

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FABIOLA DA SILVA NARDI

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE *HLA-G*, *HLA-E*, *MICA* E
A EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS *HLA-G/E*, *MICA/B* E *ULBP-2* SOLÚVEIS TOTAIS
E CARREADAS POR VESÍCULAS EXTRACELULARES EM CASOS DE FALHA DE
IMPLANTAÇÃO EMBRIONÁRIA E CONTROLES FÉRTEIS**

**CURITIBA
2016**

FABIOLA DA SILVA NARDI

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE *HLA-G*, *HLA-E* E *MICA* E A
EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS *HLA-G/E*, *MICA/B* E *ULBP-2* SOLÚVEIS TOTAIS
E CARREADAS POR VESÍCULAS EXTRACELULARES EM CASOS DE FALHA
DE IMPLANTAÇÃO EMBRIONÁRIA E CONTROLES FÉRTEIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética, Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Genética.

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

**CURITIBA
2016**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA




PARECER

Os abaixo-assinados, membros da banca examinadora da defesa de tese de doutorado, a qual se submeteu FABÍOLA DA SILVA NARDI, para obtenção do título de doutora em genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se aprove a candidata. Secretária da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 27 de abril de 2016


Doutora Sueli Donizete Borelli
Universidade Estadual de Maringá - Membro Titular



Doutor Newton Sérgio de Carvalho
Hospital de Clínicas/Universidade Federal do Paraná – Membro Titular


Doutora Maria Luiza Petzl-Erler
Universidade Federal do Paraná – Membro Titular


Doutor Rodrigo Coutinho de Almeida
Universidade Federal do Paraná – Membro Titular


Doutora Maria da Graça Bicalho
Universidade Federal do Paraná – Orientadora e Presidente da Banca

Visto


Professora Doutora Ana Claudia Bonatto
Vice-Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética

“O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém.”

Dalai Lama

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente à Prof. Dra. Maria da Graça Bicalho por sua orientação, empatia, disposição e apoio em todas as minhas decisões durante a realização deste projeto.

Agradeço muito também à minha orientadora na Alemanha, Dra. Vera Rebmann, que me apoiou muito durante todo o processo do meu doutorado sanduíche e a minha amiga Bettina Wagner, que me auxiliou muito em todas as etapas de adaptação no exterior, tanto em nível social quanto em nível técnico.

Ao Dr. Jorge Neumann e Dra. Tatiana Michelon, do Centro de Imunologia da Reprodução, por cederem as amostras, sem as quais este trabalho não existiria e pela parceria e contribuição durante toda a minha caminhada acadêmica.

Aos membros da equipe LIGH, pelo auxílio técnico durante as diversas etapas deste estudo e, especialmente à minha amiga Gorete pelo auxílio na coleta de material dos casais controle.

Às minhas colegas e amigas Renata Slowik e Geórgia Fernanda Gelmini que me auxiliaram em diversas etapas deste estudo.

Aos meus amigos do *Institut für Transfusionsmedizin Essen*, obrigada pelo carinho, colaboração, e principalmente pela amizade, tornando minha vivência na Alemanha inesquecível.

Aos Professores presentes na Banca de Avaliação da Tese. Obrigada por aceitarem fazer parte desta etapa de minha carreira profissional.

À minha grande amiga Symone Vitoriano da Conceição Castro, que sempre esteve do meu lado nos momentos mais difíceis e felizes desta caminhada.

Ao meu companheiro, Bastian, obrigada por todo o amor, respeito, apoio e felicidade que você me proporciona. Você é o mais precioso presente da minha estada na Alemanha.

À minha amada mãe, Djanira, por todo o apoio e incentivo da vida inteira. E ao meu pai, que com certeza ora por mim do alto.

A Deus, por estar sempre presente, me dando saúde e tornando esta etapa possível, permitindo que todas essas pessoas maravilhosas façam parte da minha vida.

RESUMO

Repetidas falhas de implantação embrionária são um sério problema para as clínicas de medicina reprodutiva. Conseqüentemente, marcadores diagnósticos, que em última análise auxiliariam na prática clínica, são desejáveis. Sinais imunomoduladores circulantes, liberados durante a gestação, como as moléculas HLA (HLA-G/-E) e tipo-HLA (MICA/B e ULBP-2) em suas formas solúveis e secretadas via vesículas extracelulares (EVs), promovem a sinalização intercelular para desenvolvimento embrionário. Este estudo investigou a associação entre a variabilidade dos genes *HLA-G/-E* e *MICA* e o perfil de expressão de HLA-G/-E, MICA/B e ULBP-2 em sangue periférico nas suas duas formas solúveis, total e carregadas por EVs, em casos de falha de implantação embrionária e controles férteis. Participaram deste estudo 62 casais com pelo menos duas falhas de implantação embrionária (IF); 131 casais férteis não gestantes com pelo menos duas gestações normais, sem relato de complicações (FW) e 29 mulheres férteis gestantes (PW). ExoQuik, ultracentrifugação, Western blot, Nanoparticle Tracking Analysis e citometria de fluxo foram utilizados para caracterização de EVs. ELISA foi utilizado para a quantificação das citocinas TGF- β 1, IL-10 e IFN- γ e das moléculas HLA-G/-E, MICA/B e ULBP-2 em suas isoformas solúveis totais e carregadas por EVs. A genotipagem dos genes *HLA-G/-E* e *MICA* foi realizada por sequenciamento, SSOp e SSP. Este estudo evidenciou a concentração aumentada das citocinas TGF- β 1 e IL-10 e a capacidade de intensificar a atividade de caspase-3 em células NK CD56^{dim} citotóxicas em EVs derivadas de mulheres gestantes. Além disso, sugeriu a existência de associações de potenciais marcadores genéticos e de seus níveis de expressão em casos de falha de implantação, como: (i) a maior frequência do alelo *HLA-G 14pb del* e níveis aumentados de HLA-G solúvel (sHLA-G) total; (ii) os haplótipos *HLA-G*01:01:08/14pb del* e *HLA-G*01:04:01/14pb del* como prováveis haplótipos de risco; (iii) o haplótipo *HLA-G*01:01:01/14pb del* associado à níveis elevados de sHLA-G total e vesicular e o haplótipo *HLA-G*01:01:02/14pb ins* associado à níveis reduzidos de sHLA-G vesicular. Não foram encontradas diferenças em relação à diversidade alélica e genotípica e níveis de expressão de HLA-E. Em relação às moléculas ligantes do receptor NKG2D, os alelos *MICA*002:01*, *MICA*004:00* e *MICA*008:01/04* estão associados a níveis de MICA solúvel total independente das condições dos grupos de estudo. Além de corroborar a importância das EVs em gestações normais e patológicas, este estudo evidenciou a importância das variações nas sequências gênicas na regulação dos níveis de expressão de proteínas importantes no contexto imunológico, como HLA-G e MICA. No entanto, mais estudos que auxiliem no esclarecimento dos possíveis fatores de suscetibilidade e proteção relacionados a essas moléculas e seu papel em casos de falhas implantacionais e demais complicações gestacionais são necessários.

