

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
**SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**CURSO DE BIOMEDICINA**  
**ANDRÉ EDUARDO DOS SANTOS**

VARIAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO MHC DE CLASSE I (HLA-A e HLA-B) EM  
CASAIS COM HISTÓRICO DE ABORTO E SUA RELAÇÃO COM A SELEÇÃO  
SEXUAL

CURITIBA  
2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
**SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**CURSO DE BIOMEDICINA**  
**ANDRÉ EDUARDO DOS SANTOS**

**AVALIAÇÃO DA VARIÇÃO DAS PROTEÍNAS DO MHC DE CLASSE I (HLA-A e  
HLA-B) EM CASAIS COM HISTÓRICO DE ABORTO E SUA RELAÇÃO COM A  
SELEÇÃO SEXUAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Universidade Federal do Paraná para a obtenção  
do título de Bacharel em Biomedicina e avaliação  
da disciplina TCC-II.

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

CURITIBA

2016

## RESUMO

O complexo principal de histocompatibilidade (MHC) é um conjunto de genes presente em todos os vertebrados que possui a função de expressar proteínas relacionadas com a resposta imunológica. Em seres humanos o MHC recebe o nome de antígeno leucocitário humano (HLA) e está localizado no braço curto do cromossomo 6. O sistema gênico HLA apresenta 3 regiões distintas (classe I, II e III) onde na classe I e II são expressas proteínas de superfície de membrana que possuem a função de apresentação dos peptídeos para as células T. Na região de classe III encontram-se genes que expressam proteínas relacionadas com a modulação da resposta imunológica. Além da importância na resposta imunológica, alguns pesquisadores descobriram evidências de que as proteínas do MHC poderiam influenciar na escolha sexual, uma vez que a variabilidade auxilia no sucesso reprodutivo. Por isso, o presente estudo buscou avaliar as diferenças quantitativas nas estruturas proteicas do MHC de classe I, com ênfase nos HLA-A e HLA-B, em casais com histórico de aborto. A avaliação foi realizada em duas etapas, sendo a primeira observando às diferenças de aminoácidos nas estruturas do MHC de classe I dos casais e a segunda as diferenças de epítomos. A análise de aminoácidos foi realizada por meio do banco de dados IMGT/HLA e a de epítomos pelo banco de dados EpVix. As análises estatísticas foram realizadas pelo software estatístico BioEstat 5.0, sendo usado o teste de normalidade D'Agostino e para avaliar o de variância a ANOVA de um critério. Dentre os resultados obtidos, não houve algum significativo, em desacordo com os dados apresentados pela literatura até o momento.

Palavras chave: MHC, HLA, escolha sexual.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	5
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	6
2.1 O Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) .....	6
2.2 Caracterizando melhor os genes HLA .....	8
2.3 Conhecendo melhor a estrutura e a função das proteínas HLA de Classe I e Classe II .....	9
2.4 A influência do MHC na escolha sexual .....	12
3. OBJETIVOS.....	13
3.1 Objetivo Geral .....	13
3.2 Objetivos Específicos.....	13
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	14
4.1 Composição da Amostra .....	14
4.2 Metodologia para análise das diferenças no número de aminoácidos e no número de epítomos HLA .....	14
4.3 Análise e alinhamento de sequências protéicas HLA pelo banco de dados IMGT/HLA .....	15
4.4 Análise das diferenças no número de epítomos pelo banco de dados EpVix... ..	17
4.5 Análise Estatística.....	20
5. RESULTADOS .....	20
5.1 Resultados das análises pelo banco de dados IMGT/HLA .....	20
5.2 Resultados das análises pelo banco de dados EpVix.....	22
6. DISCUSSÃO.....	24
7. CONCLUSÃO .....	25
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	26

## 1. INTRODUÇÃO

O termo complexo principal de histocompatibilidade (do inglês, *Major Histocompatibility Complex*), refere-se a um grupamento gênico situado no cromossoma 6. Por extensão, refere-se também às proteínas por eles codificadas que se expressam na membrana da maioria das células de um indivíduo cuja função é contribuir com a implementação da resposta imunológica.

Os genes que compõem o MHC estão presentes em todos os vertebrados e são polimórficos. Em humanos, os genes MHC de Classe I e II codificam proteínas fortemente imunogênicas e por essa razão são denominados antígenos leucocitários humano (HLA). Localizado no braço curto do cromossomo 6, o sistema gênico HLA apresenta 3 regiões distintas, referidas como HLA de classe I, HLA de classe II e HLA de Classe III, sendo que apenas os genes situados nas duas primeiras regiões codificam as proteínas HLA apresentadoras de antígenos para linfócitos T seja ou, sinalizando invasões virais ou neoplasias celulares para as células *Natural Killer*.

Os genes situados na região HLA de Classe III codificam para outras proteínas não apresentadoras de antígenos, mas que atuam na resposta imune ou em outras funções celulares não imunes.

Além de sua atuação na implementação da resposta imune, alguns pesquisadores apresentaram evidências de que genes do MHC, em diferentes espécies, atuariam também em características reprodutivas. Yamazaki (1976) e colaboradores foram os primeiros a verificar que o MHC influenciava na escolha do parceiro em murinos e diversos trabalhos posteriores apresentaram resultados que corroboravam sua hipótese de que parceiros MHC diferentes estavam preferencialmente se escolhendo para fins reprodutivos. Essas uniões gerariam, mais frequentemente, prole MHC heterozigota. Considerando-se a função das proteínas MHC I e II na resposta imune, a heterozigose na prole conferiria melhor desempenho imunológico e maiores chances de adaptação e sobrevivência quando confrontados com micro-organismos patogênicos que compartilhavam o mesmo habitat. Em humanos, alguns estudos realizados por Wedekin (1996) e outros pesquisadores corroboraram os achados de Yamazaki referentes à escolha pelo parceiro MHC diferente. Estudos adicionais forneceram evidências de mecanismos seletivos atuando sobre embriões MHC homozigotos, uma vez que foi observado que casais com o mesmo perfil HLA, eram mais propensos ao abortamento de

repetição. Esse insucesso reprodutivo resultaria da ausência de uma resposta imune materna de reconhecimento do embrião desencadeada pelos antígenos HLA paternos e considerada benéfica na etapa implantacional e referida por Wegmann como “inflamação ontogenética”. Dessa forma, o envolvimento das proteínas HLA e diferenças HLA entre a mãe e pai, seriam um primeiro sinal para o início de um processo de mudanças celulares e moleculares (citocinas, fatores de crescimento, fatores transcricionais) no endométrio materno que resultaria numa maior receptividade ao embrião e conseqüente sucesso gestacional.

