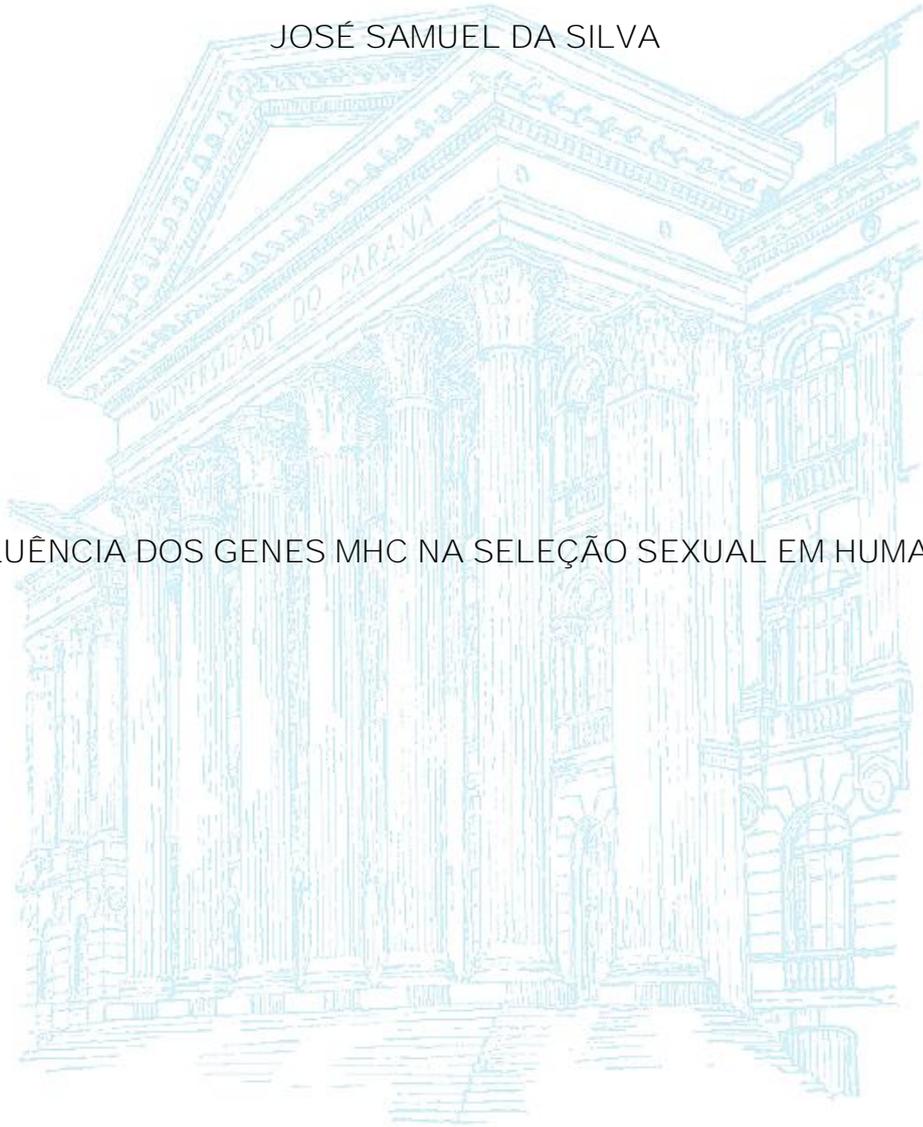


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOSÉ SAMUEL DA SILVA

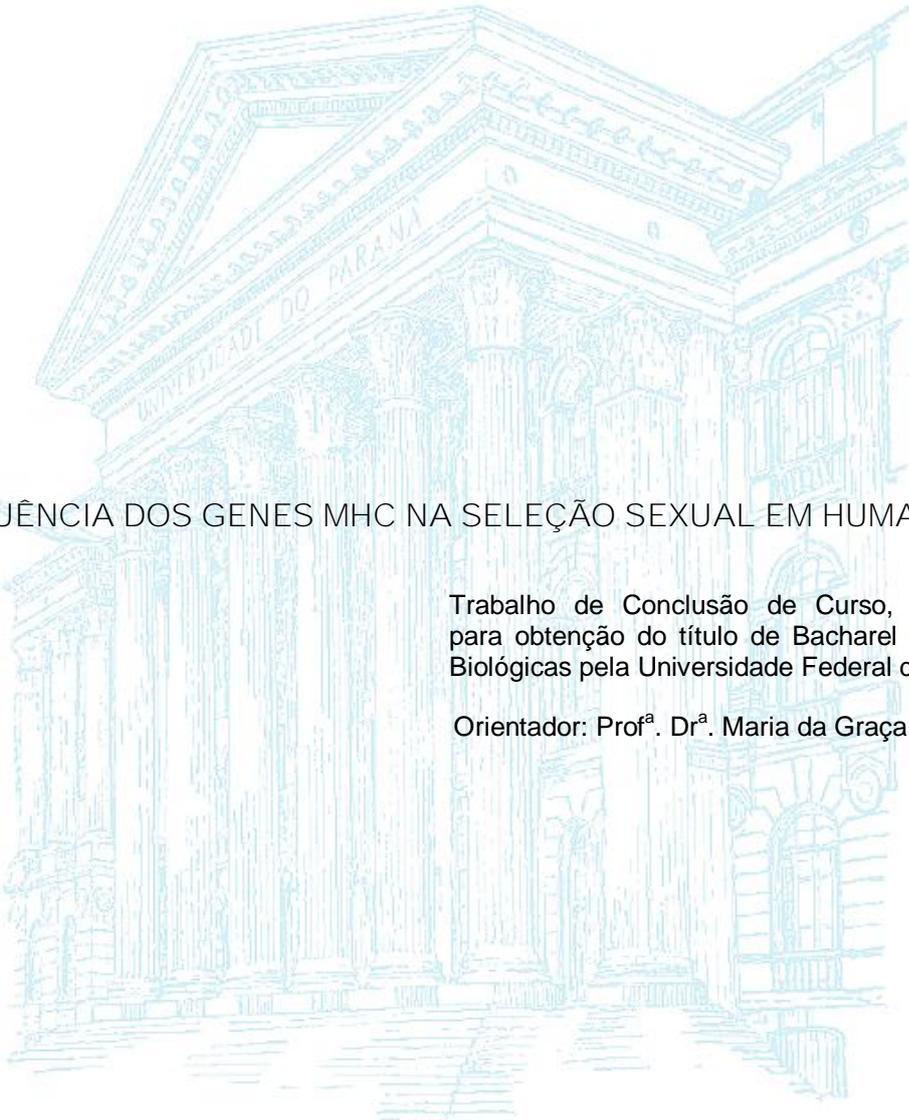
INFLUÊNCIA DOS GENES MHC NA SELEÇÃO SEXUAL EM HUMANOS



CURITIBA

2009

JOSÉ SAMUEL DA SILVA



INFLUÊNCIA DOS GENES MHC NA SELEÇÃO SEXUAL EM HUMANOS

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Paraná.

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

CURITIBA

2009

*Nothing in Biology Makes Sense Except in the
Light of Evolution*

Theodosius Dobzhansky, 1964.

Aos meus pais, irmãos e amigos.
Em especial à Renata, companheira para
todas as horas, Gabriel e Jovani, grandes
amigos dentro e fora da universidade.

.

AGRADECIMENTOS

À professora Maria da Graça Bicalho, pela orientação, apoio, incentivo e principalmente pela confiança.

Aos professores João Carlos Magalhães e Juarez Gabardo pelas sugestões e apoio no desenvolvimento do trabalho.

Ao Waldir Antônio da Silva pela ajuda no uso do banco de dados.

À todo equipe LIGH, pois apartir do trabalho de cada um deles que foi possível a realização deste trabalho.

Ao convênio FUNPAR-LIGH pelo apoio financeiro na realização e apresentação deste.

À todos os professores que participaram na minha formação.

Aos amigos e colegas da Universidade.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS.....	11
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
4. METODOLOGIA.....	18
4.1 Composição amostral dos Casais Reais.....	18
4.2 Composição amostral dos <i>Casais Virtuais</i>	18
4.3 Delineamento dos experimentos.....	19
4.3.1 Padrão de formação de casais e seleção do parceiro MHC dissimilar..	19
4.3.2 Imunogenicidade e média das diferenças estruturais HLA dentro e entre casais.....	20
4.3.3 Seleção pós-copulatória MHC dependente.....	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5.1 Padrão de formação de casais e seleção do parceiro MHC dissimilar.....	25
5.2 Imunogenicidade e média das diferenças estruturais HLA dentro e entre casais.....	29
5.3 Seleção pós-copulatória MHC dependente.....	32
6. CONCLUSÃO.....	35
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
8. ANEXOS.....	41
8.1 Anexo 1.....	41
8.2 Anexo 2.....	42
8.3 Anexo 3.....	44

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

EXEMPLO 1 – DADOS DE TIPAGEM HLA, COM AS DIFERENÇAS DENTRO DO CASAL.....	19
EXEMPLO 2 – IDENTIFICAÇÃO DE HAPLÓTIPOS.....	23
EXEMPLO 3 – GENÓTIPOS ESPERADOS.....	23
GRÁFICO 1 – DIFERENÇAS MHC DE CLASSE I E II.....	25
TABELA 1 – ESTATÍSTICA DESCRITIVA DA ANÁLISE DAS DIFERENÇAS HLA PARA OS GENES MHC DE CLASSE I E II.....	26
GRÁFICO 2 – DIFERENÇAS MHC DE CLASSE I.....	26
TABELA 2 – TABELA 1 – ESTATÍSTICA DESCRITIVA DA ANÁLISE DAS DIFERENÇAS HLA PARA OS GENES MHC DE CLASSE I.....	26
QUADRO 1 – TESTE T, CLASSE I E II.....	27
QUADRO 2 – TESTE T, CLASSE I.....	27
GRÁFICO 3 – DIFERENÇAS DE <i>EPLETS</i> QUALITATIVOS.....	29
TABELA 3 – RESULTADOS DA ANÁLISE QUALITATIVA.....	30
GRÁFICO 4 – DIFERENÇAS DE <i>EPLETS</i> QUANTITATIVOS.....	30
TABELA 4 – RESULTADOS DA ANÁLISE QUANTITATIVA.....	30
QUADRO 3 – TESTES T, DELINEAMENTOS QUALITATIVO E QUANTITATIVO...31	
QUADRO 4 – RESULTADOS DO TESTE DO QUI-QUADRADO PARA OS DIFERENTES GRUPOS.....	33
FIGURA I – ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DE MOLÉCULAS MHC DE CLASSE I.....	43
ESQUEMA I – REPRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NO HLA MATCHMAKER.....	43

