	n	%	
Mulher não possui um ou mais genes <i>KIR</i> inibitórios presentes no repertório <i>KIR</i> do seu marido	32	47%	35	51%	0,7317
Mulher não possui um ou mais genes <i>KIR</i> ativadores presentes no repertório <i>KIR</i> do seu marido	30	44%	38	56%	0,2298
Homem não possui um ou mais genes <i>KIR</i> inibitórios presentes no repertório <i>KIR</i> da sua esposa	31	46%	29	43%	0,7338
Homem não possui um ou mais genes <i>KIR</i> ativadores presentes no repertório <i>KIR</i> da sua esposa	34	50%	33	49%	0,8659

5.2 GENES *KIR2DL4*

O seqüenciador automatizado ABI Prism 3130 (Applied Biosystems®) foi utilizado para obtenção das seqüências nucleotídicas dos segmentos gênicos necessários para a caracterização alélica dos genes *KIR2DL4* nas mulheres pacientes e controles.

Foram calculadas as frequências alélicas e genotípicas e comparadas entre os dois grupos. Os alelos do gene *KIR2DL4* também foram agrupados segundo a presença ou ausência de uma deleção na posição nucleotídica 811 no éxon 7 do transcrito. Essa deleção altera o marco de leitura do gene e cria um códon de parada, dando origem a uma molécula truncada com ausência da região transmembrânica.

As tipagens alélicas foram obtidas em 63 mulheres paciente e 49 mulheres controle. Para 6 indivíduos foram identificadas sequências gênicas que não apresentaram correspondência com nenhum alelo do gene *KIR2DL4* descritos até o momento no site da IPD (The Immuno Polymorphism Database; <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/align.html>, acesso em março de 2009). Esses possíveis novos alelos serão descritos em futuros trabalhos que serão realizados por nosso grupo de pesquisa.

Não foi possível conseguir as tipagens de 5 mulheres pacientes e 18 mulheres controles devido à degradação ou não disponibilidade (término) do DNA dessas amostras.

5.2.1 FREQUÊNCIAS ALÉICAS DO GENE *KIR2DL4*

As frequências alélicas do gene de moldura *KIR2DL4* foram calculadas e comparadas entre os dois grupos, tanto em nível de alta resolução alélica quanto em baixa resolução ou de grupo alélico. Os resultados das comparações em alta resolução são mostrados na TABELA 32 e os resultados das comparações em baixa resolução (grupo alélico) na TABELA 33.

TABELA 32. FREQUÊNCIAS ALÉICAS DO GENE *KIR2DL4* DAS MULHERES PACIENTES E CONTROLES EM ALTA RESOLUÇÃO

Alelos	Pacientes (n=63)		Controles (n=49)		p-value
	n	%	n	%	
<i>KIR2DL4*00102</i>	25	19,84	18	18,37	0,8454
<i>KIR2DL4*00103</i>	9	7,14	6	6,12	0,7881
<i>KIR2DL4*00105</i>	0	0,00	1	1,02	0,4375
<i>KIR2DL4*00201</i>	4	3,17	0	0,00	0,1300
<i>KIR2DL4*00202</i>	3	2,38	4	4,08	0,6971
<i>KIR2DL4*00501</i>	17	13,49	17	17,35	0,4126
<i>KIR2DL4*00502</i>	2	1,59	2	2,04	1,0000
<i>KIR2DL4*006</i>	3	2,38	2	2,04	1,0000
<i>KIR2DL4*00801</i>	18	14,29	20	20,41	0,2277
<i>KIR2DL4*00802</i>	18	14,29	14	14,29	1,0000
<i>KIR2DL4*00902</i>	1	0,79	0	0,00	1,0000
<i>KIR2DL4*010</i>	1	0,79	0	0,00	1,0000
<i>KIR2DL4*011</i>	25	19,84	14	14,29	0,2376

TABELA 33. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE *KIR2DL4* DAS MULHERES PACIENTES E CONTROLES EM BAIXA RESOLUÇÃO

Alelos	Pacientes (n=63)		Controles (n=49)		<i>p-value</i>
	n	%	n	%	
<i>KIR2DL4*001</i>	34	26,98	25	25,51	0,8492
<i>KIR2DL4*002</i>	7	5,56	4	4,08	0,7531
<i>KIR2DL4*005</i>	19	15,08	19	19,39	0,4217
<i>KIR2DL4*006</i>	3	2,38	2	2,04	1,0000
<i>KIR2DL4*008</i>	36	28,57	34	34,69	1,0000
<i>KIR2DL4*009</i>	1	0,79	0	0,00	1,0000
<i>KIR2DL4*010</i>	1	0,79	0	0,00	1,0000
<i>KIR2DL4*011</i>	25	19,84	14	14,29	0,2376

A distribuição das frequências alélicas do gene *KIR2DL4*, entre pacientes com RSA e mulheres controle, foi comparada, e não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as mesmas tanto em alta resolução quanto em nível de grupo alélico.

5.2.2 FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DO GENE *KIR2DL4*

Foram comparadas as frequências genotípicas de *KIR2DL4* entre as amostras de mulheres pacientes com RSA e controles férteis, e nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre as amostras (TABELA 34).

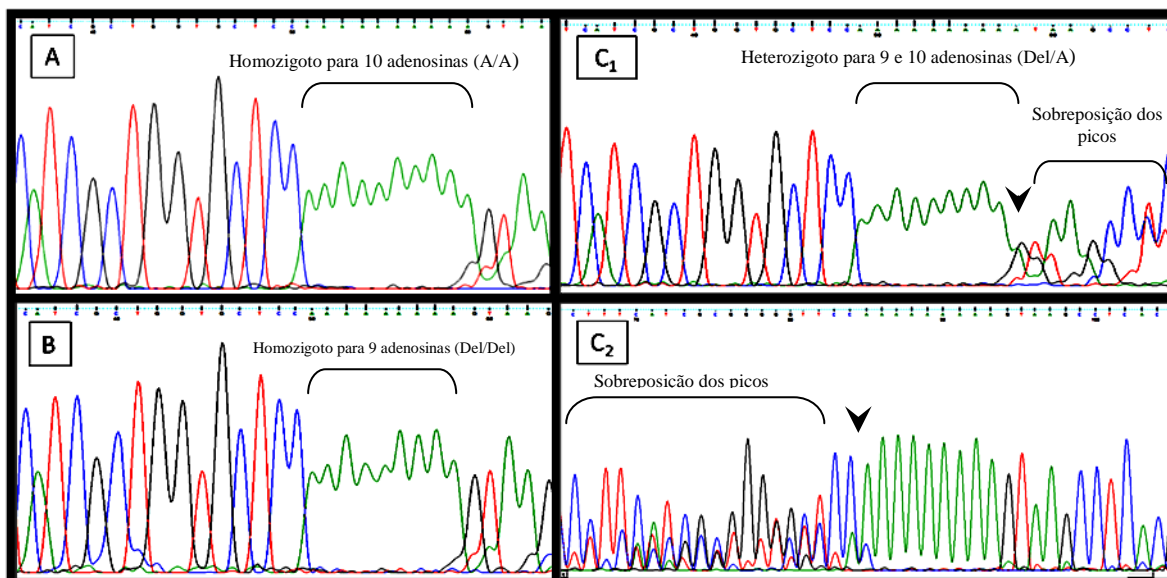
TABELA 34. COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE *KIR2DL4* ENTRE MULHERES PACIENTES E CONTROLES

Genótipos	Pacientes (n=63)		Controles (n=49)		p-value
	n	%	n	%	
<i>KIR2DL4*001 / KIR2DL4*001</i>	4	6,35	5	10,20	0,5011
<i>KIR2DL4*001 / KIR2DL4*005</i>	1	1,59	3	6,12	0,3169
<i>KIR2DL4*001 / KIR2DL4*006</i>	1	1,59	0	0,00	1,0000
<i>KIR2DL4*001 / KIR2DL4*008</i>	10	15,87	9	18,37	0,8021
<i>KIR2DL4*001 / KIR2DL4*009</i>	1	1,59	0	0,00	1,0000
<i>KIR2DL4*001 / KIR2DL4*11</i>	11	17,46	3	6,12	0,0886
<i>KIR2DL4*002 / KIR2DL4*005</i>	0	0,00	1	2,04	0,4375
<i>KIR2DL4*002 / KIR2DL4*008</i>	2	3,17	1	2,04	1,0000
<i>KIR2DL4*002 / KIR2DL4*11</i>	5	7,94	2	4,08	0,4648
<i>KIR2DL4*005 / KIR2DL4*001</i>	2	3,17	0	0,00	0,5034
<i>KIR2DL4*005 / KIR2DL4*005</i>	2	3,17	2	4,08	1,0000
<i>KIR2DL4*005 / KIR2DL4*006</i>	0	0,00	1	2,04	0,4375
<i>KIR2DL4*005 / KIR2DL4*008</i>	7	11,11	5	10,20	1,0000
<i>KIR2DL4*005 / KIR2DL4*010</i>	1	1,59	0	0,00	1,0000
<i>KIR2DL4*005 / KIR2DL4*11</i>	4	6,35	5	10,20	0,5011
<i>KIR2DL4*006 / KIR2DL4*008</i>	1	1,59	1	2,04	1,0000
<i>KIR2DL4*006 / KIR2DL4*11</i>	1	1,59	0	0,00	1,0000
<i>KIR2DL4*008 / KIR2DL4*008</i>	6	9,52	8	16,33	0,3889
<i>KIR2DL4*008 / KIR2DL4*11</i>	4	6,35	2	4,08	0,6942
<i>KIR2DL4*011 / KIR2DL4*011</i>	0	0,00	1	2,04	0,4375

5.2.3 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DO GENE *KIR2DL4* AGRUPADAS SEGUNDO A DELEÇÃO NO NUCLEOTÍDEO 811 DO ÉXON 7

Quatro grupos alélicos do gene *KIR2DL4* (*2DL4*007*, *2DL4*008*, *2DL4*009* e *2DL4*011*) apresentam uma deleção pontual na décima adenosina, de uma repetição de A em tándem que ocorre na posição 811 do éxon 7. Essa deleção produz uma mudança no marco de leitura e resulta num códon de parada no início do éxon 8 da sequência gênica. Os indivíduos homocigóticos para a presença desta adenosina apresentam eletroferogramas com 10 picos de adenosina (verdes) contínuos (FIGURA 25.A) e os indivíduos homocigóticos para a deleção desta adenosina apresentam 9 picos contínuos (FIGURA 25.B). Quando esta deleção se encontra em estado heterocigótico, observa-se nos eletroferogramas, múltiplos picos sobrepostos a jusante do ponto da deleção na sequência com sentido 5'→3' ("forward") (FIGURA 25.C₁) e a montante do ponto da deleção na sequência com sentido 3'→5' ("reverse") (FIGURA 25.C₂).

FIGURA 25. ELETROFEROGRAMAS MOSTRANDO OS ESTADOS DE HOMOZIGOSE E DE HETEROZIGOSE DA DELEÇÃO DA ADENOSINA NA POSIÇÃO 811 DA SEQUÊNCIA DO GENE *KIR2DL4*



Eletroferogramas obtidos no presente estudo. A: Indivíduo homocigoto para a seqüência de 10 adeninas (A_{10}/A_{10} ou A/A) (sem deleção); B: Indivíduo homocigoto para a deleção da décima adenina (A_9/A_9 ou Del/Del); C(C_1 e C_2): Indivíduo heterocigoto para a deleção (A_9/A_{10} ou Del/A); C_1 : Seqüência com sentido 5'→3' mostrando o pico sobreposto na décima adenina (indicado por flecha) e a jusante deste ponto a sobreposição de todos os picos decorrente da defasagem da seqüência gênica do cromossomo paterno e materno; C_2 : Seqüência com sentido 3'→5' mostrando a sobreposição de todos os picos a montante do ponto em que surge a sobreposição de dois nucleotídeos diferentes (indicado por flecha) (neste caso montante é sentido 3' por ser a seqüência com sentido reverso).

Os alelos tipados do gene *KIR2DL4* foram agrupados dependendo da presença ou ausência desta deleção e as freqüências alélicas e genóticas são apresentadas e comparadas entre os grupos pacientes e controle nas TABELAS 35 e 36 respectivamente. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as mulheres de ambos os grupos.

TABELA 35. COMPARAÇÃO ENTRE AS MULHERES PACIENTE E CONTROLE DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE *KIR2DL4* AGRUPADAS SEGUNDO A DELEÇÃO DA ADENOSINA NO ÉXON 7

Variantes do Gene <i>KIR2DL4</i>	Pacientes (n=63)		Controles (n=49)		<i>p-value</i>
	n	%	n	%	
A	62	49,21	50	51,02	0,8929
DEL	63	50,00	48	48,98	0,8936
G*	1	0,79	0	0,00	1,0000

*O alelo *KIR2DL4*003* apresenta uma guanina nesta posição.

TABELA 36. COMPARAÇÃO ENTRE AS MULHERES PACIENTE E CONTROLE DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DO GENE *KIR2DL4* AGRUPADAS SEGUNDO A DELEÇÃO DA ADENOSINA NO ÉXON 7

Genótipos	Pacientes (n=63)		Controles (n=49)		<i>p-value</i>
	n	%	n	%	
A/A	10	15,87	12	24,49	0,3383
DEL/A	42	66,67	26	53,06	0,1739
DEL/DEL	10	15,87	11	22,45	0,4660
DEL/G*	1	1,59	0	0,00	1,0000

*Indivíduo heterozigoto para a guanina presente no alelo *KIR2DL4*003* e para a deleção.

5.3 GENES *HLA-Cw*

Os genes *HLA-Cw* foram tipados pela técnica PCR-SSO e a caracterização alélica foi obtida em 118 indivíduos pacientes e 131 controles. Devido à ambigüidades nos resultados de algumas tipagens, não foram caracterizados os alelos de 18 indivíduos pacientes e de 5 indivíduos controles.

5.3.1 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE *HLA-Cw*

As frequências alélicas do gene *HLA-Cw* foram analisadas estatisticamente e comparadas entre os dois grupos. Os resultados das comparações são mostrados na TABELA 37. Estas mesmas frequências, considerando separadamente as mulheres e os homens que compõem os casais, são contrastadas nas TABELAS 38 e 39 respectivamente.

TABELA 37. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE *HLA-Cw* COMPARADAS ENTRE O GRUPO DE PACIENTES E DE CONTROLES

Alelos	Pacientes (n=118)		Controles (n=131)		<i>p-value</i>
	n	%	n	%	
<i>HLA-Cw*01</i>	11	4,66	12	4,58	1,0000
<i>HLA-Cw*02</i>	10	4,24	12	4,58	1,0000
<i>HLA-Cw*03</i>	25	10,59	29	11,07	0,8863
<i>HLA-Cw*04</i>	44	18,64	38	14,50	0,2278
<i>HLA-Cw*05</i>	16	6,78	25	9,54	0,3276
<i>HLA-Cw*06</i>	12	5,08	17	6,49	0,5683
<i>HLA-Cw*07</i>	40	16,95	57	21,76	0,2125
<i>HLA-Cw*08</i>	11	4,66	6	2,29	0,2157
<i>HLA-Cw*12</i>	18	7,63	20	7,63	1,000
<i>HLA-Cw*14</i>	5	2,12	2	0,76	0,2643
<i>HLA-Cw*15</i>	18	7,63	24	9,16	0,6286
<i>HLA-Cw*16</i>	18	7,63	12	4,58	0,1873
<i>HLA-Cw*17</i>	7	2,97	7	2,67	1,0000
<i>HLA-Cw*18</i>	1	0,42	1	0,38	1,0000

TABELA 38. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE *HLA-Cw* COMPARADAS ENTRE MULHERES DOS GRUPOS PACIENTE E CONTROLE

Alelos	Mulheres Pacientes (n=61)		Mulheres Controles (n=65)		<i>p-value</i>
	n	%	n	%	
<i>HLA-Cw*01</i>	7	5,74	4	3,08	0,3644
<i>HLA-Cw*02</i>	5	4,10	7	5,38	0,7703
<i>HLA-Cw*03</i>	11	9,02	14	10,77	0,6785
<i>HLA-Cw*04</i>	25	20,49	17	13,08	0,1297
<i>HLA-Cw*05</i>	9	7,38	12	9,23	0,6532
<i>HLA-Cw*06</i>	4	3,28	8	6,15	0,3789
<i>HLA-Cw*07</i>	23	18,85	32	24,62	0,2886
<i>HLA-Cw*08</i>	4	3,28	2	1,54	0,4344
<i>HLA-Cw*12</i>	11	9,02	10	7,69	0,8206
<i>HLA-Cw*14</i>	2	1,64	1	0,77	0,6118
<i>HLA-Cw*15</i>	10	8,20	10	7,69	1,0000
<i>HLA-Cw*16</i>	7	5,74	7	5,38	1,0000
<i>HLA-Cw*17</i>	3	2,46	5	3,85	0,7233
<i>HLA-Cw*18</i>	1	0,82	1	0,77	1,0000

TABELA 39. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE *HLA-Cw* COMPARADAS ENTRE HOMENS DOS GRUPOS PACIENTE E CONTROLE

Alelos	Homens Pacientes (n=57)		Homens Controles (n=66)		<i>p-value</i>
	n	%	n	%	
<i>HLA-Cw*01</i>	4	3,51	8	6,06	0,3917
<i>HLA-Cw*02</i>	5	4,39	5	3,79	1,0000
<i>HLA-Cw*03</i>	14	12,28	15	11,36	0,8452
<i>HLA-Cw*04</i>	19	16,67	21	15,91	1,0000
<i>HLA-Cw*05</i>	7	6,14	13	9,85	0,3531
<i>HLA-Cw*06</i>	8	7,02	9	6,82	1,0000
<i>HLA-Cw*07</i>	17	14,91	25	18,94	0,4972
<i>HLA-Cw*08</i>	7	6,14	4	3,03	0,3547
<i>HLA-Cw*12</i>	7	6,14	10	7,58	0,8024
<i>HLA-Cw*14</i>	3	2,63	1	0,76	0,3391
<i>HLA-Cw*15</i>	8	7,02	14	10,61	0,3757
<i>HLA-Cw*16</i>	11	9,65	5	3,79	0,0733
<i>HLA-Cw*17</i>	4	3,51	2	1,52	0,4199
<i>HLA-Cw*18</i>	0	0,00	0	0,00	1,0000

5.3.2 FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DO GENE *HLA-Cw*

Foram comparadas as frequências genotípicas de *HLA-Cw* entre as amostras de casais pacientes com RSA e controles férteis (TABELA 40). A distribuição dos genótipos foi similar entre ambos os grupos, com exceção dos genótipos *HLA-Cw*04/HLA-Cw*07* ($P=0,0334$; O.R.=0,25, I.C.95%:[0,0711-0,9406]) e *HLA-Cw*04/HLA-Cw*15* ($P=0,0286$; O.R.: 8,19; I.C.: [0,9934-67,6601]), que apresentaram frequência maior na amostra controle e paciente, respectivamente.

TABELA 40. COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DO GENE HLA-Cw ENTRE CASAIS PACIENTES COM RSA E CASAIS CONTROLES FÉRTEIS

Genótipos	Pacientes (n=118)		Controles (n=131)		p-value
	n	%	n	%	
Cw*01 / Cw*01	1	0,85	0	0,00	0,4739
Cw*01 / Cw*02	0	0,00	1	0,76	1,0000
Cw*01 / Cw*03	1	0,85	0	0,00	0,4739
Cw*01 / Cw*04	2	1,69	2	1,53	1,0000
Cw*01 / Cw*05	1	0,85	1	0,76	1,0000
Cw*01 / Cw*06	1	0,85	1	0,76	1,0000
Cw*01 / Cw*07	0	0,00	2	1,53	0,4994
Cw*01 / Cw*08	0	0,00	1	0,76	1,0000
Cw*01 / Cw*12	1	0,85	2	1,53	1,0000
Cw*01 / Cw*15	1	0,85	2	1,53	1,0000
Cw*01 / Cw*16	2	1,69	0	0,00	0,4994
Cw*02 / Cw*03	0	0,00	1	0,76	1,0000
Cw*02 / Cw*04	1	0,85	2	1,53	1,0000
Cw*02 / Cw*06	1	0,85	1	0,76	1,0000
Cw*02 / Cw*07	2	1,69	4	3,05	0,4994
Cw*02 / Cw*08	1	0,85	1	0,76	1,0000
Cw*02 / Cw*12	1	0,85	0	0,00	0,4739
Cw*02 / Cw*15	1	0,85	1	0,76	1,0000
Cw*02 / Cw*16	2	1,69	1	0,76	0,6048
Cw*02 / Cw*17	1	0,85	0	0,00	0,4739
Cw*03 / Cw*03	1	0,85	2	1,53	1,0000
Cw*03 / Cw*04	11	9,32	4	3,05	0,0591
Cw*03 / Cw*05	1	0,85	4	3,05	0,3734
Cw*03 / Cw*06	0	0,00	1	0,76	1,0000
Cw*03 / Cw*07	5	4,24	8	6,11	0,5779
Cw*03 / Cw*12	2	1,69	0	0,00	0,2236
Cw*03 / Cw*14	1	0,85	0	0,00	0,4739
Cw*03 / Cw*15	0	0,00	4	3,05	0,1240
Cw*03 / Cw*16	2	1,69	3	2,29	1,0000
Cw*04 / Cw*04	2	1,69	3	2,29	1,0000
Cw*04 / Cw*05	3	2,54	3	2,29	1,0000
Cw*04 / Cw*06	3	2,54	1	0,76	0,3477
Cw*04 / Cw*07	3	2,54	12	9,16	0,0334
Cw*04 / Cw*08	1	0,85	1	0,76	1,0000
Cw*04 / Cw*12	1	0,85	3	2,29	0,6240
Cw*04 / Cw*14	2	1,69	0	0,00	0,2236
Cw*04 / Cw*15	7	5,93	1	0,76	0,0286
Cw*04 / Cw*16	3	2,54	1	0,76	0,3477
Cw*04 / Cw*17	2	1,69	1	0,76	0,6048
Cw*04 / Cw*18	1	0,85	1	0,76	1,0000
Cw*05 / Cw*05	1	0,85	3	2,29	0,6240
Cw*05 / Cw*06	1	0,85	3	2,29	0,6240

Continua

TABELA 40 (Continuação). COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DO GENE HLA-Cw ENTRE CASAIS PACIENTES COM RSA E CASAIS CONTROLES FÉRTEIS

Genótipos	Pacientes (n=118)		Controles (n=131)		p-value
	n	%	n	%	
Cw*05 / Cw*07	3	2,54	2	1,53	0,6701
Cw*05 / Cw*08	4	3,39	2	1,53	0,4994
Cw*05 / Cw*12	0	0,00	1	0,76	1,0000
Cw*05 / Cw*15	1	0,85	1	0,76	1,0000
Cw*05 / Cw*16	0	0,00	2	1,53	0,4994
Cw*06 / Cw*06	0	0,00	1	0,76	1,0000
Cw*06 / Cw*07	2	1,69	2	1,53	1,0000
Cw*06 / Cw*08	3	2,54	1	0,76	0,3477
Cw*06 / Cw*12	1	0,85	2	1,53	1,0000
Cw*06 / Cw*15	0	0,00	2	1,53	0,4994
Cw*06 / Cw*17	0	0,00	1	0,76	1,0000
Cw*07 / Cw*07	5	4,24	6	4,58	1,0000
Cw*07 / Cw*12	8	6,78	5	3,82	0,4510
Cw*07 / Cw*14	1	0,85	1	0,76	1,0000
Cw*07 / Cw*15	2	1,69	5	3,82	0,4510
Cw*07 / Cw*16	4	3,39	2	1,53	0,4994
Cw*07 / Cw*17	0	0,00	2	1,53	0,4994
Cw*08 / Cw*15	1	0,85	0	0,00	0,4739
Cw*08 / Cw*16	1	0,85	0	0,00	0,4739
Cw*12 / Cw*12	0	0,00	1	0,76	1,0000
Cw*12 / Cw*14	1	0,85	1	0,76	1,0000
Cw*12 / Cw*15	1	0,85	3	2,29	0,6240
Cw*12 / Cw*16	1	0,85	0	0,00	0,4739
Cw*12 / Cw*17	1	0,85	1	0,76	1,0000
Cw*15 / Cw*15	1	0,85	1	0,76	1,0000
Cw*15 / Cw*16	2	1,69	2	1,53	1,0000
Cw*15 / Cw*17	0	0,00	1	0,76	1,0000
Cw*16 / Cw*17	1	0,85	1	0,76	1,0000
Cw*17 / Cw*17	1	0,85	0	0,00	0,4739

5.3.3 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DO GENE *HLA-Cw* REUNIDAS NOS GRUPOS C1 E C2

As moléculas *HLA-Cw* podem ser divididas em dois subgrupos dependendo dos aminoácidos na posição 77 e 80, desta forma define-se *HLA-Cw* do grupo 1 (C1) aos alelos que possuem um resíduo de serina na posição 77 e outro de asparagina na posição 80 e *HLA-Cw* de grupo 2 (C2) àqueles que apresentam resíduos de asparagina na posição 77 e de lisina na posição 80.

Sabe-se que alguns receptores *KIR* ligam-se à determinadas moléculas *HLA-Cw* dependendo do grupo C1 ou C2 que estas pertencem, como mostrado

na TABELA 4. Assim, as freqüências alélicas do gene *HLA-Cw* agrupadas foram comparadas entre os grupos paciente e controle e apresentam-se na TABELA 41. Estas mesmas freqüências, considerando-se separadamente as mulheres e os homens que compõem os casais, são contrastadas nas TABELAS 42 e 43 respectivamente.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nas comparações entre ambos os grupos.

TABELA 41. FREQÜÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE *HLA-Cw* AGRUPADAS EM C1 E C2 COMPARADAS ENTRE O GRUPO DE PACIENTES E CONTROLES

Alelos	Pacientes (n=118)		Controles (n=131)		<i>p-value</i>
	n	%	n	%	
C1	128	54,24	138	52,67	0.7873
C2	108	45,76	124	47,33	

TABELA 42. FREQÜÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE *HLA-Cw* AGRUPADAS EM C1 E C2 COMPARADAS ENTRE AS MULHERES PACIENTES E CONTROLES

Alelos	Pacientes (n=66)		Controles (n=65)		<i>p-value</i>
	n	%	n	%	
C1	65	53,28	70	53,85	1.0000
C2	57	46,72	60	46,15	

TABELA 43. FREQÜÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE *HLA-Cw* AGRUPADAS EM C1 E C2 COMPARADAS ENTRE OS HOMENS PACIENTES E CONTROLES

Alelos	Pacientes (n=57)		Controles (n=66)		<i>p-value</i>
	n	%	n	%	
C1	63	55,26	68	51,52	0.6089
C2	51	44,74	64	48,48	

As mesmas comparações, considerando os grupos pacientes e controles por inteiro e comparando as mulheres e os homens por separado, foram feitas considerando os genótipos *HLA-Cw* agrupados e são mostradas nas TABELAS 44, 45 e 46. A distribuição dos genótipos de *HLA-Cw* agrupados foi similar entre pacientes com RSA e controle e as comparações não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

TABELA 44. FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DO GENE *HLA-Cw* AGRUPADAS EM C1 E C2 COMPARADAS ENTRE O GRUPO DE PACIENTES E CONTROLES

Genótipos	Pacientes (n=118)		Controles (n=131)		<i>p-value</i>
	n	%	n	%	
C1/C1	37	31,36	34	25,95	0.3995
C1/C2	54	45,76	70	53,44	0.2542
C2/C2	27	22,88	27	20,61	0.7584

TABELA 45. FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DO GENE *HLA-Cw* AGRUPADAS EM C1 E C2 COMPARADAS ENTRE AS MULHERES PACIENTES E CONTROLES

Genótipos	Pacientes (n=61)		Controles (n=65)		<i>p-value</i>
	n	%	n	%	
C1/C1	20	32,79	16	24,62	0.3307
C1/C2	25	40,98	38	58,46	0.0531
C2/C2	16	26,23	11	16,92	0.2775

TABELA 46. FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DO GENE *HLA-Cw* AGRUPADAS EM C1 E C2 COMPARADAS ENTRE OS HOMENS PACIENTES E CONTROLES

Genótipos	Pacientes (57)		Controles (66)		<i>p-value</i>
	n	%	n	%	
C1/C1	17	29,82	18	27,27	0.8419
C1/C2	29	50,88	32	48,48	0.8573
C2/C2	11	19,30	16	24,24	0.5229

5.4 GENES *HLA-G*

O seqüenciador automatizado ABI Prism 3130 (Applied Biosystems®) foi utilizado para obtenção das seqüências nucleotídicas dos segmentos gênicos necessários para a caracterização alélica dos genes *HLA-G* nas mulheres pacientes e controles.

Foram calculadas as frequências alélicas e genotípicas e comparadas entre os dois grupos. Os alelos do gene *HLA-G* também foram agrupados segundo a presença ou ausência de uma deleção de 14 pares de bases na região 3' UTR (exon 8) que poderia ter conseqüências funcionais na molécula *HLA-G* influenciando na estabilidade do RNAm e no mecanismo de *splicing* alternativo do transcrito primário.

5.4.1 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE *HLA-G*

As frequências alélicas do gene *HLA-G* foram analisadas estatisticamente e comparadas entre os dois grupos. Os resultados das comparações são mostrados na TABELA 47. O alelo *HLA-G*010103* se apresentou significativamente mais freqüente entre os controles ($P = 0,0270$; O.R: 0,1783; I.C. 95%: [0,0381-0,8352]) e o alelo *HLA-G*010403* foi significativamente mais freqüente entre os pacientes ($P = 0,0251$; O.R.: 7,7532; I.C. 95%: [0,9738-61,7326]). Estas mesmas frequências alélicas, considerando separadamente as mulheres e os homens que compõem os casais, são contrastadas nas TABELAS 48 e 49 respectivamente. Nas mulheres o grupo de alelos *HLA-G*0101A* (que inclui os alelos *HLA-G*010101* e *HLA-G*010106*) foi significativamente mais freqüente no grupo controle ($P = 0,0134$; O.R.: 0.4780; I.C. 95%: [0,2680-0,8526]). Nos homens a distribuição das frequências foi semelhante e não foram observadas diferenças estatisticamente significativas.