No presente estudo o principal objetivo foi avaliar as diferenças/semelhanças HLA e o potencial imunogênico da dupla marido/mulher, fundamentados na hipótese da “inflamação ontogenética”. As diferenças HLA foram inferidas pela análise do número de aminoácidos e/ou epítomos presentes nas proteínas HLA-A e HLA-B compartilhados pela dupla marido e mulher, nas amostras pacientes e controles. Diferenças HLA (HLA-A e HLA-B), tendo como base diferenças na estrutura primária da proteína HLA poderia ser um instrumento adicional para inferir o potencial imunogênico entre ambos e contribuir para elucidar de que forma o perfil HLA dos parceiros influenciaria no sucesso reprodutivo.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 O Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC)**

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), do inglês *Major Histocompatibility Complex*, é uma região presente no genoma de todos os vertebrados. Destaca-se por apresentar um conjunto de genes polimórficos, em sua maioria responsáveis por codificar proteínas de superfície de membrana que atuam na resposta imune (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2012).

O MHC foi descoberto em 1940 por George Snell e colaboradores, que através do cruzamento com linhagens de camundongos endogâmicos, identificaram o *locus* responsável pela expressão de proteínas responsáveis pela rejeição dos enxertos de um camundongo para outro de linhagens diferentes. Em camundongos este *locus* fica no cromossomo 17 e recebeu o nome de H-2, significando histocompatibilidade-2, por influenciar a histocompatibilidade e também nomear o

antígeno correlato inicialmente detectado na membrana de leucócitos dessa espécie (HANSEN, CARRENO, SACHS, 1993; ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2012).

Atualmente já existem informações sobre a presença de uma região MHC homóloga em outros animais além dos camundongos e seres humanos, como bovinos, equinos, suínos, peixes, felinos, caninos, carneiros e outros primatas. Pela homologia e organização dos genes e também pela similaridade estrutural e funcional das proteínas MHC nas diferentes espécies, muitas vezes o nome atribuído ao MHC de uma certa espécie é substituído pelo termo genérico MHC (IMMUNO POLYMORPHISM DATABASE, 2015), o que é facilitador da integração e interpretação de informações moleculares e evolutivas referentes ao MHC.

O MHC humano recebeu o nome de Antígeno Leucocitário Humano (HLA), do inglês *Human Leucocyte Antigen* e está localizado no braço curto do cromossomo 6 (6p21.3). Sua caracterização se deu graças aos estudos de três pesquisadores: John van Rood, Rose Payne e Jean Dausset, na década de 50 do século passado. Em 1954, Dausset observou que em pacientes que haviam passado por um transplante renal ou por transfusões sanguíneas havia a formação de anticorpos contra os leucócitos dos doadores (DAUSSET, 1954; ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2012).

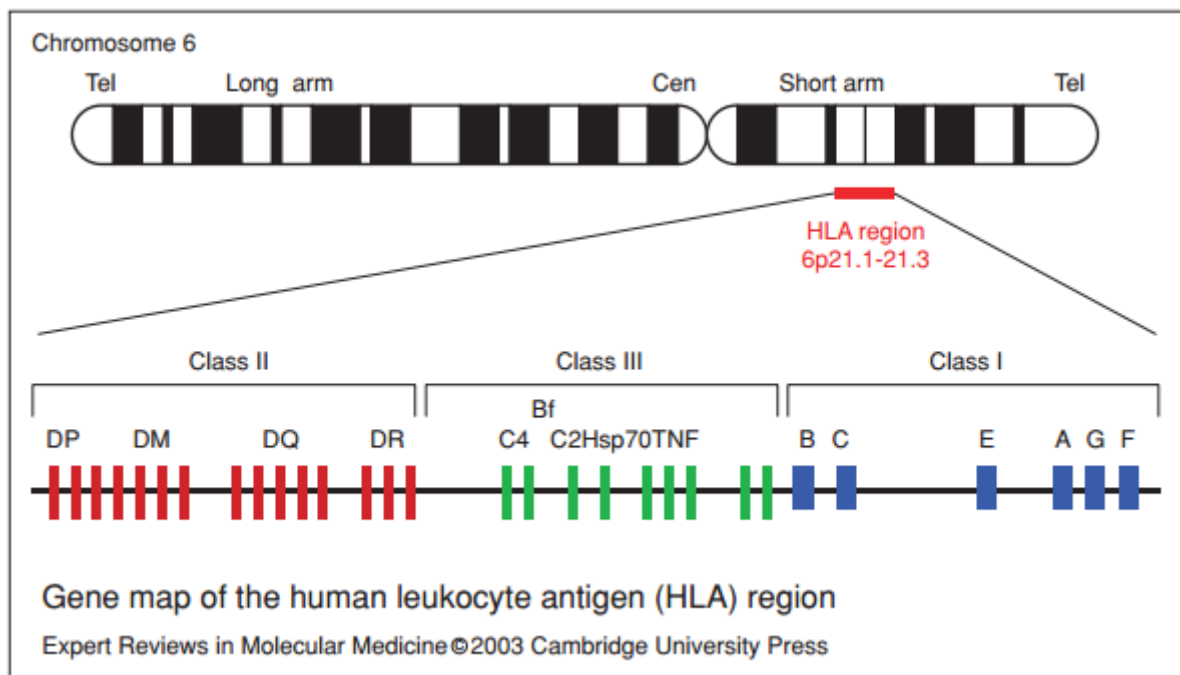
A região genômica onde situa-se o MHC humano (HLA) apresenta 3 grupamentos gênicos distribuídos ao longo de uma extensão de 4000kb e referidas como regiões HLA de classe I, HLA de classe II e HLA de Classe III. Apenas os genes situados nas duas primeiras regiões codificam as proteínas HLA apresentadoras de antígenos para linfócitos T CD8+ e CD4+. (Figura 1) (SHINNA, INOKO, KULSKI, 2004).

Algumas proteínas MHC de Classe I também sinalizam invasões virais ou neoplasias celulares para as células *Natural Killer*. Os genes situados na região HLA de Classe III codificam para outras proteínas não apresentadoras de antígenos mas que atuam na resposta imune ou em outras funções celulares não imunes. (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2012).

## 2.2 Caracterizando melhor os genes HLA

Na região HLA de Classe I situam-se os genes *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C*, referidos como clássicos e também aqueles não clássicos: *HLA-E*, *HLA-F* e *HLA-G*. Na região de HLA classe II situam-se os genes clássicos *HLA-DRA* e *HLA-DRB*, *HLA-DQA* e *HLA-DQB*, *HLA-DPA*, e *HLA-DPB1* e também aqueles referidos como não clássicos *HLA-DMA*, *HLA-DMB*, *HLA-DOA* e *HLA-DOB* (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2012. PETERSDORF, 2013. IMGT/HLA, 2015). Na região HLA de classe III localizada entre as regiões HLA de de classe I e II situam-se genes que codificam moléculas importantes na resposta imune, tais como, as proteínas ligadas ao sistema complemento e citocinas importantes, entre outras ( $LT\alpha$ ,  $LT\beta$  e TNF) (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2012).