RESUMO

Estudos anteriores sugerem que o fenótipo HLA pode influenciar na escolha de parceiros sexuais humanos, assim como os fenótipos do sistema H2 determinam a escolha preferencial por parceiros em camundongos. Nestes roedores, moléculas voláteis, direta ou indiretamente resultantes da degradação dos antígenos MHC, conferem ao animal um odortipo característico que é reconhecido pelo possível parceiro. Os animais tendem a evitar acasalamentos com outros de odortipo MHC semelhante, uma evidência da similaridade MHC entre ambos. Esta tendência além de favorecer a heterozigose reduz a taxa de endogamia nas populações. A hipótese explicativa é que, a união entre tipos geneticamente diferentes resultaria numa condição de heterozigose também nos loci MHC o que maximizaria a função apresentadora das moléculas codificadas por esses genes, conferindo à prole heterozigota uma maior capacidade de apresentação de antígenos, logo um melhor desempenho na sua resposta imune (maior valor adaptativo). As evidências em humanos são indiretas e foram obtidas experimentalmente utilizando conjuntos de voluntários que procuravam identificar o odor de sua preferência em roupas ou sachês utilizados por indivíduos de sexo oposto, cuja identidade lhes era desconhecida. Foi possível demonstrar que, nestas circunstâncias as mulheres preferem o odor relacionado a tipos HLA diferentes de seu próprio tipo. Outro campo de investigação são as interações materno-fetais, ou relacionadas a formação dos embriões, onde os genes HLA também podem estar envolvidos com processos relacionados ao sucesso da reprodução. No presente trabalho, o objetivo foi a busca de novas evidências sobre a influência do MHC humano, ou seja, o HLA na formação de casais, e também em processos pós-copulatórios de seleção MHC-dependente. Para tanto foi delineado um estudo usando-se como amostra casais e famílias do Estado do Paraná. Todos os indivíduos presentes no estudo, possuem tipagem genética para os locos HLA-A, HLA-B e HLA-DR e os resultados estão arquivados nos registros do Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH), do Departamento de Genética da UFPR. Os resultados do presente trabalho foram sugestivos de que os casais se estruturam com menos semelhanças HLA do que seria de se esperar pelo acaso, corroborando a hipótese de que os antígenos HLA, especialmente os de classe I, possam influenciar na seleção de parceiros sexuais e, mais ainda, na formação de casamentos humanos. No entanto não foi encontrado evidências de seleção pós-copulatória MHC-dependente. Este trabalho apresentou uma abordagem original, abrindo novas perspectivas de pesquisa e de discussões, pois uma das metodologias usadas baseia-se numa ferramenta utilizada na prática clínica, sendo usada agora também para o estudo de evolução.

ABSTRACT

Many studies suggested that the HLA phenotype can influence on mate choice in humans, like the phenotypes of H2 system influence dissimilar mates in mouse. In this rodents, volatile molecules, directly or indirectly resulting from MHC antigens degradation, provides the animal a characteristics odortype that is recognize by possible mates. The animals tend to avoid mates with similar MHC odortype, an evidence of MHC genotype similarities between then. These tendency in addition of increasing the heterozygosis, decrease the inbreeding on natural populations. The explanatory hypothesis suggests that the union between genetically different individuals results in a heterozygosis condition for the MHC genes, this situation maximizes the binding function of these molecules, conferring the heterozygote offspring a better capacity to recognize antigenic peptides, consequently a better immunity response (increased fitness). The evidences in humans are indirect and were obiteined on experiments that used volunteers that identified the odors of their preference from clothes used by individuals of opposite sex, whose identity where unknown. In these circumstances, was demonstrated that women prefer odors from individual that are HLA different from theirs. Another field of research is the maternal-fetal interactions, where the HLA genes may also be involved with processes related to successful reproduction. In this study the goal was to search for new evidences on the influence of human MHC, or HLA in the formation of couples, and also in the post-copulatory selection MHC-dependent. To develop that, we designed a study using couples and families in the State of Paraná as sample. All individuals in the study have genetic typing for loci HLA-A, HLA-B and HLA-DR and the results are filed in the records of the Laboratory of Immunogenetics and Histocompatibility (LIGH), Department of Genetics, UFPR. The results of this work suggest that couples are structured with less HLA similarities than one would expect by chance, supporting the hypothesis that the HLA, especially class I, may influence the selection of sexual partners and moreover, the formation of human marriages. However, it was not found evidence of MHC-dependent post-copulatory selection. This paper presented an original approach, opening new prospects for research and discussions, since one of the methodologies used is based on a tool used in clinical practice, now also being used for the study of evolution.

1 INTRODUÇÃO

O tema seleção sexual desde sua apresentação inicial por Charle Darwin, foi alvo de grandes investigações. A classificação de seleção Intra-sexual e Inter-sexual, foi dada para processos evolutivos direcionados pela competição entre machos e escolha preferencial das fêmeas respectivamente. A competição entre machos a princípio apresenta uma razão clara, o acesso as fêmeas para a reprodução. Já os mecanismos de escolha das fêmeas mostram-se mais complexos. Observou-se também que os processos de seleção sexual ocorriam também após a cópula, onde o sucesso da reprodução de fêmeas que copulavam com vários machos, era favorecido apenas a alguns desses machos. Ainda existe diversas hipóteses sobre como seriam esses processos de escolha, e quais seriam as forças evolutivas que levaram ao desenvolvimento de tais mecanismos. Um dos genes candidatos a marcadores de processos de escolha diferencial de parceiros, são os genes do MHC ou Complexo Principal de Histocompatibilidade (do inglês *Major Histocompatibility Complex*). Uma função bem conhecida de alguns deste genes é a apresentação de antígenos aos linfócitos T, processo inicial da ativação da resposta imunológica.

Diante o grande número de publicações a respeito deste empolgante tema, a relevância deste trabalho está baseada nas discussões teóricas encontradas, uma vez que os dados empíricos são bastante diversos e portanto um consenso a respeito do assunto parece distante. No entanto, esse cenário motiva e impulsiona novas investigações científicas. O presente trabalho tem como objetivo levantar novos dados a respeito da influência dos genes MHC na escolha preferencial de parceiros em humanos e também em processos de seleção pós-copulatória.

Para tal foram delineados três diferentes experimentos, sendo os dois primeiros referentes a escolha diferencial de parceiros e o último sobre seleção pós copulatória.

2 OBJETIVOS e JUSTIFICATIVAS

2.1 Objetivos Gerais

Investigar numa amostra de casais do Estado do Paraná, Região Sul do Brasil, a hipótese de seleção diferencial de parceiros MHC/HLA dependente.

Investigar numa amostra de famílias do Estado do Paraná, Região Sul do Brasil, a hipótese da seleção pós-copulatória MHC/HLA dependentes, em favor dos heterozigotos.

2.2 Objetivos específicos

1. Estimar e comparar o perfil MHC do casal quanto ao número de diferenças HLA e comparar a média dessas diferenças entre os grupos amostrais;
2. Estimar e comparar o número de diferenças estruturais das proteínas hla.
3. Investigar e testar a hipótese da ocorrência de seleção pós-copulatória MHC dependente;

Para nossa Hipótese Nula, considerou-se a não influência dos genes MHC na formação dos casais, situação em que as amostras não deveriam diferir significativamente.

De acordo com a Hipótese Alternativa, havendo influência dos genes MHC na formação dos casais e, a escolha pelo parceiro fosse preferencialmente pelo MHC diferente, os casais reais deveriam apresentar maior número de diferenças HLA do que os casais gerados ao acaso.

No experimento de seleção pós-copulatória considerou-se como Hipótese Nula a não ocorrência de desvios em favor dos heterozigotos, de modo que a geração filial comportaria-se como o esperado pela Primeira Lei de Mendel. De acordo com a Hipótese Alternativa, haveria uma vantagem dos heterozigotos levando ao aumento destes em relação aos homozigotos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O conceito da seleção natural de Darwin, processo através do qual a sobrevivência e reprodução de certos indivíduos de uma população prevalecem sobre os demais em função de seus atributos ou características fenotípicas, tem sido amplamente utilizado para sustentar investigações sobre o comportamento reprodutivo de muitas espécies, inclusive a espécie humana.

Em 1871 Darwin no livro *The Descent of Man, and Selection in Relation to Sex* propôs a teoria da seleção sexual que implicaria em variações no padrão de acasalamento das espécies como resultado de uma escolha ou preferência, por parte da fêmea, por características “extravagantes” presentes nos machos (seleção inter-sexual). A escolha do parceiro baseada em características sem valor adaptativo aparente, como bem exemplificada pela cauda do pavão, levaria ao aumento da frequência desta característica na população, até o ponto onde o “prejuízo” ou custo energético para mantê-las, seria maior que o benefício gerado pela escolha preferencial, permanecendo então estáveis. Este mecanismo de seleção de parceiros foi corroborado por muitos estudos empíricos desde sua postulação (revisado por KIRKPATRICK, 1982 e MAJERUS, 1986).

ZAHAVI (1975), com a proposição do “*The handicap principle*”, afirma que a presença de características extravagantes seria uma maneira verdadeira do macho “mostrar” os bons genes dos quais ele é portador. Essa estratégia de exibir características ou ornamentos que demandam um grande custo energético de produção e manutenção e, inclusive em alguns casos podem até comprometer sua própria sobrevivência, não poderia ser imitado por um macho que não fosse portador desses “bons genes” para a sobrevivência. Dessa forma, a característica extravagante que atrairia a fêmea para a escolha preferencial seriam indicadores de “bons genes” presentes no parceiro e que seriam transmitidos para a prole, objetivo principal dessa estratégia reprodutiva. Esta hipótese também ficou conhecida como o “Custo da honestidade” (ZAHAVI, 1975).

Com o aprofundamento destas teorias foi sugerido que a seleção sexual estaria ocorrendo não apenas mediada pelas características extravagantes, mas poderia também ser influenciada por mecanismos que não demandassem tanto

gasto energético, mas que ainda pudessem informar sobre o *background* genético do parceiro de forma verdadeira (HAMILTON e ZUK, 1982).

Utilizando como base a idéia de coevolução, VAN VALEN (1973) propôs um mecanismo evolutivo chamando de "*The Red Queen Hypothesis*" (Hipótese da Rainha Vermelha) em uma alusão à história de Lewis Carroll "*Through the Looking Glass*", onde a Rainha Vermelha disse para Alice "*aqui é preciso estar sempre correndo o máximo que você pode para se manter no mesmo lugar*". Van Valen demonstrou que uma corrida armamentista estava ocorrendo, tanto na coevolução predador-presa, como parasita-hospedeiro, onde aqueles que não se adaptassem seriam extintos, por isso a constante corrida para manter-se no mesmo lugar.

HAMILTON e ZUK (1982) posteriormente associaram esse conceito de Van Valen à seleção sexual, propondo que a escolha de parceiros pela fêmea estaria relacionada ao vigor do macho, o qual seria diretamente influenciado pela sua capacidade genética de resistência aos parasitas. Deste modo, novas combinações de genes da resposta imune seriam necessárias a cada geração para impedir a predominância dos parasitas. Para que tal teoria pudesse ser testada as seguintes premissas deveriam ser contempladas: *i)* A existência de uma enorme variação de genes de resistência na população; *ii)* A fêmea conhecer seus próprios genes; *iii)* A fêmea ser capaz de identificar os genes de resistência dos possíveis parceiros. Esta hipótese tem sido corroborada por muitos estudos, inclusive com humanos, e os genes candidatos que melhor se enquadram nessas premissas básicas seriam os genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade (do inglês MHC - *Major Histocompatibility Complex*).