TABELA 47. COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE *HLA-G*

Alelos	Pacientes (n=120)		Controles (n=100)		<i>p-value</i>
	n	%	n	%	
<i>HLA-G*010103</i>	2	0,83	9	4,50	0,0270
<i>HLA-G*010107</i>	0	0,00	1	0,50	0,4545
<i>HLA-G*010108</i>	57	23,75	37	18,50	0,1997
<i>HLA-G*0101A</i>	60	25,00	66	33,00	0,0721
<i>HLA-G*0103</i>	24	10,00	13	6,50	0,2280
<i>HLA-G*010401</i>	33	13,75	19	9,50	0,1843
<i>HLA-G*010403</i>	9	3,75	1	0,50	0,0251
<i>HLA-G*0105N</i>	6	2,50	4	2,00	0,7614
<i>HLA-G*01B</i>	49	20,42	50	25,00	0,3022

Legenda: *HLA-G*0101A*=*HLA-G*010101* e ou *HLA-G*010106* – *HLA-G*01B*=*HLA-G*010102* e/ou *HLA-G*0106*

TABELA 48. COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE *HLA-G* EM MULHERES

Alelos	Mulheres Pacientes (n=60)		Mulheres Controles (n=50)		<i>p-value</i>
	n	%	n	%	
<i>HLA-G*010103</i>	1	0,83	4	4,00	0,1795
<i>HLA-G*010108</i>	23	19,17	17	17,00	0,7051
<i>HLA-G*0101A</i>	29	24,17	40	40,00	0,0134
<i>HLA-G*0103</i>	16	13,33	7	7,00	0,2250
<i>HLA-G*010401</i>	16	13,33	6	6,00	0,1039
<i>HLA-G*010403</i>	5	4,17	0	0,00	0,1279
<i>HLA-G*0105N</i>	5	4,17	3	3,00	1,0000
<i>HLA-G*01B</i>	25	20,83	23	23,00	0,7272

Legenda: *HLA-G*0101A=HLA-G*010101* ou *HLA-G*010106* – *HLA-G*01B=HLA-G*010102* ou *HLA-G*0106*.

TABELA 49. COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE *HLA-G* EM HOMENS

Alelos	Homens Pacientes (n=60)		Homens Controles (n=50)		<i>p-value</i>
	n	%	n	%	
<i>HLA-G*010103</i>	1	0,83	5	5,00	0,1810
<i>HLA-G*010107</i>	0	0,00	1	1,00	0,4564
<i>HLA-G*010108</i>	34	28,33	20	20,00	0,2217
<i>HLA-G*0101A</i>	31	25,83	26	26,00	1,0000
<i>HLA-G*0103</i>	8	6,67	6	6,00	1,0000
<i>HLA-G*010401</i>	17	14,17	13	13,00	1,0000
<i>HLA-G*010403</i>	4	3,33	1	1,00	0,3797
<i>HLA-G*0105N</i>	1	0,83	1	1,00	1,0000
<i>HLA-G*01B</i>	24	20,00	27	27,00	0,2836

Legenda: *HLA-G*0101A=HLA-G*010101* ou *HLA-G*010106* – *HLA-G*01B=HLA-G*010102* ou *HLA-G*0106*

5.4.2 FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DO GENE *HLA-G*

Foram comparadas as frequências genotípicas de *HLA-G* entre as amostras de casais pacientes com RSA e controles férteis. Os resultados das comparações são mostrados na TABELA 50. Estas mesmas frequências alélicas, considerando separadamente as mulheres e os homens que compõem os casais, são contrastadas nas TABELAS 51 e 52 respectivamente. Em nenhum dos casos foram observadas diferenças estatisticamente significativas.

TABELA 50. COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DO GENE *HLA-G*

Genótipos	Pacientes (n=120)		Controles (n=100)		<i>p-value</i>
	n	%	n	%	
<i>HLA-G*010103-010108</i>	1	0,83	2	2,00	0,6017
<i>HLA-G*010103-010401</i>	0	0,00	1	1,00	0,4611
<i>HLA-G*010108-010108</i>	8	6,67	3	3,00	0,3419
<i>HLA-G*010108-010401</i>	0	0,00	0	0,00	1,0000
<i>HLA-G*010108-0105N</i>	2	1,67	1	1,00	0,5010
<i>HLA-G*0101A-010103</i>	1	0,83	3	3,00	0,1099
<i>HLA-G*0101A-010107</i>	0	0,00	1	1,00	0,4611
<i>HLA-G*0101A-010108</i>	12	10,00	11	11,00	1,0000
<i>HLA-G*0101A-0101A</i>	7	5,83	12	12,00	0,2030
<i>HLA-G*0101A-010401</i>	9	7,50	5	5,00	0,7749
<i>HLA-G*0101A-010403</i>	2	1,67	1	1,00	0,5010
<i>HLA-G*0101A-0105N</i>	1	0,83	1	1,00	1,0000
<i>HLA-G*0101A-01B</i>	8	6,67	10	10,00	0,2898
<i>HLA-G*0103-010108</i>	3	2,50	2	2,00	1,0000
<i>HLA-G*0103-0101A</i>	9	7,50	4	4,00	0,5467
<i>HLA-G*0103-0103</i>	1	0,83	1	1,00	1,0000
<i>HLA-G*0103-010401</i>	3	2,50	0	0,00	0,2475
<i>HLA-G*0103-01B</i>	7	5,83	3	3,00	0,7262
<i>HLA-G*010401-010108</i>	7	5,83	4	4,00	0,7262
<i>HLA-G*010401-010401</i>	2	1,67	2	2,00	1,0000
<i>HLA-G*010401-010403</i>	1	0,83	0	0,00	1,0000
<i>HLA-G*010401-0105N</i>	2	1,67	0	0,00	1,0000
<i>HLA-G*010401-01B</i>	0	0,00	1	1,00	0,4611
<i>HLA-G*010403-010108</i>	2	1,67	0	0,00	0,5010
<i>HLA-G*0105N-010108</i>	0	0,00	2	2,00	0,4611
<i>HLA-G*01B-0105N</i>	1	0,83	2	2,00	0,6017
<i>HLA-G*01B-01B</i>	8	6,67	6	6,00	0,7379
<i>HLA-G*01B-010103</i>	6	5,00	2	2,00	0,6017
<i>HLA-G*01B-010108</i>	7	5,83	9	9,00	0,7956
<i>HLA-G*01B-0101A</i>	1	0,83	6	6,00	1,0000
<i>HLA-G*01B-010401</i>	4	3,33	5	5,00	1,0000
<i>HLA-G*01B-010403</i>	5	4,17	0	0,00	0,2475

Legenda: *HLA-G*0101A*=*HLA-G*010101* ou *HLA-G*010106* – *HLA-G*01B*=*HLA-G*010102* ou *HLA-G*0106*

TABELA 51. COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DO GENE HLA-G EM MULHERES

Genótipo	Mulheres Pacientes (n=60)		Mulheres Controles (n=50)		p-value
	n	%	n	%	
HLA-G*010103-010108	0	0,00	1	2,00	0,4769
HLA-G*010108-010108	2	3,33	1	2,00	1,0000
HLA-G*010108-0105N	1	1,67	1	2,00	1,0000
HLA-G*0101A-010103	1	1,67	2	4,00	0,2237
HLA-G*0101A-010108	6	10,00	6	12,00	1,0000
HLA-G*0101A-0101A	4	6,67	8	16,00	0,1859
HLA-G*0101A-010401	4	6,67	2	4,00	1,0000
HLA-G*0101A-010403	1	1,67	0	0,00	1,0000
HLA-G*0101A-0105N	1	1,67	1	2,00	1,0000
HLA-G*0101A-01B	1	1,67	3	6,00	0,1039
HLA-G*0103-010108	2	3,33	1	2,00	1,0000
HLA-G*0103-0101A	5	8,33	3	6,00	1,0000
HLA-G*0103-0103	1	1,67	0	0,00	1,0000
HLA-G*0103-010401	2	3,33	0	0,00	0,4962
HLA-G*0103-01B	4	6,67	2	4,00	1,0000
HLA-G*010401-010108	2	3,33	1	2,00	1,0000
HLA-G*010401-010401	1	1,67	1	2,00	1,0000
HLA-G*010401-010403	1	1,67	0	0,00	1,0000
HLA-G*010401-0105N	2	3,33	0	0,00	1,0000
HLA-G*010401-01B	0	0,00	1	2,00	0,4769
HLA-G*010403-010108	1	1,67	0	0,00	1,0000
HLA-G*0105N-010108	0	0,00	2	4,00	0,4769
HLA-G*01B-010103	1	1,67	1	2,00	1,0000
HLA-G*01B-010108	5	8,33	3	6,00	1,0000
HLA-G*01B-0101A	6	10,00	6	12,00	1,0000
HLA-G*01B-010401	2	3,33	1	2,00	0,4962
HLA-G*01B-010403	1	1,67	0	0,00	1,0000
HLA-G*01B-0105N	1	1,67	1	2,00	1,0000
HLA-G*01B-01B	2	3,33	2	4,00	1,0000

Legenda: HLA-G*0101A=HLA-G*010101 ou HLA-G*010106 – HLA-G*01B=HLA-G*010102 ou HLA-G*0106

TABELA 52. COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DO GENE *HLA-G* EM HOMENS

HLA-Genótipo	Homens Pacientes (n=60)		Homens Controles (n=50)		<i>p-value</i>
	n	%	n	%	
<i>HLA-G*010103-010108</i>	1	1,67	1	2,00	1,0000
<i>HLA-G*010103-010401</i>	0	0,00	1	2,00	0,4557
<i>HLA-G*010108-010108</i>	6	10,00	2	4,00	0,4485
<i>HLA-G*010401-010108</i>	1	1,67	1	2,00	1,0000
<i>HLA-G*010108-0105N</i>	1	1,67	0	0,00	1,0000
<i>HLA-G*0101A-010107</i>	0	0,00	1	2,00	0,4557
<i>HLA-G*0101A-010103</i>	0	0,00	1	2,00	0,4557
<i>HLA-G*0101A-010108</i>	6	10,00	5	10,00	1,0000
<i>HLA-G*0101A-0101A</i>	3	5,00	4	8,00	1,0000
<i>HLA-G*0101A-010401</i>	5	8,33	3	6,00	1,0000
<i>HLA-G*0101A-010403</i>	1	1,67	1	2,00	1,0000
<i>HLA-G*0101A-01B</i>	7	11,67	7	14,00	0,7660
<i>HLA-G*0103-010108</i>	1	1,67	1	2,00	1,0000
<i>HLA-G*0103-0101A</i>	4	6,67	1	2,00	0,6226
<i>HLA-G*0103-0103</i>	0	0,00	1	2,00	0,4557
<i>HLA-G*0103-010401</i>	1	1,67	0	0,00	1,0000
<i>HLA-G*0103-01B</i>	3	5,00	1	2,00	1,0000
<i>HLA-G*010401-010108</i>	4	6,67	2	4,00	1,0000
<i>HLA-G*010401-010401</i>	1	1,67	1	2,00	1,0000
<i>HLA-G*010403-010108</i>	1	1,67	0	0,00	1,0000
<i>HLA-G*01B-010103</i>	0	0,00	1	2,00	0,4557
<i>HLA-G*01B-010108</i>	5	8,33	6	12,00	0,7198
<i>HLA-G*01B-010401</i>	3	5,00	4	8,00	0,6581
<i>HLA-G*01B-010403</i>	3	5,00	0	0,00	0,4972
<i>HLA-G*01B-0105N</i>	0	0,00	1	2,00	0,4557
<i>HLA-G*01B-01B</i>	3	5,00	4	8,00	0,6581

Legenda: *HLA-G*0101A*=*HLA-G*010101* ou *HLA-G*010106* – *HLA-G*01B*=*HLA-G*010102* ou *HLA-G*0106*

5.4.3 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DA DELEÇÃO DO FRAGMENTO DE 14 PARES DE BASES NO ÉXON 8 DO GENE *HLA-G*

As frequências alélicas da deleção do fragmento de 14 pares de bases no éxon 8 do gene *HLA-G* são comparadas entre os grupos paciente e controle na TABELA 53. Estas mesmas frequências, considerando separadamente as mulheres e os homens que compõem os casais, são contrastadas nas tabelas 54 e 55 respectivamente. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nas comparações entre ambos os grupos.

TABELA 53. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DA DELEÇÃO DO FRAGMENTO DE 14 PARES DE BASES NO ÉXON 8 DO GENE *HLA-G*

Exon 8	Pacientes (n=120)		Controles (n=136)		<i>p-value</i>
	n	%	n	%	
14	82	34,17	110	40,44	0,1449
<i>del</i>	158	65,83	162	59,56	

TABELA 54. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DA DELEÇÃO DO FRAGMENTO DE 14 PARES DE BASES NO ÉXON 8 DO GENE *HLA-G* EM MULHERES

Exon 8	Mulheres Pacientes (n=60)		Mulheres Controles (n=68)		<i>p-value</i>
	n	%	n	%	
14	46	38,33	54	39,71	0,8863
<i>del</i>	74	61,67	82	60,29	

TABELA 55. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DA DELEÇÃO DO FRAGMENTO DE 14 PARES DE BASES NO ÉXON 8 DO GENE *HLA-G* EM HOMENS

Exon 8	Homens Pacientes (n=60)		Homens Controles (n=68)		<i>p-value</i>
	n	%	n	%	
14	36	30,00	56	41,18	0,0687
<i>del</i>	84	70,00	80	58,82	

Em relação à frequência dos genótipos, as comparações entre os casais pacientes e controles são mostradas na tabela 56. Estas mesmas frequências, considerando separadamente as mulheres e os homens que compõem os casais, são contrastadas nas tabelas 57 e 58 respectivamente. A distribuição dos genótipos foi similar entre ambos os grupos, com exceção do genótipo homozigótico para a deleção 14-14, que apresentou uma frequência maior nos controles ($P=0,0412$; O.R.=0,42, I.C.95%:[0,1938-0,9285]).

TABELA 56. FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DA DELEÇÃO DO FRAGMENTO DE 14 PARES DE BASES NO ÉXON 8 DO GENE *HLA-G*

Genótipos	Pacientes (n=120)		Controles (n=136)		<i>p-value</i>
	n	%	n	%	
<i>14-14</i>	10	8,33	24	17,65	0,0412
<i>14-del</i>	68	56,67	61	44,85	0,0618
<i>del-del</i>	42	35,00	51	37,50	0,6979

TABELA 57. FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DA DELEÇÃO DO FRAGMENTO DE 14 PARES DE BASES NO ÉXON 8 DO GENE *HLA-G* EM MULHERES

Genótipos	Mulheres Pacientes (n=60)		Mulheres Controles (n=68)		<i>p-value</i>
	n	%	n	%	
<i>14-14</i>	6	10,00	12	17,65	0,3086
<i>14-del</i>	34	56,67	29	42,65	0,1562
<i>del-del</i>	20	33,33	27	39,71	0,4694

TABELA 58. FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DA DELEÇÃO DO FRAGMENTO DE 14 PARES DE BASES NO ÉXON 8 DO GENE *HLA-G* EM HOMENS

HLA- Genótipos	Homens Pacientes (n=60)		Homens Controles (n=68)		<i>p-value</i>
	n	%	n	%	
<i>14-14</i>	4	6,67	12	17,65	0,0676
<i>14-del</i>	34	56,67	32	47,06	0,2934
<i>del-del</i>	22	36,67	24	35,29	1,0000

5.5 EFEITO COMBINATORIAL DOS GENES *KIR* E GENES *HLA*

O possível efeito entre as combinações dos genes *KIR* e *HLA* foi testado mediante comparações entre as frequências dos genótipos *KIR* materno e os genótipos esperados numa progênie hipotética que apresentasse o genótipo *HLA-Cw*. Os resultados são mostrados na TABELA 59.

Do mesmo modo foi avaliado o efeito no RSA da combinação dos genótipos da deleção da adenosina na posição 811 do éxon 7 do gene *KIR2DL4* materno em relação à deleção do fragmento de 14 pares de bases do éxon 8 do gene *HLA-G* da progênie estimada para os casais. A comparação é mostrada na TABELA 60.

Numa outra abordagem foram comparadas as freqüências dos alelos do gene *HLA-G* dos casais em relação à presença dos diferentes alelos do gene *KIR2DL4* materno como é mostrado na TABELA 61.

Nos três testes a distribuição das freqüências foi similar no grupo de pacientes com RSA e dos controles férteis e nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada quando se compararam as amostras.

TABELA 59. COMPARAÇÃO DOS GENÓTIPOS DE *HLA-Cw* ESPERADOS NA PROGÊNIE HIPOTÉTICA DOS CASAIS EM RELAÇÃO AO GENÓTIPO *KIR* MATERNO

Genótipo <i>KIR</i> materno	Genótipo <i>HLA-Cw</i> esperado na prole hipotética dos casais				<i>p-value</i>
	Pacientes		Controles		
	Genótipos	n	Genótipos	n	
<i>KIR A/A</i>	<i>C1/C1</i>	11	<i>C1/C1</i>	22	0,2141
	<i>C2/C2</i>	7	<i>C2/C2</i>	12	0,6190
	<i>C1/C2</i>	30	<i>C1/C2</i>	30	0,1266
Total		48		64	
<i>KIR B/B</i>	<i>C1/C1</i>	11	<i>C1/C1</i>	20	0,6734
	<i>C2/C2</i>	9	<i>C2/C2</i>	18	0,5063
	<i>C1/C2</i>	28	<i>C1/C2</i>	34	0,5789
Total		48		72	
<i>KIR A/B</i>	<i>C1/C1</i>	38	<i>C1/C1</i>	31	0,6665
	<i>C2/C2</i>	22	<i>C2/C2</i>	27	0,2593
	<i>C1/C2</i>	60	<i>C1/C2</i>	50	0,5976
Total		120		108	

TABELA 60. COMPARAÇÃO DOS GENÓTIPOS DO ÉXON 8 DO GENE *HLA-G* ESPERADOS NA PROGÊNIE HIPOTÉTICA DOS CASAIS EM RELAÇÃO AO GENÓTIPO DA DELEÇÃO DA ADENOSINA 811 NO ÉXON 7 DO GENE *KIR2DL4*

Genótipo da deleção do fragmento de 14 pb do éxon 8 esperado na progenie hipotética dos casais					
Genótipo da deleção do éxon 7 do <i>KIR2DL4</i> materno	Pacientes		Controles		<i>p-value</i>
	Genótipo	n	Genótipo	n	
<i>KIR2DL4 Del - Del</i>	<i>14-14</i>	1	<i>14-14</i>	2	1,0000
	<i>Del - Del</i>	13	<i>Del - Del</i>	20	1,0000
	<i>Del - 14</i>	10	<i>Del - 14</i>	14	1,0000
Total		24		36	
<i>KIR2DL4 A-A</i>	<i>14-14</i>	2	<i>14-14</i>	6	0,4500
	<i>Del - Del</i>	12	<i>Del - Del</i>	14	0,6142
	<i>Del - 14</i>	14	<i>Del - 14</i>	20	1,0000
Total		28		40	
<i>KIR2DL4 Del - A</i>	<i>14-14</i>	17	<i>14-14</i>	14	0,5400
	<i>Del - Del</i>	39	<i>Del - Del</i>	28	0,7500
	<i>Del - 14</i>	52	<i>Del - 14</i>	30	0,4460
Total		108		72	

TABELA 61. FREQUENCIAS ALÉLICAS DO GENE *HLA-G* DOS CASAIS PACIENTE E CONTROLE EM RELAÇÃO AOS DIFERENTES ALELOS DO GENE *KIR2DL4* MATERNO

Frequência <i>HLA-G</i> do casal	<i>KIR 2DL4</i> Materno											
	<i>KIR 2DL4 001</i>			<i>KIR 2DL4 002</i>			<i>KIR 2DL4 005</i>			<i>KIR 2DL4 006</i>		
	P	C	p-value	P	C	p-value	P	C	p-value	P	C	p-value
010108	18	5	0,2291	3	5	0,2045	13	5	0,4016	3	0	1,0000
0101A	26	19	0,1725	4	1	0,6264	8	12	0,0270	5	0	1,0000
0103	5	4	0,4832	8	3	0,4647	3	3	0,6654	1	0	1,0000
010401	12	3	0,2664	2	1	1,0000	8	3	0,5160	1	0	1,0000
010403	4	0	0,2999	0	0	1,0000	3	0	0,2852	0	0	1,0000
0105N	4	1	0,6631	0	0	1,0000	0	0	1,0000	0	0	1,0000
01B	18	10	0,8235	3	2	0,9961	7	3	0,7320	2	0	1,0000
010103	0	1	0,3359	0	0	1,0000	1	0	1,0000	0	0	1,0000
010107'	0	1	0,3359	0	0	1,0000	0	0	1,0000	0	0	1,0000

Legenda: P: pacientes, C: Controles

TABELA 61 (Continuação). FREQUENCIAS ALÉLICAS DO GENE *HLA-G* DOS CASAIS PACIENTE E CONTROLE EM RELAÇÃO AOS DIFERENTES ALELOS DO GENE *KIR2DL4* MATERNO

Frequência <i>HLA-G</i> do casal	<i>KIR 2DL4</i> Materno											
	<i>KIR 2DL4 008</i>			<i>KIR 2DL4 009</i>			<i>KIR 2DL4 010</i>			<i>KIR 2DL4 011</i>		
	P	C	p-value	P	C	p-value	P	C	p-value	P	C	p-value
010108	17	11	0,5036	1	0	1,0000	1	0	1,0000	10	3	1,0000
0101A	26	13	1,0000	1	0	1,0000	0	0	1,0000	15	4	0,768
0103	7	6	0,3609	0	0	1,0000	2	0	1,0000	7	4	0,4535
010401	4	3	0,6876	0	0	1,0000	1	0	1,0000	8	1	0,4375
010403	5	0	0,2987	1	0	1,0000	0	0	1,0000	2	0	1,0000
0105N	2	2	0,6035	0	0	1,0000	0	0	1,0000	1	0	1,0000
01B	21	7	0,3644	1	0	1,0000	0	0	1,0000	15	8	0,2555
010103	0	0	1,0000	0	0	1,0000	0	0	1,0000	2	0	1,0000
010107'	0	0	1,0000	0	0	1,0000	0	0	1,0000	0	0	1,0000

Legenda: P: pacientes, C: Control

6. DISCUSSÃO

Este estudo caso-controle investigou a variação genética presente no cluster de genes *KIR* e nos alelos dos genes *HLA-Cw*, *KIR2DL4*, e *HLA-G* e sua relação com o abortamento espontâneo recorrente.

As tentativas de se explicar o enigma da sobrevivência fetal são tão antigas quanto a própria imunogenética. A Imunologia da Reprodução tornou-se uma nova área de estudo que se originou da Imunologia dos Transplantes. Os investigadores partiam da premissa de que o feto poderia ser considerado um aloenxerto e se submeteria às leis de rejeição ou compatibilidade. Hoje, métodos imunológicos de investigação mais sofisticados têm sido utilizados, buscando definir com maior clareza os mecanismos de imunorregulação em uma gravidez normal ou em uma gravidez que termina em aborto. Complementando a hipótese de Medawar em 1953, de que ocorreria uma supressão do sistema imune materno para a aceitação do alo-enxerto fetal, Thomas Wegmann e colaboradores postularam que citocinas do tipo Th2 anti-inflamatórias (como por exemplo, IL-4 e IL-10) inibiriam respostas Th1 mediadas por citocinas pro-inflamatórias (como por exemplo, IFN- γ , TNF- α e IL-2), permitindo a sobrevivência fetal (WEGMANN *et al.*, 1993). Sabe-se hoje que certo grau de inflamação é uma característica normal e necessária do primeiro trimestre da gestação e o alo-reconhecimento é importante para a produção inicial de citocinas, sendo crucial para o processo implantacional. Logo numa fase mais avançada da gestação a produção de citocinas Th2 aumenta em função de ajudar na manutenção do conceito (CHRISTIANSEN *et al.*, 2006). Assim a cooperação entre os perfis Th1-Th2 parece ser um cenário muito mais próximo ao que realmente ocorre durante a gravidez do que apenas um fenômeno do tipo Th2 anti-inflamatório (WILCZYŃSKI, 2005).

Entre os problemas que afetam a gravidez está o RSA idiopático que ocorre freqüentemente durante o primeiro trimestre. Esse é o período no qual a placenta é formada, e o abortamento pode ocorrer como consequência do desenvolvimento anormal da unidade feto placentária ou por falhas nos mecanismos morfológicos e/ou fisiológicos responsáveis pela manutenção desta unidade semi-alogénica dentro do útero materno.

Os abortos espontâneos podem resultar de diferentes causas: anormalidades cromossômicas presentes no embrião e/ou nos pais, disfunções hormonais, alterações anatômicas, doenças auto-imunes e infecções no trato reprodutivo materno. No entanto, todas essas causas respondem por cerca de 60% das perdas gestacionais recorrentes em populações humanas. É provável que cerca da metade das restantes, possa ser atribuída a causas imunes e/ou genéticas ainda não-elucidadas (COULAM, 1986; COULAM e STERN, 1994; KIWI, 2006).

Vários fatores relacionados ao sistema imune podem se somar levando ao RSA idiopático, incluindo o reconhecimento de antígenos paternos presentes na unidade fetoplacentária pelo sistema imune materno, seguido pela destruição do feto. Embora as evidências para isso sejam limitadas é sabido que existe um tráfego bidirecional de células e ácidos nucleicos entre mãe e feto, e no terceiro trimestre da gravidez normalmente todas as amostras de plasma materno apresentam DNA fetal (BIANCHI e ROMERO, 2003).

Nas últimas décadas um número considerável de pesquisas visou identificar os constituintes celulares e os processos imunes que estariam supostamente envolvidos com RSA. Até a década de 80, acreditava-se que os linfócitos T eram as principais células do sistema imune que participariam do processo reprodutivo, porém há pouco mais de dez anos, as células NK têm sido mais extensivamente estudadas, uma vez que elas constituem a principal população leucocitária presente no endométrio no momento da implantação e no início da gravidez (DOSIOU e GIUDICE, 2006).

No endométrio de mulheres não grávidas, o número de células NK pode variar durante o ciclo menstrual. A quantidade destas células apresenta um baixo nível na fase proliferativa pré-ovulatória, aumentando gradualmente logo depois da ovulação e atingindo um pico máximo na fase secretória tardia. A presença de células uNK na mucosa uterina é uma característica do começo da gravidez, estas começam a ficar menos conspícuas depois da vigésima semana da gestação e são totalmente ausentes na decídua a termo. As células NK não estão presentes no útero antes da menarca ou depois da menopausa (KING *et al.*, 1998).

Estas evidências indicam uma possível importante função reguladora por parte das células NK durante a gravidez, que seria executada pela imuno-modulação

do balanço Th1/Th2 através da secreção de citocinas como a IL-4 e IFN- γ e pela interação com as moléculas HLA de classe I (HLA-C, HLA-G e HLA-E) expressas no trofoblasto (BOYSON *et al.*, 2002; TSUDA *et al.*, 2001; TRUNDLEY e MOFFET, 2004)

O trofoblasto extra-viloso não expressa HLA-A, HLA-B ou moléculas HLA de classe II, as quais são os principais estimuladores da rejeição de enxertos dependente de células T. Entretanto estas células trofoblásticas expressam uma combinação de moléculas HLA-C, HLA-G e HLA-E que são ligantes específicos dos receptores das células NK. Entre estes receptores se encontram os receptores KIR, codificados por genes localizados no complexo de receptores leucocitários no cromossomo 19q13.4 (KING *et al.*, 2000a; KING *et al.*, 2000b; KING *et al.*, 2000c; WILSON *et al.*, 2000). As interações entre as moléculas HLA de classe I expressas no trofoblasto e os receptores das células NK uterinas tem sido relacionadas com diversos mecanismos reguladores da reprodução, como o início da menstruação, o estrito controle da invasão do trofoblasto durante o desenvolvimento da placenta, a implantação do embrião, a manutenção da decídua, a angiogénese do endométrio, a estabilidade vascular dos vasos da circulação sangüínea placentária e o sistema de reconhecimento da gravidez (HIBY *et al.*, 1997; LI *et al.*, 2001; MOFFETT-KING, 2002; VARLA-LEFTHERIOTI, 2004; SARGENT, BORZYCHOWSKY e REDMAN, 2006; KUSUMI *et al.*, 2006;).

Em vista da evidência apresentada acima, e dado que tanto o repertório de receptores KIR expresso pelas células NK, quanto a diversidade de moléculas HLA de classe I expressas pelo trofoblasto, dependem diretamente do conjunto de genes herdados pelos indivíduos, os genes que codificam para os receptores KIR (assim como os diferentes alelos que codificam para o receptor KIR2DL4) e para seus ligantes HLA-C e HLA-G foram tipificados em 68 casais com RSA de causa desconhecida e em 68 casais férteis com dois ou mais filhos. O presente trabalho teve como objetivo investigar a relação entre a variabilidade destes genes e a perda da gestação pelo aborto repetitivo através da análise de associação entre estes genes e a interrupção da gestação.

6.1 NÚMERO DE INDIVÍDUOS E ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO

Uma grande dificuldade existente para estudos de associação entre diversos parâmetros e o RSA é a obtenção de um grupo amostral de indivíduos Pacientes e outro de Controles que atendam a todos os critérios para enquadramento no perfil desejado e que sejam suficientemente grandes para que os resultados sejam os mais próximos da realidade.

Vários estudos demonstram a mesma dificuldade, como o trabalho de BAEK e colaboradores (2002), o qual fez uma comparação da expressão gênica na interface materno-fetal entre pacientes com gravidez normal e pacientes com RSA, sendo o *n* amostral desse estudo de 12 mulheres, sendo 6 pacientes com RSA e 6 controles (BAEK *et al.*, 2002).