Devido à densidade e proximidade dos genes situados na região HLA, algumas características são atribuídas a esse complexo gênico tais como, a herança em bloco, que determina a formação de haplótipos, de forma que a combinação de alelos HLA é herdada num mesmo cromossomo. Outra característica importante dos genes é que atuam em co-dominância (SHINNA, INOKO, KULSKI, 2004. ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2012).



**Figura 1:** Representação gráfica da localização do HLA no braço curto do cromossomo 6, suas três regiões e seus principais genes em cada região (MENRA, KAUR, 2003).

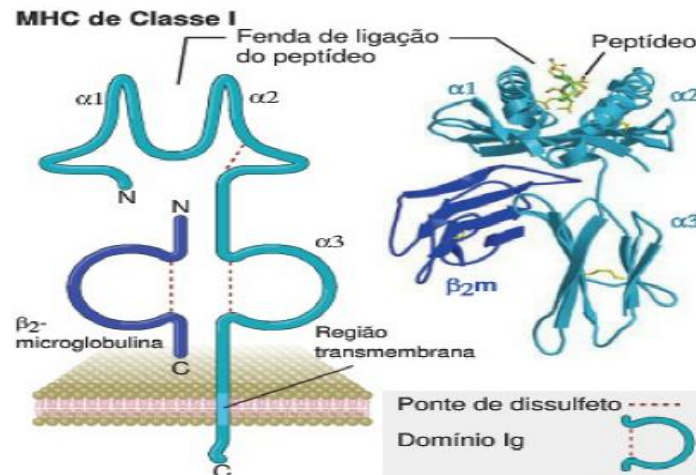
Os genes do HLA apresentam uma alta taxa de polimorfismos e um número expressivo de alelos, sendo que atualmente foram já registrados 13.840 alelos. Deste total, 10.297 referem-se aos genes HLA de classe I e 3.543 aos genes HLA de classe II (IMGT/HLA, 2015).

Dentre os genes da classe I, os genes clássicos (*HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C*) são os que apresentam o maior número de alelos, tendo sido registrados 3.285 alelos para o gene *HLA-A*, 4.077 alelos para o gene *HLA-B* e 2.801 alelos para o gene *HLA-C*. Dentre os genes HLA de Classe II, os genes clássicos também são os que apresentam o maior número de polimorfismos, o *HLA-DRB* com 1.932 alelos, o *HLA-DQB1* com 876 alelos e o *HLA-DPB1* com 587 alelos (IMGT/HLA, 2015).

A quantidade de proteínas resultantes da expressão dos genes clássicos de classe I são 7309. Sendo 2313 resultantes da expressão do *HLA-A*, 3011 do *HLA-B* e 1985 do *HLA-C*. Na classe II, o total de proteínas expressas pelos genes clássicos são 2487. Sendo 1412 resultantes da expressão do *HLA-DRB*, 595 do *HLA-DQB1* e 480 do *HLA-DPB1* (IMGT/HLA, 2015).

### **2.3 Conhecendo melhor a estrutura e a função das proteínas HLA de Classe I e Classe II**

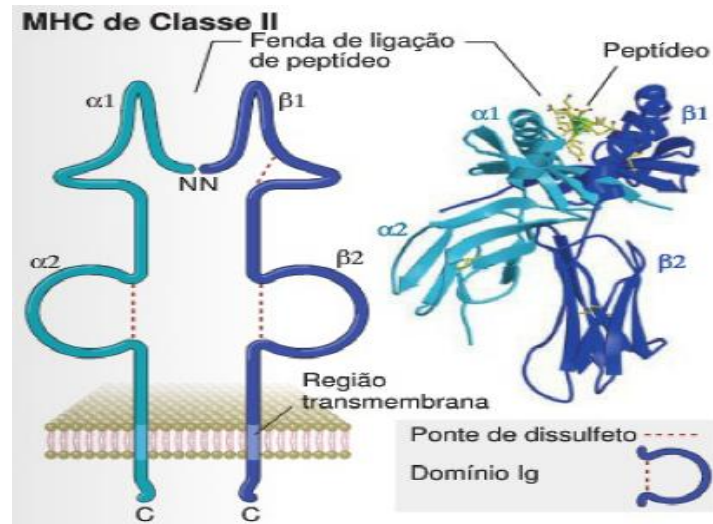
A proteína HLA de classe I é heterodimérica e sua estrutura conta com a colaboração de uma cadeia polipeptídica referida como cadeia pesada ou cadeia  $\alpha$ , que se associa com uma cadeia leve, a  $\beta$ 2-microglobulina. Na cadeia  $\alpha$ , destacam-se três módulos funcionais:  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 e  $\alpha$ 3 que resultam da expressão dos éxons 2, 3 e 4, respectivamente, dos genes MHC de Classe I. Os módulos  $\alpha$ 1 e  $\alpha$ 2 são responsáveis por formar a fenda de ligação ao peptídeo enquanto o módulo  $\alpha$ 3 associa-se com a  $\beta$ 2-microglobulina e estabelece conexão com a superfície de membrana (Figura 2). As proteínas HLA de Classe I são expressas em todas as células nucleadas e são responsáveis por apresentar peptídeos de proteínas estranhas de origem citosólica ou nuclear. (NEEFJES *et al*, 2011. ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2012).