Os genes MHC clássicos têm-se revelado como os mais polimórficos do genoma humano (*HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C* e *HLA-DR*, *HLA-DQ* e *HLA-DP*). Os produtos protéicos por eles codificados desempenham um importante papel na resposta imune, imunomodulando o tamanho do repertório de linfócitos circulantes e sua ativação, sendo responsáveis pela apresentação de antígenos aos linfócitos T, processo inicial da ativação da resposta imune adaptativa.

YAMAZAKI (1976) foi o primeiro a investigar a influência dos genes MHC na seleção sexual de parceiros. No seu trabalho com linhagens endocruzadas de camundongos, os quais diferiam apenas nos seus genótipos MHC, foi observado a escolha preferencial por parte das fêmeas, as quais se acasalavam com indivíduos

com genótipos MHC diferente do seu próprio. Outros estudos (YAMAZAKI et al, 1978; EKLUND, 1997; PENN e POTTS, 1998) também corroboraram a hipótese de seleção de parceiros MHC diferentes em camundongos. Segundo alguns autores, moléculas voláteis, direta ou indiretamente resultante da degradação das proteínas MHC, confeririam ao animal um odortipo (BROWN et al, 1989 e YAMAZAKI et al, 1999) característico que seria reconhecido pelo possível parceiro. As evidências experimentais são sugestivas de que os animais evitam acasalamentos com parceiros MHC semelhante, numa escolha sinalizada por pistas olfativas MHC-relacionadas.

Trabalhos com lagartos (OLSSON et al, 2003), peixes (LANDRY et al, 2001) e aves (BONNEAUD et al, 2006 e RICHARDSON et al, 2005) também encontraram a preferência pela dissimilaridade MHC. Esta tendência, além de favorecer a heterozigose, atributo desejável para esses genes da resposta imune (HAMILTON e ZUK, 1982), também reduziria a taxa de endogamia nas populações (BROWN e EKLUND, 1994; POTTS *et al*, 1994). A hipótese explicativa é que, a união entre indivíduos MHC diferentes, maximizaria na prole a função apresentadora das moléculas codificadas por esses genes. Dessa forma, um melhor desempenho na resposta imune seria obtido não apenas para os genes MHC, mas também para os demais genes que participam da resposta imune que estivessem segregando em desequilíbrio de ligação e, para os quais a heterozigose também conferisse um melhor valor adaptativo.

Os genes HLA (*Human Leukocyte Antigen*), denominação do MHC na espécie humana, tem sido investigados quanto a possível influência na escolha preferencial de parceiros. O primeiro estudo, modelo e referência para outros estudos similares realizados por outros grupos de pesquisa é mundialmente conhecido como o “teste das camisetas” e foi realizado por WEDEKIND et al (1995) e contou com a colaboração de estudantes da Universidade de Bern, Suíça. Evidências favoráveis à escolha de parceiro dependente do tipo MHC foram observadas em alguns outros estudos (JACOB et al, 2002) mas não em outros (GRAMMER, 2002)

Em 2005, foi publicado por esse mesmo grupo de pesquisa na Universidade Federal do Paraná (SANTOS et al, 2005) o primeiro estudo realizado em população brasileira. Foi utilizado um delineamento experimental semelhante àquele utilizado

por Wedekin e estudantes do curso de Biologia da UFPR, do sexo masculino e do sexo feminino colaboraram para esse estudo.

Além de informação do perfil MHC/HLA de cada participante, os mesmos realizaram um teste olfativo, para o qual, foram instruídos a usar um colar com um sachê de algodão durante uma semana, a fim de deixar impregnados seus odores corporais que seriam posteriormente avaliados e classificados quanto ao quesito cheiro agradável/desagradável. Recomendou-se que durante o experimento só utilizassem produtos de higiene pessoal inodoros, não se alimentassem com alimentos condimentados (alho, pimenta etc), não fumassem e que evitassem qualquer situação que pudesse mascarar seu odortipo natural, pois esperava-se que nesses sachês ficasse impregnada sua individualidade MHC (odortipo MHC) presente no suor que ficou retido no artefato de algodão que todos usaram para a realização do experimento. Os resultados deste trabalho corroboraram aqueles observados por Wedekin e foram sugestivos da escolha preferencial por parceiros com dissimilaridade HLA. No estudo realizado por WEDEKIND et al (1995) foi observado uma inversão nos resultados das avaliações, quando as mulheres usavam método contraceptivo hormonal o que não foi avaliado no experimento de SANTOS et al (2005).

Uma forma alternativa de se investigar a influência de genes MHC na formação de casais, foi conduzida num estudo que avaliou o perfil MHC(HLA) de casais reais, de uma comunidade isolada nos Estados Unidos, comparando-os com casais gerados aleatoriamente. Os resultados foram sugestivos de que casais reais apresentavam mais diferenças HLA entre si do que o esperado ao acaso (OBER et al, 1997). O mesmo delineamento investigativo foi conduzido em casais orientais de Tóquio (Japão), no entanto os resultados foram discordantes (JUJI et al, 2000).

Existe ainda um foco diferente no estudo da seleção e escolha de parceiros influenciada pelo MHC, que assume que características visuais seriam sinalizadoras para a escolha dos possíveis parceiros uma vez que nós humanos priorizamos e utilizamos muito mais o sentido da visão, enquanto o olfato é muito reduzido quando comparado com outros mamíferos. As principais características que seriam avaliadas na escolha do par ideal seriam: simetria corporal, simetria facial, aparência e textura de pele, sendo que estas mesmas características poderiam estar

relacionadas indiretamente aos genes MHC. Os resultados foram bem diversos (PETRIE et al, 2005a; PETRIE et al, 2005b).

Mecanismos de seleção sexual pós-copulatória, foram inicialmente relatados em espécies de insetos cujas fêmeas copulam com múltiplos parceiros (PARKER, 1970). Muito foi pesquisado sobre como funcionaria este mecanismo, também relacionando-o com a hipótese de influência dos genes da resposta imune, admitindo-se que o maior valor adaptativo seria para os heterozigotos. Um processo de seleção pós-cópula poderia evitar gastos energéticos maternos, com uma prole que futuramente não fosse capaz de perpetuar seus genes e, ainda otimizar a formação dos mais adaptados. Esta seleção poderia ocorrer de diferentes formas e em diferentes estágios do processo reprodutivo e da ontogênese: a) seleção sobre os espermatozóides através do trato reprodutivo da fêmea; b) o óvulo “escolher” o espermatozóide; c) segunda divisão meiótica ser influenciada pelo haplótipo do espermatozóide que penetrou no ovócito; d) seleção sobre o embrião através do oviduto; e) no momento da implantação; f) nutrição do embrião e aborto espontâneo; g) alimentação ou morte seletiva pela mãe após o nascimento (revisado por WEDEKIND, 1994). Os resultados dos trabalhos envolvendo o MHC neste tipo de seleção são ainda mais contraditórios. Em humanos (FELLOUS e DAUSSET, 1970; HALIM e FESTENSTEIN, 1975; ARNAIZ-VILLENA e FESTENSTEIN, 1976; HALIM et al, 1982) encontraram a expressão de moléculas MHC de Classe I em espermatozóides, a qual foi interpretada como uma maneira de sinalização do haplótipo HLA do espermatozóide, uma vez que qualquer função de apresentação de antígenos não era possível pois a α_2 -microglobulina (molécula que estabiliza a estrutura da proteína MHC para sua função de apresentação de antígenos) não estava presente. Contraditoriamente, em experimentos similares (HAAS e NAHHAS, 1986; KUHLMAN et al, 1986) não foram encontrados estes resultados, ou ainda observados somente em alguns indivíduos da amostra (KURPISZ et al, 1987).

WEDEKIND et al (1996) trabalhando com linhagens congênicas de camundongos que diferiam apenas nos genes MHC, realizaram um experimento de fertilização artificial procurando por evidências de seleção pós copulatória, que poderia ocorrer pela escolha do espermatozóide pelo ovócito ou por uma segunda divisão meiótica do ovócito, influenciada pelo haplótipo do espermatozóide. Os dados brutos não apresentaram diferença entre os blastocistos homozigotos e

heterozigotos. No entanto quando se estratificou a amostra, uma diferença estatística significativa revelou-se em favor dos heterozigotos, corroborando a hipótese de seleção pós-copulatória em favor dos heterozigotos. Em humanos BLACK E HEDRICK (1997), trabalhando com grupos isolados de ameríndios, detectaram que havia menos nascimentos de indivíduos homozigotos que o esperado de acordo com o genótipo dos pais destes indivíduos. Resultados sugestivos de que outros mecanismos, além de escolha diferencial de parceiros, estariam atuando na redução de homozigotos observados, como por exemplo, algum processo de seleção mediado pela interação materno-fetal a favor dos heterozigotos.

4 METODOLOGIA

4.1 Composição amostral dos Casais Reais

Como primeira etapa do estudo, casais reais representativos da população, foram selecionados no banco de dados (n= 55.000) do Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade – LIGH, do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná. Todos tinham sido genotipados em baixa resolução (grupo alélico: dois dígitos) para os locos *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-DRB1* através do método PCR-rSSOP e PCR-SSP.

No Anexo 1 está descrita a metodologia que foi desenvolvida para a busca e seleção desses casais, considerando-se que nas fichas cadastrais não existiam informações sobre o grau de parentesco entre os indivíduos do banco de dados.

Após este processo, chegou-se a um N amostral de 90 casais reais (*Casais Reais I*).

Casais reais também do banco de dados do LIGH (n=110), que apresentavam em comum o fato de ter um filho(a) com doença onco-hematológica e com indicação de Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas (TCTH) e também genotipados em baixa resolução (nível grupo alélico: dois dígitos) para os locos *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-DRB1* através do método PCR-rSSOP e PCR-SSP, compuseram uma segunda amostra de casais reais denominada *Casais Reais TCTH*.

A genotipagem HLA de seus filhos estavam disponíveis para os locos *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-DRB1* através da mesma metodologia. Sendo estas famílias completas a amostra para o experimento de seleção pós copulatória MHC dependente.

4.2 Composição amostral dos *Casais Virtuais*

À partir dos 90 casais reais da amostra *Casais Reais I* foram constituídos novos pares de casais, combinando-se aleatoriamente os 90 homens e 90 mulheres, compondo então o Primeiro Grupo Controle, denominado *Casais Virtuais I* (n= 90).

O Segundo Grupo Controle (*Casais Virtuais II*, n= 300) foi estruturado usando-se o software do Sistema LIGH, que selecionou randomicamente homens e

mulheres do banco de dados do LIGH (n= 55.000), combinando-os de modo a formar pares compostos por um homem e uma mulher.