FUKUI e colaboradores analisaram a relação das falhas implantacionais com a expressão de citocinas intracelulares em grupos de células NK de sangue periférico em mulheres com RSA, teve como amostra paciente 20 mulheres com duas ou mais falhas de implantação após técnicas de reprodução assistida e 25 mulheres com RSA sem técnicas de fertilização *in vitro* (FIV), e, como grupo controle, participaram 15 mulheres sem histórias de infertilidade ou abortos (FUKUI *et al.*, 2008). No trabalho de JOKIMAA e colaboradores (2002), que testou a relação entre infertilidade sem causa aparente, RSA e os genes envolvidos com a produção e degradação da matrix extracelular endometrial, analisou 14 mulheres férteis como grupo controle, 9 mulheres como o grupo com infertilidade idiopática e 10 mulheres foram enquadradas no grupo com RSA (JOKIMAA *et al.*, 2002)

Outros trabalhos com enfoques semelhantes ao presente investigaram a associação entre genes *KIR* e abortamento de repetição em grupos amostrais de 26 casais com RSA versus 26 casais controle (VARLA-LEFTHERIOTI *et al.*, 2003), de 15 mulheres com RSA (VARLA-LEFTHERIOTI *et al.*, 2005) e de 20 casais com RSA versus 15 casais controle (YAMADA *et al.*, 2004).

Entre os trabalhos que utilizam maior quantidade de indivíduos com RSA encontram-se, o de COUMANS e colaboradores (1999) que analisou 52 mulheres com RSA para verificar anormalidades metabólicas e homeostáticas associadas a esta afecção (COUMANS *et al.*, 1999), o estudo caso controle com o polimorfismo dos genes *IL6* e *TGFB1* e o RSA em pacientes do sul do

Brasil foi realizado por nosso grupo de pesquisa, contou com 57 mulheres pacientes e 74 mulheres controles (VON LINSINGEN, BOMPEIXE e BICALHO, 2005).

Dentro dos estudos estatisticamente mais robustos sobre a associação entre genes *KIR* e *RSA*, encontram-se o de WITT e colaboradores (2004) que analisou 51 mulheres com *RSA* e 55 mulheres férteis, o trabalho de FLORES e colaboradores (2007) e o de WANG e colaboradores (2007) que analisaram 70 mulheres e 73 casais com *RSA* e 70 mulheres e 68 casais férteis como controle respectivamente (WITT et al., 2004; FLORES et al., 2007; WANG et al., 2007). Estes estudos utilizaram tamanhos amostrais semelhantes ao do presente estudo.

A contagem da população do Paraná em 2007, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), foi de 10.284.503 habitantes, sendo 77% de origem euro brasileiro, 51% mulheres e 49% homens (IBGE, 2007). No ano de 2005 foram registrados 164588 nascimentos e 1560 óbitos fetais, segundo dados do IBGE, 2007. Considerando-se que por ano, cada casal tem apenas um filho, pode-se considerar que aproximadamente 166148 mulheres tiveram gestações no ano de 2005. Segundo COULAM e colaboradores (1997), de 2 a 5% dos casais sofrem *RSA*, portanto, das aproximadamente 166148 mulheres que conseguiram engravidar no Paraná em 2005, de 3322 a 8307 teriam tido abortos espontâneos de repetição, sendo registrados apenas 1560 óbitos fetais. Esses números seriam satisfatórios para a realização da pesquisa em questão, porém deve-se salientar que dos óbitos fetais registrados, grande parte, provavelmente, foi um aborto único e de causa conhecida, uma vez que apenas 2 a 5% das mulheres sofrem *RSA* contra 10 a 15% que sofrem abortos únicos (COULAM *et al.*, 1997; TULPPALA e YLIKORKALA, 1999). Além disso, das mulheres cujas perdas gestacionais foram de repetição e de causa desconhecida, poucas procuraram clínicas de medicina reprodutiva especializadas, o que faz com que os pesquisadores da área tenham acesso a um número extremamente restrito de casais com *RSA* de causas desconhecidas (DE FRANÇA, 2008).

A busca por esses casais pela equipe do LIGH ocorre desde 1997, porém estoques de DNA acabam, a qualidade do material genético de algumas amostras é perdida e a reposição do sangue de casais desse tipo é sempre

muito pequena. O fato de algumas amostras estarem estocadas há pelo menos 10 anos, e por serem congeladas e descongeladas várias vezes para a realização das pesquisas pode explicar porque muitas amostras apresentaram problemas na amplificação tanto na técnica PCR-SSO quanto na técnica de seqüenciamento. Além disso, algumas amostras apresentaram uma baixa concentração de DNA, e podem não ter tido material suficiente para uma amplificação satisfatória.

Como descrito anteriormente, se conseguiu uma lista de 106 casais da Clínica Genetika e Citogene, porém mais da metade conseguiu ter filhos e dentre os casais que não conseguiram ter filhos somente 6 aceitaram participar do estudo.

Em relação ao tipo de estudo realizado é necessário ressaltar que o abortamento espontâneo recorrente é considerado uma afecção multifatorial ou complexa. Sabe-se que estes padecimentos resultam de um processo dependente de múltiplos fatores, entre os quais se encontram diversos genes, fenômenos epigenéticos e fatores ambientais. Estes fatores não são individualmente suficientes, e em geral, não são essenciais para que a afecção se estabeleça. De fato, a maioria deles ocorre na população sadia em frequência apreciável. Em conjunto, entretanto, podem levar o indivíduo a ultrapassar o limiar de manifestação da afecção. No presente estudo foi investigado o componente genético de susceptibilidade a RSA através de um estudo de associação caso-controle entre indivíduos/casais não consangüíneos entre si. Testes múltiplos aplicados à mesma amostra de pacientes e de controles aumentam a chance de resultados falso-positivos, ou seja, de se observar uma associação espúria (PETZL-ERLER, 2005). Entre as soluções propostas para minimizar esta classe de erros pode ser mencionada a correção de Bonferroni onde o valor de p utilizado como limiar de significância é o valor limiar de p preestabelecido (comumente 0,05) dividido pelo número total de comparações realizadas naquelas amostras, deste modo se dois comparações são feitas e o limiar de p preestabelecido for de 0,05, o valor de p resultante das comparações deverá ser menor ou igual a 0,025 ($p_{\text{Bonferroni}} = p/\text{número de comparações}$).

No presente trabalho não foram utilizadas correções sobre o valor de p achado devido a que o grande número de comparações efetuadas acabaria diminuindo

excessivamente o limiar de significância, levando a análise a incorrer em um aumento do erro tipo II (atribuir uma igualdade entre as duas amostras, quando realmente existe uma diferença entre as mesmas). Em compensação o presente estudo somente procurou associações entre genes candidatos, os quais são genes que devido a sua função biológica, podem ser previamente implicados na suscetibilidade ou na modulação do grau de uma determinada afecção. Além disso, para aumentar o rigor dos resultados, as diferenças estatisticamente significativas obtidas das comparações gerais entre estes genes candidatos foram interpretadas com cautela. Também, dentro destas análises comparativas entre genes candidatos foram montados cenários a priori, onde foram testados um conjunto de combinações de genes previamente estabelecidas dependendo dos efeitos que estes genes poderiam ter. As associações achadas neste contexto foram consideradas fidedignas.

6.2 GENES *KIR*

Na investigação dos polimorfismos genéticos dos genes *KIR* não foram observadas diferenças relativas à distribuição das frequências dos diferentes locos *KIR* quando se comparou o grupo de pacientes com RSA versus o grupo de controles férteis. Também não se acharam diferenças significativas quando comparadas as mulheres e os homens, de ambos os grupos, por separado. As frequências dos genes *KIR* obtidas tanto em pacientes quanto em controles foram semelhantes às descritas para as populações caucasianas (MIDDLETON *et al.*, 2008). Estes resultados diferem dos publicados em vários estudos que mostraram que as mulheres do grupo paciente com RSA, a diferença das mulheres férteis, apresentavam menor frequência de genes *KIR* inibitórios (*KIR2DL1* e *KIR2DL2*), os quais seriam apropriados para manter o estado de inibição-tolerância das células NK na interface materno-fetal (VARLA-LEFTHERIOTI *et al.*, 2003; YAMADA *et al.*, 2004; VARLA-LEFTHERIOTI *et al.*, 2005; FLORES *et al.*, 2007)

Numa outra abordagem foi feita a comparação da identidade dos repertórios *KIR* entre as mulheres e os homens de cada casal, realizada com o intuito de avaliar a possibilidade da existência de um sistema de reconhecimento fetal independente dos ligantes HLA, onde foram comparadas entre as amostras paciente e controle as frequências dos casais

cujas mulheres não apresentavam um ou mais genes inibitórios/ativadores presentes nos maridos e vice-versa. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nestas comparações.

Estes dados diferem dos achados por VARLA-LEFTHERIOTI e colaboradores (2003) que analisando, em indivíduos caucasianos da Grécia, 26 casais com RSA e 26 casais controle acharam que a porcentagem de mulheres que apresentava um ou mais genes *KIR* inibitórios ausentes no seu marido, era significativamente mais elevada no grupo de casais com RSA que no grupo de controles (VARLA-LEFTHERIOTI *et al.*, 2003). Estas discrepâncias com o presente trabalho podem ser devidas às variações nos repertórios de genes *KIR* entre os dois grupos étnicos diferentes (caucasianos brasileiros e caucasianos gregos), ou também podem ser atribuídas à diferença do tamanho amostral existente entre ambos os estudos.

O presente estudo demonstrou que os repertórios *KIR* com número elevado de genes *KIR* ativadores (5 ou 6 genes *KIR* ativadores) são mais frequentes entre mulheres com RSA do que em controles ($P = 0,0201$), com um valor de Odds Ratio de 2,71 com um Intervalo de Confiança de 95% de [1,23-6,01], o que indica que a probabilidade de que uma mulher com este repertório apresente RSA é aproximadamente 3 (2,71) vezes maior à probabilidade de que isto aconteça em uma mulher que não apresente este tipo de repertório. Estes dados são diferentes com os achados por WITT e colaboradores (2004) que não achou nenhuma associação entre o polimorfismo dos genes *KIR* e RSA em um estudo similar realizado em indivíduos caucasoides brasileiros. Esta diferença pode se dever a que no trabalho de WITT e colaboradores algumas frequências dos genes *KIR* ativadores poderiam ter sido subestimadas em função da metodologia de tipificação disponível naquele momento (2004). Por exemplo, é sabido que a frequência do gene *KIR2DS4* nas diferentes populações, incluindo a população brasileira previamente estudada e a dos controles observada no presente estudo, se encontra entre 84 e 100% (MIDDLETON *et al.*, 2008). No trabalho de WITT e colaboradores a frequência de este gene foi estimada em 38%. Esta provável subestimação relacionada com o gene ativador *KIR2DS4* poderia ter um forte impacto na composição dos repertórios *KIR* quando estratificados segundo o número de genes *KIR* ativadores. De todas formas, estas

diferenças poderiam levar aos investigadores a considerar a existência de uma maior complexidade fisiológica envolvida no RSA de causa desconhecida. Estes resultados são coincidentes com os observados por WANG e colaboradores (2007), que também acharam um número aumentado de genes *KIR* ativadores em mulheres chinesas com RSA (WANG et al., 2007). A partir deste ponto pode se inferir que estes resultados congruentes podem ser indicativos de uma importante influência dos receptores *KIR* nas causas de RSA, dado que estes dois grupos étnicos (chineses han e caucasóides brasileiros) são amplamente diferentes nas frequências dos genes *KIR* (JIANG et al., 2005; MIDDLETON et al., 2008), porém quando estes genes são avaliados em mulheres afetadas pela condição de RSA, um perfil similar de genes *KIR* ativadores elevados é observado em ambos os grupos étnicos.

Normalmente os receptores *KIR* ativadores nas células NK podem reconhecer ligantes que estejam presentes tanto em células alvo quanto em células normais, mas a influência dos mecanismos inibitórios é dominante (epistática) por sobre os mecanismos ativadores, levando o balanço de sinais ao estado de inibição-tolerância da célula NK quando os receptores *KIR* inibitórios entram em contato com os ligantes HLA de classe I expressos constitutivamente na maioria das células do corpo (ABBAS, LICHTMAN e PILLA, 2007). Subseqüentemente temos proposto um mecanismo fisiológico que explicaria a observação de um número elevado de genes *KIR* ativadores em mulheres com RSA. Neste modelo uma mais ampla gama de receptores *KIR* ativadores diferentes se estariam expressando nas células NK predispondo-as a reconhecer um espectro mais amplo de ligantes derivados de tecidos embrionários, que levariam às células NK a uma sinalização proporcionalmente maior de estímulos de ativação da citotoxicidade que se sobreporia à ação dos estímulos de inibição-tolerância provenientes da sinalização dos receptores inibitórios, desencadeando um ataque citotóxico contra as células semialogênicas na interfase materno-fetal, o que culminaria na perda da gravidez.

Seguindo este modelo onde o complemento de genes *KIR* ativadores é mais amplo em mulheres com RSA, é de se esperar que em média, os clones de células NK e uNK expressem uma quantidade maior de receptores *KIR* ativadores na sua superfície. Como resultante, estas células se tornariam mais

agressivas, com um alto potencial de disparar sinais citotóxicas e apoptóticas em resposta a um maior número de estímulos ativadores recebidos quando comparadas com clones de células NK e uNK de mulheres férteis com menos genes *KIR* ativadores e por conseqüência mais tolerantes aos tecidos alogênicos, estado que poderia darse devido a um mais restrito repertório de genes *KIR* ativadores ou a uma maior proporção de genes *KIR* inibitórios em relação ao número de genes *KIR* ativadores, ambas situações levariam a célula a um estado de não ativação da citotoxicidade. Este cenário poderia ser significativo na hora de definir o sucesso ou a falha do processo gestacional.

Os resultados em principio conflitantes presentes na literatura que mostram uma reduzida freqüência de genes *KIR* inibitórios em mulheres com RSA (VARLA-LEFTHERIOTI *et al.*, 2003; YAMADA *et al.*, 2004; VARLA-LEFTHERIOTI *et al.*, 2005; FLORES *et al.*, 2007) contrastando com o presente trabalho e com o de WANG e colaboradores (2007) realizado com indivíduos chineses han onde um aumento de genes *KIR* ativadores foi documentado, podem ser encaixados perfeitamente como sinérgicos e não como mutuamente excludentes, em nosso modelo, dado que tanto as células NK que apresentem uma menor taxa de inibição (devido a uma menor variedade de receptores inibitórios), quanto as que apresentam uma maior taxa de ativação (devida a uma maior diversidade de receptores ativadores), são igualmente direcionadas para um mesmo estado de indução da ativação. Desta forma estas mulheres apresentam nos dois casos, linhagens clonais de células NK mais agressivas que poderiam ser em media, ativadores mais fortes da citotoxicidade contra os tecidos embrionários.

WANG e colaboradores propuseram que o número de genes *KIR* ativadores por fenótipo poderia influenciar a susceptibilidade ao RSA mediante um efeito de dosagem gênica (WANG *et al.*, 2007). Esta hipótese é plausível, porém para elucidá-la estudos aplicando técnicas mais específicas, aptas para identificar o número de cópias de cada gene *KIR* existentes em cada genótipo são necessários, dado que as técnicas comumente empregadas na tipificação destes genes como SSP ou SSO não são capazes de discriminar entre genótipos homocigóticos e heterocigóticos.

Em relação as comparações dos haplótipos e dos genótipos *KIR* a distribuição das freqüências entre pacientes com RSA e mulheres controle foi

similar, exceto com relação ao haplótipo 40 que apresentou maior frequência na amostra paciente tanto nas comparações entre os casais ($P = 0,0304$; O.R: 7,1842; I.C. 95%: [0,87-58,79]) como nas comparações entre os grupos de mulheres ($P = 0,0295$; O.R: 7,3231; I.C. 95%: [0,88-60,34]). Nos dois casos esta associação estaria indicando que os indivíduos portadores desse haplótipo teriam aproximadamente 7 vezes mais chances de apresentar RSA que aqueles indivíduos que não apresentam o haplótipo 40. Estas associações devem ser consideradas com cautela devido a que em ambos os casos o Intervalo de Confiança de 95% inclui o valor de 1, situação que invalidaria a condição do haplótipo 40 de estar associado a predisposição ou susceptibilidade.

As frequências descritas no presente trabalho para os haplótipos *KIR* agrupados A e B coincide com a relatada na literatura (47-59%) para as populações caucasóides, com um valor de aproximadamente 50% para cada designação haplotípica em todos os grupos amostrais analisados (UHRBERG *et al.*, 1997).

6.3 ALELOS DO GENE *KIR2DL4*

Os alelos do gene *KIR2DL4* foram tipificados pela técnica de seqüenciamento automatizado em 63 mulheres paciente e 49 mulheres controle. Em 6 indivíduos foram identificadas sequências gênicas que não apresentaram correspondência com nenhum alelo do gene *KIR2DL4* descritos até o momento no site da IPD (The Immuno Polymorphism Database; <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/align.html>, acesso em março de 2009). Esses possíveis novos alelos serão descritos em futuros trabalhos que serão realizados por este grupo de pesquisa.

No foi achada associação entre as variáveis alélicas do gene *KIR2DL4* e RSA, sendo este o primeiro trabalho em realizar esta abordagem, não existem na literatura situações para comparar.

Os alelos deste gene foram agrupados dependendo da deleção de uma adenosina na posição 811 do éxon 7 e não foram achadas associações entre este polimorfismo e RSA na comparação entre mulheres pacientes e controles. WITT e colaboradores (2002), em um enfoque semelhante testaram a existência de associações entre os alelos agrupados dependendo da presença

ou ausência desta deleção no éxon 7 do gene *KIR2DL4* e pré-eclampsia e também não foram achadas associações estatisticamente significativas (WITT *et al.*, 2002).

Foi observado num estudo de expressão protéica que os níveis do receptor KIR2DL4 foram significativamente mais elevados nas membranas de células uNK de mulheres férteis quando comparadas com mulheres com RSA (WEI-HUA YAN *et al.*, 2007). A explicação sugerida para esta observação, porém não foi testada, foi que as mulheres com RSA poderiam apresentar em maior frequência a variante do gene KIR2DL4 com a deleção da adenosina no éxon 7 que teria como consequência menores níveis deste receptor na membrana das células uNK. No presente trabalho foi comparada a frequência desta deleção entre mulheres férteis e com RSA e não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa.

Em contraposição à importância do receptor KIR2DL4 na gravidez, foi reportado por Gomez-Lozano e colaboradores (2003) que o receptor KIR2DL4 não seria essencial para a reprodução desde que foi descrito o caso de uma mulher múltipara que não apresenta o gene *KIR2DL4* no seu genoma (GOMEZ-LOZANO *et al.*, 2003). Uma possível explicação alternativa para este fato poderia ser o funcionamento de um mecanismo semelhante ao que acontece nas diferentes linhagens clonais de células NK onde as moléculas KIR são expressas de maneira estocástica em cada uma delas e não sempre é expresso um receptor KIR inibitório com especificidade para ligar com uma molécula HLA de classe I própria, em esses casos a função do reconhecimento de moléculas HLA de classe I autólogas é assumida pelo receptor inibitório de tipo lectina CD94:NKG2A (SHILLING *et al.*, 2002b).

Em relação à distribuição das frequências nas populações poucos trabalhos estão disponíveis na literatura com técnicas que permitam elucidar o polimorfismo completo destes alelos e em um número considerável. Um deles apresenta um painel de 76 indivíduos de Estados Unidos descritos como predominantemente brancos (SHULSE, STEINER e HURLEY; 2007). Não foram achadas diferenças estatisticamente significativas entre essas frequências e as obtidas no presente trabalho.

Quando comparadas as frequências das mulheres controle férteis com as de um estudo realizado em 78 indivíduos da população han da China (ZHU

et al., 2006), as únicas freqüências que apresentaram valores semelhantes entre as duas populações foram as do alelo *KIR2DL4*00103* (5-7%) e a do *KIR2DL4*011* (13-15%). O outro trabalho existente que avaliou os alelos do gene *KIR2DL4* em populações foi realizado em 2004 através da técnica PCR-SSOP (WILLIAMS *et al.*, 2004). Esta técnica apresenta limitações uma vez que muitos alelos novos compartilham as mesmas regiões dos alelos conhecidos quando a técnica foi utilizada, impedindo a identificação desses alelos e dificultando assim as comparações de freqüências com o presente trabalho.

6.4 GENE *HLA-Cw*

Uma vez que os receptores KIR são expressos nas células NK uterinas e seus ligantes, as moléculas *HLA-Cw*, são expressas no trofoblasto, foram comparados os polimorfismos do gene *HLA-Cw* nas amostras paciente e controle. A distribuição das freqüências alélicas e genótipos foi similar entre ambos os grupos, com exceção de dois genótipos: *HLA-Cw*04/HLA-Cw*07* (2,54% em pacientes Vs. 9,16% em controles; $P=0,0334$; O.R.=0,25, I.C.95%:[0,0711-0,9406]) que se mostrou mais frequente na amostra dos controles, indicando que a presença deste genótipo seria protetora, diminuindo quatro vezes a chance de padecer RSA nas pessoas que o apresentem a diferencia daqueles que tenham outra constituição genotípica de *HLA-Cw*. O outro genótipo que apresentou uma diferença significativa foi o *HLA-Cw*04/HLA-Cw*15* (5,93% em pacientes Vs. 0,76% em controles; $P=0,0286$; O.R.: 8,19; I.C.: [0,9934-67,6601]), que apresentou uma freqüência maior na amostra paciente, indicando que as pessoas portadoras desta combinação teriam aproximadamente 8 vezes mais chance de padecer RSA que as pessoas que apresentem outro genótipo. Estas associações devem ser tomadas com cautela dado que muito provavelmente sejam espúrias visto que o número amostral pode ser pequeno para discriminar diferenças apresentadas entre as combinações genotípicas do gene *HLA-Cw* o qual é muito polimórfico, especialmente no segundo caso onde o intervalo de confiança de 95% da Odds Ratio inclui o valor 1, situação que invalidaria a condição deste genótipo de estar associado a predisposição ou susceptibilidade. Porém é importante prestar atenção à esta distribuição genotípica em estudos com números amostrais maiores ou que sejam realizados em outras populações.

Dado que o reconhecimento das moléculas HLA-Cw por parte dos receptores KIR é dependente dos aminoácidos nas posições 77 e 80 das moléculas HLA-Cw, estas podem ser separadas em dois grupos: C1 e C2, dependendo desta característica. desta forma define-se *HLA-Cw* do grupo 1 (C1) aos alelos que possuem um resíduo de serina na posição 77 e outro de asparagina na posição 80 e *HLA-Cw* de grupo 2 (C2) àqueles que apresentam resíduos de asparagina na posição 77 e de lisina na posição 80.

Foram realizadas comparações entre as freqüências alélicas e genotípicas dos genes *HLA-Cw* separados nos grupos C1 e C2 entre pacientes e controle e não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas.

Trabalhos anteriores postularam a importância da função que o polimorfismo de *HLA-Cw* teria em relação ao RSA, porém a única associação descrita até o momento foi relatada por HIBY e colaboradores em 2008, quem informou a presença aumentada do grupo C2 em ambos os membros dos casais com RSA (CHRISTIANSEN et al., 1997; HIBY et al., 2008).

6.5 GENE HLA-G

Desde a descoberta do HLA-G em 1990 em células da placenta fetal na interface materno-fetal, esta molécula tem chamado a atenção dos geneticistas e imunólogos da reprodução (ELLIS; PALMER; MICHAEL, 1990; KOVATS et al., 1990). No presente estudo foi investigado um possível papel do polimorfismo do gene *HLA-G* em relação ao RSA. Foram comparadas as distribuições alélicas e genotípicas dos alelos de *HLA-G* observadas em casais com abortamento recorrente espontâneo e seus controles.

Foi observada uma diferença estatisticamente significativa quando comparado o alelo *HLA-G*010103* entre o grupo inteiro de pacientes e o de controles, uma maior freqüência na amostra controle (4,50%) quando comparado ao grupo paciente (0,83%) ($P = 0,0270$; O.R: 0,1783; I.C. 95%: [0,0381-0,8352]). Este resultado indica que os indivíduos que possuem este alelo protetor apresentam uma chance de entre 5 a 6 vezes menor de desenvolver RSA do que os indivíduos que não o possuem. Os trabalhos publicados têm se mostrado contraditórios quando se referem ao papel do alelo em questão no processo gestacional. PFEIFFER e colaboradores (2001) relataram uma freqüência

aumentada do alelo *HLA-G*010103* no grupo de mulheres com RSA em comparação com o grupo de mulheres controle, estando o alelo correlacionado com baixos níveis da proteína HLA-G solúvel (sHLA-G), quando presente em homozigose (PFEIFFER *et al.* 2001). HVIID *et al.* (2002) não encontraram associação entre *G*010103* e RSA em um estudo com 61 mulheres Dinamarquesas com RSA e 47 mulheres Dinamarquesas controles (HVIID *et al.* 2002). ALDRICH e colaboradores (2001) também não encontraram associação de 41 *HLA-G*010103* e RSA em uma amostra de 113 casais com abortamento (ALDRICH *et al.* 2001). YAMASHITA e colaboradores observaram uma frequência de 13% do alelo *HLA-G*010103* entre os casais pacientes e de 6% entre os casais controles (YAMASHITA *et al.* 1999). ABBAS e colaboradores (2004) demonstraram, em um estudo com 300 mulheres indianas com RSA, uma frequência elevada do alelo *HLA-G*010103* no grupo de mulheres com RSA (9,5%) em comparação ao grupo de mulheres controle (5%) (ABBAS *et al.* 2004). Entretanto, em concordância com o presente trabalho PENZES e colaboradores (1999) mostraram uma tendência oposta, com frequência alélica de 12,5% no grupo controle e de 2,4% no grupo paciente (PENZES *et al.* 1999).

O alelo *HLA-G*010403* foi encontrado em maior frequência no grupo de pacientes (3,75%) quando comparado com os controles (0,50%) ($P = 0,0251$; O.R.: 7,7532; I.C. 95%: [0,9738-61,7326]). Este resultado indicaria uma chance aproximadamente 8 vezes maior de apresentar RSA para aqueles indivíduos que apresentem este alelo em relação a aqueles que não o apresentem. Este resultado é concordante com o relatado por ALDRICH e colaboradores (2001), em seu trabalho de genotipagem de 113 casais com RSA, evidenciaram a associação positiva do grupo de alelos *G*0104* com abortamento (ALDRICH *et al.*, 2001). Esta associação deve ser observada com cautela dado que no intervalo de 95% de confiança encontra-se o valor 1 e possivelmente seja uma associação espúria.

Foi observada uma associação negativa ($P=0,0307$) entre o grupo de alelos *HLA-G*0101A* (*HLA-G*010101* e ou *HLA-G*010106*) e RSA no grupo controle feminino (40%) quando comparado ao grupo paciente feminino (25%) ($P = 0,0134$; O.R.: 0.4780; I.C. 95%: [0,2680-0,8526]), o que indica aproximadamente um risco 2 vezes maior para os indivíduos que não portam o

alelo do grupo. O alelo *HLA-G*010101* é o mais freqüente na maioria das populações estudadas: 37% na população portuguesa, 32% na população alemã e 32.2% em caucasóides enquanto que o alelo *HLA-G*010106* é encontrado com freqüências bastante reduzidas nas populações (VAN DER VEN *et al.* 1998). ALDRICH e colaboradores (2001) verificaram uma tendência de associação negativa com RSA dos alelos do Grupo G*0101, os quais apresentaram uma freqüência mais elevada nos casais com sucesso reprodutivo e uma freqüência reduzida nos casais com abortamento (ALDRICH *et al.*, 2001). Entretanto esta observação não foi estatisticamente significativa ao nível de 5%. Outros trabalhos não evidenciaram associação do alelo *HLA-G*010101* com RSA (HVIID *et al.*, 2002; ABBAS *et al.*, 2004).

Em relação ao gene *HLA-G* também foi investigado o polimorfismo de 14pb (deleção/ausência de deleção) presente no exon 8 de *HLA-G* (3'UTR), no qual a presença da seqüência de 14pb parece estar associada com um padrão diferenciado de expressão de ARNm, sofrendo processamento alternativo e perdendo 92pb da seqüência de ARNm de 3'UTR. As isoformas geradas por alelos com deleção de 14pb daquela região mantém a seqüência de 92pb do ARNm e parecem ser menos estáveis (HVIID *et al.* 2002). A deleção de 14pb, segundo ROUSSEAU *et al.* (2003), parece ser um polimorfismo recente, sendo encontrada em humanos, mas não em outras espécies de primatas.

Uma vez realizadas as comparações foi observada uma diferença estatisticamente significativa onde o genótipo homozigótico para a deleção 14-14, que apresentou uma freqüência maior nos controles (17,65%) quando comparado com o grupo paciente (8,33%) ($P=0,0412$; O.R.=0,42, I.C.95%:[0,1938-0,9285]). Este resultado indica uma chance aproximadamente de 2 a 3 vezes menor de desenvolver RSA para os indivíduos que apresentam este genótipo. Foi relatado um resultado contraditório, com uma maior freqüência do genótipo 14-14 no grupo de mulheres com RSA quando comparado ao grupo controle feminino; entretanto, o resultado não foi estatisticamente significativo ($P=0,0820$) HVIID *et al.* (2002)

Em relação a este polimorfismo foi evidenciado uma associação significativa entre o genótipo 14-14 e a média de peso da placenta no momento do nascimento. Placentas com o genótipo 14-14 apresentaram um peso, em média, 100g superior ao peso das placentas com os outros dois genótipos. O

mesmo estudo também encontrou associação do genótipo *14-14* com o peso da criança observado no momento do nascimento, sendo o peso do indivíduo portador do genótipo *14-14* sempre superior ao peso dos portadores dos outros dois genótipos. Portanto, o genótipo *14-14* poderia favorecer, possivelmente pela maior estabilidade da molécula de ARNm, o desenvolvimento gestacional sem complicações, enquanto que a variante *del*, quando presente, parece diminuir a concentração das isoformas de proteínas HLA-G presentes na interface materno-fetal (HVIID *et al.*, 2004b).

6.6 EFEITO COMBINATORIAL DOS GENES *KIR* E GENES *HLA*

As células NK que participam da imuno-vigilância na unidade feto-placentária são de origem materna, porém as moléculas HLA expressas no trofoblasto são 50% de origem materna e 50% de origem paterna. Por esta razão e pelo fato da ausência de DNA de origem embrionária, para testar um cenário mais real do que poderia estar acontecendo em cada processo gestacional, a partir dos alelos dos genes *HLA* de cada casal paciente e controle foram projetados os genótipos e a relação de freqüência esperada para os possíveis filhos que cada casal poderia ter. Esta projeção foi construída com o intuito de poder agrupar os genes e genótipos *KIR* maternos com os possíveis genótipos *HLA* da sua progênie hipotética, montada a partir dos genes paternos e maternos para cada casal.