**Figura 2:** Representação estrutural do MHC de classe I (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2012)

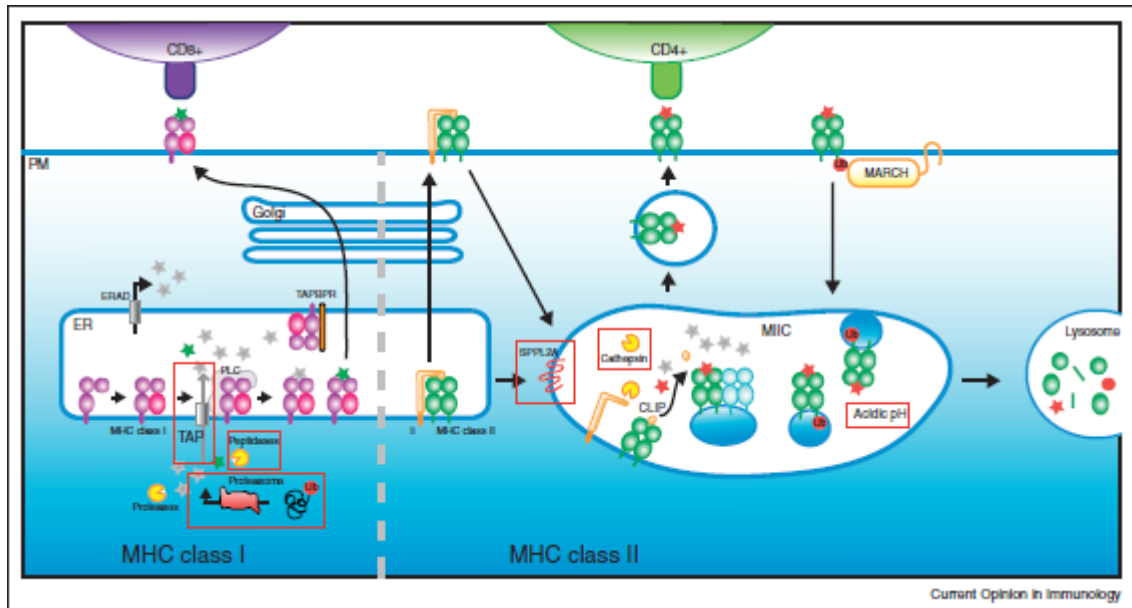
O mecanismo de apresentação de peptídeos envolvendo o MHC de classe I (Figura 4) inicia-se com a degradação do antígeno pelo proteossoma, estrutura de clivagem protéica presente no citoplasma celular. Em seguida os peptídeos são transportados para o lúmen do retículo endoplasmático através da proteína transportadora associada com a apresentação de antígenos (TAP). Dentro do retículo, o peptídeo se associa na fenda do complexo principal de histocompatibilidade. Ambos são transportados pela via do complexo de Golgi para a superfície celular e lá acontecerá a interação entre o MHC de classe I e o TCR do linfócito T CD8+ (NEEFJES *et al*, 2011. ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2012. KASTEREN *et al*, 2014).

A proteína HLA de classe II, também é heterodimétrica, composta por uma cadeia  $\alpha$  e outra cadeia  $\beta$ . A estrutura da proteína HLA de Classe II apesar das semelhanças com aquela de Classe I, organiza-se espacialmente com dois módulos em cada uma das cadeias polipeptídicas  $\alpha$  e  $\beta$ . Os módulos  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  e  $\beta 1$  e  $\beta 2$  resultam da expressão dos éxons 2 e 3, dos genes HLA de Classe II. Na proteína HLA, as regiões  $\alpha 1$  e  $\beta 1$  formam a fenda peptídica, enquanto as regiões  $\alpha 2$  e  $\beta 2$  são responsáveis pela conexão com a superfície de membrana (Figura 3). A proteína MHC de classe II é expressa somente nas células apresentadoras de antígenos (APCs) e a sua função é a apresentação de peptídeos com origem da degradação de proteínas extracelulares pela via endocítica (NEEFJES *et al*, 2011. ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2012).



**Figura 3:** Representação estrutural do MHC de classe II (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2012).

O mecanismo de apresentação de peptídeos pelo MHC de classe II (Figura 4) se inicia com a união dos dímeros  $\alpha$  e  $\beta$  e uma proteína associada de cadeia invariante no retículo endoplasmático. Essa proteína de cadeia invariante impede que o complexo se ligue a qualquer peptídeo. Uma vez pronto, o complexo é enviado até a superfície de membrana pela via do complexo de Golgi. A formação de endossomos ricos em MHC de classe dois recebe o nome de MIIC. Quando uma proteína extracelular é endocitada por uma MIIC, ela sofre com a ação de diversas proteases presentes na vesícula que as degradam. Essas enzimas proteolíticas também clivam a cadeia invariante deixando somente uma parte de 24 aminoácidos na fenda peptídica, denominado de cadeia peptídica invariante associada à classe II (CLIP). Para que o peptídeo do antígeno consiga ocupar a fenda peptídica, a chaperona HLA-DM remove a CLIP da fenda. O peptídeo do antígeno ocupa a fenda e o MHC de classe II com o peptídeo do antígeno é enviado a superfície de membrana onde acontecerá a interação com o TCR do linfócito T CD4+ (NEEFJES *et al*, 2011. ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2012. KASTEREN *et al*, 2014).



**Figura 4:** Representação dos mecanismos de apresentação de antígenos do MHC de classe I e do MHC de classe II (KASTEREN *et al*, 2014).

## 2.4 A influência do MHC na escolha sexual

Devido a sua presença em todos os vertebrados e a grande diversidade genética, o complexo principal de histocompatibilidade despertou a curiosidade de diversos pesquisadores como um possível influenciador para a escolha do parceiro sexual (JORDAN, BRUFORD, 1998. HAVLICEK, ROBERTS, 2009). O primeiro experimento relacionando a escolha sexual com o MHC foi realizado por Yamazaki e colaboradores (1976). Neste experimento foi evidenciado que o complexo H-2 em camundongos fornecia um odor individual e específico para cada animal e isso influenciava na escolha do parceiro sexual (YAMAZAKI *et al*, 1976). Outros estudos de comportamento mostraram a influência dos genes do MHC na formação de um odor característico e individual para cada roedor (YAMAZAKI *et al*, 1978. PENN, POTTS, 1998b.). Este odor teria a função de ajudar na discriminação individual entre camundongos, ratos e seres humanos (ALBERTS, OBER, 1993. JORDAN, BRUFORD, 1998. PENN, POTTS, 1998b).

A escolha do parceiro sexual é realizada pela fêmea e a busca é baseada na variabilidade genética. Machos heterozigotos para os genes do MHC são escolhidos com uma maior frequência do que os homozigotos (ZIEGLER, KENTENICH, UCHANSKA-ZIEGLER, 2005. CUTRERA, FANJUL, ZENUTO, 2012). A variabilidade do MHC influencia em uma melhor resposta imunológica, dessa forma, auxiliando na

resistência e combate contra parasitas e doenças (DRURY, 2010. CUTRERA, FANJUL, ZENUTO, 2012).

A importância da escolha sexual e a influência do MHC nesse comportamento englobam o sucesso reprodutivo (PIERTNEY, OLIVER, 2006. DRURY, 2010). Estudos relacionam a fertilização seletiva pelo MHC (WEDEKIND *et al*, 1996. WEDEKIND *et al*, 2004) e o aborto seletivo pelo MHC (ALBERTS, OBER, 1993). Os estudos verificaram que a escolha por uma combinação mais favorável dos alelos do MHC durante a fertilização, pode ser uma resposta adaptativa contra o combate de doenças (HAVLICEK, ROBERTS, 2009).