4.3 Delineamento dos experimentos

4.3.1 Padrão de formação de casais e seleção do parceiro MHC dissimilar

A fim de comparar as diferenças HLA entre os casais dos diferentes grupos amostrais, contou-se inicialmente o número de diferenças HLA entre cada casal. Esse número poderia variar de 0 a 4 quando considerados somente os genes MHC de Classe I (*HLA-A* e *HLA-B*) ou de 0 a 6 quando incluído o gene MHC de Classe II *HLA-DRB1**, como mostrado no Exemplo 1.

Nº LIGH	HLA-A	HLA-A	HLA-B	HLA-B	HLA-DR	HLA-DR	nº s Classe I	nº s Classe I e II
LIGH038822	02	26	35	38	01	11	2	3
LIGH039820	02	11	27	35	01	13		
LIGH004728	01	03	55	57	07	14	4	5
LIGH004730	11	30	13	35	04	07		

EXEMPLO 1 – DADOS DE TIPAGEM HLA, COM AS DIFERENÇAS DENTRO DO CASAL

FONTE: O autor (2009)

NOTA: A primeira coluna refere-se ao número de cadastro do indivíduo no Sistema LIGH, as seis colunas seguintes são os resultados da tipagem genética para os diferentes locos. O número de diferenças expressos nas duas últimas colunas, é dado contando-se o número de grupos alélicos diferentes entre os membros do casal, *HLA-A* e *HLA-B* são genes de Classe I e *HLA-DR* de Classe II. Os resultados destacados mostra similaridades dentro dos casais.

Os dados obtidos desta contagem foram transformados segundo o "Coeficiente $(x + 0,5)^{1/2}$ " para torná-los mais próximos de uma distribuição normal (Normalidade), e então utilizado o "Teste T" para comparação das diferenças HLA observadas entre os diferentes grupos amostrais. Como o Teste T permite comparar grupos dois a dois, seriam possíveis 6 combinações (C^2_4), no entanto este teste estatístico só permite fazer t-1 comparações, onde t é o número de tratamentos (neste caso, grupos amostrais), ou seja, três comparações (4 grupos). As comparações escolhidas para a realização do teste foram: a.) Casais Virtuais I X

Casais Virtuais II; a.II) Casais Reais I X Casais Virtuais II; a.III) Casais Reais X Casais Reais TCTH. Foram escolhidas estas comparações pelas seguintes razões:

- *a.I:* comparação da amostras controles permitiria analisar a “eficiência” na metodologia de escolha dos controles (não podendo ocorrer diferenças significativas entre elas).
- *a.II:* Comparar os casais representativos da população (*Casais Reais I*) com a amostra controle melhor representada (*Casais Virtuais II*, n=300).
- *a.III:* Comparar os dois grupos distintos de casais reais.

Média, variância, desvio padrão e coeficiente de variação foram calculados para os dados transformados, sendo apresentados como componentes da estatística descritiva das amostras.

4.3.2 Imunogenicidade e média das diferenças estruturais HLA dentro e entre casais

O objetivo deste experimento foi caracterizar as diferenças estruturais da molécula hla entre o casal, possibilitando assim inferirmos sobre as diferenças funcionais destas moléculas (diferentes estruturas hla apresentam diferentes peptídeos aos Linfócitos T, se o casal apresentar estruturas semelhantes, a apresentação de antígenos também vai ser semelhante, ou seja os filhos destes casal comportariam-se como indivíduos homozigotos para estes genes). Considerando-se a hipótese de escolha preferencial de parceiros MHC dependente, onde a escolha fosse favorecida ao MHC dissimilar, sendo a função biológica explicativa que a união entre indivíduos MHC diferentes maximizaria na prole a função apresentadora das moléculas codificadas por esses genes (HAMILTON e ZUK, 1982), espera-se que as diferenças HLA entre o casal sejam também diferenças estruturais e funcionais.

Para se avaliar as diferenças estruturais das proteínas hla entre os cônjuges, foi utilizado o programa *HLA Matchmaker*, (disponível gratuitamente no site www.hlamatchmaker.net), esse foi um uso inédito deste programa no contexto da reprodução, originalmente desenvolvido no contexto dos transplantes clínicos de células e tecidos, especialmente no transplante renal, para se avaliar o perfil de

reatividade de aloanticorpos HLA presentes no soro do receptores hipersensibilizados, contra antígenos HLA nas células do doador. Este programa utiliza um algoritmo baseado nas diferenças estruturais ao nível de *eplets* entre moléculas HLA e permite estimar a imunogenicidade destas moléculas. Os *eplets* são aminoácidos incluídos dentro de uma distância de 3,0 a 3,5 *Ångstrons*, podendo estar em estrutura linear ou ligados após dobramentos da conformação terciária da proteína. Maiores descrições sobre o *HLA Matchmaker* consultar o Anexo 2.

Para a comparação das diferenças estruturais entre moléculas HLA de dois indivíduos, o programa *HLA Matchmaker* orienta que a inserção ou *input* dos genótipo HLA seja em "alta resolução". No entanto, os dados de genotipagem HLA dos *Casais Reais I*, estavam definidos em "baixa resolução", razão pela qual utilizamos uma ferramenta disponível para a resolução deste problema em uma das interfaces do *HLA Matchmaker* denominado *4-digit convert*.

O *4-digit convert* transforma dados de genotipagem HLA definidos em baixa resolução (dois dígitos) para alta-resolução (nível alélico: quatro dígitos). O padrão de conversão para os genes MHC de Classe I está baseado nas frequências dos alelos dentro de cada grupo alélico, ou seja, o programa converte o grupo alélico (2 dígitos), para o alelo mais comum dentro daquele grupo (4 dígitos). Para os genes de MHC de Classe II o padrão de conversão baseia-se no desequilíbrio de ligação entre os genes *HLA-DQ* e *HLA-DR*. Como os resultados de tipagem nas amostras analisadas não apresentam genotipagem para o gene *HLA-DQ*, não foi possível a conversão dos resultados de *HLA-DR* para alta resolução, e portanto a análise das diferenças estruturais foi possível somente para os genes de MHC de Classe I.

Um problema relacionado à conversão dos dados, é o fato de que existem alguns grupos alélicos que correspondem a mais de um grupo sorológico - por exemplo, *HLA - A09, A10, A19, B12, B15 B16, B21 e B22* - para estes dados de baixa resolução o programa *HLA Matchmaker* não converte para alta resolução. Este problema foi superado retirando-se da amostra aqueles casais onde pelo menos um dos cônjuges apresentava um resultado de genotipagem que não pudesse ser convertido para alta resolução. Após estas exclusões, os novos tamanhos amostrais foram: *Casais Reais I ** (n=62), *Casais Virtuais I ** (n=60) e *Casais Reais TCTH ** (n=55).

Um exemplo de como é visualizada as diferenças de *eplets* em cada casal está no ANEXO 3, onde também é apresentado como procedeu-se a tabulação e contagens das diferenças. Conforme apresentado no ANEXO 3, os resultados obtidos das diferenças estruturais (*eplets*) das moléculas hla de cada casal pode ser visualizado por diversos ângulos. Como o programa *HLA Matchmaker* retorna os *eplets* (diferenças estruturais) capazes de gerar reconhecimento imune do receptor, e o presente objetivo foi avaliar as diferenças estruturais entre as moléculas hla do casal, o dado utilizado para determinação do número de diferentes *eplets* em cada casal foi a média das duas situações (*I.* homem como doador; *II.* mulher como doadora).

Os dados obtidos destas médias também foram transformados segundo o "Coeficiente $(x + 0,5)^{1/2}$ " para torná-los mais próximos de uma distribuição normal, e então aplicado o "Teste T" para comparação entre os diferentes grupos amostrais.

Como já apresentado anteriormente o "Teste T" apresenta limitações quanto ao número de comparações que podem ser realizadas. Nesta caso onde foram comparados três grupos diferentes (*Casais Reais I **, *Casais Virtuais I ** e *Casais Reais TCTH **), são possíveis três comparações, no entanto somente duas comparações podem ser realizadas usando o Teste T. As comparações escolhidas foram: *b. I) Casais Reais I * x Casais Virtuais I **; *b.II) Casais Reais I * x Casais Reais TCTH **.

4.3.3 Seleção pós-copulatória MHC dependente

O delineamento procedeu-se de forma a investigar trios de indivíduos, compostos por pai, mãe e filho, verificando se a ocorrência de filhos homozigotos para os genes MHC estava de acordo com o esperado em ausência de seleção. A hipótese de seleção sexual pós-copulatória, sugere um desvio em favor dos heterozigotos.

Para atender aos objetivos de nosso estudo, foram selecionadas famílias onde o casal apresentava alguma similaridade HLA, pois somente nestas famílias poderia ocorrer a formação de filhos homozigotos. Dentre as 109 famílias analisadas, pertencentes ao banco de dados do Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH-UFPR), todas tipadas para os genes *HLA-A*, *HLA-B* e

HLA-DRB1, 70 atendiam ao critério de similaridade HLA. O próximo passo foi analisar trios formados por pai, mãe e filho. Naquelas famílias que tinham mais de um filho, as mesmas contribuíram com trios adicionais, tanto quantos eram os filhos presentes. No total foram analisados 291 trios. A etapa seguinte foi a identificação dos haplótipos presentes em cada trio, os haplótipos dos pais eram deduzidos através dos genótipos dos filhos, como demonstrado no Exemplo 2.