Estas progênies hipotéticas foram geradas a partir dos genótipos *HLA-Cw* dos casais reunidos nos grupos C1 e C2 e agrupadas com os genótipos *KIR* maternos agrupados como A ou B (TABELA 59). Estas agrupações apresentam uma grande implicância funcional dado que os genes *HLA-Cw* foram agrupados dependendo do sitio de reconhecimento dos receptores *KIR* e os genes haplótipos destes foram agrupados dependendo da quantidade de genes ativadores da citotoxicidade.

A distribuição das freqüências nos grupos foi comparada entre pacientes e controles. No caso do *HLA-G*, este foi agrupado dependendo da deleção do fragmento de 14 pares de bases e reunido com os genótipos *KIR2DL4* maternos agrupados em relação à deleção da adenosina 811 no éxon 7 (TABELA 60). O intuito funcional destas agrupações seria que tanto a deleção do fragmento de 14 pares de bases em *HLA-G* quanto a deleção da adenosina

no éxon 7 do gene *KIR2DL4* teriam um efeito nas isoformas dos produtos expressos podendo influenciar a prevalência de isoformas solúveis ou ancoradas na membrana celular.

Alem disso as agrupações diminuem significativamente o número de classes onde são distribuídas as freqüências, desta forma as análises estatísticas são muito mais robustas.

Em relação aos resultados destas comparações não foram encontradas diferenças estatísticas entre ambos os grupos. Estes resultados não podem ser comparados com nenhum outro, dado que este é o primeiro trabalho que implementa o uso estatístico de progênies hipotéticas nesta área.

Em uma outra abordagem foram agrupadas as freqüências alélicas do gene HLA-G dos casais e agrupadas em relação ao alelo do gene *KIR2DL4* feminino. As freqüências foram comparadas entre os grupos paciente e controle e não foram observadas diferenças significativas (TABELA 61).

7 CONCLUSÕES

No presente trabalho foram analisados o polimorfismo dos repertórios dos genes *KIR* e polimorfismo alélico dos genes *KIR2DL4*, *HLA-Cw* e *HLA-G* em casais com abortamento espontâneo recorrente e em casais férteis, ambos os grupos pertencentes à população do estado de Paraná, Brasil.

- O presente estudo demonstrou que os repertórios *KIR* com número elevado de genes *KIR* ativadores causariam predisposição ao RSA em mulheres.
- Com base nos resultados do presente trabalho e os apresentados na literatura, foi elaborado um modelo biológico do sistema de imunovigilância das células NK na interface materno-fetal, na saúde e no RSA.
- Em relação ao gene *KIR2DL4*, foram identificadas em 6 indivíduos, sequências gênicas que não apresentaram correspondência com nenhum alelo do gene descritos até o momento.
- O alelo *HLA-G*010103* e o agrupamento alélico *HLA-G*0101A* (*HLA-G*010101* e *HLA-G*010106*) mostraram um efeito protetor contra o RSA.
- Em relação à deleção de 14 pares de bases do éxon 8 do gene *HLA-G*, o genótipo homozigótico para a ausência de deleção (14-14) mostrou um efeito protetor contra o RSA.
- Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o polimorfismo do gene *KIR2DL4* e RSA.
- Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas robustas entre o polimorfismo do gene *HLA-Cw* e RSA.

- Não foram achadas diferenças significativas entre as combinações das variantes genóticas do gene *HLA-Cw* (distribuídas nos grupos C1 e C2) e os genótipos *KIR* agrupados, em relação ao RSA.
- Não foram achadas diferenças significativas entre as combinações das variantes genóticas da deleção do fragmento de 14 pares de bases do gene *HLA-G* e os genótipos do gene *KIR2DL4* agrupados segundo a presença ou ausência da deleção da adenosina na posição 811 do éxon 7.

8 REFERÊNCIAS

ABBAS A.; AGRAWAL, S.; NAIK, S.; TRIPATHI, P. Analysis of human leukocyte antigen HLA-G polymorphism in normal women and in women with recurrent spontaneous abortions. **European Journal of Immunogenetics**, London, v. 31, n. 6, p. 275, 2004.

ABBAS A. LICHTMAN A PILLA I. **Cellular and molecular Immunology**. Philadelphia, Saunders Elsevier, 2007.

ALDRICH C. L.; STEPHENSON, M. D.; KARRISON, T.; ODEM, R. R.; RANCH, D. W.; SCOTT, J. R.; SCHREIBER, J. R.; OBER, C. HLA-G genotypes and pregnancy outcome in couples with unexplained recurrent miscarriage. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v. 7, n. 12, p. 1167-1172, 2001.

ANDRE, P.; BIASSONI, R.; COLONNA, M.; COSMAN, D.; LANIER, L.L.; LONG, E.O.; LOPEZ-BOTET, M.; MORETTA, A.; MORETTA, L.; PARHAM, P.; TROWSDALE, J.; VIVIER, E.; WAGTMANN, N.; WILSON, M.J. New nomenclature for MHC receptors. **Nature immunology**, v. 2, n. 8, p. 661, 2001.

ANSARI, A .H.; KIRKPATRICK, B. Recurrent pregnancy loss. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 43, n. 9, p. 806-814, 1998.

ARAMBURU, J.; BALBOA, M. A.; RAMIREZ, A.; SILVA, A.; ACEVEDO, A. A novel functional cell surface dimer (Kp43) expressed by natural killer cells and T cell receptor- γ / δ +T lymphocytes. I. Inhibition of the IL-2 dependent proliferation by anti-Kp43 monoclonal antibody. **J. Immunol.** 144:3238–47; 1990.

AVIRACHAN, S. Anatomic and chromosomal anomalies in 639 spontaneous abortuses. **Human genetics**, v. 55, n. 1, p. 87-98, 1980.

AYRES, M.; AYRES, M.JR; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A.S. Bioestat – **Aplicações Estatísticas nas áreas das Ciências da Saúde**. Belém, 2005.

BAEK, K.H. Aberrant gene expression associated with recurrent pregnancy loss. Oxford: **Molecular Human Reproduction**, v.10, n. 5, p. 291-297, 2004.

BAEK, K.H.; CHOI, B.C.; LEE, J.H.; CHOI, H.K.; LEE, S.H.; KIM, J.W.; HILL, J.A.; CHUNG, H.M.; KO, J.J.; CHA, K.Y. Comparison of gene expression at the feto-maternal interface between normal and recurrent pregnancy loss patients. East Melbourne: **Reproduction, fertility, and development**, v.14, p. 235-240, 2002.

BAHRAM, S.; BRESNAHAN, M.; GERAGHTY, D. E.; SPIES, T. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 91:6259–63; 1994.

BAINBRIDGE, D.; ELLIS, S.; LE BOUTEILLER, P.; SARGENT, I. HLA-G remains a mystery. **Trends in Immunology**, v. 22, n. 10, out. 2001.

BAUER, S.; GROH, V.; WU, J.; STEINLE, A.; PHILLIPS, J. H. Activation of natural killer cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. **Science**, 85:727–30; 1999.

BERKE, G. The CTL's kiss of death. **Cell**, v. 81, n. 1, p. 9-12, 1995.

BERTONE, S.; SCHIAVETTI, F.; BELLOMO, R.; VITALE, C.; PONTE, M.; MORETTA, L.; MINGARI, M. C. Transforming growth factor- β -induced expression of CD94/NKG2A inhibitory receptors in human T lymphocytes. **Eur. J. Immunol** 29:23–29; 1999.

BIANCHI, D.T.; ROMERO, R. Biological implications of bi-directional fetomaternal cell traffic: a summary of a National Institute of Child Health and Human Development-sponsored conference. **The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v.14; n.2, p.123-129, 2003.

BIX, M.; LIAO, N-S.; ZIJLSTRA, M.; LORING, J.; JAENISCH, R.; RAULET, D. Rejection of class I MHC-deficient haemopoietic cells by irradiated MHC-matched mice. **Nature**, 349:329–31, 1991.

BORREGO, F *et al.* Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. **Molecular Immunology**, v. 38, n. 9, p. 637-60, 2002.

BOTTINO, C.; CASTRICONI, R.; PENDE, D.; RIVERA, P.; NANNI, M. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1(CD226) activating molecule. **J.Exp. Med.** 198:557–67; 2003.

BOYSON, JONATHAN E *et al.* CD1d and invariant NKT cells at the human maternal-fetal interface. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 21, p. 13741-6, 2002.

BRANCH, D.W.; DUDLEY, D.J.; SCOTT, J.R.; SILVER, R.M. Antiphospholipid antibodies and fetal loss. **New England Journal of Medicine**, v. 326, n. 14, p. 952-954, 1992.

BROWN, M. H.; BOLES, K.; ANTON VAN DER MERWE, P.; KUMAR, V.; MATHEW, P. A.; BARCLAY, N. A. 2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48. **J. Exp. Med.** 188:2083–90; 1998.

BURNS, G. F.; TRIGLIA, T.; WERKMEISTER, J. A.; BEGLEY, C. G.; BOYD, A. W. TLISA1, a human T lineage-specific activation antigen involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes and anomalous killer cells from their precursors. **J. Exp. Med.** 161:1063–78; 1985.

BYRNE, J. L. e WARD, K. Genetic factors in recurrent abortion. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 37, p. 730-744, 1994.

CARP, H.J.A. ; TADER, V.; MASHIACH, S. Recurrent miscarriage: A review of current concepts, immune mechanisms, and results of treatment. **Obstetrical & Gynecological Survey**, v. 45, p. 657-669, 1990.

CERWENKA, A.; BARON, J. L.; LANIER, L. L. Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo. **Proc. Natl.Acad. Sci.** 98:11521–26; 2001.

CERWENKA, A.; BARON, J. L.; LANIER, L. L. Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo. **Proc. Natl.Acad. Sci.** 98:11521–26; 2001.

CHEN, X-Y et al. The 14 bp deletion polymorphisms in HLA-G gene play an important role in the expression of soluble HLA-G in plasma. **Tissue Antigens**, v. 72, n. 4, p. 335-41, 2008.

CHRISTIANSEN, O B *et al.* HLA-C and -Bw typing of couples with unexplained recurrent miscarriages. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 37, n. 1, p. 63-77, 1997.

CHRISTIANSEN, O.B.; RIISOM, K.; LAURITSEN, J.G.; GRUNNET, N. No increased histocompatibility antigen-sharing in couples with idiopathic habitual abortions. **Human Reproduction**, v.4, n. 2, p. 160-162, 1989.

CHRISTIANSEN, OLE B;NIELSEN, HENRIETTE S;KOLTE, ASTRID M. Inflammation and miscarriage. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, v. 11, n. 5, p. 302-8, 2006.

CLARK, D.A.; ARCK, P.C.; JALALI, R.; MERALI, F.S.; MANUEL, J.; CHAOUAT, G.; UNDERWOOD, J.L.; MOWBRAY, J.F. Psycho-neuro-cytokine/endocrine pathways in immunoregulation during pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 35, n. 4, p. 330-337, 1996.

COLONNA, M.; NAVARRO, F.; BELLON, T.; LLANO, M.; GARCIA, P. A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. **J. Exp. Med.** 186:1809–18; 1997.

COLONNA, M.; SAMARIDIS, J.; Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. **Science**, v. 268, n. 5209, p. 405-408, 1995.

COSMAN, D.; FANGER, N.; BORGES, L.; KIBIN, M.; CHIN, W. A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules, **Immunity** 7:273–82; 1997.

COSMAN, D.; MULLBERG, J.; SUTHERLAND, C. L.; CHIN, W.; ARMITAGE, R. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein

UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. **Immunity** 14:123–33; 2001.

COULAM, C. B. Unexplained recurrent pregnancy loss: Epilogue. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 29, p. 999-1004, 1986.

COULAM, C. B.; STERN, J. J. Endocrine factors associated with recurrent spontaneous abortion. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 37, p. 730-744, 1994.

COULAM, C.B. Immunotherapy for recurrent spontaneous abortion. **Early Pregnancy**, n. 1, v. 1, p. 13-26, 1995.

COULAM, C.B.; CLARK, D.A.; BEER, A.E.; KUTTEH, W.H.; SILVER, R.; KWAK, J. Current clinical options for diagnosis and treatment of recurrent spontaneous abortion, **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 38, p. 57-74, 1997.

COUMANS, A.B.C; HUIJGENS, P.C.; JAKOBS, C.; SCHATS, R.; VRIES, J.I.P; VAN PAMPUS, M.G.; DEKKER, G.A. Haemostatic and matabolic abnormalities in women with unexplained recurrent abortion. **Human Reproduction**, v. 14, p. 211-214, 1999.

D'ANDREA, A.; CHANG, C.; FRANZ-BACON, K.; MCCLANAHAN, T.; PHILLIPS, J.H.; LANIER, L.L. Molecular cloning of NKB1. A natural killer cell receptor for HLA-B allotypes. **Journal of Immunology**, v. 155, n. 5, p. 2306-2310, 1995.

DE FOUGEROLLES, A.R. ; BAINES, M.G. Modulation of the natural killer cell activity in pregnant mice alters the spontaneous abortion rate. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 11, n. 2, p. 147-153, 1987.

DE FRANÇA P.P. O POLIMORFISMO DOS GENES MICA E MICB E O ABORTAMENTO. RECORRENTE. *Dissertação* apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná. 2008

DERRE, L.; CORVAISIER, M.; PANDOLFINO, M. C.; DIEZ, E.; JOTEREAU, F.; GERVOIS, N. Expression of CD94/NKG2-A on human T lymphocytes is induced by IL-12: implications for adoptive immunotherapy. **J. Immunol.** 168:4864–70; 2002.

DIEFENBACH, A.; JENSEN, E. R.; JAMIESON, A. M.; RAULET, D. H. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. **Nature** 413:165–71; 2001.

DIEFENBACH, A.; JENSEN, E. R.; JAMIESON, A. M.; RAULET, D. H. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. **Nature** 413:165–71; 2001.

DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. **Immunity** 4:573–81; 1996.

DOSIOU, C.; GIUDICE, L.C. Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives, **Endocrine Reviews**, v. 26, p. 44-62, 2006.

DUPONT, B.; SELVAKUMAR, A.; STEFFENS, U. The killer cell inhibitory receptor genomic region on human chromosome 19q13.4. **Tissue Antigens**, v. 49, n. 6, p. 557-563. Review. 1997

EDMONDS, D.K.; LINDSAY, K.S.; MILLER, J.F.; WILLIAMSON, E.; WOOD, P.J. Early embryonic mortality in women. **Fertility and Sterility**, v. 38, n. 4, p. 447-453, 1982.

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

FAN, Q.R.; LONG, E.O.; WILEY, D.C. Crystal structure of the human natural killer cell inhibitory receptor KIR2DL1-HLA-Cw4 complex. **Nature Immunology**, v. 2, n. 5, p. 452-460, 2001.

FAURE, MATHIAS LONG, ERIC O. KIR2DL4 (CD158d), an NK cell-activating receptor with inhibitory potential, **Journal of Immunology**, v. 168, n. 12, p. 6208-14, 2002.

FILIFE-SANTOS, ORCHIDÉE et al. Inborn errors of IL-12/23- and IFN-gamma-mediated Immunity: molecular, cellular, and clinical features. **Seminars in Immunology**, v. 18, n. 6, p. 347-61, 2006.

FLORES, A C *et al.* KIR receptors and HLA-C in the maintenance of pregnancy. **Tissue Antigens**, v. 69 Suppl 1, p. 112-3, 2007.

FORBES, L. S. The evolutionary biology of spontaneous abortion in humans. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 12, p. 446-450, 1997.

FRASER, E.J.; GRIMES, D.A .; SCHULZ, K.F. Immunization as therapy for recurrent spontaneous abortion: a review and meta-analysis. **Obstetrics & Gynecology**, v. 82, n. 5, p. 854-859, 1993.

FUKUI, A.; KWAK-KIM, J.; NTRIVALAS, E.; GILMAN-SACHS, A.; LEE, S.K.; BEAMAN, K. Intracellular cytokine expression of peripheral blood natural killer cell subsets in women with recurrent spontaneous abortions and implantation failures. **Fertility and Sterility**, n. 89, v. 1, p. 157- 165, 2008.

FUZZI, BEATRICE et al. HLA-G expression in early embryos is a fundamental prerequisite for the obtainment of pregnancy, **European Journal of Immunology**, v. 32, n. 2, p. 311-5, 2002.

GARDINER, C. M.; GUETHLEIN, L. A.; SHILLING, H. G.; PANDO, M.; CARR, W. H.; RAJALINGAM, R.; VILCHES, C.; PARHAM, P. Different NK cell surface phenotypes defined by the DX9 antibody are due to KIR3DL1 gene polymorphism. **Journal of Immunology**, v. 166, n. 5, p. 2992-3001, 2001.

GARNI-WAGNER, B. A.; PUROHIT, A.; MATHEW, P. A.; BENNETT, M.; KUMAR, K. A novel function-associated molecule related to non-MHC-restricted cytotoxicity mediated by activated natural killer cells and T cells. **J. Immunol.** 151:60–70; 1993.

GEARY, M.; RAFFERTY, G.; MURPHY, J.F. Comparison of liveborn and stillborn low birthweight babies and analysis of aetiological factors, **Irish medical journal**, v. 90, n. 7, p.269-271, 1997.

GEISELHART, A et al. Comparative analysis of the immunophenotypes of decidual and peripheral blood large granular lymphocytes and T cells during early human pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 33, n. 4, p. 315-22, 1995.

GODDIJN, M.; LESCHOT, N.J. Genetic aspects of miscarriage. London: Bailliere's Best Practice & Research. **Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 14, p. 855-865, 2000.

GOMEZ-LOZANO, N.; GARDINER, C. M.; PARHAM, P.; VILCHES, C. Some human KIR haplotypes contain two KIR2DL5 genes: KIR2DL5A and KIR2DL5B. **Immunogenetics**, v. 54, n. 5, p. 314-319, 2002.

GÓMEZ-LOZANO, N *et al.* Recognition of HLA-G by the NK cell receptor KIR2DL4 is not essential for human reproduction. **European Journal of Immunology**, v. 33, n. 3, p. 639-44, 2003.

GOODRIDGE, JODIE P et al. KIR2DL4 (CD158d) genotype influences expression and function in NK cells. **Journal of Immunology**, v. 171, n. 4, p. 1768-74, 2003.

GOODRIDGE, JODIE P et al. Three common alleles of KIR2DL4 (CD158d) encode constitutively expressed, inducible and secreted receptors in NK cells. **European Journal of Immunology**, v. 37, n. 1, p. 199-211, 2007.

GRIEBEL, C.P.; HALVORSEN, J.; GOLEMON, T.B.; DAY, A.A. Management of spontaneous abortion. **Kansas: American Family Physician**, v.72, n.7, p. 1243-1250, 2005.

GUERRA, M.S. **Introdução à citogenética geral**. Rio de Janeiro: Guanabara S.A., 1988.

GUO, S.; THOMPSON, E. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**; v. 48, n. 2, p. 361-372, 1992.

HARLAP, S.; SHIONO, P.H. Alcohol, smoking, and incidence of spontaneous abortions in the first and second trimester. **Lancet**, v. 2, n. 8187, p. 173-176, 1980.

HASSIAKOS, D.J.; ZOURLAS, P. A . Transcervical division of uterine septa. **Obstetrical & Gynecological Survey**, v. 45, n. 3, p. 165-173, 1990.

HEINONEN, P.K.; PYSTYNEN, P.P. Primary infertility and uterine anomalies. **Fertility and Sterility**, v. 40, n. 3, p. 311-316, 1983.

HENSLEIGH, P.A.; FAINSTAT, T. Corpus luteum dysfunction: serum progesterone levels in diagnosis and assessment of therapy for recurrent and threatened abortion. **Fertility and Sterility**, v. 32, n. 4, p. 396-400, 1979

HIBY, S E *et al.* Association of maternal killer-cell immunoglobulin-like receptors and parental HLA-C genotypes with recurrent miscarriage. **Human Reproduction (Oxford, England)**, v. 23, n. 4, p. 972-6, 2008.

HOGLUND, P.; OHLEN, C.; CARBONE, E.; FRANKSSON, L.; LJUNGGREN, H-G.; *et al.* Recognition of β 2-microglobulin-negative (β 2m-) T-cell blasts by natural killer cells from normal but not from β 2m-mice: nonresponsiveness controlled by β 2m-bone marrow in chimeric mice, **Proc. Natl. Acad. Sci.** 88:10332–36, 1991

HOUCHINS, J. P.; YABE, T.; MCSHERRY, C.; BACH, F. H. DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. **J. Exp. Med.** 173:1017–20; 1991.

HSU, K.C.; LIU, X.R.; SELVAKUMAR, A.; MICKELSON, E.; O'REILLY, R.J.; DUPONT, B. Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. **Journal of Immunology**, v. 169, n. 9, p. 5118-5129, 2002.

HUGO-endorsed disponível em
<www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/genefamily/kir.html> acesso em: 10 set. 2008.

HVIID, T V F *et al.* Association between human leukocyte antigen-G genotype and success of in vitro fertilization and pregnancy outcome. **Tissue Antigens**, v. 64, n. 1, p. 66-9, 2004.

HVIID, T. V. HLA-G genotype is associated with fetoplacental growth. **Human Immunology**, Shannon, v.65, p. 586-593, 2004b.

HVIID, T.V.; HYLENIUS, S.; HOEGH, A.M.; KRUSE, C.; CHRISTIANSEN, O.B. HLA-G polymorphisms in couples with recurrent spontaneous abortions. **Tissue Antigens**, v. 60, n. 2, p.122-132. 2002.

INFANTE-RIVARD, C.; DAVID, M.; GAUTHIER, R.; RIVARD, G.E. Lupus anticoagulants, anticardiolipin antibodies, and fetal loss. A case-control study. **New England Journal of Medicine**, v. 325, n. 15, p. 1063-1066, 1991.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Banco de Dados: Dezembro/2007. Versão 2.0 Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=pr>>. Acesso em: 15/04/2009

JAN CHALUPNY, N.; SUTHERLAND, C. L.; LAWRENCE, W. A.; REINWESTON, A.; COSMAN, D. ULBP4 is a novel ligand for human NKG2D. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 305:129–35; 2003.

JIANG, K *et al.* Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in the Chinese Han population. **Tissue Antigens**, v. 65, n. 6, p. 556-63, 2005.

JOKIMAA, V.; OKSJOKI, S.; KUJARI, H.; VUORIO, E.; ANTTILA, L. Altered expression of genes involved in the production and degradation of endometrial extracellular matrix in patients with unexplained infertility and recurrent miscarriages. **Molecular Human Reproduction**, v. 8, n.12, p. 1111-1116, 2002.

KAJII, T.; FERRIER, A.; NIIKAWA, N.; TAKAHARA, H.; OHAMA, K.; AVIRACHAN, S. Anatomic and chromosomal anomalies in 639 spontaneous abortuses. **Human Genetics**, v. 55, n. 1, p. 87-98, 1980.

KÄRRE, K. NK Cells, MHC Class I Molecules and Missing Self, **Scandinavian Journal of Immunology**. 55:221-228, 2002.

KÄRRE, K. Role of target histocompatibility antigens in regulation of natural killer activity: a reevaluation an hypothesis. In Callewaert D. Herberman RB, eds. Mechanisms of Cytotoxicity by NK Cells. **San Diego: Academic Press**. 81-91, 1985.

KARRE, K.; LJUNGGREN, H. G.; PIONTEK, G.; KIESSLING, R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. **Nature**, v. 319, n. 6055, p.675-678, 1986.

KATZ, G.; MARKEL, G.; MIZRAHI, S.; ARNON, T.I.; MANDELBOIM, O. Recognition of HLA-Cw4 but not HLA-Cw6 by the NK cell receptor killer cell Ig-like receptor two-domain short tail number 4. **Journal of Immunology**, v. 166, n. 12, 7260-7267, 2001.

KING A, HIBY SE, GARDNER L, JOSEPH S, BOWEN JM, VERMA S, BURROWS TD, AND LOKE YW. Recognition of trophoblast HLA class I molecules by decidual NK cell receptors--a review. **Placenta**, v.21, n. 4, Suppl A, S81-S85, 2000c

KING, A *et al.* Human uterine lymphocytes. **Human Reproduction Update**, v. 4, n. 5, p. 480-5, 1998.

KING, A.; ALLAN, D.S.; BOWEN, M.; POWIS, S.J.; JOSEPH, S.; VERMA, S.; HIBY, S.E.; MCMICHAEL, A.J.; LOKE, Y.W.; BRAUD, V.M. HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK cells. **European Journal of Immunology**, v. 30, n. 6, p.1623-1631, 2000a.

KING, A.; BURROWS, T.; LOKE, Y.W. Human uterine natural killer cells. **Natural Immunity**, v. 15, n. 1, p. 41-52, 1996.

KING, A.; BURROWS, T.D.; HIBY, S.E.; BOWEN, J.M.; JOSEPH, S.; VERMA, S.; LIM, P.B.; GARDNER, L.; LE BOUTEILLER, P.; ZIEGLER, A.; UCHANSKA-ZIEGLER, B.; LOKE, Y.W. Surface expression of HLA-C antigen by human extravillous trophoblast. **Placenta**, v. 21, n. 4, p. 376-387, 2000b.

KING, A.; HIBY, S.E.; VERMA, S.; BURROWS, T.; GARDNER, L.; LOKE, Y.W. Uterine NK cells and trophoblast HLA class I molecules. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 37, n. 6, p. 459-462, 1997.

KIWI, ROBERT. Recurrent pregnancy loss: evaluation and discussion of the causes and their management. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 73, n. 10, p. 913-21, 2006.

KOZAK, M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. **Cell**, v. 44, n. 2, p. 283-92, 1986.

KUBIN, M. Z.; PARSHLEY, D. L.; DIN, W.; WAUGH, J. Y.; DAVIS-SMITH, T. Molecular cloning and biological characterization of NK cell activation-inducing ligand, a counterstructure for CD48. **Eur. J. Immunol.** 29:3466–77; 1999.

KUSUMI, MAKI et al. Expression patterns of lectin-like natural killer receptors, inhibitory CD94/NKG2A, and activating CD94/NKG2C on decidual CD56bright natural killer cells differ from those on peripheral CD56dim natural killer cells. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 70, n. 1-2, p. 33-42, 2006.

KWAK, J.Y.; BEER, A.E.; KIM, S.H.; MANTOUVALOS, H.P. Immunopathology of the implantation site utilizing monoclonal antibodies to natural killer cells in women with recurrent pregnancy losses. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 41, n.1, p. 91-98, 1999.

LAHIRI, D.K.; NURNBERGER, J.R. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HWM DNA from blood for RFPL studies. **Nucleic Acids Research**, v.19, p. 5444, 1991.

LANIER, L. L. NK cell receptors. **Annu Rev Immunol** 16:359–393; 1998.

LANIER, L. L. On guard-activating NK cell receptors. **Nat Immunol** 2:23; 2001.

LANIER, L. L.; CORLISS, B.; PHILLIPS, J. H. Arousal and inhibition of human NK cells. **Immunol. Rev.** 155:145–54, 1997.

LANIER, L.L. NK cell receptors. **Annual Review of Immunology**, v. 16, p. 359-393, 1998.

LANIER, L.L. NK cell recognition. **Annu. Rev. Immunol.** 23: 225-274; 2005.

LEES, D.H.; SUTHERST, J.R. The sequelae of cervical trauma. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 120, n. 8, 1050-1054, 1974.

LI, X F et al. Angiogenic growth factor messenger ribonucleic acids in uterine natural killer cells. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, n. 4, p. 1823-34, 2001.

LJUNGGREN, H. G.; KARRE, K. Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 162, n. 6, p. 1745-1759, 1985.

LJUNGGREN, H. G.; KARRE, K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. **Immunology Today**, v.11, n. 7, p. 237-244, 1990. Review.

MARSH, STEVEN G E et al. Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. **Immunogenetics**, v. 55, n. 4, p. 220-6, 2003.

MARTIN, M.P.; GAO, X.; LEE, J.H.; NELSON, G.W.; DETELS, R.; GOEDERT, J.J.; BUCHBINDER, S.; HOOTS, K.; VLAHOV, D.; TROWSDALE, J.; WILSON, M.; O'BRIEN, S.J.; CARRINGTON, M. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. **Nature Genetics**, v. 429, n. 4, p. 429-434, 2002a.

MARTIN, M.P.; NELSON, G.; LEE, J.H., PELLETT, F.; GAO, X.; WADE, J.; WILSON, M.J.; TROWSDALE, J.; GLADMAN, D.; CARRINGTON, M. Cutting edge: susceptibility to psoriatic arthritis: influence of activating killer Ig-like receptor genes in the absence of specific HLA-C alleles. **Journal of Immunology**, v. 169, n. 6, p. 2818-2822, 2002b.

MASSON, D.; JARRY, A.; BAURY, B.; BLANCHARDIE, P.; LABOISSE, C. Overexpression of the CD155 gene in human colorectal carcinoma. **Gut** 49:236-40; 2001.

MAXWELL, L.D.; WALLACE, A.; MIDDLETON, D.; CURRAN, M.D. A common KIR2DS4 deletion variant in the human that predicts a soluble KIR molecule analogous to the KIR1D molecule observed in the rhesus monkey. **Tissue Antigens**, v. 60, n. 3, p. 254-258, 2002.

McDONALD, A .D.; ARMSTRONG, B.G.; SLOAN, M. Cigarette, alcohol, and coffee consumption and congenital defects. **American Journal of Public Health**, v. 82, n. 1, p. 91-93, 1992.

MELERO, I.; SALMERON, A.; BALBOA, M.A.; ARAMBURU, J.; LOPEZ-BOTET, M. Tyrosine kinase-dependent activation of human NK cell functions

upon stimulation through a 58-kDa surface antigen selectively expressed on discrete subsets of NK cells and T lymphocytes. **Journal of Immunology**, v. 152, n. 4, p.1662-1673, 1994.

MIDDLETON, D *et al.* Killer immunoglobulin receptor gene and allele frequencies in Caucasoid, Oriental and Black populations from different continents. **Tissue Antigens**, v. 71, n. 2, p. 105-13, 2008.

MILLER, J.F.; WILLIAMSON, E.; GLUE, J.; GORDON, Y.B.; GRUDZINSKAS, J.G.; SYKES, A . Fetal loss after implantation. A prospective study. **Lancet**, v. 2, n. 8194, p. 554-556, 1980.