A variabilidade do MHC influencia no sucesso gestacional, uma vez que o sistema imune da mãe necessita reconhecer o perfil HLA paterno para que ocorra a implantação no endométrio. A inflamação oncogénica, assim chamada, é o resultado das mudanças moleculares e celulares ocasionadas pela diferença do perfil HLA materno e paterno. As mudanças variam desde fatores transcricionais, expressão de citocinas e fatores de crescimento, auxiliando na implantação do embrião e o sucesso da gestação (MORRISH, MILLER, 1998).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Comparar o perfil HLA (HLA-A e HLA-B) em casais com histórico de aborto de repetição e casais controle e investigar a influência do perfil HLA dos parceiros no sucesso reprodutivo.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

Estimar o número de aminoácidos diferentes presentes na estrutura da proteína HLA de Classe I e de Classe II quando da comparação de casais com histórico de aborto de repetição e casais controle usando informações do banco de dados IMGT/HLA

Estimar o número de epítomos diferentes presentes na estrutura da proteína HLA de Classe I e quando da comparação de casais com histórico de aborto de repetição e casais controle usando informações do banco de dados EpVix.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Composição da Amostra

Cinquenta e seis (56) casais pacientes, referidos como euro-brasileiros (filhos ou netos de pais/avós com ancestralidade europeia-) e com histórico de pelo menos dois abortos de etiologia desconhecida. Como grupo controle, participaram 45 casais pertencentes ao mesmo grupo étnico, sociocultural e que apresentaram pelo menos duas gestações com sucesso.

O número de casais paciente e controle na análise das diferenças de aminoácidos não foi o mesmo para todas as comparações individuais HLA-A, HLA-B e análise conjunta HLA-A e HLA-B devido à existência de ambiguidades na tipagem HLA-A ou HLA-B de um dos membros do casal, conforme quadro abaixo:

<b>Quadro (n) amostral</b>	<b>Casais pacientes</b>	<b>Casais controles</b>
HLA-A	56	43
HLA-B	58	43
HLA-A + HLA-B	55	39

O número de casais paciente e controle utilizados na análise de epítomos pelo banco de dados EpVix apresentou um (n) amostral de 45 casais pacientes e 33 casais controle. O tamanho reduzido deve-se a falta da tipagem HLA-DR em alguns casais e ela se faz necessária para o cruzamento de dados pelo banco de dados EpVix.

### 4.2 Metodologia para análise das diferenças no número de aminoácidos e no número de epítomos HLA

Os dados da tipagem sorológica HLA de casais paciente e controle foram obtidos da tese de doutorado de Bicalho, M.G. (2002). Esses dados foram

posteriormente convertidos para classificação grupo alélica tendo como referência o alelo *HLA* mais frequente que correspondia à tipagem HLA-A e HLA-B de cada indivíduo da amostra.

#### 4.3 Análise e alinhamento de sequências protéicas HLA pelo banco de dados IMGT/HLA

Foram montadas duas tabelas no programa de software Excel, sendo uma delas para comparar respectivamente as tipagens HLA-A e HLA-B entre o casal. Isso permitiu a visualização do número de aminoácidos diferentes entre ambos que pode ser visualizado na tabela 1.

	A	B	C	D	E	F
1	Tabela HLA-A	Pacientes				
2	Casais	a.a. diferentes	a.a. diferentes	a.a. diferentes	a.a. diferentes	Média
3	01P	A*30 x A*01	A*30 x A*02	A*31 x A*01	A*31 x A*02	-
4	01P	21	18	20	16	18,75
5	02P	A*01 x A*02	A*01 x A*33	A*02 x A*02	A*02 x A*33	-
6	02P	24	22	0	17	15,75

**Tabela 1:** Modelo da tabela contendo a tipagem HLA-A da mulher e do marido bem como o número de aminoácidos diferentes inferidos da tipagem HLA –A do casal. A tipagem HLA-A que precede o “x” sempre é o da mulher sendo que a posterior é a do homem.

Após essa etapa o banco de dados do IMGT/HLA foi acessado (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>). No *menu* do site clicou-se em *Alignments* e que direcionava para a seguinte seção, onde foi possível comparar as sequências das proteínas codificadas pelos diferentes alelos HLA-A e HLA-B.

No primeiro passo selecionava-se qual *locus* seria utilizado (A ou B) e no recurso para alinhamento selecionava-se o item *Protein – Full Length Protein* (Proteína – Proteína completa). O segundo passo requer a inserção da sequência referência (no caso, o grupo alélico da tipagem HLA da mulher) seguindo-se com a inserção da sequência a ser comparada (o grupo alélico referente à tipagem HLA do homem). Por fim, clicava-se em *Align Sequence Now* (Alinhe a sequência agora). A figura 5 mostra todos os passos.

**STEP 1 - Select the gene and feature to align**

Select Locus:  and select the features to align:

**STEP 2 - Select sequences and reference**

Enter the required reference sequence:

Enter any specific sequences required (separated by a new line or a comma):

Tick the box for exact matches only (i.e. 02:10 does not match 02:100)

**STEP 3 - Select how you view the alignment**

Select how you wish to view any mismatches:

Select how the alignment will be numbered:

Omit alleles unsequenced for this region:

Select type of output:

**STEP 4 - Proceed with the alignment**

**Figura 5:** Visualização de como fica o preenchimento para o acesso ao alinhamento no banco de dados. Na figura foi utilizado a comparação do HLA-A\*30:01:01 da mulher com o HLA\*01:01:01:01 do homem.

Com o alinhamento das sequências proteicas podia-se visualizar e contar o número de aminoácidos diferentes entre elas. A contagem era iniciada a partir do aminoácido referido como 1 até o de número 182. Essa sequência de aminoácidos na estrutura primária da proteína resulta da expressão dos éxons 2 e 3 do gene HLA de classe I e, também são os responsáveis por constituir os módulos  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  da molécula do MHC de classe I. É nessa região que se observa a maior diversidade individual entre as diferentes proteínas HLA de Classe I. Na figura 6 temos um exemplo de alinhamento entre duas sequências, com as diferenças de aminoácidos nas respectivas estruturas proteicas.



1. Acesso ao site e criação do perfil da mulher do casal. Clica-se em *Recipients* (Receptor) e em seguida em *New Recipient* (Novo Receptor). *Obs: A mulher foi escolhida como “receptor”, porque na gestação ela é o equivalente ao receptor de tecidos ou órgão no transplante, ou seja, ela abrigará o alo-enxerto fetal (embrião) que expressa os antígenos HLA paternos, durante o período gestacional.*
2. . Para criar o perfil do homem clica-se em *Donors* (Doador) e em seguida *New Donor* (Novo Doador).

Após criação dos perfis Receptor/Doador , clica-se em HLA, *New HLA (recipients and donors)* e *Search*. Nessa página seleciona-se o perfil da mulher recém-criada clicando em *Select*. A figura 7 mostra o local.