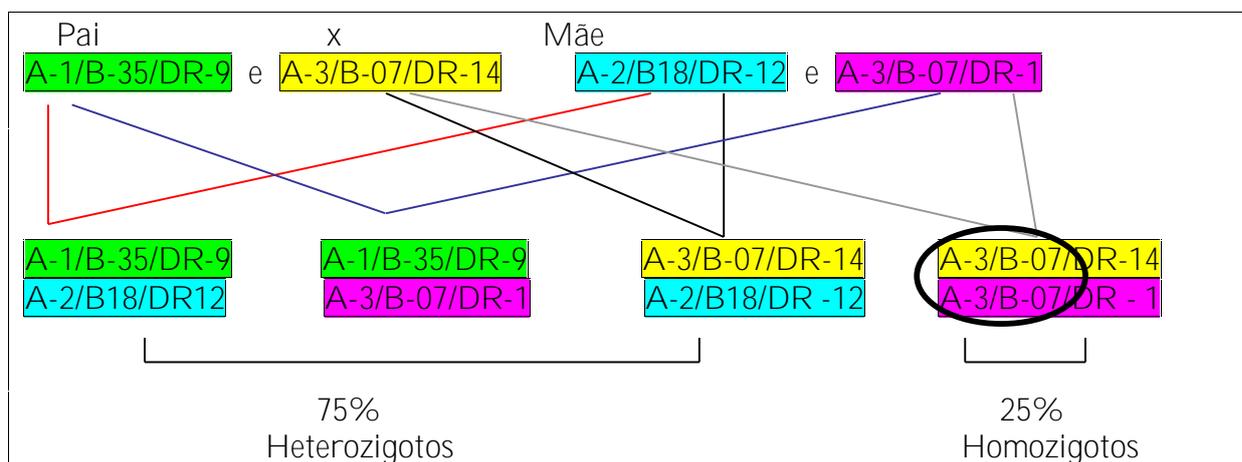
	Genótipos Conhecidos			Haplótipos identificados
	HLA-A	HLA-B	HLA-DR	
Pai	A-1 e A-3	B-7 e B-35	DR-9 e DR-14	A-1/B-35/DR-9 e A-3/B-7/DR-14
Mãe	A-2 e A-3	B-7 e B-18	DR-1 e DR-12	A-2/B-18/DR-12 e A-3/B-7/DR-1
Filho	A-1 e A-3	B-7 e B-35	DR-1 e DR-9	A-1/B-35/DR-9 e A-3/B-7/DR-1

EXEMPLO 2 – IDENTIFICAÇÃO DE HAPLÓTIPOS

FONTE: O autor (2009)

NOTA: Essa dedução direta dos haplótipos é possível por estes genes estarem em alto desequilíbrio de ligação. Conhecendo-se os genótipos presentes em cada trio, pode-se deduzir a fase de ligação dos genótipos nos pais pela análise do genótipo do filho, que apresenta um haplótipo materno e um paterno, logo conhecendo-se um haplótipo de um indivíduo identifica-se o segundo haplótipo por exclusão.

Para o cálculo do esperado de filhos homocigotos, foi analisado para cada trio a probabilidade de gerar um filho homocigoto em ausência de seleção (Exemplo 3). Foram considerados como homocigotos (observado e esperado) a ocorrência de homocigose em um ou mais, dos locos analisados.



EXEMPLO 3 – GENÓTIPOS ESPERADOS

FONTE: O autor (2009)

NOTA: Por estes genes estarem em alto desequilíbrio de ligação no momento da segregação comportam-se como o esperado pela Primeira Lei Mendeliana. O círculo indica os alelos homocigotos.

Os 291 trios puderam ser separados de acordo com a distribuição das probabilidades, sendo possível a formação de três classes de trios: com

probabilidade de 25% (n=156), 50% (n=122) e 75% (n=13) de filhos homozigotos. Então foi comparado o número de filhos observados dentro de cada grupo com o esperado para os respectivos grupos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo a hipótese da vantagem do *MHC* heterozigoto (sobredominância), como inicialmente sugerido por DOHERTY e ZINKERNAGEL (1975), indivíduos com esse genótipo apresentam vantagem adaptativa, por serem capazes de apresentar maior número de diferentes peptídeos antigênicos aos linfócitos T e conseqüentemente ativá-los, implementando uma resposta imune mais eficiente aos patógenos quando comparados com indivíduos *MHC* homozigotos. Os resultados dos diferentes delineamentos estão relacionados à seguir.

5.1 Padrão de formação de casais e seleção do parceiro *MHC* dissimilar

Nos Gráficos 1 e 2 estão representadas as médias não transformadas das diferenças HLA para os quatro grupos analisados. As Tabelas 1 e 2, apresentam os dados referentes as análises da estatística descritiva de cada amostra, onde pode-se visualizar a média, variância, desvio padrão e coeficiente de variação após a transformação pelo coeficiente $(x+0,5)^{1/2}$.

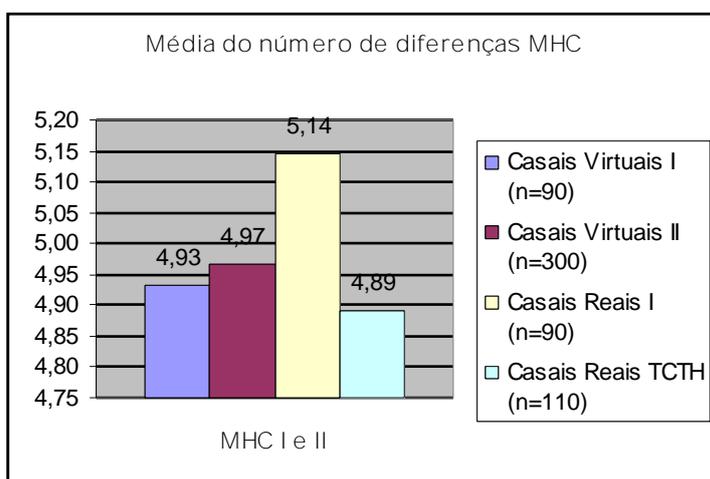


GRÁFICO 1 – DIFERENÇAS MHC DE CLASSE I E II
 FONTE: O autor (2009)

	Casais Virtuais II	Casais Virtuais I	Casais Reais I	Casais Reais TCTH
Média	2,329135	2,32198	2,368235	2,312795
Variância	0,041938	0,042212	0,036311	0,042272
Desvio Padrão	0,204788	0,205455	0,190555	0,205601
Coeficiente de variação	0,087924	0,088483	0,080463	0,088897

TABELA 1 – ESTATÍSTICA DESCRITIVA DA ANÁLISE DAS DIFERENÇAS HLA PARA OS GENES MHC DE CLASSE I E II

FONTE: O autor (2009)

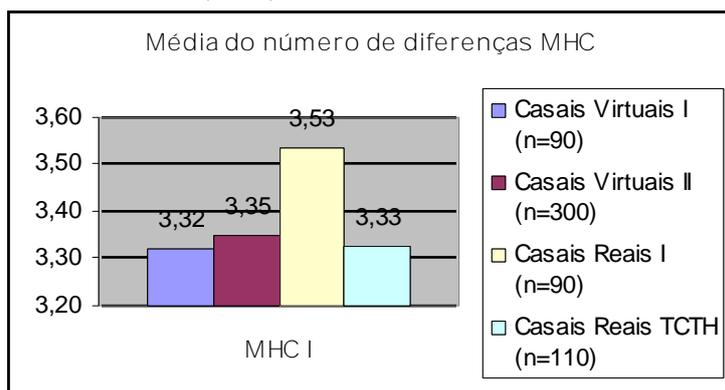


GRÁFICO 2 – DIFERENÇAS MHC DE CLASSE I

FONTE: O autor (2009)

	Casais Virtuais II	Casais Virtuais I	Casais Reais I	Casais Reais TCTH
Média	1,952125	1,945445	2,001811	1,947463
Variância	0,035993	0,037886	0,026379	0,03498
Desvio Padrão	0,189719	0,194644	0,162416	0,18703
Coeficiente de variação	0,097186	0,100051	0,081135	0,096038

TABELA 2 – TABELA 1 – ESTATÍSTICA DESCRITIVA DA ANÁLISE DAS DIFERENÇAS HLA PARA OS GENES MHC DE CLASSE I

FONTE: O autor (2009)

Na representação gráfica é possível perceber um aumento no número médio de diferenças alélicas dos casais representativos da população (*Casais Reais I*) em relação aos casais gerados aleatoriamente (*Casais Virtuais I e II*) bem como em relação aos casais com filhos a espera Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas (*Casais Reais TCTH*). No entanto, com uma análise matemática simples constata-se que a média das diferenças HLA para os genes de Classe I e II é 4,34% maior nos *Casais Reais I* em relação aos demais, e 6,04% quando analisados somente os genes de Classe I. Estes resultados não são suficientes para inferir sobre a diferença entre as médias dos diferentes grupos, necessitando de um teste estatístico que avalie a significância destas diferenças. Os testes escolhidos para análise foram: a.) *Casais Virtuais I X Casais Virtuais*

II; a.II) *Casais Reais I X Casais Virtuais II*; a.III) *Casais Reais X Casais Reais TCTH*, como já discutido anteriormente. Os valores de p para estes testes estão apresentados nos Quadros 1 e 2.

a.I)	0,7716
a.II)	0,0537
a.III)	0,0257

QUADRO 1 – TESTES T, CLASSE I E II

FONTE: O autor (2009)

NOTA: Em destaque os valores com diferenças significativas.

a.I)	0,7710
a.II)	0,0125
a.III)	0,0157

QUADRO 2 – TESTES T, CLASSE I

FONTE: O autor (2009)

NOTA: Em destaque os valores com diferenças significativas.

Os resultados obtidos nas comparações das amostras controles - *Casais Virtuais I e II* – revela semelhança entre estas amostras ($p=0,7710$ e $p=0,7716$), indicando que as metodologias usadas para obtenção das mesmas foram satisfatórias e de tamanho adequado para sustentar análises para o teste estatístico proposto (*Teste T*).

A diferença encontrada na comparação entre a média das diferenças HLA dos *Casais Reais I* com os *Casais Virtuais II (a.II)* foi significativa quando analisamos somente os genes *MHC de Classe I* (Quadro 2). Este resultado corrobora a hipótese de escolha preferencial por indivíduos com genótipo MHC dissimilar, uma vez que os casais reais estão se estruturando com mais diferenças do que o esperado pelo acaso. No entanto quando esta mesma análise é feita utilizando-se os dados de MHC de Classe I e II juntos a diferença não é significativa com α de 5% (Quadro 1).

O fato de que os dados foram agrupados em dois delineamentos principais (MHC de Classe I e MHC de Classe I e II), e a significância estatística ter sido observada apenas para os dados MHC de Classe I, nos permite levantar a seguinte hipótese de acordo com os estudos anteriores. Considerando que os mecanismos sinalizadores do genótipo MHC seriam reconhecidos através do sistema olfatório, onde nesse contexto, cada indivíduo possui um odortipo MHC característico direto

ou indiretamente relacionado às moléculas MHC (PEN e POTTS, 1998) e sabendo-se da expressão ubíqua das proteínas MHC de Classe I em todas as células nucleadas, enquanto a expressão constitutiva das moléculas MHC de Classe II ocorre somente em células da resposta imune (por exemplo, células apresentadoras de antígenos - células dendríticas, macrófagos e linfócitos B) (ABBAS e LICHTMAN, 2005). Desta maneira poderia ocorrer uma sinalização e reconhecimento sub-ótimos do odortipo MHC do parceiro, pela concentração e disponibilidade reduzidas das moléculas de Classe II em proporção àquelas de Classe I, onde o odortipo do indivíduo poderia ser mais fortemente influenciado pelas moléculas MHC de Classe I. Esta hipótese seria uma maneira de explicar os resultados encontrados.