MINGARI, M. C.; PONTE, M.; BERTONE, S.; SCHIAVETTI, F.; VITALE, C. HLA class I-specific inhibitory receptors in human T lymphocytes: interleukin-15-induced expression of CD94/NKG2A in superantigen- or alloantigen-activated CD8+T cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 95:1172–77; 1998.

MOCIKAT, RALPH *et al.* Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. **Immunity**, v. 19, n. 4, p. 561-9, 2003.

MOFFETT-KING, ASHLEY. Natural killer cells and pregnancy. **Nature Reviews. Immunology**, v. 2, n. 9, p. 656-63, 2002.

MOORE, K.L. **Embriologia Clínica**. VUGMAN, F.S. [Trad] 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1994.

MORETTA, A.; TAMBUSI, G., BOTTINO, C.; TRIPODI, G.; MERLI, A.; CICCONE, E.; PANTALEO, G.; MORETTA, L. A. Novel surface antigen expressed by a subset of human CD3- CD16+ natural killer cells. Role in cell activation and regulation of cytolytic function. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 171, n. 3, 695-714, 1990.

NAKAJIMA, H.; CELLA, M.; LANGEN, H.; FRIEDLEIN, A.; COLONNA, M.; Activating interactions in human NK cell recognition: the role of 2B4-CD48. **Eur. J. Immunol.** 29:1676–83; 1999.

NIOKOU, D.; SPYROPOULOU-VLACHOU, M.; DARLAMITSOU, A.; STAVROPOULOS-GIOKAS, C. Distribution of Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors in the Greek Population. **Human Immunology**, v. 64, n. 12, 1167–1176, 2003.

OLCESE, L.; CAMBIAGGI, A.; SEMENZATO, G.; BOTTINO, C.; MORETTA, A.; VIVIER, E.; Human killer cell activatory receptors for MHC class I molecules are included in a multimeric complex expressed by natural killer cells. **Journal of Immunology**, v. 158, n. 11, p. 5083-5086, 1997.

ONE LAMBDA, INC. KIR SSO **Genotyping Test. Summary and explanation.** www.onelambda.com (sítio acesso em: 19/09/2008).

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

PÉNZES, M.; RAJCZY, K.; GYODI, E.; RETI, M.; FEHER, E.; PETRANYI, G. HLA-G gene polymorphism in the normal population and in recurrent spontaneous abortion in hungary. **Transplantation Proceedings**, New York, v. 31, n. 4, p.1832-1833, 1999.

PERITT, D.; SESOK-PIZZINI, D. A.; SCHRETZENMAIR, R.; MACGREGOR, R. R.; VALIANTE, N. M. C1.7 antigen expression on CD8+ T cells is activation dependent: increased proportion of C1.7+CD8+ T cells in HIV-1-infected patients with progressing disease. **J. Immunol.** 162:7563–68 1999.

PETZL-ERLER M. M. Análise de associação para investigação do componente Genético de Doenças Multifatoriais. Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2005. Artigo não publicado em revista indexada.

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

PFEIFFER, K. A.; REBMANN, V.; PASSLER, M.; VAN DER VEN, K.; VAN DER VEN, H.; KREBS, D.; GROSSES-WILD, H. Soluble histocompatibility antigen levels in early pregnancy after IVF. **Human Immunology**, v. 61, p. 559-564, 2000.

PIONTEK, G. E., TANIGUCHI, K., LJUNGGREN, H.G., GRONBERG, A., KIESSLING, R., KLEIN, G., KARRE, K. YAC-1 MHC class I variants reveal an association between decreased NK sensitivity and increased H-2 expression after interferon treatment or in vivo passage. **Journal of Immunology**, v. 135, n. 6, p. 4281-4288, 1985.

POLIFKA, J.E.; FRIEDMAN, J.M. Environmental toxins and recurrent pregnancy loss. **Infertility of Reproductive Medical Clinics of North America**, v. 2, p. 195-199, 1991.

PONTE, M *et al.* Inhibitory receptors sensing HLA-G1 molecules in pregnancy: decidua-associated natural killer cells express LIR-1 and CD94/NKG2A and acquire p49, an HLA-G1-specific receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 10, p. 5674-9, 1999.

PROBST, C. M. CONVERT: uma ferramenta computacional auxiliar no estudo de polimorfismos genéticos, versão 1.1. Laboratório de Genética Molecular Humana, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, 1998.

PROW disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/prow/guide/679664748_g.html>
acesso em: 10 set. 2004.

RAI, RAJ REGAN, LESLEY. Recurrent miscarriage. **Lancet**, v. 368, n. 9535, p. 601-11, 2006.

RAJAGOPALAN, S.; LONG, E.O. A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *The Journal of Experimental Medicine*, New York, v. 189, n. 7, p. 1093-1100, 1999. Erratum in: **The Journal of Experimental Medicine**, v. 191, n. 11, p. 2027, 2000.

RAJAGOPALAN, SUMATI et al. Activation of NK cells by an endocytosed receptor for soluble HLA-G. **PLoS Biology**, v. 4, n. 1, p. e9, 2006.

RAULET, D H;VANCE, R E;MCMAHON, C W. Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annual Review of Immunology*, v. 19, p. 291-330, 2001.

RAVET, SOPHIE et al. Distinctive NK-cell receptor repertoires sustain high-level constitutive NK-cell activation in HIV-exposed uninfected individuals. **Blood**, v. 109, n. 10, p. 4296-305, 2007.

REYMOND N, IMBERT AM, DEVILARD E, FABRE S, CHABANNON C. DNAM-1 and PVR regulate monocyte migration through endothelial junctions. **J. Exp. Med.** 199:1331–41; 2004.

ROCK, J A ZACUR, H A. The clinical management of repeated early pregnancy wastage. **Fertility and Sterility**, v. 39, n. 2, p. 123-40, 1983.

ROCK, J.A .; MURPHY, A .A . Anatomic abnormalities. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 29, n. 4, p. 886-911, 1986.

RODEY, G. E., NEYLAN, J. F.; WHELCHER, J. D.; REVELS, K. W.; BRAY, R. A. Epitope specificity of HLA class I alloantibodies. I. Frequency analysis of antibodies to private versus public specificities in potential transplant recipients. **Hum Immunol.**; v.39, n. 4, 272-280, 1994.

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

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

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

ROUSSEAU, P.; PAUL, P.; O'BRIEN, M.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E. D.; MOREAU, P. The X1 box of HLA-G promoter is a target site for RFX and Sp1 factors. **Human Immunology**, v. 61, p. 1132-1137, 2000.

SANTOURLIDIS, SIMEON et al. Crucial role of DNA methylation in determination of clonally distributed killer cell Ig-like receptor expression patterns in NK cells. **Journal of Immunology**, v. 169, n. 8, p. 4253-61, 2002.

SARGENT, IAN L;BORZYCHOWSKI, ANGELA M;REDMAN, CHRISTOPHER W G. NK cells and human pregnancy--an inflammatory view. **Trends in Immunology**, v. 27, n. 9, p. 399-404, 2006.

SARTURI, P. R; VARGAS, R. G; BICALHO, M. da G. Non synonymous nucleotidic mutations in the hlag exon 2 and 3 are associated with recurrent spontaneous abortion in brazilian couples. **American Journal of Reproductive Immunology**, Submitted in september 9. Em fase de publicação.

SBRACIA, M.; MASTRONE, M.; SCARPELLINI, F.; GRASSO, J.A. Influence of histocompatibility antigens in recurrent spontaneous abortion couples and on their reproductive performances. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 35, n. 2, p. 85-92, 1996.

SCHNEIDER, S.; KUEFER, J.M.; ROESLLI, D.; EXCOFIER, L. ARLEQUIN: a software for population genetics analysis, version 1.1. Genetics and Biometry laboratories, Dept. of Anthropology, University of Genebra, 2000.

SCOTT, J. L.; DUNN, S. M.; HILLAM, A. J.; WALTON, S.; BERNDT, M. C. Characterization of a novel membrane glycoprotein involved in platelet activation. **J. Biol. Chem.** 264:13475–82; 1989.

SELVAKUMAR, A.; STEFFENS, U.; PALANISAMY, N.; CHAGANTI, R. S.; DUPONT, B. Genomic organization and allelic polymorphism of the human killer cell inhibitory receptor gene KIR103. **Tissue Antigens** 49:564; 1997.

SELVAKUMAR, A.; STEFFENS, U.; PALANISAMY, N.; CHAGANTI, R.S.; DUPONT, B. Genomic organization and allelic polymorphism of the human killer cell inhibitory receptor gene KIR103. **Tissue Antigens**, v. 49, n. 6, p. 564-573, 1997.

SELVAKUMAR, A;STEFFENS, U;DUPONT, B. NK cell receptor gene of the KIR family with two IG domains but highest homology to KIR receptors with three IG domains. **Tissue Antigens**, v. 48, n. 4 Pt 1, p. 285-94, 1996.

SHIBUYA, A.; CAMPBELL, D.; HANNUM, C.; YSSEL, H.; FRANZ-BACON, K. DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. **Immunity** 4:573–81; 1996.

SHILLING, H.G.; GUETHLEIN, L.A.; CHENG, N.W.; GARDINER, C.M.; RODRIGUEZ, R.; TYAN, D.; PARHAM, P. Allelic polymorphism synergizes with

variable gene content to individualize human KIR genotype. **Journal of Immunology**, v. 168, n. 5, p. 2307-2315, 2002.

SHILLING, H. G., N. YOUNG, L. A. GUETHLEIN, N. W. CHENG, C. M. GARDINER, D. TYAN, AND P. PARHAM, 2002, Genetic control of human NK cell repertoire: **J.Immunol.**, v. 169, n. 1, p. 239-247, 2002b.

SHIMIZU, Y.; DEMARS, R. Demonstration by class I gene transfer that reduced susceptibility of human cells to natural killer cell-mediated lysis is inversely correlated with HLA class I antigen expression. **European Journal of Immunology**, v.19, n. 3, p. 447-451, 1989.

SHULSE, C;STEINER, N K;HURLEY, C K. Allelic diversity in KIR2DL4 in a bone marrow transplant population: description of three novel alleles. **Tissue Antigens**, v. 70, n. 2, p. 157-9, 2007.

SHUM, B. P.; FLODIN, L. R.; MUIR, D. G.; RAJALINGAM, R.; KHAKOO, S. I. Conservation and variation in human and common chimpanzee CD94 and NKG2 genes. **J. Immunol.** 168:240–52; 2002.

SIVORI, S.; PAROLINI, S.; FALCO, M.; MARCENARO, E.; BIASSONI, R. 2B4 functions as a co-receptor in human NK cell activation. **Eur. J. Immunol.** 30:787–93; 2000.

SMYTH, MARK J et al. Activation of NK cell cytotoxicity. **Molecular Immunology**, v. 42, n. 4, p. 501-10, 2005.

SPEISER, D. E.; COLONNA, M.; AYYOUB, M.; CELLA, M.; PITTET, M. J.; The activatory receptor 2B4 is expressed in vivo by human CD8+ effector $\alpha\beta$ T cells. **J. Immunol.** 167:6165–70; 2001.

STARKEY, P M;SARGENT, I L;REDMAN, C W. Cell populations in human early pregnancy decidua: characterization and isolation of large granular lymphocytes by flow cytometry. **Immunology**, v. 65, n. 1, p. 129-34, 1988.

STEWART, C ANDREW;VAN BERGEN, JEROEN;TROWSDALE, JOHN. Different and divergent regulation of the KIR2DL4 and KIR3DL1 promoters. **Journal of Immunology**, v. 170, n. 12, p. 6073-81, 2003.

STIRRAT, G.M. Recurrent miscarriage. II: Clinical associations, causes, and management. **Lancet**, v. 236, n. 8717, p. 728-733, 1990b.

STIRRAT, G.M. Recurrent miscarriage. **Lancet**, v. 336, v. 8716, p. 673-675, 1990a.

STORKUS, W.J.; ALEXANDER J.; PAYNE, J. A.; DAWSON, J.R.; CRESSWELL, P. Reversal of natural killing susceptibility in target cells expressing transfected class I HLA genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 7, p. 2361-2364, 1989.

SVEJGAARD, A.; JERSILD, C.; NIELSEN, L. S.; BODMER, W. F. HL-A antigens and disease. Statistical and genetical considerations. **Tissue Antigens**; v.4, n. 2, p. 95-105, Review, 1974.

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

TAHARA-HANAOKA S, SHIBUYA K, ONODA Y, ZHANG H, YAMAZAKI S. Functional characterization of DNAM-1 (CD226) interaction with its ligands PVR (CD155) and nectin-2 (PRR-2/CD112). **Int. Immunol.** 16:533–38; 2004.

TOYAMA-SORIMACHI, N.; TAGUCHI, Y.; YAGITA, H.; KITAMURA, F.; KAWASAKI, A. Mouse CD94 participates in Qa-1- mediated self recognition by NK cells and delivers inhibitory signals independent of Ly-49. **J. Immunol.** 166:3771–79; 2001.

TRIPATHI, P et al. Role of 14-bp deletion in the HLA-G gene in the maintenance of pregnancy. **Tissue Antigens**, v. 64, n. 6, p. 706-10, 2004.

TRIPP, C S;WOLF, S F;UNANUE, E R. Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 8, p. 3725-9, 1993.

TROMPETER, HANS-INGO et al. Three structurally and functionally divergent kinds of promoters regulate expression of clonally distributed killer cell Ig-like receptors (KIR), of KIR2DL4, and of KIR3DL3. **Journal of Immunology**, v. 174, n. 7, p. 4135-43, 2005.

TROWSDALE, JOHN MOFFETT, ASHLEY. NK receptor interactions with MHC class I molecules in pregnancy. **Seminars in Immunology**, v. 20, n. 6, p. 317-20, 2008.

TRUNDLEY, A MOFFETT, A. Human uterine leukocytes and pregnancy. **Tissue Antigens**, v. 63, n. 1, p. 1-12, 2004.

TSUDA. Characterization of NKT cells in human peripheral blood and decidual lymphocytes. **Am J reprod Immunol**, 45, 295-302, 2001.

UHRBERG, M.; VALIANTE, N.M.; SHUM, B.P.; SHILLING, H.G.; LIENERT-WEIDENBACH, K.; CORLISS, B.; TYAN, D.; LANIER, L.L.; PARHAM, P. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. **Immunity**, v.7, n. 6, p. 753-763. 1997.

UHRBERG, M.; VALIANTE, N.M.; YOUNG, N. T.; LANIER, L.L.; PHILLIPS, J. H.; PARHAM, P. The repertoire of killer cell Ig-like receptors and CD94:NKG2A receptors in T cells: clones sharing identical alpha beta TCR rearrangement express highly diverse killer cell Ig-like receptor patterns. **Journal of Immunology**, v. 166, n. 5, p. 2307-2315, 2001.

UHRBERG, MARKUS. Shaping the human NK cell repertoire: an epigenetic glance at KIR gene regulation. **Molecular Immunology**, v. 42, n. 4, p. 471-5, 2005.

VALIANTE, N.M.; TRINCHIERI, G. Identification of a novel signal transduction surface molecule on human cytotoxic lymphocytes **J. Exp. Med.** 178:1397–406; 1993

VALIANTE, N.M.; UHRBERG, M.; SHILLING, H.G.; LIENERT-WEIDENBACH, K.; ARNETT, K.L.; D'ANDREA, A.; PHILLIPS, J.H.; LANIER, L.L.; PARHAM, P. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. **Immunity**, v. 7, n. 6, p. 739-751, 1997.

VAN DER MEER, A *et al.* Membrane-bound HLA-G activates proliferation and interferon-gamma production by uterine natural killer cells. **Molecular Human Reproduction**, v. 10, n. 3, p. 189-95, 2004.

VAN DER VEN, K.; SKRABLIN, S; ENGELS, G.; KREBS, D. HLA-G polymorphism and allele frequencies in caucasians. **Human Immunology**, New York, v. 59, p. 302-312, 1998.

VARLA-LEFTHERIOTI, M *et al.* Lack of the appropriate natural killer cell inhibitory receptors in women with spontaneous abortion. **Human Immunology**, v. 66, n. 1, p. 65-71, 2005.

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

VARLA-LEFTHERIOTI, M. Role of a KIR/HLA-C allorecognition system in pregnancy. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 62, n. 1-2, p. 19-27, 2004.

VARLA-LEFTHERIOTI, M.; SPYROPOULOU-VLACHOU, M.; NIOKOU, D.; KERAMITSOGLU, T.; DARLAMITSOU, A.; TSEKOURA, C.; PAPADIMITROPOULOS, M.; LEPAGE, V.; BALAFOUTAS, C.; STAVROPOULOS-GIOKAS, C. Natural killer (NK) cell receptors' repertoire in couples with recurrent spontaneous abortions. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 49, n. 3, p. 183-91, 2003.

VASSILIADOU, N.; BULMER, J.N. Immunohistochemical evidence for increased numbers of 'classic' CD57+ natural killer cells in the endometrium of women suffering spontaneous early pregnancy loss. **Human Reproduction**, v.11, n.7, p. 1569-1574, 1996.

VILCHES, C.; PANDO, M.J.; PARHAM, P. Genes encoding human killer-cell Ig-like receptors with D1 and D2 extracellular domains all contain untranslated pseudoexons encoding a third Ig-like domain. **Immunogenetics**, New York v. 51, n. 8-9, p. 639-646, 2000.

VILCHES, C.; PARHAM, P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 217-251, 2002.

VON LINSINGEN, R.; BOMPEIXE, P.E.; BICALHO, M.G. A Case–Control Study in IL6 and TGFB1 Gene Polymorphisms and Recurrent Spontaneous Abortion in Southern Brazilian Patients. New York: **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 53, p. 94-99, 2005.

WAGTMANN, N.; BIASSONI, R.; CANTONI, C.; VERDIANI, S.; MALNATI, M. S.; VITALE, M.; BOTTINO, C.; MORETTA, L.; MORETTA, A.; LONG, E. O. Molecular clones of the p58 NK cell receptor reveal immunoglobulin-related molecules with diversity in both the extra- and intracellular domains. **Immunity**, v. 2, n. 5, p.439-449, 1995.

WALLACH, D;FELLOUS, M;REVEL, M. Preferential effect of gamma interferon on the synthesis of HLA antigens and their mRNAs in human cells. **Nature**, v. 299, n. 5886, p. 833-6, 1982.

WANG S, ZHAO YR, JIAO YL, WANG LC, LI JF, CUI B, XU CY, SHI YH, CHEN ZJ: Increased activating killer immunoglobulin-like receptor genes and decreased specific HLA-C alleles in couples with recurrent spontaneous abortion. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 360, p. 696-701, 2007.

WARBURTON, D.; FRASER , F.C. Spontaneous abortion risks in man: data from reproductive histories collected in a medical genetic unit. **American Journal of Human Genetics**, v.16, p. 1-17, 1964.

WARRINGTON, K.J.; TAKEMURA, S.; GORONZY, J.J.; WEYAND, C. M. CD4+,CD28- T cells in rheumatoid arthritis patients combine features of the innate and adaptive immune systems. **Arthritis and Rheumatism**, v. 44, n.1, p.13-20, 2001.

WILCOX, A .J.; WEINBERG, C.R.; O'CONNOR, J.F.; BAIRD, D.D.; SCHLATTERER, J.P.; CANFIELD, R.E.; ARMSTRONG, E.G.; NISULA, B.C. Incidence of early loss of pregnancy. **New England Journal of Medicine**, v. 319, n. 4, p. 189-194, 1988.

WILCZYŃSKI, J.R. Th1/Th2 cytokines balance--yin and yang of reproductive immunology. **Amsterdam: European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology**, v. 122, n. 2, p. 136-143, 2005.

WILLIAMS, F *et al.* Investigation of killer cell immunoglobulinlike receptor gene diversity: I. KIR2DL4. **Human Immunology**, v. 65, n. 1, p. 31-8, 2004.

WILSON, M.J.; TORKAR, M.; HAUDE, A.; MILNE, S.; JONES, T.; SHEER, D.; BECK, S.; TROWSDALE, J. Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences of the United States of America, Washington, v. 97, n. 9, p. 4778-4783, 2000.

WILSON, M.J.; TORKAR, M.; TROWSDALE, J. Genomic organization of a human killer cell inhibitory receptor gene. **Tissue Antigens**, v. 49, n. 6, p. 574-579, 1997.

WITT, C.S.; DEWING, C.; SAYER, D.C.; UHRBERG, M.; PARHAM, P.; CHRISTIANSEN, F.T. Population frequencies and putative haplotypes of the killer cell immunoglobulin-like receptor sequences and evidence for recombination. **Transplantation**, v. 68, n. 11, p.1784-1789, 1999.

WITT CS, GOODRIDGE J, GERBASE-DELIMA MG, DAHER S, CHRISTIANSEN FT: Maternal KIR repertoire is not associated with recurrent spontaneous abortion. **Hum Reprod**, v. 19, p. 2653-2657, 2004.

WITT, C.S.; WHITEWAY, J.M.; WARREN, H.S.; BARDEN, A.; ROGERS, M.; MARTIN, A.; BEILIN, L.; CHRISTIANSEN, F.T. Alleles of the KIR2DL4 receptor and their lack of association with pre-eclampsia. **European Journal of Immunology**, v. 32, n. 1, p. 18-29, 2002.

YAMADA, HIDETO *et al.* Decrease in a specific killer cell immunoglobulin-like receptor on peripheral natural killer cells in women with recurrent spontaneous abortion of unexplained etiology. **American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)**, v. 51, n. 3, p. 241-7, 2004.

YAMASHITA, T.; FUJII, T.; TOKUNAGA, K.; TADOKORO, K.; HAMAI, Y.; MIKI, A.; KOZUMA, S.; JUJI, T.; TAKETANI, Y. Analysis of human leukocyte antigen-G polymorphism including intron 4 in japanese couples with habitual abortion. **American Journal of Reproduction and Immunology**, Rhode Island, v.41, p. 159-163, 1999.

YAN, WEI-HUA *et al.* Possible roles of KIR2DL4 expression on uNK cells in human pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 57, n. 4, p. 233-42, 2007.

YEN, J.H.; MOORE, B.E.; NAKAJIMA, T.; SCHOLL, D.; SCHAID, D.J.; WEYAND, C.M.; GORONZY, J.J. Major histocompatibility complex class I-recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 193, n.10, p. 1159-67, 2001.

YIE, SHANG-MIAN *et al.* Secretion of human leukocyte antigen-G by human embryos is associated with a higher in vitro fertilization pregnancy rate. **Fertility and Sterility**, v. 83, n. 1, p. 30-6, 2005.

YIE, SHANG-MIAN;TAYLOR, ROBERT N;LIBRACH, CLIFFORD. Low plasma HLA-G protein concentrations in early gestation indicate the development of preeclampsia later in pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 193, n. 1, p. 204-8, 2005.

YOKOYAMA, W.M. Recognition structures on natural killer cells. **Current Opinion in Immunology**, v. 5, n. 1, p. 67-73, 1993.

YOO, YUN JOO et al. Haplotype inference for present-absent genotype data using previously identified haplotypes and haplotype patterns. **Bioinformatics**, v. 23, n. 18, p. 2399-406, 2007.

ZHU, F., JIANG, K., LV, Q., HE, J. e YAN, L. Investigation of killer cell immunoglobulin-like receptor KIR2DL4 diversity by sequence-based typing in Chinese population. **Tissue Antigens**, Vol. 67, n. 3, p.214-221, 2006.

ANEXOS

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DA PESQUISA PELO COMITÊ DE ÉTICA DO
HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ

ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ANEXO3 – ARTIGO SUBMETIDO E ACEITO EM REVISTA INDEXADA

**ANEXO 1 – APROVAÇÃO DA PESQUISA PELO COMITÊ DE ÉTICA DO
HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

Curitiba, 02 de agosto de 2.001.

Ilmo (a) (s) Sr. (a)(s)
MARIA DA GRAÇA BICALHO DE LACERDA
Nesta

Prezado(a) Senhor(a):

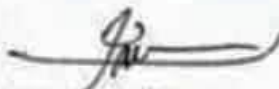
Comunicamos que o Projeto de pesquisa **"DETECÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES RELEVANTES NO PROGNÓSTICO E ACEITAÇÃO DO ALO-ENXERTO"**, está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução nº 196/96 do Ministério da Saúde.

Protocolo CEP-HC nº 037ext.019/2001-07

O referido projeto foi apresentado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, em reunião realizada no dia 31 de julho de 2.001.

Sendo o que se apresenta para o momento, subscrevo-me,

Atenciosamente



Prof. Dr. Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa em
Seres Humanos do Hospital de Clínicas – UFPR

ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

- a)** Você está sendo convidado a participar como paciente ()
como controle () de um estudo intitulado " DETECÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES RELEVANTES NO PROGNÓSTICO E ACEITAÇÃO DO ALO-ENXERTO". É através das pesquisas, inclusive básicas, que ocorrem os avanços na Medicina, e sua participação é de fundamental importância.
- b)** O objetivo desta pesquisa é tentar contribuir para que órgãos transplantados como o rim sejam melhor aceitos pelo receptor bem como contribuir para tentar esclarecer fenômenos relacionados aos abortos recorrentes de causas desconhecidas. E a participação de controles neste caso é de fundamental importância, pois através das comparações entre transplantes bem aceitos ou não é que poderemos chegar a fatos importantes, assim como entre aqueles casais com abortos de repetição e aqueles casais com número de dois ou mais filhos
- c)** Caso você participe da pesquisa, será necessário que você forneça uma amostra de sangue (10 ml)
- d)** O único inconveniente que você poderá experimentar é a dor pela picada na hora da coleta de sangue, bem como pequenos hematomas que possam vir a ocorrer, e que não causam dano a pacientes ou controles.
- e)** Não há riscos para você.
- f)** Para tanto você deverá comparecer ao LIGH, para a coleta do sangue.
- g)** A pesquisadora responsável pelo projeto, Profa. Maria Da Graça Bicalho - fone: 3361-1729, poderá ser contactada no LIGH.
- h)** Está garantido que você terá todas as informações que você queira, antes, durante e depois da pesquisa.
- i)** A sua participação neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de recusar participar da pesquisa.
- j)** As informações relacionadas à pesquisa poderão ser inspecionadas pelos pesquisadores que executam a pesquisa e pelas autoridades legais, no entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação ou por qualquer meio, isto será feito de forma codificada, para que a confidencialidade seja mantida.
- l)** Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames) não são de responsabilidade dos pacientes ou controles.

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

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

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

Eu concordo voluntariamente em participar desta pesquisa.

_____	___/___/___	_____	___/___
/__			
Assinatura do paciente/controle	Data	Pesquisador	Data

ANEXO 3 – ARTIGOS PUBLICADOS EM REVISTAS INDEXADAS

Activating Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor Genes' Association with Recurrent Miscarriage

Rafael Gustavo Vargas¹, Eni Picchioni Bompeixe², Patrícia Pinhode França¹, Marcio Marques de Moraes¹, Maria da Graça Bicalho¹

¹Genetics Department, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil;

²Basic Pathology Department, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil

Keywords

Abortion, apoptosis, KIR, NK cell, PCR-SSO, pregnancy loss

Correspondence

M. G. Bicalho, Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade, Departamento de Genética-SCB, Centro Politécnico, CP 19071, CEP 81.530.990, Curitiba, PR, Brazil.
E-mail: ligh@ufpr.br

Submitted December 20, 2008;
accepted April 20, 2009.

Citation

Vargas RG, Bompeixe EP, França PP, de Moraes MM, da Graça Bicalho M. Activating killer cell immunoglobulin-like receptor genes' association with recurrent miscarriage. *Am J Reprod Immunol* 2009; 62: 34–43

doi:10.1111/j.1600-0897.2009.00709.x

Introduction

Recurrent miscarriage (RM) is an important clinical problem of early pregnancy with many etiologies affecting 2–5% of couples attempting to reproduce.¹ Its commonly accepted definition is the occurrence of three or more consecutive spontaneous miscarriages until the 20th gestational week. In practice, many clinicians work to a less rigorous definition of two or more, perhaps because it is from that point that patients become worried and part of the

Problem

Natural killer (NK) cells are regulated through NK cell receptors such as killer cell immunoglobulin-like receptors (KIRs). KIRs are suspected of being involved in the causes of recurrent miscarriage (RM) as a higher proportion of activated NK cells were observed in women with RM when compared with that in controls. The aim of this study was to investigate if *KIR* genes coding for receptors known to have as ligands HLA class I molecules are correlated with RM.

Method of study

A matched case–control study was carried out in 68 south Brazilian Caucasian patient couples with RM and 68 control fertile couples. *KIR* genes were typed by PCR-Reverse SSO method.

Results

The rate of possession of an elevated number of activating *KIR* genes (positive for five or six activating *KIR* genes out of six different activating *KIR* genes analyzed) in RM patient women was significantly higher ($P = 0.0201$) when compared with that in control fertile women. These data suggest that women carrying a high content of activating *KIR* genes have about threefold increased probability to develop RM [OR = 2.71; 95% CI (1.23–6.01)].