New HLA (recipients and donors)

Identifier, Name... [Q Search](#)

Records found: 89

IDENTIFIER	NAME	CREATED AT	ACTIONS
HOMEM EX	HOMEM EX	01/14/2016 16:57	<a href="#">Select</a>
MULHER EX	MULHER EX	01/14/2016 16:56	<a href="#">Select</a>

**Figura 7:** Página de cadastro para os HLAs nos perfis do software EpVix.

Depois de clicado você chega na página para o cadastro HLA. Neste momento você preenche os *loci* A, B e DR com as tipagens da mulher do casal (Figura 8). Clica-se em *Next*, confere se o preenchimento está correto e se clica em *Confirm*. O mesmo procedimento deve ser realizado com o perfil do homem, com a diferença que no momento do preenchimento dos *loci* se utiliza os HLAs masculinos do mesmo casal utilizada no cadastro da mulher.

Original resolution HLA

A-30:01	A-31:01
B-35:01	B-35:01
CW	CW
DRB1-11	DRB1-08

**Figura 8:** Exemplo do preenchimento dos *loci* A, B e DR.

Uma vez o cadastro de HLA realizado, clica-se em *Crossmatches*, *Perform Crossmatch* e *Search*. Procura-se o perfil do homem do casal a ser avaliado e o seleciona. A seção seguinte de *Perform Crossmatch* é aberta e neste momento que é selecionado o perfil da mulher do casal a ser avaliado. Se confirma o casal e o *Crossmatch* é executado. Como os resultados de interesse são apenas os *Mismatches* dos *loci* A e B, apenas esses dois são anotados em uma tabela no software Excel. A figura 9 mostra um exemplo de como ficam os resultados no banco de dados Epvix.

Mismatches by loci	
<b>HLA HOMEM EX (Donor) Inf.:</b> A*01:01, A*02:01, B*44:02, B*51:01, DRB1*13:01, DRB1*07:01, DRB3*01:01, DRB4*01:01, DQA1*01:03, DQA1*02:01, DQB1*06:03, DQB1*02:02	
<b>HLA MULHER (Recipient) Inf.:</b> A*01:01, A*11:01, B*08:01, B*27:01, DRB1*15:01, DRB1*07:01, DRB4*01:01, DRB5*01:01, DQA1*01:02, DQA1*02:01, DQB1*06:02, DQB1*02:02	
<b>A</b> 27	62GE, 62GK <sub>2</sub> , 63EK, 65RK, 66K, 66KA, 66KAH, 94TV, 97R, 105S, 107W, 113YH, 116Y, 127K, 144TKH, 145KHA, 151AHV, 152V, 156L, 156LA, 163T, 163TEW, 184A, 193AV, 194V, 207S, 253Q
<b>B</b> 30	9Y, 41T, 45KE, 66IS, 71TTN, 94II, 97R, 113YD, 162GLS, 163L, 163LE, 166ES, 199V, 44RT, 44RT+69TNT, 76ENI, 80I, 80I+152RE, 80I+65QI, 80I+90A, 94TW, 97T, 131S+163LW, 152E, 152RE, 163LW, 163LW+65QI, 170RH, 193PV, 194V

**Figura 9:** Resultados dos *Mismatches* nos *loci* A e B no banco de dados do EpVix.

## 4.5 Análise Estatística

Para a análise estatística foi utilizado o teste D'Agostino para verificar a normalidade e para verificar a hipótese alternativa foi utilizado o teste estatístico de variância ANOVA de um critério.

A Hipótese Nula é a de que os casais pacientes e casais controles não tenham uma variação quantitativa de aminoácidos e epítomos em suas estruturas. A Hipótese Alternativa é a de que os casais pacientes apresentam uma menor variabilidade quantitativa de aminoácidos e epítomos nas estruturas dos seus complexos principal de histocompatibilidade de classe I.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Resultados das análises pelo banco de dados IMGT/HLA

Os resultados aritméticos podem ser observados na tabela 2.

Resumo	Pacientes_A	Pacientes_B	Pacientes-Total	Controle_A	Controle_B	Controle_Total
Tamanho da amostra =	56	58	55	43	43	39
Mínimo	0	9,25	17	0	6	16
Máximo	25	24	44	23,5	30	46,5
Amplitude Total	25	14,75	27	23,5	24	30,5
Mediana	15,375	16,25	32,75	15,5	17	33,75
Primeiro Quartil (25%)	13,1875	14,5	28,5	12,25	14,375	28,375
Terceiro Quartil (75%)	18,75	18,75	35,25	18,125	19,5	36,625
Desvio Interquartilico	5,5625	4,25	6,75	5,875	5,125	8,25
Média Aritmética	15,3884	16,6595	32,2818	15,0407	17,0058	32,7372
Variância	21,4521	10,3042	29,4075	21,4432	22,3526	56,4308
Desvio Padrão	4,6316	3,21	5,4229	4,6307	4,7279	7,512
Erro Padrão	0,6189	0,4215	0,7312	0,7062	0,721	1,2029
Coeficiente de Variação	30,10%	19,27%	16,80%	30,79%	27,80%	22,95%
Assimetria (g1)	-0,6432	0,3627	-0,2864	-0,7813	0,2588	-0,2947
Curtose (g2)	1,1504	-0,0478	0,2664	1,3888	0,7025	-0,1893
Média Harmônica =	14,366	16,0502	31,2723	14,1714	15,5168	30,7537
N (média harmônica) =	55	58	55	42	43	39
Média Geométrica =	15,0581	16,3561	31,8001	14,8223	16,3115	31,8017
N (média geométrica) =	55	58	55	42	43	39
Variância (geom.) =	1,039	1,0166	1,0141	1,0375	1,0411	1,0282
Desvio Padrão (geom.) =	1,3455	1,2149	1,1967	1,3379	1,3558	1,2879

**Tabela 2:** Resultados aritméticos das amostras utilizadas na análise de aminoácidos.

Os resultados de normalidade obtidos pelo teste estatístico de D'Agostino podem ser visualizados na tabela 3.

Normalidade D'Agostino	Pacientes_A	Pacientes_B	Pacientes-Total	Controle_A	Controle_B	Controle_Total
Resultados	Coluna 1	Coluna 2	Coluna 3	Coluna 4	Coluna 5	Coluna 6
Tamanho da amostra =	56	58	55	43	43	39
D (Desvio) =	0,2754	0,2799	0,2791	0,2747	0,2761	0,2808
Valores críticos 5%	0.2712 a 0.2866	0.2715 a 0.2866	0.2711 a 0.2866	0.2693 a 0.2867	0.2693 a 0.2867	0.2686 a 0.2867
Valores críticos 1%	0.2666 a 0.2874	0.2669 a 0.2874	0.2664 a 0.2874	0.2639 a 0.2874	0.2639 a 0.2874	0.2627 a 0.2874
p =	ns	ns	ns	ns	ns	ns

**Tabela 3:** Resultados obtidos pelo teste estatístico de D'Agostino através do software BioEstat 5.0.

Os resultados obtidos pelo teste de variância ANOVA de um critério para os casais de pacientes e controle HLA-A, HLA-B e Total podem ser visualizados nas tabelas 4, 5 e 6, respectivamente.