ABSTRACT

Recurrent embryo implantation failure remains a serious problem of modern assisted reproductive technologies outcome. Consequently, diagnostic markers, which can assist clinical practice, are desirable. Immunomodulatory signals are released during pregnancy via HLA (HLA-G/-E) and HLA-type (MICA/B and ULBP-2) molecules in distinct released forms, as total soluble molecules or secreted via extracellular vesicles (EVs), promoting intracellular signaling for embryo development. The aim of this study was to investigate the variability of the *HLA-G/-E* and *MICA* genes and the expression profile of the HLA-G/-E, MICA/B and ULBP-2 molecules in its total soluble and secreted via EVs forms, in embryo implantation failure and fertile controls. Therefore, we included in the study 62 couples with at least two embryo implantation failures (IF); 131 non-pregnant fertile couples with at least two normal pregnancies with no reporting complications (FW) and 29 fertile pregnant women (PW). ExoQuik, ultracentrifugation, Western blot, Nanoparticle Tracking Analysis and flow cytometry were used for EVs characterization. ELISA was performed for the quantification of the TGF- β 1, IL-10 e IFN- γ cytokines and HLA-G/-E, MICA/B e ULBP-2 molecules. The genotyping of *HLA-G/-E* and *MICA* genes was performed by sequencing, SSOp and SSP techniques. As main results, we showed increased levels of TGF- β 1 and IL-10 cytokines and the ability to enhance the caspase-3 activity in cytotoxic CD56^{dim} cells in EVs derived from pregnant women. Furthermore, we suggested potential genetic markers and the association with their expression levels in implantation failure women, such as: (i) higher frequency of *HLA-G 14bp del* and increased levels of total soluble HLA-G (sHLA-G); the possible risk haplotypes *HLA-G*01:01:08/14pb del* and *HLA-G*01:04:01/14pb del*; (iii) the haplotype *HLA-G*01:01:01/14pb del* associated with increased levels of total and vesicular sHLA-G and the haplotype *HLA-G*01:01:02/14pb ins* associated with reduced levels of vesicular sHLA-G. There were no differences in the allelic and genotypic distribution and expression levels of HLA-E. Regarding to the NKG2D-ligands molecules, the alleles MICA*002:01, MICA*004:00 and MICA*008:01/04 are associated with total soluble MICA levels regardless of the study group conditions. In addition to corroborate the EVs importance in normal and pathological pregnancies, this study showed the importance of the gene sequences variances in the regulation of the expression levels of important proteins in the immunological context, such as HLA-G and MICA. However, further studies are needed to clarify potential susceptibility and protective factors related to these molecules and their role in cases of implantation failure and other pregnancy complications.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. FALHA DE IMPLANTAÇÃO EMBRIONÁRIA	3
2.2. IMUNOLOGIA DA GESTAÇÃO	3
2.3. COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE (MHC)	4
2.3.1. Definição e Histórico	4
2.3.2. Organização genômica e estrutura molecular do MHC	5
2.4. ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO HUMANO G (HLA-G)	8
2.4.1. Histórico e expressão de HLA-G	8
2.4.2. Estrutura e função de HLA-G	9
2.4.3. Polimorfismo do gene HLA-G	11
2.4.4. HLA-G e gestação	13
2.5. ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO HUMANO E (HLA-E)	14
2.5.1. Histórico e expressão do gene HLA-E	14
2.5.2. Estrutura e função de HLA-E	15
2.5.3. Polimorfismo do gene HLA-E	17
2.5.4. HLA-E e gestação	18
2.6. GENES RELACIONADOS AO MHC DE CLASSE I - (MIC)	20
2.6.1. Histórico e expressão dos genes MIC	20
2.6.2. Estrutura e função de MIC	20
2.6.3. Polimorfismo do gene MICA	22
2.6.4. MIC e gestação	23
2.7. PROTEÍNAS LIGANTES DE UL-16 (ULBPs)	25
2.8. VESÍCULAS EXTRACELULARES	26
2.8.1. Vesículas extracelulares e gestação	29
4. OBJETIVOS	32
4.1. OBJETIVO GERAL	32
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
5. RESULTADOS	33
5.1. CAPÍTULO I	34
5.2. CAPÍTULO II	47
5.3. RESULTADOS COMPLEMENTARES	60
5.3.1. Caracterização da amostra	60
5.3.2. Frequências alélicas e genotípicas do gene HLA-G em pacientes com falha de implantação embrionária e controles férteis não gestantes	60
5.3.3. Níveis de HLA-G solúvel em mulheres com falha de implantação embrionária e controles férteis não gestantes	66
5.3.4. Associação de alelos do gene HLA-G com níveis de HLA-G solúvel	67
5.3.5. Frequências haplotípicas do gene HLA-G e do polimorfismo 14pb ins/del em mulheres com falha de implantação embrionária e controles férteis não gestantes	68
5.3.6. Associação de haplótipos do gene HLA-G e polimorfismo 14pb ins/del com níveis de HLA-G solúvel	69
5.3.7. Frequências alélicas e genotípicas do gene HLA-E em pacientes com falha de implantação embrionária e controles férteis não gestantes	71
5.3.8. Níveis de HLA-E solúvel em pacientes com falha de implantação embrionária e controles férteis não gestantes	72
5.3.9. Associação de alelos do gene HLA-E com níveis de HLA-E solúvel	72
5.3.10. Frequências alélicas e genotípicas do gene MICA em pacientes com falha de implantação embrionária e controles férteis não gestantes	73
5.3.11. Níveis de MICA solúvel em pacientes com falha de implantação embrionária e controles férteis não gestantes	80
5.3.12. Associação de alelos do gene MICA com níveis de MICA solúvel	81

5.3.13. Níveis de MICB solúvel em pacientes com falha de implantação embrionária e controles férteis não gestantes.....	83
5.3.14 Níveis de ULBP-2 solúvel em pacientes com falha de implantação embrionária e controles férteis não gestantes.....	83
6. DISCUSSÃO.....	85
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	94
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
10. APÊNDICES.....	125
1. MATERIAIS E MÉTODOS.....	126
1.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	126
1.2. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	127
1.3. EXTRAÇÃO DE DNA.....	128
1.4. GENOTIPAGEM DOS GENES <i>HLA-G</i> E <i>HLA-E</i> PELO MÉTODO DE SEQUENCIAMENTO AUTOMATIZADO.....	128
1.4.1. Purificação do produto amplificado.....	130
1.4.2. Reação de Sequenciamento.....	130
1.4.3. Precipitação do DNA sequenciado.....	131
1.4.4. Eletroforese Capilar.....	131
1.4.5. Definição alélica dos genes <i>HLA-G</i> e <i>HLA-E</i>	132
1.5. GENOTIPAGEM DE 14PB INSERÇÃO/DELEÇÃO DA REGIÃO 3'UTR DO GENE <i>HLA-G</i>	132
1.6. GENOTIPAGEM DO GENE <i>MICA</i>	134
1.6.1. Genotipagem do gene <i>MICA</i> pela técnica de PCR-SSOP.....	134
1.6.2. Caracterização do microssatélite do gene <i>MICA</i>	135
1.6.3. Definição alélica do gene <i>MICA</i> pela técnica de PCR-SSP.....	137
1.7. PRECIPITAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	139
1.8. CARACTERIZAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	139
1.9. VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE PROTEÍNAS TÍPICAS DE VESÍCULAS EXTRACELULARES POR SDS-PAGE E WESTERN BLOT.....	140
1.10. QUANTIFICAÇÃO DAS CITOCINAS IFN- γ , IL-10 E TGF- β 1.....	142
1.11. QUANTIFICAÇÃO DAS MOLÉCULAS <i>HLA-G</i> , <i>HLA-E</i> , <i>MICA/B</i> E <i>ULBP-2</i>	143
1.12. ESTUDOS FUNCIONAIS.....	144
1.12.1. Captação de vesículas extracelulares por células de sangue periférico.....	144
1.12.2. Detecção da atividade de caspase-3, da expressão de IFN- γ e da degranulação em PBMCs na presença e na ausência de vesículas extracelulares.....	145
1.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	147
2. QUESTIONÁRIOS CLÍNICOS E DEMOGRÁFICOS.....	149
3. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	155

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização da amostra.	60
Tabela 2. Comparação das frequências alélicas do gene HLA-G entre casais IF e casais FW.	61
Tabela 3. Comparação das frequências alélicas do gene HLA-G entre os grupos IF e FW de acordo com o gênero.	62
Tabela 4. Comparação das frequências genotípicas do gene HLA-G entre casais IF e casais FW.	63
Tabela 5. Comparação das frequências genotípicas do gene HLA-G entre as mulheres pertencentes aos grupos falha de implantação e controle fértil.	64
Tabela 6. Comparação das frequências genotípicas do gene HLA-G entre os homens pertencentes aos grupos falha de implantação e controle fértil.	65
Tabela 7. Associação dos alelos do gene HLA-G com os níveis de sHLA-G _{tot} e sHLA-G _{EV} em mulheres pertencentes aos grupos falha de implantação e controle fértil.	68
Tabela 8. Comparação das frequências haplotípicas de HLA-G e polimorfismo de HLA-G 14pb ins/del (+14pb/-14pb) entre mulheres pertencentes aos grupos falha de implantação e controle fértil.	69
Tabela 9. Associação dos haplótipos de HLA-G e polimorfismo de HLA-G 14pb ins/del (+14pb/-14pb) com os níveis de sHLA-G _{tot} e sHLA-G _{EV} em mulheres pertencentes aos grupos falha de implantação e controle fértil. ...	70
Tabela 10. Frequências alélicas e genotípicas do gene HLA-E.	71
Tabela 11. Associação dos alelos do gene HLA-E com os níveis de sHLA-E _{tot} e sHLA-E _{EV}	73
Tabela 12. Comparação das frequências alélicas do gene MICA entre casais IF e casais FW.	73
Tabela 13. Comparação das frequências alélicas do gene MICA entre as mulheres pertencentes aos grupos falha de implantação e controle fértil.	74
Tabela 14. Comparação das frequências alélicas do gene MICA entre os homens pertencentes aos grupos falha de implantação e controle fértil.	75
Tabela 15. Comparação das frequências genotípicas do gene MICA entre casais IF e casais FW.	75
Tabela 16. Comparação das frequências genotípicas do gene MICA entre as mulheres pertencentes aos grupos falha de implantação e controle fértil.	77
Tabela 17. Comparação das frequências genotípicas do gene MICA entre os homens pertencentes aos grupos falha de implantação e controle fértil.	79
Tabela 18. Associação dos alelos do gene MICA com os níveis de sMICA _{tot} e sMICA _{EV} em mulheres pertencentes aos grupos falha de implantação e controle fértil.	82
Tabela 19. Oligonucleotídeos iniciadores para amplificação dos genes HLA-G e HLA-E.	129
Tabela 20. Reação de amplificação dos genes HLA-G e HLA-E.	129
Tabela 21. Condições de amplificação para os genes HLA-G e HLA-E.	129
Tabela 22. Reagentes utilizados na etapa de purificação.	130
Tabela 23. Condições de ciclagem utilizadas na etapa de purificação.	130
Tabela 24. Reagentes utilizados na reação de sequenciamento.	130
Tabela 25. Condições de ciclagem para reação de sequenciamento.	131
Tabela 26. Oligonucleotídeos iniciadores para sequenciamento dos genes HLA-G e HLA-E.	131
Tabela 27. Oligonucleotídeos iniciadores para amplificação do exon 8 do gene HLA-G.	133
Tabela 28. Reação de amplificação do exon 8 do gene HLA-G.	133
Tabela 29. Condições de amplificação do exon 8 do gene HLA-G.	133
Tabela 30. Microssatélite do exon 5 e sua associação com os alelos do gene MICA.	135
Tabela 31. Condições de amplificação do microssatélite do gene MICA.	136
Tabela 32. Condições de amplificação para definição alélica do gene MICA por PCR-SSP.	138
Tabela 33. Oligonucleotídeos iniciadores específicos para resolução de ambiguidades MICA.	139