Conclusion

Our results indicate that RM could be associated with NK cell activation mediated by a profile rich in activating *KIR* genes.

physician's responsibility is to respond to their concern.^{2,3}

The cause of a miscarriage may reside in the patients' genes, anatomy, endocrine system, immune system, blood-clotting system, and/or the environment, but in many cases no cause can be found. In fact, cause can be determined in only about half of the patients.⁴

Data derived from epidemiologic surveys indicate that the risk of a third miscarriage after two miscarriages is 30%. Given a 10–15% probability that any

clinically recognized pregnancy should result in spontaneous abortion, this rate is at least twice that which would be expected stochastically. Thus, specific repetitive risk factors are likely to underlie RM.⁵

Natural killer (NK) cells are large granular cells of the immune system that constitute the third major lymphocyte subset, only after T cells and B cells, and represent approximately 10–15% of all circulating lymphocytes in blood. NK cell activation results from integration of signals induced by the interaction of a highly diversified repertoire of inhibitory and activating NK cell receptors (NKR) with ligands, such as HLA class I molecules, expressed on target cells.⁶ Given that in each clonal lineage the expression of KIR receptors is stochastic, only a few receptors are randomly expressed in the different NK clonal lineages and in general, all the functional *KIR* genes of an individual are expressed in different clones of NK cells. However, the repertoire of functional KIR receptors expressed on the surface of NK cells of an individual depends directly on the complement of inherited *KIR* genes.^{7–10}

The main effector functions of NK cells are cytotoxicity and cytokine production.¹¹ They are also found in many lymphoid tissues, spleen, lung, liver, intestine, and the human endometrium.¹² Uterine NK (uNK) cells with a CD56^{bright}, CD16[−], CD3[−] phenotype^{13,14} constitute the dominant decidual cell population comprising about 70% of the total leukocyte population in the uterine mucosa.^{15,16}

In the non-pregnant endometrium, the number of uNK cells varies throughout the menstrual cycle. They are few in the proliferative pre-ovulatory phase of the cycle, gradually increasing during the mid-luteal post-ovulatory phase and reaching a peak in the late secretory phase. The presence of uNK cells in the uterine mucosa is exclusively an early pregnancy feature as they become less conspicuous after ~20 weeks of gestation and are totally absent in decidua at term. NK cells are not found in the uterus before menarche or post-menopause.¹⁶

Decidual (extravillous) trophoblast does not express HLA-A, HLA-B, or HLA class II molecules, the main stimulators of T-cell-dependent graft rejection responses. Nevertheless, these trophoblastic cells express a unique combination of HLA-C, HLA-E, and HLA-G molecules that are specific ligands for NKR, such as the killer immunoglobulin-like receptor (KIR) family,^{17,18} encoded by genes located in the leukocyte receptor complex (LRC) on chromosome 19q13.4.¹⁹ Of the 16 known *KIR* genes, seven

encode the inhibitory receptors *KIR2DL1-3*, *KIR2DL5*, and *KIR3DL1-3*; six encode the activating receptors *KIR2DS1-5* and *KIR3DS1*; one encodes the activating/inhibitory receptor *KIR2DL4*; and two are pseudogenes *KIR2DP1* and *KIR3DP1* that do not encode any functional KIR receptor.^{20,21} Seven genes within this *KIR* repertoire are known to encode receptors for the HLA class I molecules expressed on trophoblasts: *KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS4*,¹⁷ and *KIR2DL4*^{22,23} (Table I).

The interactions between trophoblastic HLA class I molecules and NK cell receptors on uNK cells^{32,33} have been reported to be closely involved in several reproductive regulatory mechanisms, such as in the initiation of menstruation, in the strict control of

Table I KIR molecules (and pseudogenes) and their MHC ligands

KIR	Function	MHC ligand
KIR2DL1	Inhibitory	HLA-C molecules Asn77, Lys80 (Cw2,4,5,6,15) ^{24,25}
KIR2DL2	Inhibitory	HLA-C molecules Ser77, Asn80 (Cw1,3,7,8) ^{24,25}
KIR2DL3	Inhibitory	HLA-C molecules Ser77, Asn80 (Cw1,3,7,8) ^{24,25}
KIR2DL4	Activating/ inhibitory	HLA-G ²⁶
KIR2DL5	Inhibitory	Unknown, probably HLA-G ²⁷
KIR2DS1	Activating	HLA-C molecules Asn77, Lys80 (Cw2,4,5,6,15) ^{24,28}
KIR2DS2	Activating	HLA-C molecules Ser77, Asn80 (Cw1,3,7,8) ²⁹
KIR2DS3	Activating	Unknown ²¹
KIR2DS4	Activating	HLA-Cw4 ³⁰
KIR2DS5	Activating	Unknown ²¹
KIR3DL1	Inhibitory	HLA-Bw4 ³¹
KIR3DL2	Inhibitory	HLA-A*3, HLA-A*11 ^{21,31}
KIR3DL3	Inhibitory	Unknown ²¹
KIR3DS1	Activating	Unknown ^{21,31}
<i>KIR2DP1</i>	None (pseudogene)	None ¹⁹
<i>KIR3DP1</i>	None (pseudogene)	None ¹⁹

KIR molecules that present MHC ligand expressed in trophoblast are shown in boldface.

trophoblast invasion during placental development,³⁴ in the allorecognition system in pregnancy,³⁵ in implantation, in decidua maintenance, in endometrial angiogenesis, and in vascular stability.^{36,37}

Recently, NK cell hyperactivity was suspected of being involved in RM.^{38,39} It was also observed that women with RM have a significantly higher proportion of activated NK cells in peripheral blood when compared with that in normal controls.^{40–42} All these observations lead to the hypothesis that a functional deregulation of NK cells, possibly mediated by NKRs, may be related to RM of unknown etiology.

In view of the evidence presented above, and given that the repertoire of functional KIR receptors expressed on the NK cell surface of an individual depends directly on the inherited *KIR* genes, and in general, all functional *KIR* genes of an individual are expressed in a combinatorial manner in the different clones of NK cells,^{7,43} *KIR* genes were genotyped and compared in 68 couples with RM of unknown etiology and 68 control fertile couples.

The aim of this study was to investigate the association between *KIR* genes and recurrent miscarriages. This study was carried out by comparing *KIR* gene frequencies and *KIR* repertoires (number of inhibitory and activating genes) present in RM patients and control fertile women. Additionally, we compared the presence/absence of the inhibitory and activating *KIR* profiles within RM couples and fertile couples to evaluate the putative combinatorial effect of the couple *KIR* profile and the outcome of pregnancy.

Materials and methods

Subjects

Sixty-eight Southern Brazilian Caucasian couples with a history of RM, defined as three or more consecutive abortions occurring until the 20th gestational week, with clinically verified pregnancies and no liveborn infant, were included in the study. Both male and female partners of couples experiencing RM were evaluated. The control group comprehended 68 fertile couples with two or more liveborn children and no history of abortions, matched by ethno-geographic origin, age, and social conditions with the RM patient group. Only women with unexplained RM with the same partner formed the RM patient group. All of them had undergone a diagnostic workup to rule out a verifiable cause for the RM

at the Obstetrics Department of the Hospital de Clínicas of Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil, and the private Genetika Clinic. The following tests were performed to exclude known causes of abortion: hysteroscopy, hysterosalpingography, serial ultrasound, parental karyotypes, investigation of luteal phase insufficiency, prolactin dosage, glyce-mic curve, determination of thyroid hormone levels, investigation of toxoplasmosis, cytomegalovirus, rubella, *Chlamydia trachomatis*, and *Mycoplasma hominis*, and investigation of antiphospholipid antibodies (anticardiolipin and lupus anticoagulant).

In the RM patient group, women's mean age at abortions was 26.4 years, with an average of 3.43 abortions (min = 3 max = 10; SD = 1.09). The control group consisted of 68 healthy and Southern Brazilian fertile couples. Women's mean age at birth of last child was 25.73 years. They had at least two children (an average of 2.6 births, min = 2 max = 5; SD = 0.77) and were carefully matched for the variables cited above. Ethical approval for the study was obtained from the Ethics Committee of the Hospital de Clínicas, and an informed consent to participate in the study was obtained from all individuals.

Genotyping

DNA was extracted from blood samples by the salting out technique.⁴⁴ *KIR* genotypes were identified with the KIR SSO Genotyping Test (One-Lambda Inc, Canoga Park, CA, USA) that applies Luminex[®] technology to the reverse Sequence Specific Oligonucleotide probes (Reverse-SSO) DNA typing method, according to the manufacturer's instructions. As polymorphism is found over the entire sequence of *KIR* genes, three separate PCR amplifications (Exons 3, 5, and 7–9) were performed for each sample.⁴⁵ Each PCR reaction contained 2.5 μ L of DNA at a concentration of 20 ng/ μ L. Data acquisition was performed in the LABScan 100TM flow analyzer LuminexTM (Luminex Corporation, Austin, TX, USA).

HLA Visual Software version 1.0 (One Lambda Inc.) analyzes the obtained data and assigns individual *KIR* gene profiles. Genotype assignment is based on the reaction pattern compared with patterns associated with published *KIR* gene sequences.⁴⁶ The genotyping assays were repeated and corroborated using the Sequence Specific Primer (SSP) technique with primers and protocol as previously described.⁴⁷

Statistical analysis

KIR genes and repertoires frequencies between RM patients and control fertile women were determined by direct counting and compared by the two-tailed Fisher's exact test using 2×2 contingency tables. The level of significance was set at P -value ≤ 0.05 . The strength of association, if present, was estimated by calculating the Odds Ratio (OR) with a confidence interval of 95% (95% CI).

To evaluate the existence of a fetal allorecognition system based on the husband's *KIR* genes considering that the NK cells effector function depends on a dynamic balance between signals transduced by variable activating and inhibitory cell surface receptors,^{48,49} RM and control couples were stratified according to the following four *KIR* repertoire combinations, as previously described by Varla-Leftherioti et al.⁵⁰: (i) Woman lacking inhibitory *KIR* gene(s) possessed by her husband, (ii) Woman lacking activating *KIR* gene(s) possessed by her husband, (iii) Man lacking inhibitory *KIR* gene(s) possessed by his wife, and (iv) Man lacking activating *KIR* gene(s) possessed by his wife. The observed pattern was then compared between RM patients and fertile control couples by the two-tailed Fisher's exact test using 2×2 contingency tables. The level of significance was set at P -value ≤ 0.05 .

Results

KIR gene frequencies were successfully genotyped in RM patients and control fertile couples, which were positive for the framework genes *KIR3DL2*, *KIR3DL3*, and *KIR2DL4* and for the specific control reactions, and no amplification signal was observed for the specific negative control reactions.

Women's *KIR* Genes and Repertoires

No statistically significant difference was observed among *KIR* genes frequencies when patient and control women were compared (Table II).

The results showed that *KIR* gene repertoires with an elevated content of activating *KIR* genes (five or six activating out of six *KIR* genes per repertoire) were significantly higher in the RM group and were found in 25 of 68 patient women and in 12 of 68 control fertile women [36.76% versus 17.64%; $P = 0.0201$; OR = 2.71; 95% CI (1.23–6.01)]. In contrast, no statistically significant difference was found

Table II Frequency of each *KIR* gene in patient women with recurrent miscarriages and fertile control women

<i>KIR</i> gene	Patients (n = 68)	Controls (n = 68)	<i>P</i> -value
<i>KIR2DL1</i>	63 (93%)	64 (94%)	1.0000 (ns)
<i>KIR2DL2</i>	43 (63%)	37 (54%)	0.3031 (ns)
<i>KIR2DL3</i>	58 (85%)	58 (85%)	1.0000 (ns)
<i>KIR2DL4</i>	68 (100%)	68 (100%)	1.0000 (ns)
<i>KIR2DL5</i>	37 (54%)	33 (49%)	0.4990 (ns)
<i>KIR2DP1</i>	67 (99%)	65 (96%)	0.6194 (ns)
<i>KIR2DS1</i>	32 (47%)	26 (38%)	0.3054 (ns)
<i>KIR2DS2</i>	45 (66%)	39 (57%)	0.2972 (ns)
<i>KIR2DS3</i>	22 (32%)	24 (35%)	0.8563 (ns)
<i>KIR2DS4</i>	62 (91%)	64 (94%)	0.7444 (ns)
<i>KIR2DS5</i>	30 (44%)	19 (28%)	0.0736 (ns)
<i>KIR3DL1</i>	64 (94%)	63 (93%)	1.0000 (ns)
<i>KIR3DL2</i>	68 (100%)	68 (100%)	1.0000 (ns)
<i>KIR3DL3</i>	68 (100%)	68 (100%)	1.0000 (ns)
<i>KIR3DP1</i>	68 (100%)	68 (100%)	1.0000 (ns)
<i>KIR3DS1</i>	34 (50%)	23 (34%)	0.0817 (ns)

KIR genes encoding molecules that present MHC ligand expressed in trophoblast are shown in boldface.

ns, statistically not significantly different.

The percentage values were rounded to entire numbers.

when the inhibitory *KIR* gene repertoires of RM patient and control fertile women were compared (Table III).

KIR Sharing between Partners

To test the effect of the different profile combinations within couples in the outcome of pregnancy, *KIR* gene repertoires were compared among partners. Four statistical classes were formed and compared between patients and controls: (i) wives who lack the inhibitory *KIR* genes present in their husbands' genomes, (ii) wives that lack the activating *KIR* genes present in their husbands' genomes, (iii) husbands that lack the inhibitory *KIR* genes present in their wives' genomes, and (iv) husbands that lack the activating *KIR* genes present in their wives' genomes. The results of this approach showed no difference between the two groups in any of the four combinations studied (Table IV).

Discussion

For the maintenance of the semiallogeneic fetus within the uterus, the maternal immune system

Table III Frequency of *KIR* repertoires in patient women with recurrent miscarriages and fertile control women

	Patients (<i>n</i> = 68)	Controls (<i>n</i> = 68)	<i>P</i> -value
<i>KIR</i> repertoires grouped by inhibitory gene content			
Repertoires with high content of inhibitory <i>KIRs</i> ^a	20 (29%)	15 (22%)	0.3360 (ns)
Repertoires with intermediate content of inhibitory <i>KIRs</i> ^b	43 (64%)	49 (72%)	0.3595 (ns)
Repertoires with low content of inhibitory <i>KIRs</i> ^c	5 (7%)	4 (6%)	1.0000 (ns)
<i>KIR</i> repertoires grouped by activating gene content			
Repertoires with high content of activating <i>KIRs</i> ^d	25 (37%)	12 (18%)	0.0201
Repertoires with intermediate content of activating <i>KIRs</i> ^e	27 (39%)	38 (56%)	0.0623 (ns)
Repertoires with low content of activating <i>KIRs</i> ^f	16 (24%)	18 (26%)	0.8432 (ns)

The value shown in boldface is statistically significantly different. ns, statistically not significantly different.

The percentage values were rounded to entire numbers.

^aRepertoires with seven inhibitory *KIR* genes.

^bRepertoires with five or six inhibitory *KIR* genes.

^cRepertoires with three or four inhibitory *KIR* genes.

^dRepertoires with five or six activating *KIR* genes.

^eRepertoires with two, three, or four activating *KIR* genes.

^fRepertoires with only one activating *KIR* gene.

Table IV Comparison of *KIR* repertoires between partners

<i>KIR</i> gene status	Patients (<i>n</i> = 68)	Controls (<i>n</i> = 68)	<i>P</i> -value
Wife lacks inhibitory <i>KIR</i> of her husband	32 (47%)	35 (51%)	0.7317 (ns)
Wife lacks activating <i>KIR</i> of her husband	30 (44%)	38 (56%)	0.2298 (ns)
Husband lacks inhibitory <i>KIR</i> of his wife	31 (46%)	29 (43%)	0.7338 (ns)
Husband lacks activating <i>KIR</i> of his wife	34 (50%)	33 (49%)	0.8659 (ns)

The percentage values were rounded to entire numbers.

Inh., inhibitory; Act., activating; ns, statistically not significantly different.

must provide a balance between the need for fetal intrusion into the mother's resources and the need to protect the mother from excessive fetal greed.⁵¹ The NK cells appear to be closely involved in this mechanism due to their elevated number in the decidua when compared with that of peripheral blood NK cells and for their direct contact with trophoblast, indicating that these cells have a regulatory role during pregnancy. Perhaps, this is achieved by the immune-modulation of the Th1/Th2 balance through the production of IL-4 and IFN- γ ⁵²⁻⁵⁴ and by the presence of the unique HLA class I molecules

expressed in trophoblastic cells (HLA-G, HLA-E, and HLA-C), all taking place at the fetal-maternal interface. In support of this idea, it was seen that up to 30% of the extravillous trophoblastic cells undergo apoptosis in the placental bed of uncomplicated pregnancies during early gestation. Additionally, it was observed that many of these apoptotic trophoblastic cells are surrounded by uNK cells.⁵⁵

This study was designed to investigate if differences in the repertoire of *KIR* genes between partners affect fetal development, leading to pregnancy loss. Our results indicate that women with RM presented an increased content of activating *KIR* genes in their repertoires (five or six out of six activating *KIR* genes) and that women carrying this elevated number of activating *KIRs* have about three times increased probability to develop RM [$P = 0.0201$; OR = 2.71; 95% CI (1.23-6.01)].

Several studies have demonstrated associations between RM and *NKR* genes, some of them indicating that RM women may not carry in their *KIR* repertoire the appropriate *KIR* genes (typically, *KIR2DL1* and *KIR2DL2*) encoding for receptors capable to interact with trophoblastic HLA-C and deliver signals to inhibit NK cell activation.^{50,56-58} These observations suggested an important role of *HLA-C* genes polymorphisms in the RM causes.⁵⁹ However, no association was found until 2008 when Hiby and collaborators found an association between RM and

the *HLA-C2* group that were elevated in both partners of RM couples.⁴⁹

The within-couples comparisons of *KIR* gene repertoires showed no differences between RM and fertile couples. These results diverge from those observed by Varla-Leftherioti et al.⁵⁰ in Greek Caucasians, where it was found that the percentage of women with RM of unknown etiology who lack the inhibitory *KIR* genes possessed by their husbands is significantly higher than that of women with successful pregnancies. This discrepancy might be due to variations of *KIR* gene and repertoire frequencies between the two different ethnicities (Brazilian Caucasians and Greek Caucasians) and in the number of individuals examined in each study (Varla-Leftherioti et al.⁵⁰ analyzed 26 RM and 26 fertile couples and in this study, 68 RM and 68 fertile couples were analyzed.).

Some studies, such as this, described a significantly elevated rate of possession of activating *KIRs* in RM patient women.^{60,61} A similar study performed by Witt et al.⁶² in Brazilian populations did not find any evidence of association between *KIR* genes polymorphism and predisposition to RM. Such differences may be due to different and smaller (51 patient women with RM and 55 fertile control women) sampling within the Brazilian Caucasian population. The Witt et al.⁶² investigation also included the analysis of six activating *KIR* genes of the entire *KIR* repertoire. Nevertheless, some of the activating *KIR* gene frequencies may have been underestimated in function of the methodology used at the time of the work of Witt et al.⁶². For example, the frequency of the activating *KIR* gene *KIR2DS4* in different populations is presently known, including the previously studied Brazilian populations and in this study, it is between 84% and 100%.⁶³ In the work of Witt et al.,⁶² the frequency of this gene was estimated to be 38% and this difference in frequency could impact on the *KIR* repertoire composition (the number of activating and inhibitory *KIR* genes). However, such divergences may lead investigators to consider the existence of a higher physiological complexity implicated in the RM of unknown etiology.

Our findings are similar to the results observed by Wang et al.⁶¹ in 2007 who found an increased number of activating *KIR* genes in Han Chinese women affected by RM when compared with that in fertile control women. Thus, we hypothesize that these results are indicative of an important physiological influence of *KIR* receptors on RM, given that these

dramatically different ethnic groups (Chinese Han and Brazilian Caucasian) present very divergent *KIR* gene frequencies;^{63,64} however, when evaluated in women affected with RM condition, a similar profile of elevated activating *KIR* gene frequencies was found in both ethnicities.

Activating receptors on NK cells may recognize structures that are present on both NK susceptible target cells and normal cells, but the influence of inhibitory pathways dominates when class I MHC molecules, which are constitutively expressed on most cells in the body, are recognized.⁶⁵

Therefore, we suggest that the physiological mechanism underlying the observation of an increased number of activating *KIR* genes may be one where a broad range of different activating *KIR* receptors predispose NK cells to recognize a wider spectrum of activation ligands derived from embryonic tissues leading to an increased proportion of cytotoxic and apoptotic signals that overcome the action of the inhibitory receptors against semiallogeneic cells in the fetomaternal interface and culminate in miscarriage.

Thus, considering that the set of activating *KIR* genes is broader in women with RM, it is expected that, on average, the NK cell and uNK cell clones express more activating *KIR* receptors on their surface. As a result, these cells are more aggressive, with higher potential to trigger cytotoxicity and apoptosis in response to a larger number of received activating stimuli when compared to other NK cells. In contrast, uNK cell clones of fertile women express lesser activating genes and they are more tolerant towards allogeneic tissues. This is due to a slender activating *KIR* repertoire or a higher inhibitory *KIR*/activating *KIR* ratio, which drives cellular response towards a state of non-cytotoxicity. This scenario may be significant at a crucial decision time defining the success or failure of a pregnancy.

The apparently diverging results between previous studies^{50,56–58} showing a more limited frequency of inhibitory *KIRs* in RM women and the present study in Caucasian and that of Wang et al.⁶¹ in Chinese Han individuals showing an increase of activating *KIRs* in patient women may be explained as synergic and not mutually exclusive, given that both results lead to the same common resultant: a more aggressive pool of NK cells which on average are stronger activators of cytotoxicity and apoptosis against embryonic tissues.

Also, as hypothesized by Wang et al.⁶¹ in 2007, the number of activating *KIR* genes per phenotype

may influence the susceptibility to RM through a gene dosage effect. To elucidate this hypothesis, further studies applying more specific techniques capable of identifying the number of copies of each *KIR* gene per genotype are needed; given that techniques such as SSP and SSO are not able to discriminate between homozygous or hemizygous genotypes.

This study suggests that *KIR* genes may play a major role throughout pregnancy and an elevated number of different activating *KIR* genes may predispose women to RM.

It is important to remark that our sample size is relatively large when compared with the majority of works in the same area; however, given the extensive polymorphism present in the *KIR* gene cluster and the multiple numbers of different *KIR* gene combinations within couples, it also may not be statistically robust. Larger samples should be analyzed to solve this problem. Finally, further studies including the analysis of the genetic polymorphism and molecular interaction between KIRs and their HLA-C ligands as well as *KIR2DL4* and HLA-G alleles are necessary to better understand the role of NK cells in pregnancy and miscarriage.

Acknowledgments

This work was supported by the agreement between FUNPAR-LIGH and by CAPES. We are grateful to the patients and control families. The authors thank professors Eleidi Alice Chautard-Freire-Maia, Juarez Gabardo, Iglener João Cavalli, Lupe Furtado-Alle, and Salmo Raskin for comments and suggestions; LIGH staff for technical support; and Hadriano M. Lacerda for the assistance with the English translation and editorial work.

References

- 1 Coulam CB, Clark DA, Beer AE, Kutteh WH, Silver R, Kwak J, Stephenson M: Current clinical options for diagnosis and treatment of recurrent spontaneous abortion. Clinical Guidelines Recommendation Committee for Diagnosis and Treatment of Recurrent Spontaneous Abortion. *Am J Reprod Immunol* 1997; 38:57–74.
- 2 Stirrat GM: Recurrent miscarriage. *Lancet* 1990; 336:673–675.
- 3 Christiansen OB, Nybo Andersen AM, Bosch E, Daya S, Delves PJ, Hviid TV, Kutteh WH, Laird SM, Li TC, van der Ven K: Evidence-based investigations and treatments of recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 2005; 83:821–839.
- 4 Kiwi R: Recurrent pregnancy loss: evaluation and discussion of the causes and their management. *Cleve Clin J Med* 2006; 73:913–921.
- 5 Lambropoulou M, Tamiolakis D, Venizelos J, Liberis V, Galazios G, Tsikouras P, Karamanidis D, Petrakis G, Constantinidis T, Menegaki M, Papadopoulos N: Imbalance of mononuclear cell infiltrates in the placental tissue from fetuses after spontaneous abortion versus therapeutic termination from 8th to 12th weeks of gestational age. *Clin Exp Med* 2006; 6:171–176.
- 6 Ravet S, Scott-Algara D, Bonnet E, Tran HK, Tran T, Nguyen N, Truong LX, Theodorou I, Barre-Sinoussi F, Pancino G, Paul P: Distinctive NK-cell receptor repertoires sustain high-level constitutive NK-cell activation in HIV-exposed uninfected individuals. *Blood* 2007; 109:4296–4305.
- 7 Valiante NM, Uhrberg M, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Arnett KL, D'Andrea A, Phillips JH, Lanier LL, Parham P: Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity* 1997; 7:739–751.
- 8 Shilling HG, Young N, Guethlein LA, Cheng NW, Gardiner CM, Tyan D, Parham P: Genetic control of human NK cell repertoire. *J Immunol* 2002; 169:239–247.
- 9 Uhrberg M: Shaping the human NK cell repertoire: an epigenetic glance at *KIR* gene regulation. *Mol Immunol* 2005; 42:471–475.
- 10 Trompeter HI, Gomez-Lozano N, Santourlidis S, Eisermann B, Wernet P, Vilches C, Uhrberg M: Three structurally and functionally divergent kinds of promoters regulate expression of clonally distributed killer cell Ig-like receptors (*KIR*), of *KIR2DL4*, and of *KIR3DL3*. *J Immunol* 2005; 174:4135–4143.
- 11 Freud AG, Caligiuri MA: Human natural killer cell development. *Immunol Rev* 2006; 214:56–72.
- 12 Trinchieri G: Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 1989; 47:187–376.
- 13 Starkey PM, Sargent IL, Redman CW: Cell populations in human early pregnancy decidua: characterization and isolation of large granular lymphocytes by flow cytometry. *Immunology* 1988; 65:129–134.
- 14 Geiselhart A, Dietl J, Marzusch K, Ruck P, Ruck M, Horny HP, Kaiserling E, Handgretinger R: Comparative analysis of the immunophenotypes of decidual and peripheral blood large granular lymphocytes and T cells during early human

- pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1995; 33:315–322.
- 15 King A, Burrows T, Loke YW: Human uterine natural killer cells. *Nat Immunol* 1996; 15:41–52.
 - 16 King A, Burrows T, Verma S, Hiby S, Loke YW: Human uterine lymphocytes. *Hum Reprod Update* 1998; 4:480–485.
 - 17 King A, Hiby SE, Gardner L, Joseph S, Bowen JM, Verma S, Burrows TD, Loke YW: Recognition of trophoblast HLA class I molecules by decidual NK cell receptors – a review. *Placenta* 2000; 21(Suppl. A):S81–85.
 - 18 King A, Burrows TD, Hiby SE, Bowen JM, Joseph S, Verma S, Lim PB, Gardner L, Le Bouteiller P, Ziegler A, Uchanska-Ziegler B, Loke YW: Surface expression of HLA-C antigen by human extravillous trophoblast. *Placenta* 2000; 21:376–387.
 - 19 Wilson MJ, Torkar M, Haude A, Milne S, Jones T, Sheer D, Beck S, Trowsdale J: Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:4778–4783.
 - 20 Hsu KC, Liu XR, Selvakumar A, Mickelson E, O'Reilly RJ, Dupont B: Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. *J Immunol* 2002; 169:5118–5129.
 - 21 Du Z, Gjertson DW, Reed EF, Rajalingam R: Receptor-ligand analyses define minimal killer cell Ig-like receptor (KIR) in humans. *Immunogenetics* 2007; 59:1–15.
 - 22 Yan WH, Lin A, Chen BG, Zhou MY, Dai MZ, Chen XJ, Gan LH, Zhu M, Shi WW, Li BL: Possible roles of KIR2DL4 expression on uNK cells in human pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2007; 57:233–242.
 - 23 Borrego F, Kabat J, Kim DK, Lieto L, Maasho K, Pena J, Solana R, Coligan JE: Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. *Mol Immunol* 2002; 38:637–660.
 - 24 Boyington JC, Sun PD: A structural perspective on MHC class I recognition by killer cell immunoglobulin-like receptors. *Mol Immunol* 2002; 38:1007–1021.
 - 25 Maenaka K, Juji T, Nakayama T, Wyer JR, Gao GF, Maenaka T, Zaccari NR, Kikuchi A, Yabe T, Tokunaga K, Tadokoro K, Stuart DI, Jones EY, van der Merwe PA: Killer cell immunoglobulin receptors and T cell receptors bind peptide-major histocompatibility complex class I with distinct thermodynamic and kinetic properties. *J Biol Chem* 1999; 274:28329–28334.
 - 26 Faure M, Long EO: KIR2DL4 (CD158d), an NK cell-activating receptor with inhibitory potential. *J Immunol* 2002; 168:6208–6214.
 - 27 Yusa S, Catina TL, Campbell KS: KIR2DL5 can inhibit human NK cell activation via recruitment of Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase-2 (SHP-2). *J Immunol* 2004; 172:7385–7392.
 - 28 Biassoni R, Pessino A, Malaspina A, Cantoni C, Bottino C, Sivori S, Moretta L, Moretta A: Role of amino acid position 70 in the binding affinity of p50.1 and p58.1 receptors for HLA-Cw4 molecules. *Eur J Immunol* 1997; 27:3095–3099.
 - 29 Stewart CA, Laugier-Anfossi F, Vely F, Saulquin X, Riedmuller J, Tisserant A, Gauthier L, Romagne F, Ferracci G, Arosa FA, Moretta A, Sun PD, Ugolini S, Vivier E: Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:13224–13229.
 - 30 Katz G, Markel G, Mizrahi S, Arnon TI, Mandelboim O: Recognition of HLA-Cw4 but not HLA-Cw6 by the NK cell receptor killer cell Ig-like receptor two-domain short tail number 4. *J Immunol* 2001; 166:7260–7267.
 - 31 Gardiner CM, Guethlein LA, Shilling HG, Pando M, Carr WH, Rajalingam R, Vilches C, Parham P: Different NK cell surface phenotypes defined by the DX9 antibody are due to KIR3DL1 gene polymorphism. *J Immunol* 2001; 166:2992–3001.
 - 32 Sargent IL, Borzychowski AM, Redman CW: NK cells and human pregnancy – an inflammatory view. *Trends Immunol* 2006; 27:399–404.
 - 33 Hiby SE, King A, Sharkey AM, Loke YW: Human uterine NK cells have a similar repertoire of killer inhibitory and activatory receptors to those found in blood, as demonstrated by RT-PCR and sequencing. *Mol Immunol* 1997; 34:419–430.
 - 34 Kusumi M, Yamashita T, Fujii T, Nagamatsu T, Kozuma S, Taketani Y: Expression patterns of lectin-like natural killer receptors, inhibitory CD94/NKG2A, and activating CD94/NKG2C on decidual CD56bright natural killer cells differ from those on peripheral CD56dim natural killer cells. *J Reprod Immunol* 2006; 70:33–42.
 - 35 Varla-Leftherioti M: Role of a KIR/HLA-C allelrecognition system in pregnancy. *J Reprod Immunol* 2004; 62:19–27.
 - 36 Li XF, Charnock-Jones DS, Zhang E, Hiby S, Malik S, Day K, Licence D, Bowen JM, Gardner L, King A, Loke YW, Smith SK: Angiogenic growth factor messenger ribonucleic acids in uterine natural killer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:1823–1834.