Anova para A			
FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	1	2,94	2,94
Erro	97	20.8 e+02	21,448
F =	0,1371		
(p) =	0,7132		

**Tabela 4:** ANOVA de um critério para a variabilidade de aminoácidos entre casais pacientes e controle no HLA-A.

Anova para B			
FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	1	2,962	2,962
Erro	99	15.3 e+02	15,416
F =	0,1921		
(p) =	0,6663		

**Tabela 5:** ANOVA de um critério para a variabilidade de aminoácidos entre casais pacientes e controle no HLA-B.

Anova para Total			
FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	1	4,732	4,732
Erro	92	37.3 e+02	40,569
F =	0,1166		
(p) =	0,7333		

**Tabela 6:** ANOVA de um critério para a variabilidade de aminoácidos total (HLA-A e HLA-B) entre casais pacientes e controle.

## 5.2 Resultados das análises pelo banco de dados EpVix

Os dados aritméticos podem ser visualizados na tabela 7.

Resumo	Pacientes_A	Pacientes_B	Pacientes_Total	Controle_A	Controle_B	Controle_Total
Tamanho da amostra =	45	45	45	33	33	33
Mínimo	0	0	15	0	0	0
Máximo	57	52	92	57	55	105
Amplitude Total	57	52	77	57	55	105
Mediana	26	22	48	27	26	53
Primeiro Quartil (25%)	17	16	37	17	18	35
Terceiro Quartil (75%)	33	33	61	34	31	65
Desvio Interquartilico	16	17	24	17	13	30
Média Aritmética	26,2444	24,0222	50,2667	24,7273	25,9394	50,6667
Variância	168,2798	144,204	350,7455	221,3295	185,4337	521,3542
Desvio Padrão	12,9723	12,0085	18,7282	14,8771	13,6174	22,8332
Erro Padrão	1,9338	1,7901	2,7918	2,5898	2,3705	3,9747
Coeficiente de Variação	49,43%	49,99%	37,26%	60,16%	52,50%	45,07%
Assimetria (g1)	-0,0529	0,4526	0,2665	-0,2178	0,2981	-0,1644
Curtose (g2)	-0,0905	-0,0954	-0,4716	-0,4607	-0,0462	0,4314
Média Harmônica =	23,2466	18,5602	42,5123	22,8034	16,54	27,3387
N (média harmônica) =	42	44	45	28	32	32
Média Geométrica =	25,7575	21,7436	46,5656	26,5037	22,836	45,3895
N (média geométrica) =	42	44	45	28	32	32
Variância (geom.) =	1,0888	1,1301	1,0771	1,1105	1,2102	1,2306
Desvio Padrão (geom.) =	1,5569	1,7002	1,5123	1,6344	1,9402	1,9961

**Tabela 7:** Resultados aritméticos das amostras utilizadas na análise de epítotos.

Os resultados de normalidade obtidos pelo teste estatístico de D'Agostino podem ser visualizados na tabela 8.

Normalidade D'Agostino	Pacientes_A	Pacientes_B	Pacientes_Total	Controle_A	Controle_B	Controle_Total
Resultados	Coluna 1	Coluna 2	Coluna 3	Coluna 4	Coluna 5	Coluna 6
Tamanho da amostra =	45	45	45	33	33	33
D (Desvio) =	0,2817	0,2803	0,2838	0,2816	0,2795	0,2772
Valores críticos 5%	0.2697 a 0.2867	0.2697 a 0.2867	0.2697 a 0.2867	0.2671 a 0.2867	0.2671 a 0.2867	0.2671 a 0.2867
Valores críticos 1%	0.2644 a 0.2874	0.2644 a 0.2874	0.2644 a 0.2874	0.2605 a 0.2873	0.2605 a 0.2873	0.2605 a 0.2873
p =	ns	ns	ns	ns	ns	ns

**Tabela 8:** Resultados obtidos pelo teste estatístico de D'Agostino através do software BioEstat 5.0.

Os resultados obtidos pelo teste de variância ANOVA de um critério para os casais de pacientes e controle HLA-A, HLA-B e Total podem ser visualizados nas tabelas 9, 10 e 11, respectivamente.

<b>Anova A um critério</b>			
FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	1	43,823	43,823
Erro	76	14.5 e+03	190,617
F =	0,2299		
(p) =	0,6384		

**Tabela 9:** ANOVA de um critério para a variabilidade de epítomos entre casais pacientes e controle no HLA-A.

<b>Anova B um critério</b>			
FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	1	69,977	69,977
Erro	76	12.3 e+03	161,564
F =	0,4331		
(p) =	0,5195		

**Tabela 10:** ANOVA de um critério para a variabilidade de epítomos entre casais pacientes e controle no HLA-B.

<b>Anova Total um critério</b>			
FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	1	3,046	3,046
Erro	76	32.1 e+03	422,581
F =	0,0072		
(p) =	0,9302		

**Tabela 11:** ANOVA de um critério para a variabilidade de epítomos total entre casais pacientes e controle.

## 6. DISCUSSÃO

Segundo os resultados de normalidade apresentados pela análise estatística de D'Agostino (Tabelas 3 e 8), toda a amostragem se apresentou em uma distribuição normal. Desse modo, a abordagem em utilizar um teste paramétrico de variância se demonstrou possível.

Realizando o teste de variância ANOVA de um critério, verificou-se em todas as análises, tanto de aminoácidos pelo IMGT/HLA (Tabelas 4, 5 e 6) como de epítomos pelo EpVix (Tabelas 9, 10 e 11), que não houve resultados significativos. Vale destacar o (p) obtido na análise de epítomos pelo EpVix da somatória total, onde o valor de (p) fica igual a 0,9302. Um valor que podemos considerar que ambas as curvas (casais pacientes e controle) são apenas uma única.

Tais resultados entrando em divergência com outros trabalhos já citados (Ref) e com os resultados encontrados por SILVA, 2009. SILVA, em seu trabalho INFLUÊNCIA DOS GENES DO MHC NA SELEÇÃO SEXUAL EM HUMANOS, realizou análises comparando somente os grupos alélicos dos casais. Dentre os resultados apresentados, ele verificou que a variabilidade do MHC corroborava para a escolha sexual. Neste presente estudo comparamos os aminoácidos na estrutura primária das proteínas do MHC dos casais e os epítomos dessas proteínas, que são análises mais específicas.