Um achado adicional deste experimento foi a diferença encontrada entre os casais da amostra representativa da população (*Casais Reais I*) e os casais com filhos a espera de transplante de células tronco hematopoiéticas (*Casais Reais TCTH*; comparação *a.III*). A amostra TCTH apresentou uma redução significativa no número médio de diferenças HLA em relação a população geral, comportando-se como as amostras geradas ao acaso. Com este resultado surge uma nova questão: “Este achado teria algum significado biológico, ou seria apenas um viés estatístico?”. Os levantamentos prévios realizados neste trabalho apresentavam tamanhos amostrais reduzidos para a amostra dos Casais Reais TCTH (inicialmente $n=42$, depois $n=64$ e por último $n=110$), a diferença significativa ocorreu na análise desde a primeira amostra, razão esta que nos levou ao aumento específico deste tamanho amostral. Os resultados obtidos nas amostras aumentadas, inicialmente com $n=64$ e posteriormente $n=110$ (apresentada nestes trabalho) apresentaram resultados semelhantes. Se a diferença encontrada entre os casais gerados ao acaso e os casais da população é derivada da seleção sexual MHC-dependente ou não, deixou de ser a única pergunta. A nova questão, sobre o significado da diferença encontrada entre estas amostras, parece não ser apenas um viés estatístico. Quanto ao significado biológico desta diferença, seria precipitado propor uma relação de maior similaridade HLA nos pais e o desenvolvimento de doenças onco-hematológica nos filhos destes casais, mesmo considerando-se a importante atuação dos genes MHC nos mecanismos de imunovigilância. Essa relação de maior similaridade HLA nos pais e o desenvolvimento de doenças hematológicas, de certa forma apoiaria a hipótese da vantagem do heterozigoto, uma vez que estes

filhos portadores de tais doenças teriam um menor valor adaptativo em ausência de tratamentos médicos modernos. No entanto a pergunta quanto ao significado biológico desta relação ainda permanece e novos estudos devem investigar se existe uma região genética associada ao MHC que poderia estar relacionada à suscetibilidade a doenças onco-hematológicas em indivíduos homocigotos para esta região do genoma.

5.2 Imunogenicidade HLA dentro e entre casais e médias das diferenças estruturais

Os resultados obtidos deste experimento, cujo objetivo foi verificar se as diferenças HLA (ao nível de grupo alélico) encontradas entre os diferentes grupos do primeiro experimento (5.1. Padrão de formação de casais e seleção do parceiro MHC dissimilar), apresentam também um padrão de maiores diferenças estruturais, e consequentemente funcionais das moléculas hla, estão descritos a seguir.

Conforme apresentado no ANEXO 3, e já discutido anteriormente, os resultados obtidos das diferenças estruturais (*eplets*) das moléculas hla de cada casal pode ser visualizado por diversos ângulos. No entanto o foco de análise utilizado aqui foi a média das duas situações possíveis (*I.* homem como doador; *II.* mulher como doadora). Usando-se este critério de escolha para obtenção dos dados, a análise poderia ser feita computando os *eplets* de forma qualitativa ou quantitativa. Os dois delineamentos estão representados a seguir. Os Gráficos 3 e 4 apresentam a as médias de *eplets* e as Tabelas 3 e 4 apresentam os dados da estatística descritiva.

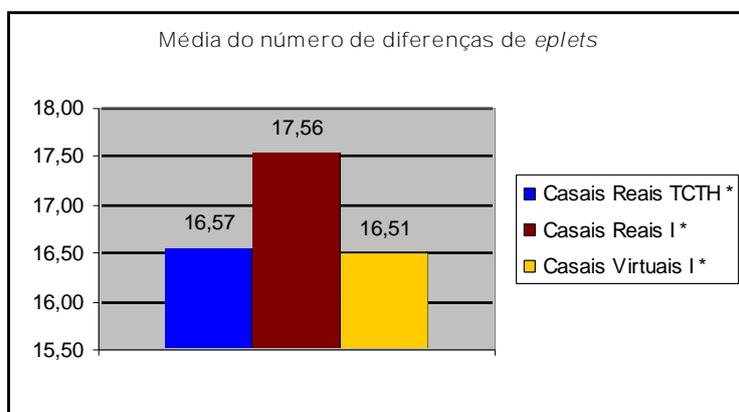


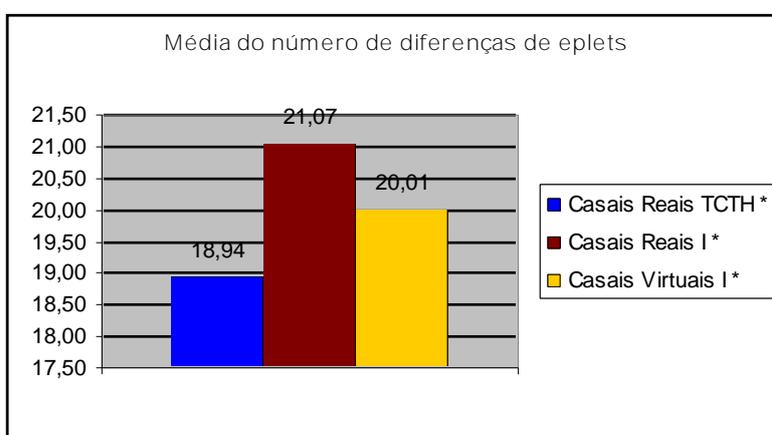
GRÁFICO 3 – DIFERENÇAS DE *EPLETS* QUALITATIVOS

FONTE: O autor (2009)

	Casais Reais TCTH *		Casais Reais I *		Casais Virtuais I *	
	a	p	A	p	a	P
Média	16,57	4,10	17,56	4,23	16,51	4,09
Variância	17,319	0,269	13,837	0,201	20,436	0,306
Desvio Padrão	4,162	0,519	3,720	0,448	4,521	0,553
Coefficiente de Variação	0,251	0,127	0,212	0,106	0,274	0,135

TABELA 3 – RESULTADOS DA ANÁLISE QUALITATIVA

FONTE: O autor (2009)

NOTA: As letras 'a' e 'p' indicam se os dados são anteriores ou posteriores a transformação segundo o coeficiente $(x+0,5)^{1/2}$.GRÁFICO 4 – DIFERENÇAS DE *EPLETS* QUANTITATIVOS

FONTE: O autor (2009)

	Casais Reais TCTH *		Casais Reais I *		Casais Virtuais I *	
	a	p	A	p	a	P
Média	19,53571	4,372118	20,54839	4,517619537	20,28333	4,449318
Variância	62,87143	0,937027	46,77631	0,649984437	79,22345	1,003627
Desvio Padrão	7,929151	0,968002	6,839321	0,806216123	8,900755	1,001812
Coefficiente de Variação	0,40588	0,221403	0,33284	0,178460385	0,438821	0,225161

TABELA 4 – RESULTADOS DA ANÁLISE QUANTITATIVA

FONTE: O autor (2009)

NOTA: As letras 'a' e 'p' indicam se os dados são anteriores ou posteriores a transformação segundo o coeficiente $(x+0,5)^{1/2}$.

As médias do número de *eplets* de cada grupo foram comparadas usando-se o *Teste T*. As combinações escolhidas para comparação foram:

b. I) *Casais Reais I** x *Casais Virtuais I**;

b.II) *Casais Reais I** x *Casais Reais TCTH**.

Os resultados do *Teste T* estão apresentados no Quadro 3.

	1.		2.
<i>b.I)</i>	0,0654	<i>b.I)</i>	0,2869
<i>b.II)</i>	0,1611	<i>b.II)</i>	0,0254

QUADRO 3 – TESTES T, DELINEAMENTOS QUALITATIVO E QUANTITATIVO

FONTE: O autor (2009)

NOTA: Valores de p , utilizando o *Teste T*, 1. para qualitativo e 2. para quantitativo. Em destaque o valor que apresenta diferença significativa.

Como apresentado no Quadro 3 os valores de p não apresentaram diferenças significativas quando comparados os grupos *Casais Reais I ** com *Casais Virtuais I ** (*b.I*) em ambos os delineamentos. A interpretação destes resultados, nos permite fazer alguns levantamentos teóricos. Uma vez que o padrão de diferenças estruturais encontradas entre os casais gerados ao acaso e os casais representativos da população não apresentaram diferenças significativas, poderíamos questionar sobre o valor das diferenças HLA encontradas no Experimento 1 (5.1. Padrão de formação de casais e seleção do parceiro MHC dissimilar, resultado: *Casais Reais I* são mais MHC diferentes que os demais grupos). Seriam estas diferenças HLA apenas marcadores para evitar o endocruzamento, como defendido por alguns autores (BROWN e EKLUND, 1994; POTTS *et al*, 1994), uma vez que as diferenças estruturais e conseqüentemente funcionais, foram as mesmas de quando a escolha é casualizada. Estes resultados não inviabilizam os modelos que explicam o polimorfismo dos genes HLA pela vantagem gerada no heterozigoto, mas torna na prática o acoplamento de escolha preferencial de parceiros condicionada pela vantagem do heterozigoto muito mais questionável, pois as diferenças estruturais não foram significativas. Caso a escolha preferencial pelo MHC dissimilar seja mesmo um mecanismo mantido por pressão em favor dos heterozigotos, uma população com tamanha diversidade, como é o caso da população brasileira, poderia estar mantendo o polimorfismo encontrado simplesmente pela estrutura da população não sendo necessário escolhas preferências, uma vez que indivíduos com genótipos semelhantes dificilmente se escolheriam. A razão da escolha pelo diferente, seria notavelmente mais significativa em populações pouco miscigenadas, onde o componente genético populacional seria menos diverso.

A diferença significativa encontrada na comparação *b.II* (*Casais Reais I ** x *Casais Reais TCTH **) reforça a pergunta sobre o significado biológico desta relação

de maior similaridade HLA nos pais e o desenvolvimento de doenças onco-hematológica nos filhos destes casais, apontando para a importância de estudos com o objetivo de esclarecer esta relação.

Este experimento apresentou uma metodologia pioneira no uso do *HLA Matchmaker*, mostrando que programas desenvolvidos para a prática clínica também podem ser usados como ferramentas para estudos evolutivos. No entanto o presente experimento apresenta pontos problemáticos, que podem comprometer qualquer análise dos resultados. Os dados apresentados ao programa foram convertidos de baixa resolução para alta resolução, ou seja, dentro de cada grupo alélico só foi utilizado o alelo mais frequente, conseqüentemente um erro é inserido na análise, uma vez que as diferenças existentes dentro do grupo e entre os grupos alélicos foram transformadas de vários tipos possíveis de diferenças em apenas uma única maneira. Outro problema foi o tamanho amostral reduzido, pois os grupos apresentaram uma grande redução em relação ao experimento 1.

Por outro lado abriu novas possibilidades de investigação, levantando questões teóricas e práticas, como por exemplo a necessidade de metodologias diferenciadas para obtenção das tipagens HLA em alta resolução também na prática das ciências básicas.

5.3 Seleção pós-copulatória MHC dependente

Os resultados deste experimento, cujo o objetivo foi a busca de evidências em favor de mecanismos de seleção pós-cópula MHC dependente, estão descritos a seguir. Nas 109 famílias avaliadas para o estudo, o número médio de filhos por família foi de 4,018. Os trios formados por pai, mãe e filho foram estratificados em três grupos para a análise estatística. Grupo 1 com probabilidade de 25% de gerar filhos homocigotos (n=156 trios), Grupo 2 com probabilidade de 50% de gerar filhos homocigotos (n=122 trios) e Grupo 3 com probabilidade de 75% de gerar filhos homocigotos (n=13 trios). Por fim, as probabilidades esperadas foram comparadas com as observações, através do Teste de Qui-quadrado apresentados no Quadro 5.