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Dispersão genômica dos genes MHC de Classe I e dos genes relacionados ao MHC de Classe I em cromossomos humanos.....	6
Figura 2. Estrutura das moléculas de Classe I e de Classe II do MHC.....	7
Figura 3. Mapa genômico da região HLA..	8
Figura 4. Processamento alternativo e isoformas do gene HLA-G.....	10
Figura 5. Formação do complexo peptídeo-HLA-E e sua ligação com os receptores CD94/NKG2.....	17
Figura 6. Esquema representativo da localização dos genes MIC na região de Classe I do MHC humano..	21
Figura 7. Formação e composição de vesículas extracelulares.....	28
Figura 8. Níveis de sHLA-G em mulheres com falha de implantação embrionária e em mulheres férteis não gestantes.....	67
Figura 9. Níveis de sHLA-E em mulheres com falha de implantação e em mulheres férteis não gestantes.	72
Figura 10. Níveis de sMICA em mulheres com falha de implantação embrionária e em mulheres férteis não gestantes.....	81
Figura 11. Níveis de sMICB em mulheres com falha de implantação e em mulheres férteis não gestantes.	83
Figura 12. Níveis de sULBP-2 em mulheres com falha de implantação embrionária e em mulheres férteis não gestantes.....	84
Figura 13. Eletroferograma Exon 3 – HLA-E.....	132
Figura 14. Detecção do polimorfismo 14pb ins/del do gene HLA-G em gel de poliacrilamida à 8%.	134
Figura 15. Representação do marcador de peso molecular ET-ROX 400 pelo software Fragment Profiler 1.2..	137
Figura 16. Representação da análise pelo programa Fragment Profiler 1.2.	137
Figura 17. Representação da análise pelo programa ZetaVIEW versão 8.02.17.....	140

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD	Células dendríticas
3'UTR	Região 3' não traduzida
5'URR	Região 5' reguladora a montante do promotor
BSA	Albumina de soro bovino
CIR	Centro de imunologia da reprodução
CMV	Citomegalovírus humano
DAP	Proteína transmembrana adaptadora de sinal
DL	Desequilíbrio de ligação
dNTPs	Deoxinucleotídeos
DO	Densidade óptica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ESCRT	Complexo endossomal para transporte
EVs	Vesículas extracelulares
EXO I	Exonuclease I
FasL	Fas-ligante
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FW	Controles férteis
GM-CSF	Fator estimulador de colônia granulócitos-macrófagos
HCG	Gonadotrofina coriônica humana
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA	Antígeno leucocitário humano
HLA-E	Antígeno leucocitário humano E
HLA-G	Antígeno leucocitário humano G
HRP	Horseradish peroxidase
HS	Proteínas de choque térmico
Hsp70	Proteína de choque térmico de 70 kDa
ICSI	Injeção intracitoplasmática de espermatozóide
IF	Falha de implantação embrionária
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig	Imunoglobulina
IIU	Inseminação intra-uterina
IL-10	Interleucina-10
ILT2	Receptor de leucócitos tipo-Ig 2
ILT4	Receptor de leucócitos tipo-Ig 4
IMGT	Sistema de informação internacional de imunogenética
KIR2DL4	Receptor de células NK tipo-Ig 2DL4
LIF	Fator inibidor de leucemia
LIGH	Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade
LT	Linfotoxinas
LTC	Linfócitos T citotóxicos
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MIC	Moléculas relacionadas ao MHC de classe I
MIP-1 α	Proteínas inflamatórias de macrófago-1 α
miRNAs	Micro RNAs
MVB	Corpos multivesiculares

NK	Células natural killer
NTA	Nanoparticle tracking analysis
OR	Odds ratio
ORF	Matriz de leitura aberta
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PW	Mulheres gestantes
RCLB	Tampão de lise de células vermelhas
RNA _m	RNA mensageiro
ROC	Receiver operating characteristic
RR	Risco relativo
SAP	Fosfatase alcalina de camarão
SDS	Dodecil sulfato de sódio
sHLA-E	HLA-E solúvel
sHLA-E _{EV}	HLA-E solúvel vesicular
sHLA-E _{tot}	HLA-E solúvel total
sHLA-G	HLA-G solúvel
sHLA-G _{EV}	HLA-G solúvel vesicular
sHLA-G _{tot}	HLA-G solúvel total
sMIC	MIC solúvel
sMICA	MICA solúvel
sMICA _{EV}	MICA solúvel vesicular
sMICA _{tot}	MICA solúvel total
sMICB	MICB solúvel
sMICB _{EV}	MICB solúvel vesicular
sMICB _{tot}	MICB solúvel total
SNPs	Polimorfismos de um único nucleotídeo
sULBP-2	ULBP-2 solúvel
sULBP-2 _{EV}	ULBP-2 solúvel vesicular
sULBP-2 _{tot}	ULBP-2 solúvel total
TAP	Transportador associado ao processamento de antígenos
TCR	Receptores de células T
TE	Trofoblasto extraviloso
TGF- β	Fator de crescimento tumoral β
TGF- β 1	Fator de crescimento tumoral- β 1
Th1	Linfócitos T auxiliares do tipo 1
Th2	Linfócitos T auxiliares do tipo 2
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TRA	Tecnologia de reprodução assistida
Treg	Células T reguladoras
ULBPs	Proteínas ligantes de UL-16
uNK	Células NK uterinas

1. INTRODUÇÃO

A infertilidade é uma condição que afeta entre 8 a 12% dos casais em idade reprodutiva, com uma média global de 9%, e tem sido definida como a incapacidade de um casal em alcançar a concepção ou concluir uma gestação a termo após um ano ou mais de relações sexuais regulares, sem proteção contraceptiva (Ombelet *et al.*, 2008). O desenvolvimento da tecnologia de reprodução assistida (TRA) tem modificado esta condição para muitos casais. Essa técnica foi aplicada pela primeira vez em 1978, como estratégia para suplantiar uma oclusão completa das tubas uterinas. Desde então, as indicações para a TRA têm sido expandidas, incluindo outras causas de infertilidade, como: infertilidade de causa masculina, endometriose associada à infertilidade, infertilidade de causa imunológica e infertilidade sem causa aparente (Pauli *et al.*, 2009).

A TRA oferece atualmente diferentes procedimentos que incluem a inseminação intra-uterina (IIU), a fertilização *in vitro* (FIV) e a injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI). Também estão disponíveis as possibilidades de criopreservação de oócitos, de espermatozoides e de embriões para procedimentos futuros (Myers, 2015). Na década de 90, foram alcançados importantes avanços nos aspectos clínicos e laboratoriais com resultados de impacto, porém os procedimentos baseados na TRA permanecem com uma considerável taxa de insucesso intrínseco. No que se refere as gestações por FIV, somente 51,4% das transferências embrionárias resultam em implantação do embrião. Destas implantações, 33,7% resultam em perdas gestacionais pré-clínicas, 3,7% em gestações bioquímicas, 14,9% em abortos clínicos e 47,7% resultam em gestações em curso (Kwak-Kim *et al.*, 2010).

O sucesso dos procedimentos baseados na TRA encontra um ponto crítico no processo de implantação embrionária, o qual é extremamente complexo e requer, tanto a habilidade do embrião de se implantar no útero, quanto a receptividade adequada do endométrio materno. Diversas evidências mostram que, durante este processo, tanto o embrião quanto o endométrio estimulam adaptações no sistema imune materno para o estabelecimento de uma gravidez viável (Szekeres-Bartho, 2015).

Durante uma gestação normal, o trofoblasto atua como um tecido semi-alógeno devido à contribuição genética parental e, nessa condição deveria ser reconhecido como estranho pelo sistema imune materno. No entanto, a rejeição do aloenxerto fetal é minimizada ou prevenida pelo perfil de expressão incomum de moléculas de antígenos leucocitários humano (HLA) pelas células do trofoblasto extraviloso (TE). O TE expressa moléculas HLA de Classe I clássicas (HLA-C) e HLA de Classe I não clássicas (HLA-E/-F/-G) do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), porém expressa em níveis muito

baixas outras moléculas de Classe I e de Classe II clássicas, como HLA-A/B/-DR (Ishitani *et al.*, 2006; Apps *et al.*, 2009).