A divergência pode ser resultado da análise quantitativa do estudo. Uma vez que só foi avaliada a quantidade de aminoácidos e epítomos que variaram na estrutura proteica do MHC de classe I. Experimentos qualitativos, que possam avaliar a natureza de cada aminoácido diferente, assim como quais epítomos que variam podem nos fornecer dados que corroborem a ideia da influência do MHC na escolha sexual.

Outro fator que pode ter influenciado os dados foi à conversão da tipagem sorológica para o grupo alélico e grupo da proteína HLA específica. Uma vez que o grupo de proteínas HLA específicas assumido era o mais frequente na população e não aquele que realmente poderia ser o casal. Uma genotipagem em alta resolução para *HLA-A* e *HLA-B* nos casais poderiam solucionar essas ambiguidades e tornariam a análise quantitativa mais condizente com a realidade.

## 7. CONCLUSÃO

Uma vez que os genes do complexo principal de histocompatibilidade estão presentes em todos os vertebrados e apresentam uma enorme quantidade de polimorfismos, os mesmos começaram a ser estudados para verificar se eles poderiam influenciar em algum momento da evolução dos seres. Muitos trabalhos evidenciaram a relação da variabilidade do MHC com a escolha sexual. Porém, este presente trabalho apresentou resultados negativos a respeito da influência do MHC na escolha sexual em parceiros com histórico de aborto.

As divergências podem ser de duas naturezas. Uma da opção de um único estudo quantitativo dos aminoácidos e epítomos da estrutura proteica do MHC de classe I. Um estudo qualitativo, avaliando a natureza de cada aminoácido e epítomo podem gerar dados que corroborem a ideia da influência do MHC na escolha sexual. A segunda natureza pode ser a forma como os dados foram obtidos. Uma vez que a conversão da tipagem sorológica para os grupos alélicos e de proteínas HLA específicas foi baseado em frequências populacionais.

Como perspectiva futura, uma nova análise utilizando resultados de tipagens moleculares em alta resolução dos genes *HLA-A* e *HLA-B*, que forneceria com um alto grau de precisão as diferenças entre os aminoácidos e epítomos nos casais. Além de utilizar uma análise qualitativa, onde mostraria a natureza de cada aminoácido e epítomo na estrutura, podendo mostrar se ele é relevante ou não na conformação da proteína ou para o reconhecimento pelo organismo materno. Essas análises qualitativas juntamente com dados quantitativos representariam de forma mais fiel o que realmente acontece no meio biológico.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. Editora **Elsevier**, 7 ed., 2012.

ALBERTS, S.C.; OBER, C. Genetic variability of the MHC: A review of non-pathogen-mediated selective mechanisms. **Yb. Phys. Anthropol.** v.36, p.71-89, 1993.

CARDOSO JR, R.A. *et al.* EPVIX – Innovative free software to perform epitope virtual crossmatch. Implementation and validation in a state of Brazil. **Human Immunology**. Ed 76, p. 1–37, 2015.

CUTRERA, A.P.; FANJUL, M.S.; ZENUTO, R.R. Females prefer good genes: MHC associated mate choice in wild and captive tuco-tucos. **Animal Behaviour**. v.83, p.847-856, 2012.

DAUSSET, J. Leuco agglutinins and blood transfusion. **Vox sanguinis**, Oxford, v. 4, p. 190-194, 1954.

DRURY, J.P. Immunity and mate choice: a new outlook. **Animal Behaviour**. v.79, p.539–545, 2010.

HANSEN T. H.; CARRENO, B. M.; SACHS, D. H. The Major Histocompatibility Complex. In: WE, P. (Ed). **Fundamental Immunology**. Ed. 3, p. 577-628, 1993.

HAVLICEK, J.; ROBERTS, S.C. MHC-correlated mate choice in humans: A review. **Psychoneuroendocrinology**. v.34, p.497—512, 2009.

IMUNNOGENETIC DATABASE (IMGT-HLA). Statistics. 2015. Disponível em: <<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html>>. Acessado em: 11/12/2015.

IMMUNO POLYMORPHISM DATABASE. IPD-MHC Groups. 2015. Disponível em: <<https://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/>>. Acessado em: 11/12/2015.

JORDAN, W.C.; BRUFORD, M.W. New perspectives on mate choice and the MHC. **Heredity**. v. 81, p. 127-133, 1998.

KASTEREN, S.I. *et al.* Chemical biology of antigen presentation by MHC molecules. **Current Opinion in Immunology**. Ed 26, p. 21-31, 2014.

MEHRA, N.K.; KAUR, G. Gene map of the human leukocyte antigen (HLA) region. **Expert Reviews in Molecular Medicine**. Cambridge. 2003.

MORRISH, D.; MILLER, R.K. Genetic Regulation of Placental Development and Immunology. **Trophoblast Research**. v.11, 1998.

NEEFJES, J. *et al.* Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. **Nature Reviews: Immunology**. v.11, p. 823-836, 2011.

PENN, D.; POTTS, W. How do major histocompatibility complex genes influence odor and mating preferences? **Advances in Immunology**. v. 69, p. 411-435, 1998b.

PETERSDORF, E.W. Genetics of graft-versus-host disease: The major histocompatibility complex. **Blood Reviews**. Ed.27, p.1–12, 2013.

PIERTNEY, S.B.; OLIVER, M.K. The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. **Heredity**. v.96, p.7–21, 2006.

SILVA, J.S. Influência dos genes MHC na seleção sexual em humanos. 2009. Disponível em: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br:8080/dspace/bitstream/handle/1884/30224/Monografia%20Jose%20Samuel%20da%20Silva.pdf?sequence=1>>. Acessado em: 15/01/2016.

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

WEDEKIND, C. *et al.* Non-random fertilization in mice correlates with the MHC and something else. **Heredity**. v.77, p.400—409, 1996.

WEDEKIND, C. *et al.* MHC-linked susceptibility to a bacterial infection, but no MHC-linked cryptic female choice in whitefish. **J. Evol. Biol.** v.17, p.11-18, 2004.

YAMAZAKI, K. *et al.* Control of mating preferences in mice by genes in the major histocompatibility complex. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 144, 1976.

YAMAZAKI, K. *et al.* Mating preferences of F2 segregants of crosses between MHC-congenic mouse strains. **Immunogenetic**. v. 6, p.253-259, 1978.

ZIEGLER, A.; KENTENICH, H.; UCHANSKA-ZIEGLER, B. Female choice and the MHC. **TRENDS in Immunology**. v.26, n.9, p.496-502, 2005.