- 37 Moffett-King A: Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:656–663.
- 38 Aoki K, Kajiuira S, Matsumoto Y, Ogasawara M, Okada S, Yagami Y, Gleicher N: Preconceptional natural-killer-cell activity as a predictor of miscarriage. *Lancet* 1995; 345:1340–1342.
- 39 Kwak JY, Beaman KD, Gilman-Sachs A, Ruiz JE, Schewitz D, Beer AE: Up-regulated expression of CD56+, CD56+/CD16+, and CD19+ cells in peripheral blood lymphocytes in pregnant women with recurrent pregnancy losses. *Am J Reprod Immunol* 1995; 34:93–99.
- 40 Ntrivalas EI, Kwak-Kim JY, Gilman-Sachs A, Chung-Bang H, Ng SC, Beaman KD, Mantouvalos HP, Beer AE: Status of peripheral blood natural killer cells in women with recurrent spontaneous abortions and infertility of unknown aetiology. *Hum Reprod* 2001; 16:855–861.
- 41 Yamamoto T, Takahashi Y, Kase N, Mori H: Decidual natural killer cells in recurrent spontaneous abortion with normal chromosomal content. *Am J Reprod Immunol* 1999; 41:337–342.
- 42 Thum MY, Bhaskaran S, Abdalla HI, Ford B, Sumar N, Shehata H, Bansal AS: An increase in the absolute count of CD56dimCD16+ CD69+ NK cells in the peripheral blood is associated with a poorer IVF treatment and pregnancy outcome. *Hum Reprod* 2004; 19:2395–2400.
- 43 Lanier LL: NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:359–393.
- 44 Lahiri DK, Nurnberger JI Jr: A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991; 19:5444.
- 45 Crum KA, Logue SE, Curran MD, Middleton D: Development of a PCR-SSOP approach capable of defining the natural killer cell inhibitory receptor (KIR) gene sequence repertoires. *Tissue Antigens* 2000; 56:313–326.
- 46 Robinson J, Waller MJ, Stoehr P, Marsh SG: IPD – the immuno polymorphism database. *Nucleic Acids Res* 2005; 33:D523–526.
- 47 Martin MP, Nelson G, Lee JH, Pellett F, Gao X, Wade J, Wilson MJ, Trowsdale J, Gladman D, Carrington M: Cutting edge: susceptibility to psoriatic arthritis: influence of activating killer Ig-like receptor genes in the absence of specific HLA-C alleles. *J Immunol* 2002; 169:2818–2822.
- 48 Vivier E, Nunes JA, Vely F: Natural killer cell signaling pathways. *Science* 2004; 306:1517–1519.
- 49 Hiby SE, Regan L, Lo W, Farrell L, Carrington M, Moffett A: Association of maternal killer-cell immunoglobulin-like receptors and parental HLA-C genotypes with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2008; 23:972–976.
- 50 Varla-Leftherioti M, Spyropoulou-Vlachou M, Niokou D, Keramitsoglou T, Darlamitsou A, Tsekoura C, Papadimitropoulos M, Lepage V, Balafoutas C, Stavropoulos-Giokas C: Natural killer (NK) cell receptors' repertoire in couples with recurrent spontaneous abortions. *Am J Reprod Immunol* 2003; 49:183–191.
- 51 Moffett A, Loke C: Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:584–594.
- 52 Boyson JE, Rybalov B, Koopman LA, Exley M, Balk SP, Racke FK, Schatz F, Masch R, Wilson SB, Strominger JL: CD1d and invariant NKT cells at the human maternal-fetal interface. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:13741–13746.
- 53 Tsuda H, Sakai M, Michimata T, Tanebe K, Hayakawa S, Saito S: Characterization of NKT cells in human peripheral blood and decidual lymphocytes. *Am J Reprod Immunol* 2001; 45:295–302.
- 54 Trundley A, Moffett A: Human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue Antigens* 2004; 63:1–12.
- 55 Bulmer JN, Lash GE: Human uterine natural killer cells: a reappraisal. *Mol Immunol* 2005; 42:511–521.
- 56 Varla-Leftherioti M, Spyropoulou-Vlachou M, Keramitsoglou T, Papadimitropoulos M, Tsekoura C, Graphou O, Papadopoulou C, Gerondi M, Stavropoulos-Giokas C: Lack of the appropriate natural killer cell inhibitory receptors in women with spontaneous abortion. *Hum Immunol* 2005; 66:65–71.
- 57 Flores AC, Marcos CY, Paladino N, Arruvito L, Williams F, Middleton D, Fainboim L: KIR receptors and HLA-C in the maintenance of pregnancy. *Tissue Antigens* 2007; 69(Suppl. 1):112–113.
- 58 Yamada H, Shimada S, Kato EH, Morikawa M, Iwabuchi K, Kishi R, Onoe K, Minakami H: Decrease in a specific killer cell immunoglobulin-like receptor on peripheral natural killer cells in women with recurrent spontaneous abortion of unexplained etiology. *Am J Reprod Immunol* 2004; 51:241–247.
- 59 Christiansen OB, Mohapeloa HP, Steffensen R, Jersild C: HLA-C and -Bw typing of couples with unexplained recurrent miscarriages. *J Reprod Immunol* 1997; 37:63–77.
- 60 Ntrivalas EI, Bowser CR, Kwak-Kim J, Beaman KD, Gilman-Sachs A: Expression of killer immunoglobulin-like receptors on peripheral blood NK cell subsets of women with recurrent spontaneous abortions or implantation failures. *Am J Reprod Immunol* 2005; 53:215–221.
- 61 Wang S, Zhao YR, Jiao YL, Wang LC, Li JF, Cui B, Xu CY, Shi YH, Chen ZJ: Increased activating killer immunoglobulin-like receptor genes and decreased

- specific HLA-C alleles in couples with recurrent spontaneous abortion. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 360:696–701.
- 62 Witt CS, Goodridge J, Gerbase-Delima MG, Daher S, Christiansen FT: Maternal KIR repertoire is not associated with recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod* 2004; 19:2653–2657.
- 63 Middleton D, Meenagh A, Moscoso J, Arnaiz-Villena A: Killer immunoglobulin receptor gene and allele frequencies in Caucasoid, Oriental and Black populations from different continents. *Tissue Antigens* 2008; 71:105–113.
- 64 Jiang K, Zhu FM, Lv QF, Yan LX: Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in the Chinese Han population. *Tissue Antigens* 2005; 65:556–563.
- 65 Abbas A, Lichtman A, Pilla I: Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia, Saunders Elsevier, 2007.



Association of HLA-G alleles and 3' UTR 14 bp haplotypes with recurrent miscarriage in Brazilian couples

Rafael Gustavo Vargas ^a, Paulo Roberto Sarturi ^b, Sibelle Botogosque Mattar ^a, Eni Piccioni Bompeixe ^c, Joandrei dos Santos Silva ^a, Alessandro Pirri ^a, Maria da Graça Bicalho ^{a,*}

^a Immunogenetics and Histocompatibility Laboratory, Genetics Department, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil

^b Assis Gurgacz Faculty, Cascavel, Paraná, Brazil

^c Basic Pathology Department, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 July 2010

Accepted 22 February 2011

Available online 25 February 2011

Keywords:

Abortion

Haplotype

HLA-G

Linkage disequilibrium

Pregnancy

Reproduction

ABSTRACT

Human leukocyte antigen (HLA)-G expression is restricted, expressed on trophoblast, with a major role in fetus acceptance. In addition to the 46 HLA-G alleles, the presence or absence of a 14 bp polymorphism located in the 3' UTR contributes to gene polymorphism that may influence both HLA-G mRNA stability and HLA-G isoform's splicing and consequently could play an immunomodulatory function in pregnancy. To elucidate the role of HLA-G polymorphism in pregnancy, HLA-G allele frequencies and the 14 bp polymorphisms were analyzed and compared in 60 couples with recurrent miscarriage (RM) and 68 fertile control couples. Two haplotypes showed a significant elevated frequency in patients (HLA-G*01:01:08/+14, $p_c < 0.0001$ and HLA-G*01:04:01/-14, $p_c < 0.0001$). The haplotype HLA-G*01:01:A/+14 exhibited a significant protective effect against RM in women ($p_c = 0.0238$). Remarkably, significant differences in linkage disequilibrium were observed between patient and control groups. Two alleles showed a positive association with the +14 bp segment in RM patients and a strong negative association with fertile controls (HLA-G*01:01:08 = patients $D' = 0.295-0.371$; controls $D' = -0.715$ to -1.000 ; HLAG* 01:05N = patients $D' = 0.728-1.000$; controls $D' = -1.000$). HLA-G*01:04:01 showed a negative association with the 14 bp segment in patients and a positive association in controls (patients $D' = -0.249$ to -0.674 ; controls $D' = 0.688-1.000$). Our results suggest that haplotypic combinations of HLA-G alleles and the 14 bp segment may be associated with RM.

© 2011 Published by Elsevier Inc. on behalf of American Society for Histocompatibility and Immunogenetics.

1. Introduction

Recurrent miscarriage (RM) affects 2%–5% of couples attempting to reproduce and represents a major concern for reproductive medicine [1,2]. In 2008, the American Society of Reproductive Medicine defined recurrent pregnancy loss as “two or more failed pregnancies. When the cause is unknown, each pregnancy loss merits careful review to determine whether specific evaluation may be appropriate. After three or more losses, a thorough evaluation is warranted” [3]. Many clinicians work with this definition because it is from that point that patients become worried, and part of the physician's responsibility is to respond to their concern. In clinical research, when etiology of RM is unknown, the commonly accepted rule for participant patient recruitment is the occurrence of three or more consecutive spontaneous miscarriages until the 20th gestational week [4,5].

The cause of a miscarriage may reside in the patients' genes, anatomy, endocrine system, immune system, blood clotting sys-

tem, and/or the environment; but in many cases, no cause can be found, and despite extensive endocrine, chromosomal, serologic, and anatomic evaluation, 30%–40% of RM cases remain unexplained [2,6].

Human leukocyte antigen (HLA)-G is a nonclassical HLA class Ib gene located within the major histocompatibility complex (MHC) at 6p21.3, one of the most polymorphic regions in the human genome. In contrast to classical HLA class Ia genes, HLA-G shows only minimal variation and to date 46 nucleotide alleles encoding 14 different protein sequences have been identified. This limited polymorphism is distributed between the $\alpha 1$, $\alpha 2$, and $\alpha 3$ domains, unlike the polymorphism in classical HLA-I molecules, which is concentrated around the peptide binding groove [7,8,9].

Decidual (extravillous) trophoblasts do not express HLA-A, HLA-B, or HLA class II molecules, the main stimulators of T-cell-dependent graft rejection responses. Nevertheless, these trophoblastic cells express a unique combination of HLA-G, HLA-C, and HLA-E molecules [10–12]. The lack of polymorphism in the peptide-binding groove of HLA-G supports the hypothesis of a function that differs from classical HLA-I (which are extremely polymorphic to present as many different peptides as possible) [13]. This special

* Corresponding author.

E-mail address: ligh@ufpr.br (M. da Graça Bicalho).

feature suggests a major role in tissue and cell signaling toward an immunosuppressive and tolerogenic function involved in fetus acceptance, acting on the main effectors involved in allograft rejection. Hence, HLA-G seems to be able to induce CD8⁺ T cell apoptosis and suppress proliferation of CD4⁺ T lymphocytes, possibly by interaction with other known receptors on CD4⁺ T cells, such as ILT2 and ILT4 [14–17]. HLA-G inhibits the antigen-specific cytotoxic T-lymphocyte response, providing more evidence as to the role of HLA-G in preventing allograft rejection. Hence, HLA-G could protect the semi-allogeneic fetus by preventing maternal cytotoxic T lymphocyte allo-responses [18,19]. In addition, HLA-G inhibits NK cytotoxicity by blocking the activating signal transduction pathway and formation of activating immunologic synapses and modulates secretion of cytokines and proliferation of peripheral blood mononuclear cells in a way that may shift the Th1:Th2 balance toward relative Th2 dominance [20–24].

The HLA-G primary transcript has been shown to generate seven alternative mRNAs that have the capacity to encode four membrane isoforms (HLA-G1, -G2, -G3, and -G4) and three soluble isoforms (HLA-G5, -G6, and -G7) [25,26]. HLA-G*01:05N null allele is characterized by a frameshift mutation in exon 3 and the presence of a stop codon in exon 4, thus leading to truncated HLA-G1, -G5, and -G4 isoforms and normal HLA-G2, -G3, and G7 isoforms [27]. Additionally, the shedding of the proteolytically cleaved surface isoform HLA-G1 (sHLA-G1) can generate a soluble form of HLA-G [28].

Harrison et al. reported an additional 14 bp deletion/insertion polymorphism in the exon 8 of the 3' untranslated region (3' UTR) of HLA-G gene [29], which may contribute importantly to the regulation of HLA-G expression [30]. Two major roles were attributed to this polymorphism; the first one indicates that the presence of 14 bases affects the stability of the transcript and thereby the level of protein expression by inducing the alternative splicing of HLA-G mRNA, leading to the removal of the 92 surrounding ribonucleotides from the mature transcript, resulting in a more stable mRNA. When the 14 bp sequence is absent, the 92 bases are retained and the mature transcript becomes unstable, as a pentameric sequence AUUUG encoded within these 92 nucleotides remains in the transcript and may be involved in deadenylation and subsequent decay of HLA-G mRNA [31,32]. The second major role is related to the effect that the 14 bp sequence exerts on the alternative splicing that produces the different HLA-G isoforms. This role was reported in a study with 150 Chinese Han individuals with the homozygous genotype +14/+14 presenting significantly lower levels of sHLA-G [33,34].

These data suggest that the 14 bp sequence is involved in mechanisms controlling post-transcriptional regulation of HLA-G molecule. Also, in 2001 Rebmann et al. reported that the generation of sHLA-G molecules is associated with certain HLA-G alleles [35]. Therefore, there is the possibility that linkage disequilibrium between specific HLA-G alleles and the presence or absence of the 14 bp segment may constitute conserved gene arrangements, leading to different post-transcriptional regulation patterns for the different HLA-G alleles.

To elucidate the role of HLA-G polymorphism in the outcome of pregnancy, we have analyzed HLA-G allele frequencies and the 14 bp polymorphisms in normal fertile couples and in RM couples. Allelic and haplotypic frequencies as the linkage disequilibrium pattern between each allele and the presence or absence of the 14 bp polymorphism were compared between the two groups.

2. Subjects and methods

2.1. Subjects

Sixty Caucasian couples from the South of Brazil with a history of RM, defined as three or more consecutive abortions occurring until the 20th gestational week, with clinically verified pregnancies and no live-born infant, were included in the study. Both male and

female partners of couples experiencing RM were evaluated. The control group comprehended 68 fertile couples with two or more live-born children and no history of abortions, matched for ethnogeographic origin, age, and socioeconomic status to the RM patient group. Only women with unexplained RM with the same partner formed the RM patient group. All of them had undergone a diagnostic workup to rule out a verifiable cause for the RM at the Obstetrics Department of the Hospital de Clínicas of Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil, and the private Genetika Clinic. The following tests were performed to exclude known causes of abortion: hysteroscopy, hysterosalpingography, serial ultrasound, parental karyotypes, investigation of luteal phase insufficiency, prolactin dosage, glycemic curve, determination of thyroid hormone levels, investigation of toxoplasmosis, cytomegalovirus, rubella, *Chlamydia trachomatis*, and *Mycoplasma hominis*, and investigation of antiphospholipid antibodies (anticardiolipin and lupus anticoagulant). In the RM patient group, women's mean age at abortions was 26.4 years, with an average of 3.43 abortions (minimum three, maximum ten; SD = 1.09). The control group consisted of 68 healthy and fertile Caucasian couples from the South of Brazil. Women's mean age at birth of last child was 25.73 years. They had at least two children (an average of 2.6 births, minimum two, maximum five; SD = 0.77) and were carefully matched for the variables cited above. Ethical approval for the study was obtained from the Ethics Committee of the Hospital de Clínicas, and informed consent to participate in the study was obtained from all individuals.

2.2. Genotyping

DNA was extracted from blood samples by the salting-out technique [36]. Polymerase chain reaction (PCR) amplification was locus-specific. HLA-G exons 2 and 3 were amplified separately using thermocycling conditions and specific primers modified from the work published by Hviid et al. in 2002 [37]: 5' (G25S e G35) and two primers for position 3' (G23S and G33), as follows: G25S'-TCCATGAGGTATTTTCAGCGC; G23S'-AGGTAATCCTTGCCATCGTA; G35S' -CCCAGACCCTTACCTGGGAGA; and G33N'-CTCTCCTTGTGCTAGGCCAGGCTGAG. The resulting amplicon was purified with Exonuclease I and Shrimp Alkaline Phosphatase (USB Corporation, Cleveland, OH) to remove excess of primers and dNTPs, followed by a sequencing reaction with fluorescent dye terminators and an additional purification step.

2.3. HLA-G sequencing and computer analysis

HLA-G alleles were defined based on exon 2 and 3 polymorphisms at the DNA level. The PCR products of exons 2 and 3 were eluted by electrophoresis using an ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Cupertino, CA) and Big Dye Terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems). Sequencing of HLA-G exons 2 and 3 allowed the analysis of codons 31, 54, 57, and 69 (exon 2) and codons 93, 107, 110, and 131 (exon 3). Combination of nucleotide variation in these codons permitted the determination of HLA-G alleles/allelic groups. The software ASSIGN SBT 3.5+ (Conexio Genomics Pty Ltd., Applecross, Australia) was used, and both alleles present in each individual were identified. However, HLA-G*01:01:01 and HLA-G*01:01:06 alleles were grouped as HLA-G*01:01A and alleles HLA-G*01:01:02 and HLA-G*01:06 as HLA-G*01B. Such a strategy was necessary, considering that such allelic pairs were identical for exons 2 and 3 nucleotide sequences but different for exon 4, which was not investigated.

2.4. 14 bp Polymorphism genotyping at exon 8 (3'-UTR)

The PCR products of exon 8 were obtained with the following oligonucleotide primers: G85S' GTGATGGGCTGTTAAAGTGT-CACC, G83S' GGAAGGAATGCAGTTCAGCATGA, as previously described by Hviid et al. [37], and were analyzed by electrophoresis on

agarose gels (4% Ultrapur agarose, Invitrogen, Carlsbad, CA) and stained with ethidium bromide.

2.5. Statistical analyses

Observed frequencies of HLA-G alleles were determined by direct counting. Allelic, genotypic, and haplotypic frequencies were compared among couples, women, and men from case and control groups through the two-tailed Fisher's exact test using 2×2 contingency tables. Multiple-comparison correction was applied by multiplying p values by the number of tested alleles ($n = 27$) (P_c) [38]. The level of significance was set at $p \leq 0.05$. The strength of association, if present, was estimated by calculating the odds ratio (OR) with a 95% confidence interval (95% CI) [39]. The Haldane correction was applied whenever an OR equal to zero was obtained in the contingency table [40].

The reconstruction of HLA-G haplotypes obtained from allelic data and the 14 bp polymorphism in exon 8, the linkage disequilibrium (LD) values, and the statistical significance of the LD values were estimated using the Arlequin v. 3.0 software package [41]. LD symbolized as D and the standardized LD (D') were calculated to show LD associations between each allele and the 14 bp polymorphisms. The D' values provide an indication of the strength of the association between pairs of sequences [42]. The square of the correlation coefficient (r^2), which is a strong indicator of LD, was also calculated [43,44].

3. Results

The frequencies of the detected polymorphisms in exons 2 and 3 and 14 bp polymorphism in exon 8 at the 3' UTR region are shown and compared between patients and controls in Table 1 and Table 2, respectively. The haplotypic frequencies were also estimated and compared between the two groups (Table 3).

In addition, linkage disequilibrium values (D , D' , and r^2) between HLA-G alleles and the presence or absence of the 14 bp polymorphism were calculated for two-sequence haplotype frequencies (Table 4).

3.1. HLA-G alleles and the 14 bp polymorphism frequencies

The frequency of HLA-G*01:01A (allelic grouping that includes HLA-G*01:01:01 and HLA-G*01:01:06 alleles) in control women was 41.91%, whereas in patients it was 24.17% (Table 1). Thus, the rate of possession of HLA-G*01:01:A was significantly higher in the control women group ($p = 0.0034$; $p_c = 0.0306$; OR = 0.4417; 95% CI = 0.2576–0.7573). When couples were compared between patient and control groups, the HLA-G*01:04:03 allele was found significantly increased in RM patients ($p = 0.0017$; $p_c = 0.0153$; OR = 11.7672; 95% CI = 1.4951–92.6123) (Table 1). After p value correction, no significant differences were observed in the rate of possession of other HLA-G alleles.

In addition, after p value corrections, no statistically significant differences were found when allele and genotypic frequencies of the 14 bp polymorphism in exon 8 of the HLA-G gene were compared (Table 2).

3.2. HLA-G allele and 14 bp polymorphism haplotypic frequencies

Haplotypic frequencies and LD values were estimated in patient and control couples by using the Arlequin v. 3.0 software package (Table 3).

The frequency of HLA-G*01:01:08/+14bp haplotype was significantly increased in all groups of patients (couples, women, and men). In patient couples, the frequency of this haplotype was 14.17%, whereas in control couples it was 1.10% ($p < 0.0001$; $p_c < 0.0001$; OR = 14.7994; 95% CI = 4.4828–48.8583). In patient RM women, the rate of possession of HLA-G*01:01:08/+14bp haplotype was 10.83% and was absent in control women ($p < 0.0001$; $p_c <$

Table 1
Comparison of HLA-G allelic frequencies

	Alleles	Patients (2n = 240)		Controls (2n = 272)		p value	p _c value
		n	%	n	%		
Couples	HLA-G*01:01:03	2	0.83	12	4.41	0.0141	0.1269
	HLA-G*01:01:07	0	0.00	2	0.73	0.5010	1.0000
	HLA-G*01:01:08	57	23.75	43	15.81	0.0257	0.2313
	HLA-G*01:01:A	60	25.00	93	34.19	0.0261	0.2349
	HLA-G*01:03	24	10.00	21	7.72	0.4346	1.0000
	HLA-G*01:04:01	33	13.75	21	7.72	0.0306	0.2754
	HLA-G*01:04:03	9	3.75	0	0.00	0.0017	0.0153^a
	HLA-G*01:05N	6	2.50	8	2.94	0.7935	1.0000
HLA-G*01B	49	20.42	72	26.47			
	Alleles	Female patients (2n = 120)		Female controls (2n = 136)		p value	p _c value
		n	%	n	%		
Women	HLA-G*01:01:03	1	0.83	6	4.41	0.1250	1.0000
	HLA-G*01:01:08	23	19.17	17	12.5	0.1686	1.0000
	HLA-G*01:01:A	29	24.17	57	41.91	0.0034	0.0306^b
	HLA-G*01:03	16	13.33	12	8.82	0.3163	1.0000
	HLA-G*01:04:01	16	13.33	6	4.41	0.0135	0.1215
	HLA-G*01:04:03	5	4.17	0	0.00	0.0216	0.1944
	HLA-G*01:05N	5	4.17	6	4.41	1.0000	1.0000
	HLA-G*01B	25	20.83	32	23.52	0.6531	1.0000
	Alleles	Male patients (2n = 120)		Male controls (2n = 136)		p value	p _c value
		n	%	n	%		
Men	HLA-G*01:01:03	1	0.83	6	4.41	0.1250	1.0000
	HLA-G*01:01:07	0	0.00	2	1.47	0.5000	1.0000
	HLA-G*01:01:08	34	28.33	26	19.12	0.1037	0.9333
	HLA-G*01:01:A	31	25.83	36	26.47	1.0000	1.0000
	HLA-G*01:03	8	6.67	9	6.62	1.0000	1.0000
	HLA-G*01:04:01	17	14.17	15	11.03	0.4566	1.0000
	HLA-G*01:04:03	4	3.33	0	0.00	0.0470	0.4230
	HLA-G*01:05N	1	0.83	2	1.47	1.0000	1.0000
HLA-G*01B	24	20.00	40	29.41	0.0854	0.7686	

CI, confidence interval; p_c value, p value after correction by multiplying by the number of alleles compared; OR, odds ratio.

Values shown in boldface are statistically significantly different.

^aOR = 0.4417; 95% CI = 0.2576–0.7573.

^bOR = 11.7672; 95% CI = 1.4951–92.6123. HLA-G*01:01A = HLA-G*01:01:01 or HLA-G*01:01:06; HLA-G*01B = HLA-G*01:01:02 or HLA-G*01:06.

0.0001; OR = 17.7593; 95% CI = 2.2991–137.1831). This haplotype frequency in men groups was 17.50% for patients and 2.21% for controls ($p < 0.0001$; $p_c < 0.0001$; OR = 9.4040, 95% CI = 2.7285–32.4123).

HLA-G*01:04:01/–14bp haplotype frequency was also significantly higher in couples and men patients. For patient couples the rate of possession of this haplotype was 10.83% against 1.47% observed in control couples ($p < 0.0001$; $p_c < 0.0001$; OR = 8.1402, 95% CI = 2.7980–23.6823). Regarding the patient men group, HLA-G*01:04:01/–14bp frequency was also significantly higher being present in 10% of patient and absent in control men ($p < 0.0001$; $p_c < 0.0017$; OR = 31.4500, 95% CI = 1.8450–537.2334).

A protective effect against RM in women was associated with the HLA-G*01:01A/+14bp that was present in 19.12% of control women against 5.83% of RM patient women ($p < 0.0014$; $p_c < 0.0238$; OR = 0.2621, 95% CI = 0.1093–0.6287).

3.3. LD values between HLA-G alleles and 14 bp polymorphism

Linkage disequilibrium parameters (D , D' , and r^2) and their statistical significance were estimated by using Arlequin v. 3.0 software package and are shown in Table 4.

Our results show several significant differences between patient and controls LD values. In all categories compared (couples,

Table 2

Comparison of allelic and genotypic frequencies of presence/absence of 14 bp segment in the exon 8 of *HLA-G*

Allele frequencies							
	Allele	Patient couples (2n = 240)		Control couples (2n = 272)		p value	p _c value
		N	%	n	%		
Couples	+14	93	38.75	106	39.00	0.1449	0.2898
	-14	147	61.25	166	61.00		
	Allele	Female patients (2n = 120)		Female controls (2n = 136)		p value	p _c value
		n	%	n	%		
Women	+14	46	38.30	51	37.50	0.8863	1.0000
	-14	74	61.70	85	62.50		
	Allele	Male patients (2n = 120)		Male controls (2n = 136)		p value	p _c value
		n	%	n	%		
Men	+14	47	30.17	55	40.44	0.0687	0.1374
	-14	73	60.80	81	59.55		
Genotype frequencies							
	Genotype	Patient couples (n = 120)		Control couples (n = 136)		p value	p _c value
		n	%	n	%		
Couples	+14/+14	12	10.00	24	17.65	0.0412	0.1236
	+14/-14	69	57.50	62	44.85	0.0618	0.1854
	-14/-14	39	32.50	50	37.50	0.6979	1.0000
	Genotype	Female patients (n = 60)		Female controls (n = 68)		p value	p _c value
		n	%	n	%		
Women	+14/+14	6	10.00	13	19.12	0.3086	0.9258
	+14/-14	34	56.67	29	42.65	0.1562	0.4686
	-14/-14	20	33.33	26	38.23	0.4694	1.0000
	Genotype	Male patients (n = 60)		Male controls (n = 68)		p value	p _c value
		n	%	n	%		
Men	+14/+14	6	10.00	11	16.18	0.0676	0.2028
	+14/-14	35	58.33	33	48.53	0.2934	0.8802
	-14/-14	19	31.67	24	35.29	1.0000	1.0000

+14, presence of 14 bp segment in the exon 8 of *HLA-G* gene; -14, absence of 14 bp segment in the exon 8 of *HLA-G* gene.

women, and men) *HLA-G*01:01:08* allele and the presence of the 14 bp segment in exon 8 showed a positive association in patients in contrast to a strong negative association in controls (patient couples: $D' = 0.3412$, $p = 0.0002$ vs control couples: $D' = -0.8210$, $p > 0.0001$; patient women: $D' = 0.2950$, $p = 0.046$ vs control women: $D' = -1.0000$, $p = 0.0010$; patient men: $D' = 0.371$, $p = 0.0010$ vs control men: $D' = -0.715$, $p = 0.0010$).

A significant negative association was observed between the *HLA-G*01:04:01* allele and the presence of the 3' UTR 14 bp sequence in patient couples and women categories, whereas in controls a positive strong association was observed for these combinations in couples and men groups (patient couples: $D' = -0.4526$, $p = 0.0260$ vs control couples: $D' = 0.6879$, $p > 0.0001$; patient women: $D' = -0.674$, $p = 0.0220$; control men: $D' = 1.000$, $p > 0.0001$).