Esse perfil de expressão de moléculas HLA pelas células do TE está comumente associada a uma implantação bem sucedida, devido a uma diminuição da citotoxicidade local, principalmente das células natural killer (NK) e linfócitos T (Rouas-Freiss *et al.*, 1997; Riteau *et al.*, 2001). Além disso, ocorre uma modificação do perfil de citocinas, o que direciona os linfócitos T para um perfil Th2 (linfócitos T auxiliares do tipo 2), contribuindo para a proteção do embrião (Raghupathy *et al.*, 1999). Sinais imunomoduladores circulantes são também liberados durante a gestação por moléculas HLA (HLA-G/E) e moléculas tipo-HLA (MICA/B e ULBP-2) solúveis e, por fatores associados à membrana liberados na forma de vesículas extracelulares (EVs). EVs que expressam na sua superfície ou transportam moléculas HLA não clássicas e moléculas tipo-HLA detectadas através do sangue materno, estão relacionadas à imunomodulação durante a gestação, promovendo a sinalização intracelular para a receptividade endometrial e desenvolvimento embrionário (Mincheva-Nilsson e Baranov, 2010; Kshirsagar *et al.*, 2012).

A identificação de genes HLA de Classe I não clássicos e a influência das suas variações alélicas e outros polimorfismos na expressão de suas proteínas, são pontos importantes dos processos imunomodulatórios gestacionais, seja na ocorrência de uma gravidez normal, patológica ou durante a implantação embrionária. No entanto, os mecanismos que envolvem todo este processo permanecem controversos e, conseqüentemente, estimulam novos estudos que possam esclarecer e refinar as informações sobre a associação entre as moléculas HLA (função, expressão e polimorfismos) e o sucesso reprodutivo. Além disso, as abordagens clínicas para os casos de falha de implantação embrionária estão focadas basicamente na qualidade dos embriões transferidos e no processo de indução da ovulação. Pouco foco tem sido dado aos fatores imunológicos relacionados aos problemas gestacionais. Mais estudos são necessários para desenvolver possíveis abordagens diagnósticas, visando a rede imunológica local e sistêmica operante na interface materno-fetal. Com base nestas evidências o objetivo do presente estudo é investigar a associação entre e a variabilidade genética dos genes *HLA-G*, *HLA-E* e *MICA* e os níveis de moléculas HLA não clássicas (HLA-G/E) e moléculas tipo-HLA (MICA/B e ULBP-2) solúveis totais e carregadas por EVs no sangue periférico em casos de falha de implantação embrionária e em controles férteis.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Falha de implantação embrionária

Na prática clínica, a implantação embrionária é considerada como bem sucedida quando existe evidência de saco gestacional intrauterino, podendo ser constatado por meio de ultrasonografia. Dessa forma, o diagnóstico de falha de implantação resulta da não evidência do saco gestacional intrauterino. O fracasso da implantação pode ocorrer muito cedo durante o curso da gestação em especial, na fase de fixação do embrião no endométrio, período onde não existem evidências de uma gravidez (teste de gravidez negativo na urina ou sangue, gonadotrofina coriônica humana – HCG). A falha de implantação pode ocorrer mais tarde no curso da gravidez (entre 12 e 20 semanas), após a migração do embrião através da superfície luminal do endométrio. No último caso, a HCG produzida pelo embrião pode ser detectada no sangue ou urina, mas o processo é interrompido antes da formação de um saco gestacional intrauterino (gravidez bioquímica) (Coughlan *et al.*, 2014).

A definição de falha de implantação embrionária recorrente pode ser bem variável entre os diferentes estudos, mas no consenso geral, o insucesso em alcançar uma gestação viável após 2 a 6 ciclos de FIV/ICSI é utilizada pela maioria dos clínicos (Tan, Y. *et al.*, 2005; Toth *et al.*, 2011). A ocorrência de falha de implantação embrionária pode estar relacionada a muitas causas, incluindo fatores gaméticos ou embrionários (qualidade do embrião, qualidade do oócito, qualidade do espermatozoide e anormalidades cromossômicas paternas), fatores uterinos (anomalias uterinas), hidrosalpinges, fatores imunológicos e causas desconhecidas (Raziel *et al.*, 2002; Strandell *et al.*, 2005; Ban-Frangez *et al.*, 2009; Ferraretti *et al.*, 2011; Absalan *et al.*, 2012; Koot *et al.*, 2012).

2.2. Imunologia da gestação

A gestação constitui um fenômeno único no organismo humano no que se refere ao comportamento do sistema imune. Data de 1953 a hipótese proposta por Peter Medawar de que o embrião se comporta no organismo materno como um enxerto semi-alogênico, estando, portanto, vulnerável às teorias de rejeição e tolerância imunológica. No estudo, ele propôs mecanismos para explicar o fenômeno de tolerância que ocorre entre a mãe e o feto durante a gestação: separação anatômica entre a mãe e o feto, imaturidade antigênica do feto e inexistência de resposta imunológica por parte da mãe (Medawar, 1953). Atualmente, sabe-se que a combinação entre esses mecanismos é essencial para o correto desenvolvimento fetal durante o período gestacional.

O componente paterno expresso pelo embrião é estranho ao sistema imune da mãe, que deverá abrigá-lo durante toda a gestação. A metade dos genes herdados do pai deverá

ser expressa e muitos deles poderão atuar como aloantígenos, sendo alvo de reconhecimento imune materno, uma vez que a mãe está exposta aos antígenos fetais durante a gravidez. No entanto, raramente ocorre um episódio de rejeição por parte da mãe ao feto, pois vários mecanismos moleculares de imunossupressão local estão envolvidos na proteção do feto (Aagaard-Tillery *et al.*, 2006).

A mudança no perfil das subpopulações de leucócitos na zona endometrial é uma consequência da implantação embrionária. Após uma reação inflamatória inicial, causada pelo rompimento do epitélio do útero pelo blastocisto, o perfil endometrial é alterado (decídua) para um padrão de seleção de expressão de antígenos MHC específicos ancorados à membrana das células do TE ou nas formas solúveis, incluindo os antígenos HLA-G, HLA-E, MICA, MICB e ULBP-2. Esse perfil de expressão modula a resposta imune materna para um ambiente gestacional favorável, inibindo a citotoxicidade direta das células NK e linfócitos T e controla a proliferação e a atividade das células T reguladoras (Treg). A partir desse momento, linfócitos T e B são identificados principalmente no miométrio distal do feto, enquanto membros do sistema imune inato, como células NK e macrófagos, são identificados predominantemente na decídua (Bulmer *et al.*, 1988; Givan *et al.*, 1997). A produção das citocinas como interleucina-10 (IL-10) e fator de crescimento tumoral- β 1 (TGF- β 1) pelas células Treg com fenótipo CD4⁺/CD25⁺, as quais são essenciais para a manutenção da tolerância gestacional, podem atingir 14% do número de células CD4⁺ na decídua (Sakaguchi, 2000). Hormônios imunomoduladores, como prolactina, HCG e progesterona são abundantes e também fazem parte desse processo, assim como as quimiocinas, que participam do controle do número e dos subtipos de células efetoras imunes na interface materno-fetal (Hunt *et al.*, 2005). Atualmente as vesículas extracelulares se tornaram parte essencial nesse processo, por participarem ativamente na comunicação intercelular entre decídua e células imunes efetoras maternas (Burnett e Nowak, 2016).

Dessa forma, o sistema de tolerância materno-fetal é amplo e altamente complexo, utilizando uma variedade de mecanismos que modulam a imunidade materna a nível local e sistêmico. Distúrbios no período implantacional em mecanismos dependentes da interação imune materno-fetal, como receptividade uterina inadequada ao estímulo alogênico ou deficiência na invasão do trofoblasto e/ou angiogênese, são causas frequentes de falhas de implantação ou perda fetal precoce (Carver *et al.*, 2003).

2.3. Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC)

2.3.1. Definição e Histórico

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (do Inglês *Major Histocompatibility Complex*), designado pela sigla MHC, foi descrito pela primeira vez no ano de 1936, em camundongos, e recebeu esta denominação devido a sua influência no sucesso ou fracasso

de transplantes de tecidos nestes animais. As primeiras moléculas foram descritas como antígenos polimórficos da superfície celular, e codificadas por um loco gênico denominado *H-2*. Os produtos destes loci constituem a principal barreira imunológica aos transplantes de aloenxertos. Esses antígenos foram denominados antígenos de histocompatibilidade e são codificados por genes de mesmo nome. Posteriormente, complexos gênicos homólogos que codificam produtos moleculares envolvidos na resposta imune foram descritos em várias espécies de mamíferos (Dunham *et al.*, 1987).

O MHC humano só foi descoberto na década de 50, por Dausset, Payne e Van Rood. Ao realizarem estudos sorológicos em pacientes transfundidos, perceberam diferenças antigênicas entre leucócitos de diferentes indivíduos. Desse modo, foram chamados de Antígenos Leucocitários Humanos ou genes HLA (do inglês *Human Leukocyte Antigen*) (Lamm e Olaisen, 1985; Bell, 1989).