Os resultados do teste estatístico indicam que os filhos observados estão de acordo com o esperado em ausência de seleção, permitindo assim sugerir a não ocorrência de mecanismos de seleção pós-copulatória em favor dos heterocigotos

MHC-dependente na amostra estudada, uma vez que não existiu um desvio em favor dos heterozigotos. BLACK e Hedrick (1997) trabalhando também com humanos encontraram menos nascimentos de indivíduos homozigotos que o esperado. Numa revisão realizada por ALBERTS e OBER (1993), vários trabalhos revelando maior similaridade HLA em casais com experiências de abortos espontâneos recorrentes foram apresentados.

Genótipos Grupo 1	Observado	Esperado	$\chi^2 = 0,1367$ $p = 0,7115$
Heterozigoto em ambos os locos	119	117 (75%)	
Homozigoto em pelo menos um loco	37	39 (25%)	
Genótipos Grupo 2	Observado	Esperado	$\chi^2 = 0,1211$ $p = 0,7172$
Heterozigoto em ambos os locos	63	61 (50%)	
Homozigoto em pelo menos um loco	59	61 (50%)	
Genótipos Grupo 3	Observado	Esperado	$\chi^2 = 0,2308$ $p = 0,6309$
Heterozigoto em ambos os locos	4	3,25 (25%)	
Homozigoto em pelo menos um loco	9	9,75 (75%)	

QUADRO 4 – RESULTADOS DO TESTE DO QUI-QUADRADO PARA OS DIFERENTES GRUPOS
FONTE: O autor (2009)

Mecanismos de seleção pós-copulatória são mais facilmente encontrados em espécies onde a fêmea copula com vários machos, os machos realizam cópula forçada ou ainda infantícidio de filhotes por parte dos machos. Teoricamente, nestas condições os mecanismos de seleção pós-copulatória permitiriam que mesmo ocorrendo a cópula com machos não “ideais” para a reprodução, o maior gasto energético da fêmea na reprodução, seria direcionado a descendentes mais “viáveis”. Nas espécies onde existe maior desenvolvimento de mecanismos de escolha de parceiros, isto levaria a uma redução teórica na necessidade de mecanismos pós-copulatórios, uma vez que, os “machos ideais” puderam

previamente ser escolhidos pelas fêmeas. O acoplamento dos genes MHC em mecanismos de seleção pós-copulatória, permitiria que este importante complexo gênico, cuja sua função imunológica influencia diretamente na adaptabilidade do indivíduo, pudesse ser também moléculas sinalizadoras para a reprodução. Alguns trabalhos (FELLOUS e DAUSSET, 1970; HALIM e FESTENSTEIN, 1975; ARNAIZ-VILLENA e FESTENSTEIN, 1976; HALIM et al, 1982) apresentaram evidências nesta direção, onde a expressão de moléculas MHC de Classe I em espermatozoides foi observada, e então interpretada como uma maneira de sinalização do haplótipo HLA do espermatozoide, uma vez que qualquer função de apresentação de antígenos não era possível pois a β_2 -microglobulina (molécula que estabiliza a estrutura para a apresentação de antígenos) não estava presente. WEDEKIND et al (1996) encontrou evidências de seleção pós-copulatória MHC-dependentes em camundongos, cujo o genótipo favorecido era o heterozigoto.

A hipótese de seleção pós-copulatória MHC-dependente, apesar de bastante atraente, não foi corroborada em nosso estudo, e juntamente com os dados disponíveis na literatura nos permitiu formular a seguinte questão: “Seleção sexual pós-copulatória MHC-dependente em humanos, foi perdida ou ainda não foi encontrada?” cuja resposta dependerá de muitos outros estudos.

6 CONCLUSÃO

Se desconsiderarmos os dados do Experimento 2, pelas críticas apresentadas anteriormente, os resultados obtidos no Experimento 1, poderiam ser explicados por duas forças evolutivas que poderiam levar a fixação de mecanismos de escolha diferencial de parceiros, são elas: como forma de reduzir os endocruzamentos nas populações (BROWN e EKLUND, 1994) ou como forma de favorecer a heterozigose, um atributo desejável em especial para os genes da resposta imune (HAMILTON e ZUK, 1982).

No entanto os modelos que evocam somente mecanismos de seleção diferencial de parceiros para explicar o polimorfismo encontrado nos genes MHC, não são capazes de explicar o porque da maior taxa de mutação encontrada na região de apresentação de antígenos das moléculas HLA do que no restante da molécula. Também não explicam a maior concentração de mutações não sinônimas em relação as sinônimas nesta mesma região da molécula, sendo que o oposto é encontrado no restante da molécula. Estes e também outros resultados são evidências de que a diversidade dos genes HLA é dirigida a região de apresentação de antígenos, e está de acordo com os mecanismos de coevolução parasita-hospedeiro, onde as forças atuantes poderiam ser: seleção dependente de frequência, vantagem do heterozigoto ou ainda seleção flutuante.

Como já citado por outros autores (REF) os modelos de coevolução parasita-hospedeiro não necessariamente excluem a possibilidade de integração com modelos de seleção diferencial MHC dependente. A interação parasita-hospedeiro, poderia ser a pressão de seleção que favoreceu a manutenção de mecanismos de escolha diferencial por parceiros MHC dissimilares.

Frente as evidências de processos gerados pela interação parasita-hospedeiro, e de seleção diferencial de parceiros MHC-dependente, este trabalho conclui apoiando a ocorrência de um mecanismo integrativo entre estas diferentes maneiras de seleção.

Em síntese este trabalho sobre seleção sexual MHC-dependente em humanos, apesar de rejeitar a hipótese de seleção pós-copulatória MHC-dependente, apresentou novas evidências sobre a escolha preferencial por parceiros HLA dissimilares. Este resultado obtido de uma amostra populacional heterogênea

(não isolada) como é o caso das amostras analisadas, permite sugerir que a ocorrência de mecanismos de escolhas preferenciais, que em outras espécies já foram mais escalarecidos, ainda são atuantes nas escolhas de parceiros em nossa espécie, mesmo que estas escolhas sejam involuntárias a consciência humana.

Outra importante consideração a fazer no momento, é que não reduzimos o processo de escolha de parceiros em humanos, simplesmente a processos biológicos, sabemos da importância de fatores sociais, culturais, religiosos etc (apesar de não quantificá-los). No entanto o resultado do presente trabalho é mais uma evidência que mecanismos evolutivos que estão diretamente ligados com a adaptabilidade da espécie ainda estão presentes em processos complexos do comportamento humano como é o caso da formação de casais.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H. 2005 CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY, FIFTH EDITION. *Elsevier Science*

ALBERTS, S.C., OBER, C. 1993 Genetic variability in the major histocompatibility complex: a review of non pathogen-mediated selective mechanisms. *Yearbook of Physical Anthropology* **36**, 71-89.

ARNAIZ-VILLENA, A., FESTENSTEIN, H. 1976 HLA genotyping by using spermatozoa: Evidence for haploid gene expression. *Lancet*, ii, 707-709.

BJORKMAN, P.J., SAPER, M.A., SAMRAOUI, B., BENNETT, W.S., STROMINGER, J.L., WILEY, D.C. 1987 Structure of the human class I histocompatibility antigen. *Nature* **329**, 506-512.

BLACK, F.L., HEDRICK, P.W. 1997 Strong balancing selection at HLA loci: evidence from segregation in Sputh Amerindian families. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 12452-12456.

BONNEAUD, C., CHASTEL, O., FEDERICI, P., WESTERDAHI, H., SORCI, G. 2006 Complex Mhc-based mate choice in a wild passerine. *Proc. Biol. Sci.* **273**, 1111-1116.

BROWN, R.E., ROSER, B., SINGH, P.B. 1989 Class I and class II regions of the major histocompatibility complex both contribute to individual odors in congenic inbred strains of rats. *Behav. Genet.* **19**, 659-674.

BROWN, J.L., EKLUND, A. 1994 Kin recognition and the major histocompatibility complex: an integrative review. *American Naturalist* **143**, 435-461.

DARWIN, C. 1871 The descent of man, and selection in relation to sex. **London:** John Murray.

DOHERTY, P.C., ZINKERNAGEL, R.M. 1975 Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the H-2 gene complex. *Nature* **351**, 290-296.

EKLUND, A. 1997 The major histocompatibility complex and mating preferences in wild house mice. *Behavioral Ecology* **8**, 630-634.

FELLOUS, M., DAUSSET, J. 1970 Probable haploid expression of HLA antigens on human spermatozoon. *Nature, London*, **225**, 191-193.

GRAMMER, K., RIKOWSKI, A. 1999 Human body odor, symmetry and attractiveness. *Proc. R. Soc. Lond. B* **266**, 869-874.

HAAS, O.G., NAHHAS, F. 1986. Failure to identify HLA ABC and Dr antigens on human sperm. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.* **10**, 39—46.

HALIM, K., FESTENSTEIN, H. 1975. HLA-D on sperm is haploid, enabling use of sperm for HLA-D typing. *Lancet*, 1255-1256.

HALIM, K., WONG, D.M., MITTAL, K.K. 1982 The HLA typing of human spermatozoa by two color fluoresces. *Tissue Antigens*, **19**, 90–91.

HAMILTON, W. D. e ZUK, M. 1982 Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites? *Science* **218**, 384-387.

JACOB, S., MCCLINTOCK, M.K., ZELANO, B., OBER, C. 2002 Paternally inherited HLA alleles are associated with women's choice of male odor. *Nat. Genet.* **30**, 175– 179.

JUJI, T., IHARA, Y., AOKI, K., TOKUNAGA, K., TAKAHASHI, K. 2000 HLA and human mate choice: tests on Japanese couples *Anthropological Science* **108(2)**, 199-214.

KIRKPATRICK, M. 1982 Sexual selection and the evolution of female choice. *Evolution* **36**, 1–12.

KUHLMANN, D., DOHR, G., PUSCH, H., SCHERBAUM, W., SCHIEFERSTEIN, G., UCHANSKA-ZIEGLER, B. AND ZIEGLER, A. 1986. Absence of HLA class I and class II antigens as well as α 2-microglobulin from normal and pathological human spermatozoa. *Tissue Antigens* **27**, 179-184.

KURPISZ, M., FERNANDEZ, N., WITF, M., KOWALIK, I., SZYMCZYNSKI, G. A., FESTENSTEIN, H. 1987. HLA expression on human germinal cells. *J. Immunogen.* **14**, 23-32.

MAJERUS, M.E.N. 1986 The genetics and evolution of female choice. *Trends Ecol. Evol.* **1**, 1–7.