A strong positive association was found between the null allele, *HLA-G*01:05N* and the 14 bp segment in couples and women from the patient group, results that diverged from the strong negative association of these sequences observed in control couples (patient

Table 3

Comparison of *HLA-G* and 14 bp polymorphism haplotypic frequencies

	Haplotypes	Patients (2n = 240)		Controls (n = 272)		p value	p _c value
		n	%	n	%		
Couples	<i>HLA-G*01:01:03/+14</i>	0	0.00	3	1.10	0.501	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:03/-14</i>	2	0.83	9	3.31	0.0676	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:08/+14</i>	34	14.17	3	1.10	<0.0001	<0.0001 ^a
	<i>HLA-G*01:01:08/-14</i>	23	9.58	40	14.71	0.0815	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:01:A/+14</i>	18	7.50	40	14.71	0.0117	0.1989
	<i>HLA-G*01:01:01:A/-14</i>	42	17.50	53	19.49	0.5715	1.0000
	<i>HLA-G*01:03/+14</i>	10	4.17	9	3.31	0.6457	1.0000
	<i>HLA-G*01:03/-14</i>	14	5.83	12	4.41	0.5468	1.0000
	<i>HLA-G*01:04:01/+14</i>	7	2.92	17	6.25	0.0937	1.0000
	<i>HLA-G*01:04:01/-14</i>	26	10.83	4	1.47	<0.0001	<0.0001 ^b
	<i>HLA-G*01:04:03/+14</i>	2	0.83	0	0.00	0.2192	1.0000
	<i>HLA-G*01:04:03/-14</i>	7	2.92	0	0.00	0.0047	0.0799
	<i>HLA-G*01:05N/+14</i>	5	2.08	0	0.00	0.0219	0.3723
	<i>HLA-G*01:05N/-14</i>	1	0.42	8	2.94	0.0407	0.6919
	<i>HLA-G × 01B/+14</i>	17	7.08	32	11.76	0.0970	1.0000
<i>HLA-G*01B/-14</i>	32	13.33	40	14.71	0.7032	1.0000	
<i>HLA-G*01:01:07/+14</i>	0	0.00	2	0.74	0.5010	1.0000	
	Haplotypes	Female patients (2n = 120)		Female controls (2n = 136)		p value	p _c value
		n	%	N	%		
Women	<i>HLA-G*01:01:03/+14</i>	0	0.00	3	2.21	0.2500	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:03/-14</i>	1	0.83	3	2.21	0.6250	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:08/+14</i>	13	10.83	0	0.00	<0.0001	<0.0001 ^c
	<i>HLA-G*01:01:08/-14</i>	10	8.33	17	12.5	0.3132	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:01:A/+14</i>	7	5.83	26	19.12	0.0014	0.0238^d
	<i>HLA-G*01:01:01:A/-14</i>	22	18.33	31	22.79	0.4405	1.0000
	<i>HLA-G*01:03/+14</i>	9	7.50	6	4.41	0.4248	1.0000
	<i>HLA-G*01:03/-14</i>	7	5.83	6	4.41	0.7769	1.0000
	<i>HLA-G*01:04:01/+14</i>	2	1.67	2	1.47	1.0000	1.0000
	<i>HLA-G*01:04:01/-14</i>	14	11.67	4	2.94	0.0071	0.1207
	<i>HLA-G*01:04:03/+14</i>	1	0.83	0	0.00	0.4688	1.0000
	<i>HLA-G*01:04:03/-14</i>	4	3.33	0	0.00	0.0470	0.7990
	<i>HLA-G*01:05N/+14</i>	5	4.17	0	0.00	0.0216	0.3672
	<i>HLA-G*01:05N/-14</i>	0	0.00	6	4.41	0.0312	0.5304
	<i>HLA-G × 01B/+14</i>	9	7.50	14	10.29	0.5143	1.0000
<i>HLA-G*01B/-14</i>	16	13.33	18	13.24	1.0000	1.0000	
	Haplotypes	Male patients (n = 60)		Male controls (n = 68)		p value	p _c value
		n	%	n	%		
Men	<i>HLA-G*01:01:03/-14</i>	1	0.83	6	4.41	0.1250	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:07/+14</i>	0	0.00	2	1.47	0.5000	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:08/+14</i>	21	17.50	3	2.21	<0.0001	<0.0001 ^e
	<i>HLA-G*01:01:08/-14</i>	13	10.83	23	16.91	0.2074	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:01:A/+14</i>	11	9.17	14	10.29	0.8347	1.0000
	<i>HLA-G*01:01:01:A/-14</i>	20	16.67	22	16.18	1.0000	1.0000
	<i>HLA-G*01:03/+14</i>	1	0.83	3	2.21	0.6250	1.0000
	<i>HLA-G*01:03/-14</i>	7	5.83	6	4.41	0.7769	1.0000
	<i>HLA-G*01:04:01/+14</i>	5	4.17	15	11.03	0.0600	1.0000
	<i>HLA-G*01:04:01/-14</i>	12	10.00	0	0.00	0.0001	0.0017^f
	<i>HLA-G*01:04:03/+14</i>	1	0.83	0	0.00	0.4688	1.0000
	<i>HLA-G*01:04:03/-14</i>	3	2.50	0	0.00	0.1016	1.0000
	<i>HLA-G*01:05N/-14</i>	1	0.83	2	1.47	1.0000	1.0000
	<i>HLA-G × 01B/+14</i>	8	6.67	18	13.24	0.0986	1.0000
	<i>HLA-G*01B/-14</i>	16	13.33	22	16.18	0.5986	1.0000

*HLA-G*01:01A* = *HLA-G*01:01:01* or *HLA-G*01:01:06*; *HLA-G*01B* = *HLA-G*01:01:02* or *HLA-G*01:06*.

Values shown in boldface are statistically significantly different.

^aOR = 14.7994; 95% CI = 4.4828–48.8583.

^bOR = 8.1402; 95% CI = 2.7980–23.6823.

^cOR = 17.7593; 95% CI = 2.2991–137.1831

^dOR = 0.2621; 95% CI = 0.1093–0.6287.

^eOR = 9.4040; 95% CI = 2.7285–32.4123.

^fOR = 31.4500; 95% CI = 1.8450–537.2334.

Table 4

Linkage disequilibrium parameters for pairs of HLA-G alleles and presence or absence of 3' UTR 14 bp segment in patient and control groups

	Couples				Women				Men			
	Patient		Control		Patient		Control		Patient		Control	
	-14	+14	-14	+14	+14	-14	+14	-14	+14	+14	-14	+14
HLA-G*01:01A												
D	0.0219	-0.0219	-0.0138	0.0138	0.034	-0.034	-0.034	0.034	-0.010	0.004	-0.004	0.0219
D'	0.2258	-0.2258	-0.0662	0.0662	0.370	-0.370	-0.156	0.156	-0.094	0.038	-0.038	0.2258
R ²	0.0108		0.0036		0.027		0.020		0.000		0.0108	
h	0.170	0.0750	0.1948	0.1470	0.1833	0.0583	0.2279	0.1911	0.0916	0.1617	0.1029	0.1750
p	0.1082		0.3247		0.071		0.097		0.825		0.1082	
HLA-G*01B												
D	0.0083	-0.0083	-0.0145	0.0145	0.005	-0.005	-0.015	0.015	-0.012	-0.013	0.013	0.0083
D'	0.1047	-0.1047	-0.0897	0.0897	0.061	-0.061	-0.100	0.100	-0.149	-0.077	0.077	0.1047
R ²	0.0018		0.0045		0.001		0.005		0.004		0.0018	
h	0.1333	0.0708	0.1470	0.1176	0.1333	0.0750	0.1323	0.1029	0.0666	0.1617	0.1323	0.1333
p	0.5136	0.2667	0.787	0.404	0.484	0.5136	0.2667	0.787	0.404	0.484	0.5136	0.2667
HLA-G*01:01:03												
D	0.0032	-0.0032	0.0062	-0.0062	0.003	-0.003	-0.006	0.006	-0.003	0.018	-0.018	0.0032
D'	1.0000	-1.0000	0.3585	-0.3585	1.000	-1.000	-0.200	0.200	-1.000	1.000	-1.000	1.0000
R ²	0.0053		0.0038		0.005		0.003		0.031		0.0053	
h	0.0083	0	0.0330	0.0110	0.0083	0	0.0220	0.0220	0	0.0441	0	0.0083
p	0.2587		0.3101		0.429		0.518		0.039		0.2587	
HLA-G*01:01:07												
D	-	-	-0.0045	0.0045	-	-	-	-	-	-0.009	0.009	-
D'	-	-	-1.0000	1.0000	-	-	-	-	-	-1.000	1.000	-
R ²	-	-	-	-	0.0116	-	-	-	-	-	-	-
h	-	-	0	0.0073	-	-	-	-	-	0	0.0147	-
p	-	-	-	-	0.0757	-	-	-	-	-	-	-
HLA-G*01:01:08												
D	-0.0496	0.0496	0.0506	-0.0506	-0.035	0.035	0.047	-0.047	0.064	0.055	-0.055	-0.0496
D'	-0.3412	0.3412	0.8210	-0.8210	-0.295	0.295	1.000	-1.000	0.371	0.715	-0.715	-0.3412
R ²	0.0573		0.0808		0.033		0.086		0.022		0.0573	
h	0.1416	0.0958	0.1470	0.0110	0.0833	0.1083	0.1250	0	0.1750	0.1691	0.0220	0.1416
p	0.0002	0.0000	0.046		0.001	0.001	0.0002	0.0000	0.046	0.001	0.001	0.0002
	Couples				Women				Men			
	Patient		Control		Patient		Control		Control		Patient	
	-14	+14	-14	+14	+14	-14	+14	-14	+14	+14	-14	+14
HLA-G*01:03												
D	0.0032	-0.0032	0.0062	-0.0062	-0.024	0.024	-0.011	0.011	-0.018	0.005	-0.005	0.0032
D'	-0.0476	0.0476	-0.0637	0.0637	-0.291	0.291	-0.200	0.200	-0.681	0.176	-0.176	-0.0476
r ²	0.0004		0.0005		0.021		0.006		0.001		0.0004	
h	0.0583	0.0416	0.0441	0.0330	0.0583	0.0750	0.0441	0.0441	0.0083	0.0441	0.0220	0.0583
p	0.7572		0.3101		0.113		0.349		0.653		0.7572	
HLA-G*01:04:01												
D	0.0241	-0.0241	-0.0324	0.0324	0.034	-0.034	0.002	-0.002	-0.014	-0.066	0.066	0.0241
D'	0.4526	-0.4526	-0.6879	0.6879	0.674	-0.674	0.111	-0.111	-0.249	-1.000	1.000	0.4526
r ²	0.0207		0.0620		0.043		0.000		0.183		0.0207	
h	0.1083	0.0291	0.0147	0.0625	0.1166	0.0166	0.0294	0.0147	0.0416	0	0.1102	0.1083
p	0.0260	0.0000	0.022	0.829	0.000	0.0260	0.0000	0.022	0.829	0.000	0.0260	0.0000
HLA-G*01:04:03												
D	0.0062	-0.0062	-	-	0.008	-0.008	-	-	-0.005	-	-	0.0062
D'	0.4265	-0.4265	-	-	0.478	-0.478	-	-	-0.362	-	-	0.4265
r ²	0.0045		-	-	-		0.006		-		-	
h	0.0291	0.0083	-	-	0.0333	0.0083	-	-	0.0083	-	-	0.0291
p	0.2995		-	-	-		0.389		-		-	
HLA-G*01:05N												
D	-0.0111	0.0111	0.0115	-0.0115	-0.026	0.026	0.017	-0.017	-0.003	0.006	-0.006	-0.0111
D'	-0.7279	0.7279	1.0000	-1.0000	-1.000	1.000	1.000	-1.000	-1.000	1.000	-1.000	-0.7279
r ²	0.0215		0.0194		0.070		0.028		0.010		0.0215	
h	0.0041	0.0208	0.0294	0	0	0.0416	0.0441	0	0	0.0147	0	0.0041
p	0.0232		0.0218		0.004		0.052		0.240		0.0232	

d, Basic measure of linkage disequilibrium (LD); D', standardized LD value; r², square of correlation coefficient; h, heterozygosity. Values shown in boldface are statistically significantly different.

couples: D' = 0.7279, p = 0.0232 vs control couples: D' = -1.0000, p > 0.0218; patient women: D' = 1.0000, p = 0.0004).

A significant negative association was found for HLA-G*01:01:03 allele and the 14 bp segment in the control men group (D' = -1.0000, p = 0.039).

In all instances, positive association between a given allele and presence of the 14 bp segment implied a negative association between this allele and absence of the 14 bp sequence and vice versa.

4. Discussion

For more than 1 decade the non-classical HLA class I molecule HLA-G is well known as an immune regulator towards tolerance and allograft acceptance. Elevated HLA-G expression (often concomitantly with a downregulation of the expression of classic HLA class I molecules) is implicated in mechanisms to evade immune surveillance used by several viruses, such as influenza virus A (IAV), human immunodeficiency virus, cytomegalovirus, herpes virus

simplex (HVS-1), and rabies virus (RABV) [45–48]. It is also involved in immune escape of tumors and it is associated with preferable outcome of allogenic transplantation [49,50]. Moreover, sHLA-G expression is dramatically reduced in women with RM or preeclampsia, and it is significantly elevated in pregnant women when compared with non-pregnant women [51,52]. In addition to the allelic and 14 bp polymorphisms, other important variations in 3'UTR and 5'UTR of the HLA-G gene are also associated with RM and preeclampsia. Furthermore, these polymorphisms demonstrated exert a significant effect in the HLA-G function, as they may influence the expression of sHLA-G [53–57]. These data also indicate that HLA-G molecules play a critical role in pregnancy outcome.

In the present study, the effect of the HLA-G gene polymorphism in recurrent miscarriage was analyzed while considering allelic variations, the presence or absence of the 14 bp segment at the 3' UTR region, the haplotype distribution, and the linkage disequilibrium patterns between these two sequences.

Regarding allelic frequencies, our data show that women carrying HLA-G*01:01A (allelic grouping that includes HLA-G*01:01:01 and HLA-G*01:01:06 alleles that are only distinguishable by differences in exon 4 have approximately 2.26 times lesser probability to develop RM [$p_c = 0.0306$]) (Table 1). It is important to point out that HLA-G*01:01:01 is the most frequent allele in the Brazilian population, with an allelic frequency that exceeds 29% and HLA-G*01:01:06 allelic frequency of 1%, indicating that the HLA-G*01:01A group could be almost totally represented by HLA-G*01:01:01 [58,59].

HLA-G*01:04:03 allele was significantly increased in RM patient couples ($p_c = 0.0153$) (Table 1). Its OR value indicates that couples carrying this allelic variant present nearly 12 times increased probability to be affected. A similar association was seen by Aldrich et al. that described an increased frequency of HLA-G*01:04 in RM couples [60].

The 14 bp polymorphism (presence/absence) present in exon 8 of HLA-G at 3'UTR region was also investigated, whereas the presence of the 14 bp sequence seems to be associated with distinct patterns of mRNA expression and stability. When the allelic and genotypic frequencies of the 14 bp polymorphism were compared, no statistically significant differences were observed after multiple comparisons correction.

Given that mRNA isoforms generated by alleles with deletion of this 14 bp region have the 92 nucleotide sequence and appear to be less stable, haplotypic frequencies between the allele coding region and the 3' UTR were analyzed and compared between patient and controls. The LD values between this 2 HLA-G gene sites were also estimated. HLA-G*01:01:08/+14bp haplotype frequency was significantly increased in all patient groups (women, men, and consequently couples), with p_c -values < 0.0001 in all three groups. The elevated OR values suggest that this haplotype is an important RM marker in both genders; further studies are needed to elucidate the mechanism underlying this observation (Table 3).

In couples and in men from the patient group, HLA-G*01:04:01/-14 bp haplotypic frequency was significantly increased ($p_c < 0.0001$ and 0.0017, respectively). The OR values showed elevated relative risks of having this haplotype, particularly for males.

In female groups, a protective effect against RM was seen for the HLA-G*01:01A/+14bp, as its frequency was higher in controls and the difference was statistically significant ($p_c = 0.0238$). The OR value indicates that women carrying this haplotypes have about four times lesser probability to develop RM.

LD between HLA-G alleles and the 14 bp sequence at the exon 8 at 3' UTR was also analyzed and compared between patient and control groups (Table 4). Interestingly, when p values corroborated the existence of LD for the same allele in patients and in controls, the LD patterns were inverted in each group. Regarding couples,

female groups, and male groups, HLA-G*01:01:08 allele and the presence of the 14 bp segment in exon 8 showed a positive association in patients contrasting with a strong negative association in controls. Similar differences in LD patterns were seen in both couple groups for the HLA-G*01:05N and the +14bp segment, with positive LD in patients and a total repulsion in controls. The HLA-G*01:04:01 and the +14bp allele showed an opposite LD constitution, showing a negative association in patients and a positive 1 in controls, both in couples groups. These data indicate that some HLA-G proteins could reach an enhanced role in the maternal–fetal tolerance depending on its 3' UTR 14 bp polymorphism. These observations are supported by the haplotypes comparison (Table 3) where the HLA-G*01:01:08/+14bp and the HLA-G*01:04:01/-14bp haplotypes were strongly associated with RM and no statistically significant difference was found for this alleles when compared only by its own allele or by its 3' UTR 14 bp polymorphism frequencies (Table 1 and Table 2, respectively).

Our results show that HLA-G*01:01:08 and HLA-G*01:05N alleles present a positive association with the 3' Utr (+14bp) segment in RM patients and a strong negative association with fertile controls. On the other hand, HLA-G*01:04:01 presents a negative association with the 14 bp segment in patients and a positive association in controls. That observation led us to hypothesize that the physiological fitness of the HLA-G*01:01:08 and HLA-G*01:05N alleles decrease when the 14 bp segment is present at the exon 8 of these alleles. Nevertheless, HLA-G*01:04:01 appear to have a decreased fitness when associated with the deletion of the 14 bp segment at the 3' UTR.

Therefore, we suggest that some alleles achieve their complete biologic functions when expressed as a determined isoform, such as soluble or membrane proteins or when their mRNA presents a more stable form. As a result, alleles are normally associated (observed by positive D' values in controls; Table 4) with regulatory regions that could be favorable for the expression of functional isoforms. In contrast, a repulsion state was observed by negative D' values in controls (Table 4) with regulatory regions that could affect, in a negative manner, the physiologic functionality of such specific allele.

The present study suggests that HLA-G alleles may play a major role throughout pregnancy, and that the presence or absence of the 14 bp segment at the 3' UTR regulatory region combined with certain alleles influences the physiologic function of the derived HLA-G protein. Therefore, determined haplotypic combinations of HLA-G alleles and presence or absence of the 14 bp segment could predispose women to RM. These findings also may open new doors in the understanding of the association of HLA-G alleles and 3'UTR 14 bp haplotypes with several disorders, such as susceptibility to virus infection or tumors progression, as evidence shows that 14 bp polymorphism at 3' UTR of could be a genetic risk factor for susceptibility to HTLV-1, human CMV, vertical transmission of HIV, and the development of cervical cancer after human papillomavirus infection [61–64].

Finally, deeper analyses are necessary of the HLA-G gene/molecule functionality as further studies, including analysis of the genetic polymorphism and molecular interaction between HLA-G ligands with its receptors, to better understand their role in pregnancy and miscarriage.

Acknowledgments

This work was supported by the agreement between FUNPAR-LIGH and by CAPES. We are grateful to the patients and control families. The authors thank professors, Juarez Gabardo, Iglénir João Cavalli, and Salmo Raskin for comments and suggestions; LIGH staff for technical support; and Hadriano M. Lacerda for the assistance with the English translation and editorial work.

References

- [1] Coulam CB, Clark DA, Beer AE, Kutteh WH, Silver R, Kwak J, Stephenson M. Current clinical options for diagnosis and treatment of recurrent spontaneous abortion. Clinical Guidelines Recommendation Committee for Diagnosis and Treatment of Recurrent Spontaneous Abortion. *Am J Reprod Immunol* 1997; 38:57–74.
- [2] Rai R, Clifford K, Regan L. The modern preventative treatment of recurrent miscarriage. *Br J Obstet Gynaecol* 1996;103:106–10.
- [3] Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 2008;89:1603.
- [4] Stirrat GM. Recurrent miscarriage. *Lancet* 1990;336:673–5.
- [5] Christiansen OB, et al. Evidence-based investigations and treatments of recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 2005;83:821–39.
- [6] Kiwi R. Recurrent pregnancy loss: Evaluation and discussion of the causes and their management. *Cleve Clin J Med* 2006;73:913–21.
- [7] Ellis SA, Sargent IL, Redman CW, McMichael AJ. Evidence for a novel HLA antigen found on human extravillous trophoblast and a choriocarcinoma cell line. *Immunology* 1986;59:595–601.
- [8] Bainbridge D, Ellis S, Le Bouteiller P, Sargent I. HLA-G remains a mystery. *Trends Immunol* 2001;22:548–52.
- [9] Apps R, Gardner L, Moffett A. A critical look at HLA-G. *Trends Immunol* 2008; 29:313–21.
- [10] King A, et al. Evidence for the expression of HLA-C class I mRNA and protein by human first trimester trophoblast. *J Immunol* 1996;156:2068–76.
- [11] Kovats S, Main EK, Librach C, Stubblebine M, Fisher SJ, et al. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science* 1990;248:220–3.
- [12] Wei XH, Orr HT. Differential expression of HLA-E, HLA-F, and HLA-G transcripts in human tissue. *Hum Immunol* 1990;29:131–42.
- [13] Pfeiffer KA, Fimmers R, Engels G, van der Ven H, van der Ven K. The HLA-G genotype is potentially associated with idiopathic recurrent spontaneous abortion. *Mol Hum Reprod* 2001;7:373–8.
- [14] Bainbridge DR, Ellis SA, Sargent IL. HLA-G suppresses proliferation of CD4(+) T-lymphocytes. *J Reprod Immunol* 2000;48:17–26.
- [15] Riteau B, Menier C, Khalil-Daher I, Sedlik C, Dausset J, Rouas-Freiss N, et al. HLA-G inhibits the allogeneic proliferative response. *J Reprod Immunol* 1999; 43:203–11.
- [16] Fournel S, et al. Cutting edge: Soluble HLA-G1 triggers CD95/CD95 ligand-mediated apoptosis in activated CD8+ cells by interacting with CD8. *J Immunol* 2000;1950:164:6100–4.
- [17] Naji A, Durrbach A, Carosella ED, Rouas-Freiss N. Soluble HLA-G and HLA-G1 expressing antigen-presenting cells inhibit T-cell alloproliferation through ILT-2/ILT-4/FasL-mediated pathways. *Hum Immunol* 2007;68:233–9.
- [18] Le Gal FA, et al. HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol* 1991;11:1351–6.
- [19] Rouas-Freiss N, Paul P, Dausset J, Carosella ED. HLA-G promotes immune tolerance. *J Biol Regul Homeost Agents* 2000;14:93–8.
- [20] Maejima M, Fujii T, Kozuma S, Okai T, Shibata Y, et al. Presence of HLA-G-expressing cells modulates the ability of peripheral blood mononuclear cells to release cytokines. *Am J Reprod Immunol* 1989;38:79–82.
- [21] Allan DS, et al. Tetrameric complexes of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G bind to peripheral blood myelomonocytic cells. *J Exp Med* 1999;189:1149–56.
- [22] Poehlmann TG, et al. Inhibition of term decidual NK cell cytotoxicity by soluble HLA-G1. *Am J Reprod Immunol* 2006;1989:56:275–85.
- [23] Yu Y, Wang Y, Feng M. Human leukocyte antigen-G1 inhibits natural killer cytotoxicity through blocking the activating signal transduction pathway and formation of activating immunologic synapse. *Hum Immunol* 2008;69:16–23.
- [24] Kanai T, et al. Human leukocyte antigen-G-expressing cells differentially modulate the release of cytokines from mononuclear cells present in the decidua versus peripheral blood. *Am J Reprod Immunol* 1989;45:94–9.
- [25] Paul P, Cabestre FA, Ibrahim EC, Lefebvre S, Khalil-Daher I, Vazeux G, et al. Identification of HLA-G7 as a new splice variant of the HLA-G mRNA and expression of soluble HLA-G5, -G6, and -G7 transcripts in human transfected cells. *Hum Immunol* 2000;61:1138–49.
- [26] Moreau P, Carosella E, Teyssier M, Prost S, Gluckman E, Dausset J, et al. Soluble HLA-G molecule. An alternatively spliced HLA-G mRNA form candidate to encode it in peripheral blood mononuclear cells and human trophoblasts. *Hum Immunol* 1995;43:231–6.
- [27] Moreau P, Dausset J, Carosella ED, e N, Rouas-Freiss. Viewpoint on the functionality of the human leukocyte antigen-G null allele at the fetal-maternal interface. *Biol Reprod* 2002;67:1375–8.
- [28] Park GM, Lee S, Park B, Kim E, Shin J, Cho K, et al. Soluble HLA-G generated by proteolytic shedding inhibits NK-mediated cell lysis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;313:606–11.
- [29] Harrison GA, Humphrey KE, Jakobsen IB, Cooper DW. A 14 bp deletion polymorphism in the HLA-G gene. *Hum Mol Genet* 1993;2:2200.
- [30] Hviid TVF, Rizzo R, Melchiorri L, Stignani M, Baricordi OR. Polymorphism in the 5' upstream regulatory and 3' untranslated regions of the HLA-G gene in relation to soluble HLA-G and IL-10 expression. *Hum Immunol* 2006;67: 53–62.
- [31] Rousseau P, Le Discorde M, Mouillot G, Marcou C, Carosella ED, et al. The 14 bp deletion-insertion polymorphism in the 3' UTR region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. *Hum Immunol* 2003;64:1005–10.
- [32] Tripathi P, Abbas A, Naik S, Agrawal S. Role of 14 bp deletion in the HLA-G gene in the maintenance of pregnancy. *Tissue Antigens* 2004;64:706–10.
- [33] Hviid TVF, Hylenius S, Rorbye C, Nielsen LG. HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels. *Immunogenetics* 2003;55:63–79.
- [34] Chen X, Yan W, Lin A, Xu H, Zhang J, Wang X. The 14 bp deletion polymorphisms in HLA-G gene play an important role in the expression of soluble HLA-G in plasma. *Tissue Antigens* 2008;72:335–41.
- [35] Rebmann V, van der Ven K, Pässler M, Pfeiffer K, Krebs D, et al. Association of soluble HLA-G plasma levels with HLA-G alleles. *Tissue Antigens* 2001;57: 15–21.
- [36] Lahiri DK, Nurnberger JJ. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991;19:5444.
- [37] Hviid TV, Hylenius S, Hoegh AM, Kruse C, Christiansen OB. HLA-G polymorphisms in couples with recurrent spontaneous abortions. *Tissue Antigens*;60: 122–32. Ago.;2002.
- [38] Sveigaard A, Jersild C, Nielsen LS, WF, Bodmer WF. HL-A antigens and disease. Statistical and genetical considerations. *Tissue Antigens* 1974;4:95–105.
- [39] Woolf B. On estimating the relation between blood group and disease. *Ann Hum Genet* 1955;19:251–3.
- [40] Sveigaard A, LP, Ryder LP. HLA and disease associations: Detecting the strongest association. *Tissue Antigens* 1994;43:18–27.
- [41] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 2005;1: 47–50.
- [42] Lewontin RC. The interaction of selection and linkage. I. General considerations; heterotic models. *Genetics* 1964;49:49–67.
- [43] Hill WG, Robertson A. Linkage disequilibrium in finite populations. *Theoret Appl Genet* 1968;38:226–31.
- [44] Franklin I, Lewontin RC. Is the gene the unit of selection?. *Genetics* 1970;65: 707–34.
- [45] LeBouder F, Khoufache K, Menier C, Mandouri Y, Keffous M, Lejal N, et al. Immunosuppressive HLA-G molecule is upregulated in alveolar epithelial cells after influenza A virus infection. *Hum Immunol* 2009;70:1016–9.
- [46] Lozano JM, González R, Luque J, Frias M, Rivero A, et al. CD8(+)-HLA-G(+) regulatory T cells are expanded in HIV-1-infected patients. *Viral Immunol* 2009;22:463–5.
- [47] Yan W, Lin A, Chen B, Chen S. Induction of both membrane-bound and soluble HLA-G expression in active human cytomegalovirus infection. *J Infect Dis* 2009;200:820–6.
- [48] Mégret F, et al. Modulation of HLA-G and HLA-E expression in human neuronal cells after rabies virus or herpes virus simplex type 1 infections. *Hum Immunol* 2007;68:294–302.
- [49] Urošević M, Trojan A, Dummer R. HLA-G and its KIR ligands in cancer—another enigma yet to be solved? *J Pathol* 2002;196:252–3.
- [50] Brugièrè O, et al. Immunohistochemical study of HLA-G expression in lung transplant recipients. *Am J Transplant* 2009;9:1427–38.
- [51] Carosella ED, Moreau P, Aractingi S, Rouas-Freiss N. HLA-G: A shield against inflammatory aggression. *Trends Immunol* 2001;22:553–5.
- [52] Hunt JS, Jadhav L, Chu W, Geraghty DE, Ober C. Soluble HLA-G circulates in maternal blood during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:682–8.
- [53] Ober C, Aldrich CL, Chervoneva I, Billstrand C, Rahimov F, Gray HL, et al. Variation in the HLA-G promoter region influences miscarriage rates. *Am J Hum Genet* 2003;72:1425–35.
- [54] Larsen MH, Hylenius S, Andersen AN, Hviid TVF. The 3'-untranslated region of the HLA-G gene in relation to pre-eclampsia: Revisited. *Tissue Antigens* 2010; 75:253–61.
- [55] Castelli EC, Mendes-Junior CT, Deghaide NH, de Albuquerque RS, Muniz YC, Simões RT, et al. The genetic structure of 3' untranslated region of the HLA-G gene: Polymorphisms and haplotypes. *Genes Immun* 2010;11:134–41.
- [56] Yie S, Li L, Xiao R, Librach CL. A single base-pair mutation in the 3'-untranslated region of HLA-G mRNA is associated with pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 2008;14:649–53.
- [57] Hviid TVF, Rizzo R, Christiansen OB, Melchiorri L, Lindhard A, et al. HLA-G and IL-10 in serum in relation to HLA-G genotype and polymorphisms. *Immunogenetics* 2004;56:135–41.
- [58] Pirri A, Contieri FC, Benvenuto R, Bicalho MDG. A study of HLA-G polymorphism and linkage disequilibrium in renal transplant patients and their donors. *Transpl Immunol* 2009;20:143–9.
- [59] Middleton D, Menchaca L, Rood H, Komerofsky R. New allele frequency database: <http://www.allelefrequency.net>. *Tissue Antigens* 2003;61:403–7.
- [60] Aldrich CL, Stephenson MD, Karrison T, Odem RR, Branch DW, Scott JR, et al. HLA-G genotypes and pregnancy outcome in couples with unexplained recurrent miscarriage. *Mol Hum Reprod* 2001;7:1167–72.
- [61] Haddad R, Cilião Alves DC, Rocha-Junior MC, Azevedo R, do Socorro Pombo-de-Oliveira M, Takayanagui OM, et al. HLA-G 14 bp insertion/deletion polymorphism is a risk factor for HTLV-1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2011; 27:283–8.
- [62] Zheng X, Zhu F, Shi W, Lin A, Yan W. The HLA-G 14 bp insertion/deletion polymorphism is a putative susceptible factor for active human cytomegalovirus infection in children. *Tissue Antigens* 2009;74:317–21.
- [63] Simões RT, et al. HLA-G polymorphisms in women with squamous intraepithelial lesions harboring human papillomavirus. *Mod Pathol* 2009;22:1075–82.
- [64] Fabris A, et al. Association between HLA-G 3' UTR 14 bp polymorphism and HIV vertical transmission in Brazilian children. *AIDS* 2009;23:177–82.