O sistema gênico HLA faz parte do Complexo Principal de Histocompatibilidade humano. Os genes *MHC* são expressos de forma co-dominante em cada indivíduo e constituem o sistema com o maior número de genes do genoma (Janer e Geraghty, 1998). Esses genes organizam-se e classificam-se em genes *MHC* da região de Classe I, de Classe II e de Classe III, de acordo com a estrutura e a função de seus produtos moleculares (Olaisen *et al.*, 1983; Steinmetz e Hood, 1983; Kaufman *et al.*, 1984). Atualmente, sabe-se que o papel biológico das proteínas HLA relaciona-se à sua ligação com uma grande variedade de peptídeos antigênicos e sua apresentação aos linfócitos T. As moléculas Classe I apresentam peptídeos citosólicos aos linfócitos citotóxicos CD8⁺, e as moléculas Classe II apresentam peptídeos derivados de vesículas endocíticas às células T auxiliares CD4⁺ (Zamoyska, 1998).

2.3.2. Organização genômica e estrutura molecular do MHC

Nos seres humanos, o MHC está localizado no braço curto do cromossomo 6, ocupando um grande segmento de DNA, estendendo-se por aproximadamente 4 Mb, codificando, pelo menos, 224 genes funcionais (Guillaudeux *et al.*, 1998; The MHC sequencing consortium, 1999), no entanto *Bahram* (Bahram, 2000) descreve a dispersão de genes relacionados ao MHC de Classe I em outros cromossomos além do cromossomo 6 (Figura 1). As proteínas de Classe I e de Classe II do MHC apresentam estrutura geral muito semelhante. Ambas são heterodímeros transmembrana, com domínios N-terminais extracelulares, onde situam-se a fenda de ligação ao peptídeo para apresentá-los às células T, uma região que atravessa a membrana e que permite sua ancoragem, e uma região intracelular (Stern e Wiley, 1994).

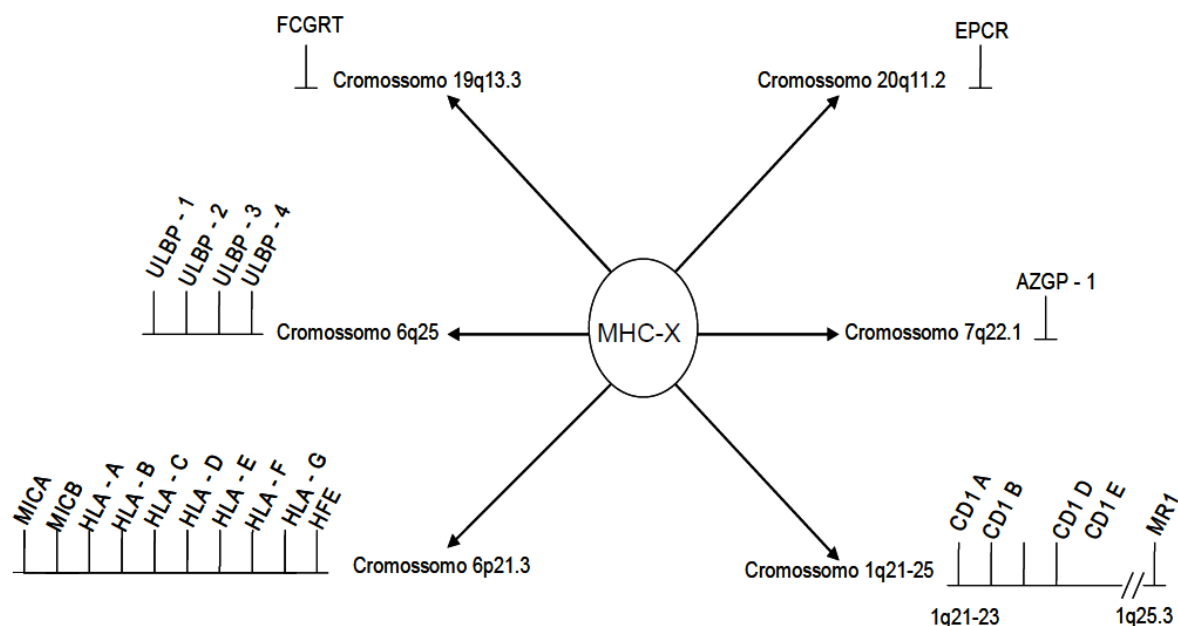


Figura 1. Dispersão genômica dos genes MHC de Classe I e dos genes relacionados ao MHC de Classe I em cromossomos humanos. Nota: A representação esquemática não está em escala e está separada em famílias multigênicas (*HLA*, *MIC*, *CD1* e *ULBP*). Os loci estão posicionados em ordem alfabética ou ordinal crescente.
Fonte: adaptado de (Bahram, 2000).

Os genes *MHC* de Classe I e os genes que codificam proteínas relacionadas ao MHC de Classe I encontram-se dispersos no genoma humano, mais precisamente nos cromossomos 6, 1, 7, 19 e 20, como mostrado na Figura 1. Os genes *MHC* de Classe I compreendem aqueles referenciados como *MHC* de Classe I clássicos (ou *MHC* de Classe Ia) que seriam *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C* e os genes *MHC* de Classe I não-clássicos, subdivididos por alguns autores em *MHC* de Classe Ib (*HLA-E*, *HLA-F* e *HLA-G*), *MHC* de Classe Ic (*MICA*, *MICB* e *HFE*) e *MHC* de Classe Id (*CD1*, *FcRn*, *ZAG*) (Bahram, 2000). Diversas características diferenciam os genes *MHC* de Classe I não-clássicos dos genes *MHC* de Classe I clássicos, como seu menor número de alelos, seus diferentes mecanismos de regulação gênica que levam a uma distribuição restrita de expressão protéica a alguns tecidos específicos e a presença de muitos pseudogenes (Rammensee *et al.*, 1995; Bahram, 2000; Van Den Elsen *et al.*, 2001).

Os genes de Classe I encontram-se próximos ao telômero do braço curto do cromossomo 6 e codificam a cadeia α das proteínas MHC de Classe I, associando-se não covalentemente a β 2-microglobulina. A β 2-microglobulina é codificada por um gene que está situado no cromossomo 15 e não faz parte do grupo de genes do MHC. A cadeia α apresenta três domínios globulares extracelulares (α 1, α 2 e α 3); o domínio α 3 e a proteína β 2-microglobulina encontram-se próximos à membrana, gerando uma estrutura similar a um domínio de imunoglobulina (Ig). O domínio N-terminal da cadeia α , que se encontra mais afastado da membrana, contém os aminoácidos que são reconhecidos pelas células T

(Figura 2A). Esses domínios ligam-se a peptídeos e os apresentam às células T citotóxicas com fenótipo CD8⁺ (Steinmetz e Hood, 1983; Stern e Wiley, 1994; Rammensee *et al.*, 1995; Zamoyska, 1998).

Os genes *MHC* de Classe II são denominados pelas siglas *HLA-DM*, *HLA-DP*, *HLA-DQ* e *HLA-DR* e situam-se na região mais centromérica do MHC e codificam proteínas semelhantes às proteínas de Classe I, sendo heterodímeros que apresentam domínios semelhante aos das Ig's, com regiões constantes próximas à membrana e dois domínios N-terminais ($\alpha 1$, $\beta 1$) polimórficos mais distantes da membrana. As moléculas de Classe II são constituídas de duas cadeias polipeptídicas ligadas de forma não-covalente: uma cadeia α de 32 a 34 kDa e uma cadeia β de 29 a 32 kDa, ambas codificadas por genes *MHC* polimórficos. Os segmentos N-terminais $\alpha 1$ e $\beta 1$ das cadeias de Classe II interagem para formar a fenda de ligação de antígenos. Nas moléculas de Classe II dos seres humanos a maior parte do polimorfismo está na cadeia β (Figura 2B). Os dois domínios polimórficos ligam-se à peptídeos e apresentam-nos para as células T auxiliares com fenótipo CD4⁺ (Kaufman *et al.*, 1984; Stern e Wiley, 1994; Rammensee *et al.*, 1995; Zamoyska, 1998).