LANDRY, C., GARANT, D., DUCHESNE, P., BERNATCHEZ, L. 2001 "Good genes as heterozygosity": the major histocompatibility complex and mate choice in Atlantic salmon (*Salmo salar*) *Proc. Biol. Sci.* **268**, 1279-1285.

OBER, C., WEITKAMP, L., COX, N., DYTCH, H., KOSTYU, D., ELIAS, S. 1997 HLA and mate choice in humans. *Am J Hum Genet* **61**: 497–504.

OLSSON, M., MADSEN, T., NORDBY, J., WAPSTRA, E., UJVARI, B. 2003 Major histocompatibility complex and mate choice in sand lizards. *Proc. Biol. Sci.* **270**, 254-256.

PARKER, G.A. 1970 Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biological Reviews* **45**, 525–567.

PENN, D.J., POTTS, W.K. 1998 MHC-disassortative mating preferences reversed by cross-fostering. *Biological Sciences* **265**, 1299–1306.

PETRIE, M., ROBERTS, S.C., LITTLE, A.C., GOSLING, L.M., JONES, B.J., PERRETT, D.I., CARTER, V. 2005a MHC-assortative facial preferences in humans. *Bio. Lett.* **1**, 400-403.

PETRIE, M., ROBERTS, S.C., LITTLE, A.C., GOSLING, L.M., JONES, B.J., PERRETT, D.I., CARTER, V., PENTON-VOAK, I. 2005b MHC-heterozygosity and human facial attractiveness. *Evolution and human behavior* **26**, 213-226.

POTTS, W.K., MANNING, C.J., WAKELAND, E.K. 1994 The role of infectious disease, inbreeding and mating preferences in maintaining MHC genetic diversity; An experimental test. *Philos. Trans. R. Soc. London. [Biol.]* **346**, 369-378.

RICHARDSOM, D.S., KOMDEUR, J., BURKE, T., VON-SCHANTZ, T. 2005 MHC-based patterns of social and extra-pair mate choice in the *Seychelles warbler*. *Proc. Biol. Sci.* **272**, 759-767.

SANTOS, P.C., SCHINEMANN, J.A., GABARO, J., BICHALHO, M.G. 2004 New evidence on MHC-based disassortative odour preferences in humans: a study with 58 Brazilian students. *Hum Immunol* **65**: 108.

VANVALEN, L. 1973. A new evolutionary law. *Evol. Theory* **3**, 1–30.

WEDEKIND, C. 1994 Mate choice and maternal selection for specific parasite resistances before, during and after fertilization. *Phil.Trans. R. Soc. Lond. B* **346**, 303-311.

WEDEKIND, C., SEEBECK, T., BETTENS, F., PAEPKE, A. 1995 MHC-dependent mate preferences in humans. *Proceeding of the Royal Society of London Series B* **260**, 245–249.

WEDEKIND, C., CHAPUISAT, M., MACAS, E., RÜLICHE, T. 1996 Nonrandom fertilization in mice correlates with MHC and something else. *Heredity*, **77**, 400–409.

YAMAZAKI, K., BOYSE, E.A., MIKE, V., THALER, H.T., MATHIESON, B.J., ABBOTT, J., BOYSE, J., ZAYAS, Z.A. and THOMAS, L. 1976 Control of mating preferences in mice by genes in the major histocompatibility complex. *The Journal of Experimental Medicine*, **144**, 1324-1335.

YAMAZAKI, K., YAMAGUCHI, M., BOYSE, E. A. 1978 Mating preference tests with recombinant congenic strain BALB. HTG*. *Immunogenetics* **6**, 261–264.

YAMAZAKI, K., BEAUCHAMP, G.K., SINGER, A., BARD, J., BOYSE, E.A. 1999 Odortypes: their origin and composition. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* **96**, 1522-1525.

ZAHAVI, A. 1975 Mate selection - a selection for a handicap. *J. Theor. Biol.* **53**, 205-214.

8 ANEXO

8.1 Anexo 1

O processo usado para a busca dos casais reais dos Doadores Voluntários de Medula Óssea ocorreu em diferentes etapas, sendo o Programa Microsoft Excel juntamente com a organização de dados gerado pelo Sistema LIGH a ferramenta que facilitou esta busca. 1) Obtenção dos dados de todos os DVMO presentes no Sistema LIGH; 2) Organização dos cadastros de acordo com o endereço; 3) Tendo a informação dos indivíduos que moravam do mesmo endereço, selecionou-se aqueles com sobrenome parcialmente igual (Ex: homem: Carlos Cunha, mulher: Maria da Costa Cunha) ; 4) Pais e filhos eram facilmente percebidos e retirados da amostra por possuírem haploidenticidade e data de nascimento compatível com a paternidade (Ex. data de nascimento: 1965 e 1987, o primeiro poderia facilmente ser pai ou mãe do segundo, confirmando esta afirmação pela similaridade genotípica).

A razão para escolha somente dos indivíduos com similaridade parcial de sobrenome, deve-se ao fato da falta de informação para detecção do grau de parentesco, então aqueles indivíduos que possuíam o sobrenome totalmente idêntico eram descartados, uma vez que poderiam ser irmãos (independentemente se o genótipo apresentava similaridade ou não), caso estes indivíduos constituíssem um casal real, fato este que pode acontecer quando a mulher troca seu sobrenome pelo do marido, estes casais foram descartados erroneamente da presente amostra, como também foram descartados aqueles que não apresentavam similaridade alguma no sobrenome.

Com esta metodologia utilizada sabemos que muitos casais reais presentes no banco de DVMO não foram encontrados, no entanto podemos afirmar com alto grau de confiança que aqueles selecionados são realmente indivíduos casados, possibilitando assim a análise realizada no presente trabalho.

8.2 Anexo 2

Devido a importância dos genes HLA, nas questões de histocompatibilidade sabe-se bastante a respeito da estrutura e função das moléculas codificadas por estes genes. BJORKMAN *et al* (1987) foram os primeiros a obter a estrutura tridimensional de algumas destas moléculas, através de métodos de cristalização e difração de raios X.

Hoje nas etapas pré transplantes é procedimento padrão a verificação do perfil HLA da dupla doador-receptor, sendo que 100% de similaridade HLA é recomendada para a realização da maioria dos transplantes, uma vez que incompatibilidades HLA levam a maiores taxas de rejeição do enxerto pelo receptor. Um grande avanço nas pesquisas nesta área de transplantes foi a identificação de “*mismatches*” permissíveis. *Mismatches* é o nome dado as diferenças HLA entre dois indivíduos, os “*mismatches*” permissíveis são diferenças alélicas presentes no doador, que não são capazes de gerar rejeição do transplante no receptor. Uma ferramenta utilizada para a identificação de mismatches permissíveis é o programa HLA Matchmaker, este programa está disponível gratuitamente na internet, e usa como plataforma o programa Microsoft Excel. O HLA Matchmaker inicialmente usava para sua análise a comparação de tripletes das diferentes proteínas hla. Os tripletes são derivados de pequenas regiões lineares de três aminoácidos das regiões polimórficas da molécula (Figura I).

Os fundamentos do HLA Matchmaker são os seguintes princípios: 1) cada antígeno HLA representa uma sequência distinta de tripletes polimórficos que apresentam potencial imunogênico capaz de induzir a ação de aloanticorpos, (2) pacientes não geram anticorpos contra tripletes presentes em suas próprias moléculas de HLA. Desta forma a caracterização dos tripletes dos diferentes alelos permitiria uma identificação prévia do potencial imunogênico de um doador incompatível ao nível de alelo, mas que poderia apresentar poucos ou nenhum mismatch ao nível de tripletes. A análise de tripletes se mostrou muito relevante na prática dos transplantes, pois transplantes com 0 *mismatches* de tripletes tiveram mesma taxa de aceitação daqueles transplantes realizados com 0 *mismatches* ao nível de alelo. O algoritmo do programa permite que com apenas a adição do

genótipo do doador e do receptor, o programa retorne os *mismatches* de tripletes para aqueles genótipos (Esquema I).

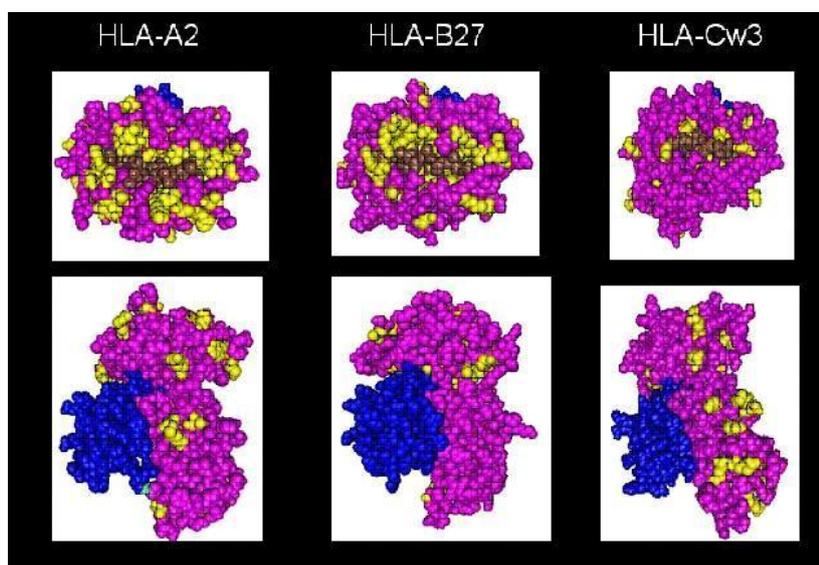


FIGURA I – ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DE MOLÉCULAS MHC DE CLASSE I

FONTE: http://www.hlamatchmaker.net/index.php?option=com_content&task=view&id=16&Itemid=2 acessado em 11 de novembro de 2009.

NOTA: Na primeira linha uma visão de cima da molécula, na segunda linha uma visão lateral. Em amarelo as regiões polimórficas, em azul a β 2-microcorulina.

HLA do Receptor	HLA do Doador	mmEp	Eplets
a*2402	a*2301	0
a*3101	a*3101	-
b*4001	b*4101	0
b*4402	b*4402	-

ESQUEMA I – REPRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NO HLA MATCHMAKER

FONTE: O autor (2009)

NOTA: Representação do resultado apresentado pelo HLA Matchmaker quando inserido os genótipos da dupla doador-receptor. Note que existe incompatibilidades alélicas (destacadas), no entanto não existe mismatches ao nível de eplets.

Com o maior conhecimento da estrutura tridimensional das proteínas codificadas pelos diferentes alelos HLA, e do padrão de reconhecimento na interação antígeno-anticorpo, foi adotado um novo algoritmo para o HLA Matchmaker, usando agora como instrumento de análise, os aminoácidos incluídos dentro de uma distância de 3,0 a 3,5 Angstroms (*eplets*) podendo estar em estrutura linear ou ligados após dobramentos da conformação terciária da proteína. Com este novo algoritmo um dado com maior precisão é obtido a respeito do potencial imunogênico de diferentes proteínas HLA.