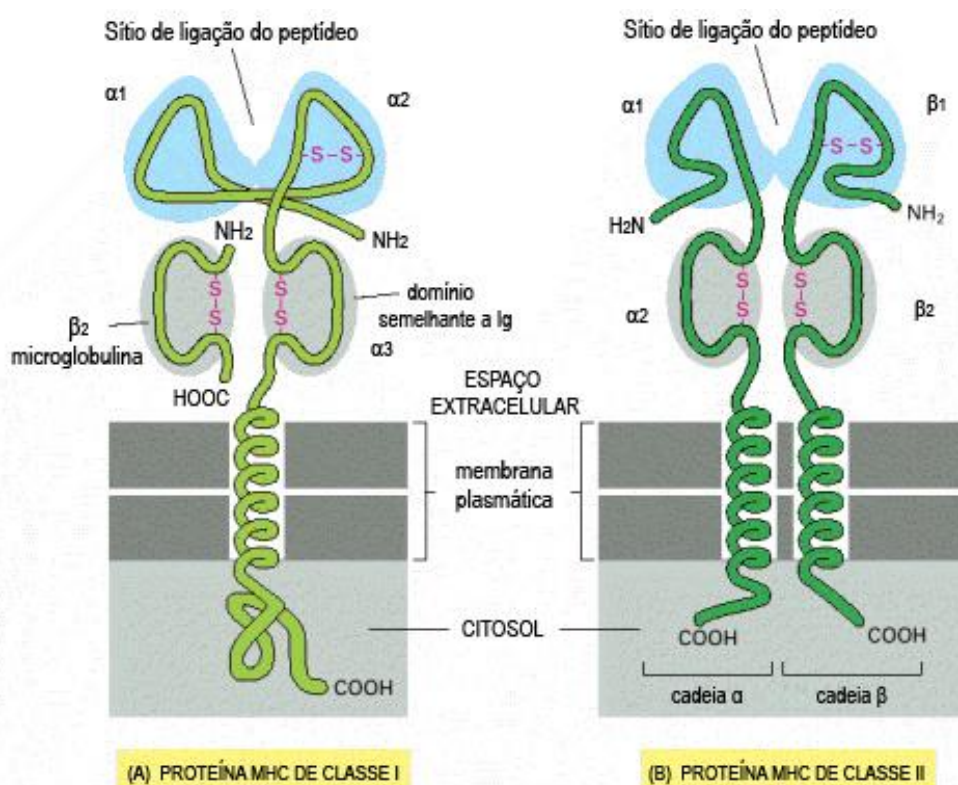


Figura 2. Estrutura das moléculas de Classe I e de Classe II do MHC. (a) As cadeias α das moléculas de Classe I possuem três domínios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$, que são codificados por exons separados. Estes encontram-se associados de forma não covalente a uma pequena cadeia polipeptídica, a β_2 -microglobulina, que não é codificada dentro da mesma região do MHC. Enquanto a β_2 -microglobulina é invariante, a cadeia α é polimórfica. (b) Nas proteínas do MHC de Classe II, ambas as cadeias são polimórficas, principalmente os domínios $\alpha 1$ e $\beta 1$.

Fonte: (Alberts *et al.*, 2004).

A região de Classe III apresenta alta densidade gênica e encontra-se entre as regiões MHC de Classe I e II. Nesta região localizam-se os genes que codificam componentes do sistema do complemento como *Fator B (Bf)*, *C2*, *C4A* e *C4B* e os genes que codificam moléculas de citocinas como o fator de necrose tumoral (*TNF*), linfotoxinas (*LTA* e *LTB*), o gene que codifica o citocromo *P-450* e o gene da enzima 21-hidroxilase (*CYP21B*) que está envolvida com a síntese de esteroides, e alguns genes de proteínas de choque térmico (*HS*) (Olaisen *et al.*, 1983; Carroll *et al.*, 1985). A Figura 3 representa esquematicamente a região MHC humana.

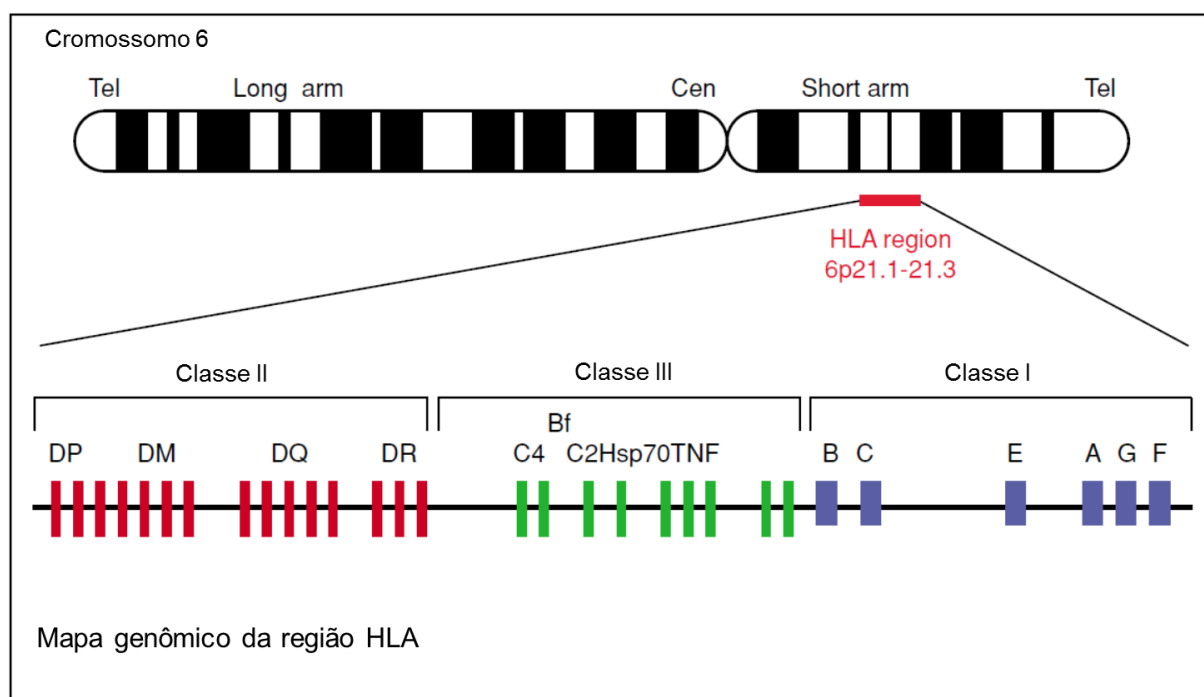


Figura 3. Mapa genômico da região HLA. A região HLA compreende aproximadamente 4Mb no cromossomo 6p21.1 até 6p21.3. As regiões de Classe II, Classe III e Classe I estão localizadas a partir do centrômero até o telômero do braço curto do cromossomo 6, respectivamente. Fonte: adaptado de (Mehra e Kuhr, 2003).

2.4. Antígeno Leucocitário Humano G (HLA-G)

2.4.1. Histórico e expressão de HLA-G

O gene *HLA-G* foi descrito pela primeira vez por Geraghty *et al* em 1987 (Geraghty *et al.*, 1987). Em 1990, foram reportadas as primeiras evidências de que esse gene codificava uma molécula presente no citotrofoblasto extraviloso, com provável papel na indução da tolerância materno-fetal (Ellis *et al.*, 1990; Kovats *et al.*, 1990). O RNA mensageiro (RNAm) de *HLA-G* pode ser detectado em uma grande variedade de tipos celulares, incluindo o citotrofoblasto extraviloso, a câmara anterior do olho, o timo fetal, o fígado fetal no primeiro trimestre, linfócitos periféricos adultos, embriões pré-implantacionais e fagócitos

mononucleares. Desde a observação inicial da expressão do *HLA-G* na interface materno-fetal, vários estudos referenciam seu relevante papel na gestação (Ober e Aldrich, 1997).

A expressão de *HLA-G* também tem sido observada em células tumorais, fundamentando a hipótese de que a expressão de algumas das isoformas de *HLA-G* seja uma das estratégias para evasão da resposta imune. O gene *HLA-G* e seus níveis de expressão também são estudados no contexto de transplantes de tecidos alogênicos (aloenxerto). A presença de algumas isoformas de *HLA-G* nos tecidos do órgão enxertado, tem sido associada com o risco menor de rejeição (Rebmann *et al.*, 2014). Sob condições patológicas, o *HLA-G* é expresso durante doenças inflamatórias (inflamações musculares), esclerose múltipla e no curso da infecção pelo HIV (revisado por (Lemaoult *et al.*, 2005).

2.4.2. Estrutura e função de HLA-G

O gene *HLA-G* está localizado telomericamente ao gene *HLA-A*, no braço curto do cromossomo 6. Sua estrutura e organização gênica é similar à organização dos genes de Classe I (*HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C*), sendo composta por 8 exons, 7 íntrons e uma região 3' não traduzida (3'UTR). O exon 1 codifica um peptídeo sinal, o exon 2 codifica o domínio $\alpha 1$, o exon 3 codifica o domínio $\alpha 2$ e o exon 4 codifica o domínio $\alpha 3$. O exon 5 codifica a região transmembrana. Os exons 6, 7 e 8 codificam o domínio citoplasmático da molécula e a região 3' não traduzida, respectivamente (Carosella *et al.*, 1999). Além disso, a existência de um códon de término no exon 6 leva à produção de uma proteína truncada com a perda de 19 resíduos de aminoácidos, que nas moléculas HLA clássicas são altamente conservados (Geraghty *et al.*, 1987; Ober e Aldrich, 1997; Van Der Ven *et al.*, 2000).

O processamento alternativo se constitui numa das características únicas dos transcritos primários do gene *HLA-G*, o qual resulta em sete isoformas protéicas distintas. Quatro destas isoformas são ligadas à membrana (*HLA-G1*, *HLA-G2*, *HLA-G3* e *HLA-G4*) e outras três isoformas são proteínas solúveis (*HLA-G5*, *HLA-G6* e *HLA-G7*) (Ishitani e Geraghty, 1992; Fujii *et al.*, 1994; Paul, Cabestre, *et al.*, 2000).

As isoformas ligadas à membrana diferem das isoformas solúveis na região C-terminal. As isoformas ligadas à membrana apresentam uma região transmembrana (codificada pelo exon 5) e uma cauda intracitoplasmática (codificada pelos exons 6 – 8), as formas solúveis substituem esta estrutura por uma pequena cauda hidrofílica codificada pela sequência 5' do intron 4 (*HLA-G5* e *G6*) ou do intron 2 (*HLA-G7*) (Figura 4) (revisado por (Roussev e Coulam, 2007). Todas as isoformas de *HLA-G* são capazes de formas dímeros através de ligações dissulfídicas devido a um resíduo de cisteína na posição 42 (Boyson *et al.*, 2002) . Além disso, as moléculas de *HLA-G* ancoradas à membrana podem ser liberadas na circulação sanguínea através da clivagem da região transmembrana por metaloproteases

(Rebmann *et al.*, 1999) ou via vesículas extracelulares, como exossomos (Riteau *et al.*, 2003; Alegre *et al.*, 2013).

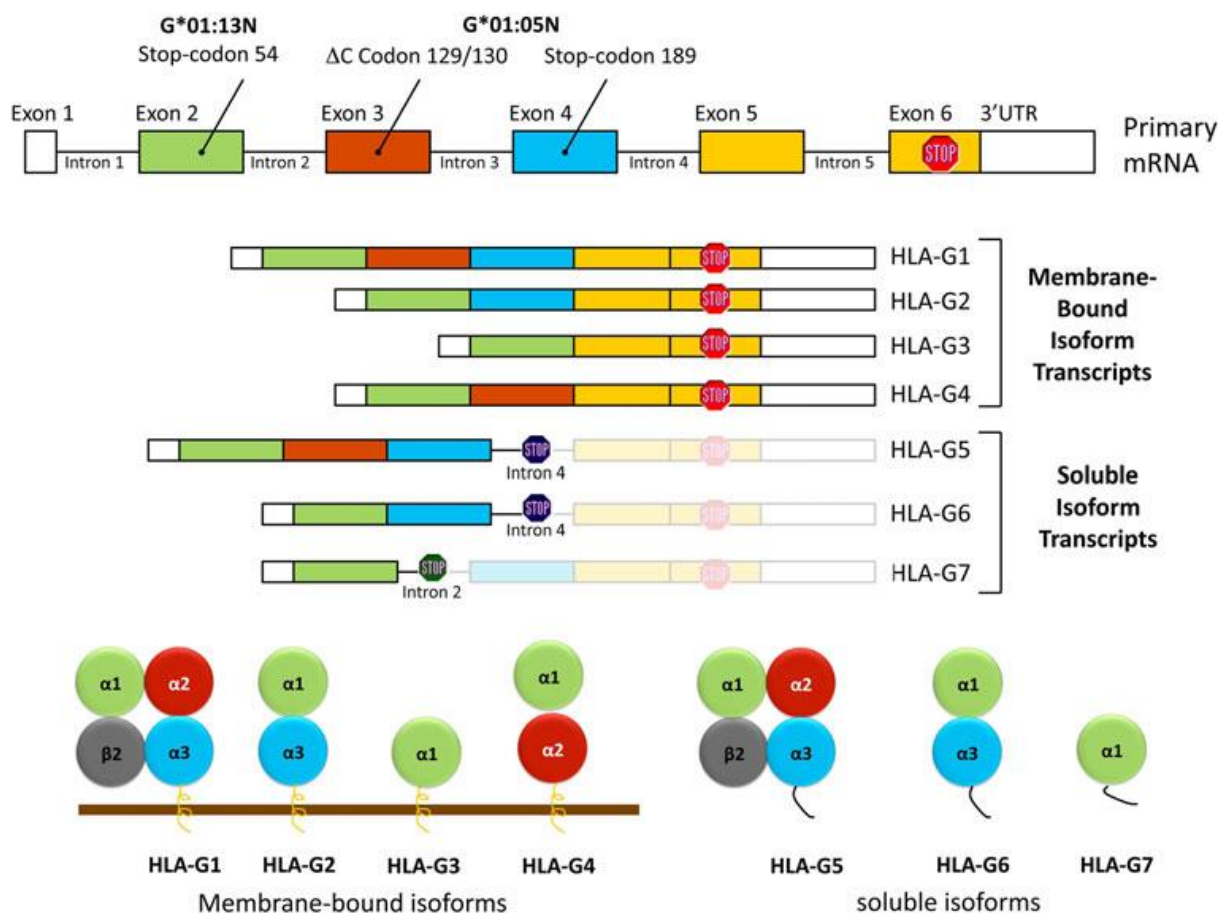


Figura 4. Processamento alternativo e isoformas do gene *HLA-G*. Uma das características dos transcritos primários de *HLA-G* é o processamento alternativo, responsável pela produção de sete isoformas de proteínas. Quatro isoformas são ligadas à membrana (HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3 e HLA-G4) e as outras três são proteínas solúveis devido a não transcrição da região de ancoragem à membrana (HLA-G5, HLA-G6 e HLA-G7). Fonte: (Donadi *et al.*, 2011).

Quanto à função, as moléculas de HLA-G atuam preferencialmente como ligantes dos receptores inibidores ILT2, ILT4 e KIR2DL4. O receptor de leucócitos tipo-Ig 2 (ILT2; LILRB1/CD85j) reconhece o domínio $\alpha 3$ de HLA-G e interage com moléculas de HLA-G associadas à $\beta 2$ -microglobulina, enquanto o receptor de leucócitos tipo-Ig 4 (ILT4; LILRB2/CD85d) interage com moléculas de HLA-G não associadas à $\beta 2$ -microglobulina. Os receptores ILT2/4 são expressos nas subpopulações de células T, B, NK, monócitos, macrófagos e células dendríticas (CD), ao passo que o receptor de células NK tipo-Ig 2DL4 (KIR2DL4) tem a sua expressão restrita à células NK. Os receptores ILT2 e ILT4 podem interagir com moléculas HLA de Classe I clássicas, mas têm uma maior afinidade por HLA-G, no entanto HLA-G é o único ligante conhecido do receptor KIR2DL4 (Colonna *et al.*, 1997; Rajagopalan e Long, 1999; Saverino *et al.*, 2000; Yan e Fan, 2005; Lamar *et al.*, 2010). Além disso, as moléculas HLA-G podem se ligar ao co-receptor CD8, induzindo a

apoptose de células T CD8⁺ através da via Fas/FasL (Fournel *et al.*, 2000; Contini *et al.*, 2003) e podem se ligar indiretamente aos receptores ativadores CD94/NKG2C e inibidores CD94/NKG2A (Llano *et al.*, 1998).

A expressão de HLA-G e a interação com seus receptores estão diretamente relacionadas com (1) a inibição das funções citolíticas das células NK e linfócitos T CD8⁺ (Rouas-Freiss *et al.*, 1997; Fournel *et al.*, 2000; Contini *et al.*, 2003); (2) a inibição da resposta aloproliferativa dos linfócitos T CD4⁺ (Lemaoult *et al.*, 2004; Gros *et al.*, 2008); (3) a apoptose de células endoteliais (Fons *et al.*, 2006); (4) a inibição da diferenciação dos linfócitos B (Horuzsko *et al.*, 2001; Ristich *et al.*, 2005); (5) a capacidade de induzir a diferenciação de células T CD4⁺ e CD8⁺ em células T reguladoras (Lemaoult *et al.*, 2007) e (6) a uma mudança no equilíbrio de citocinas Th1/Th2 para um perfil Th2 de citocinas (Kanai, Fujii, Kozuma, *et al.*, 2001).

2.4.3. Polimorfismo do gene *HLA-G*

Os genes HLA de Classe I constituem o sistema mais polimórfico e com maior diversidade alélica do genoma humano. O grau e o padrão de polimorfismo observados nos genes da Classe I, corroboram a hipótese de que a seleção atua nestes loci, mantendo altos níveis de variabilidade, particularmente nas regiões relacionadas aos exons que codificam os domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$, os quais interagem diretamente com o peptídeo ligado. Assim, foi surpreendente perceber que o gene *HLA-G* (Classe I) apresentou-se com níveis mais baixos de variação de sequência em quase todas as populações estudadas. Uma exceção encontra-se em amostras da população africana, a qual mostra extensa diversidade em nucleotídeos e correspondentes aminoácidos, localizados principalmente no domínio $\alpha 2$ de *HLA-G* (revisado por (Ober e Aldrich, 1997).

Diferenças quanto à localização e frequência dos polimorfismos do *HLA-G* parecem existir entre diferentes grupos étnicos, apesar de certas variações nucleotídicas serem compartilhadas por todas as populações estudadas, sugerindo uma origem comum de alelos do *HLA-G*. A grande maioria dos polimorfismos do *HLA-G* é sinônimo e, portanto, não alteram a composição de aminoácidos da proteína HLA-G (Van Der Ven *et al.*, 2000).

Até o momento, 51 alelos do gene *HLA-G* foram descritos, resultando em 16 proteínas distintas (*HLA-G*01:01*, **01:02*, **01:03*, **01:04*, **01:06*, **01:07*, **01:08*, **01:09*, **01:10*, **01:11*, **01:12*, **01:14*, **01:15*, **01:16*, **01:17*, **01:18* e **01:19*) e dois alelos nulos (*HLA-G*01:05N* e *HLA-G*01:13N*) (The International Immunogenetics Database – IMGT/HLA, database 3.22.0, janeiro de 2016). A definição da maioria dos alelos do *HLA-G* é baseada em polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) que mudam a matriz de leitura e conseqüentemente as sequências de aminoácidos da proteína. A função de HLA-G provavelmente é influenciada por substituições de aminoácidos, especialmente no que diz

respeito ao repertório de ligação peptídica, à afinidade a receptores e modulação de células imunes efetoras.

Estudos de associação genética relacionados a especificação alélica na região codificadora do *HLA-G* apresentam resultados controversos, porém algumas associações são interessantes. Primeiro, em 2001, um estudo de associação entre alelos de *HLA-G* e níveis de *HLA-G* solúvel (s*HLA-G*) em indivíduos saudáveis mostrou que a presença dos alelos *HLA-G*01:01:03* e *HLA-G*01:05N* estava associada à baixos valores de s*HLA-G*, enquanto o alelo *HLA-G*01:04:01* estaria associado com níveis elevados de s*HLA-G* circulante, evidenciando que os níveis de s*HLA-G* estão sob controle genético (Rebmann *et al.*, 2001). Segundo, o alelo *HLA-G*01:05N* apresenta uma deleção na posição 130 do exon 3, levando a uma mudança na matriz de leitura, gerando um stop codon (TGA) na posição 189 do exon 4 (Van Der Ven e Ober, 1994). Em consequência, a síntese do domínio $\alpha 2$ da proteína não ocorre, inibindo a tradução da molécula *HLA-G* ancorada à membrana (*HLA-G1*), assim como sua isoforma solúvel *HLA-G5*. A identificação de indivíduos saudáveis homocigotos para o alelo *HLA-G*01:05N* sugere que o alelo nulo pode ser responsável pela expressão de outras isoformas de *HLA-G* (Le Discorde *et al.*, 2005).

Estudos têm identificado diversas variações na sequência de *HLA-G* envolvendo regiões não codificadoras do gene, como 5'URR (região 5' reguladora a montante do promotor) e 3'UTR (região 3' não traduzida). Os SNPs identificados na região promotora do *HLA-G* podem influenciar na regulação da expressão do gene, considerando que a maioria dessas variações está localizada dentro ou próxima das sequências pertencentes a elementos reguladores de transcrição. Além disso, alguns sítios polimórficos na região 5'URR apresentam desequilíbrio de ligação (DL) com 8 sítios polimórficos identificados na região 3'UTR, podendo influenciar na estabilidade do RNAm gerado e nos resultados do processamento alternativo do gene *HLA-G* (revisado por (Castelli *et al.*, 2011)).

Na posição -725 observa-se a variação nucleotídica C/G/T. A transposição de C para G nessa posição forma um dinucleotídeo CpG entre as posições -726 e -725 passível de metilação, muito próxima de um importante elemento regulatório, podendo diminuir a transcrição de *HLA-G* em indivíduos portadores do alelo -725G (Ober *et al.*, 2003). Outra variação na posição -201 foi identificada na qual uma guanina no alelo *HLA-G*01:01:01* é trocada por uma alanina nos alelos *HLA-G*01:01:02*, *HLA-G*01:01:03*, *HLA-G*01:04* e *HLA-G*01:05*. Nesta região localiza-se o módulo enhancer A que liga o fator de transcrição NF- κ B2, mais especificamente no sítio κ B2 (Hviid *et al.*, 2006).

Pelo menos 3 sítios de polimorfismo na região 3'UTR estão relacionados com a regulação dos níveis de expressão do *HLA-G*: a inserção/deleção de 14 pb localizadas na posição +3741 do exon 8 parece ser uma das posições mais importantes no que se refere a níveis de expressão da proteína e a estabilidade do RNAm (Harrison *et al.*, 1993); a

presença de uma guanina na posição +3142, a qual aumenta a afinidade de micro RNAs (miRNAs) por RNAm de *HLA-G*, dessa forma diminuindo a expressão de *HLA-G* (Tan *et al.*, 2007); a presença de uma adenina na posição +3187, modificando os motivos ricos em AU, diminuindo a estabilidade do RNAm (Yie *et al.*, 2008).

A inserção de 14 pb está relacionada com o aumento da estabilidade do transcrito e com mecanismos de controle pós-transcricional (processamento alternativo), por meio do qual 92 bases são removidas do transcrito maduro no início do exon 8, produzindo transcritos de *HLA-G* menores mais estáveis do que o transcrito completo (Rousseau *et al.*, 2003). O genótipo homocigoto para inserção de 14 pb (14pb ins/ 14pb ins) tem sido associado com níveis diminuídos de sHLA-G circulante comparado com os outros dois possíveis genótipos (14pb ins/ 14pb del e 14pb del/ 14pb del) (Hviid, Rizzo, *et al.*, 2004).

2.4.4. HLA-G e gestação

São muitas as evidências que demonstram que a modulação da expressão das moléculas de *HLA-G* são uma condição fundamental para uma gestação bem sucedida, que está, em parte, associada à expressão de níveis elevados da molécula de sHLA-G e a modulação da secreção de citocinas para controlar a invasão das células trofoblásticas e para manter o estado de imunossupressão local (Vigano *et al.*, 2003). A imunossupressão local afeta a secreção materna de citocinas. Níveis baixos de sHLA-G estão relacionados à citocinas de perfil inflamatório Th1 (linfócitos T auxiliares do tipo 1): IL2, TNF- α e IFN- γ , enquanto que altos níveis de sHLA-G parecem estar associados ao perfil anti-inflamatório Th2 (linfócitos T auxiliares do tipo 2) de citocinas: IL-4, IL-5 e IL-10 (Le Bouteiller *et al.*, 2003).

A molécula de *HLA-G* ancorada à membrana e as suas isoformas solúveis são expressas tanto nas células do TE que revestem a placenta quanto nas células dendríticas (CD-10) que aumentam em número no primeiro trimestre gestacional (Rizzo *et al.*, 2011; Amodio *et al.*, 2013). Por todas essas razões, *HLA-G* é considerado uma molécula chave na mediação do “*cross-talk*” entre o TE, os leucócitos decíduais e as células do estroma, possibilitando a invasão do trofoblasto, a diferenciação das células decíduais, a remodelação vascular e a modulação da resposta imune materna (Gregori *et al.*, 2015). A possibilidade de a molécula de *HLA-G* secretada via EVs na corrente sanguínea materna se tornar um instrumento adicional na mediação dessa complexa comunicação celular ainda é incerta. No entanto, um estudo de 2012 demonstrou que amostras placentárias no primeiro trimestre gestacional e à termo secretam a isoforma *HLA-G5* via exossomos (Kshirsagar *et al.*, 2012).

Os níveis de sHLA-G solúvel no sangue periférico materno pode ser considerado um importante marcador prognóstico gestacional. Muitos estudos concordam a respeito das

variações nos níveis de sHLA-G durante os nove meses de gestação. No primeiro trimestre, os níveis de sHLA-G aumentam até atingirem seu pico máximo de expressão no terceiro mês (Hunt *et al.*, 2000; Alegre *et al.*, 2007), começando a diminuir durante o terceiro trimestre gestacional (Hackmon *et al.*, 2004). Variações significativamente detectáveis nos níveis de sHLA-G ou mesmo valores não detectáveis de sHLA-G solúvel nas primeiras semanas de gestação estão relacionados com complicações gestacionais como pré-eclampsia, abortos espontâneos e falha de implantação embrionária (Hunt *et al.*, 2000; Alegre *et al.*, 2007). Além disso, a molécula sHLA-G demonstra ser promissora na identificação e seleção de embriões na TRA, cujo resultado seria o aumento na taxa de sucesso na gravidez. Em diversos estudos, onde os níveis de sHLA-G foram quantificados em sobrenadantes de embriões de FIV, foi demonstrado que a presença dessas moléculas, no meio de cultivo dos embriões selecionados para transferência, auxiliaria na manutenção da gestação após o sucesso implantacional, enquanto que sua ausência favoreceria a perda fetal (Fuzzi *et al.*, 2002; Sher *et al.*, 2005; Rebmann, Switala, *et al.*, 2007).

Os resultados dos estudos genéticos de associação entre sítios polimórficos, variantes alélicas de *HLA-G* e complicações gestacionais são controversos. Devido ao fato de a molécula *HLA-G* ter sido proposta como um marcador diagnóstico e prognóstico importante para o sucesso gestacional, o avanço no conhecimento das variações genéticas e dos padrões de expressão de *HLA-G* em suas diferentes formas de secreção no sangue periférico em casos de complicações gestacionais se fazem necessários.

2.5. Antígeno Leucocitário Humano E (HLA-E)

2.5.1. Histórico e expressão do gene HLA-E

O gene que codifica o antígeno leucocitário humano E (*HLA-E*) foi mapeado oficialmente no ano de 1987 e está localizado a aproximadamente 400 kb do loco *HLA-A*, mais próximo ao centrômero, no cromossomo 6p21.3 (Geraghty *et al.*, 1987; Liu *et al.*, 2012). Em 1996 reportou-se que *HLA-E*, ao invés de ligar peptídeos comuns derivados de proteínas intracelulares, ligava-se a um conjunto restrito de peptídeos derivados de sequências polipeptídicas *HLA* de Classe I, como um pré-requisito para sua estabilização na superfície celular (Lee *et al.*, 1998). Em outros estudos foi possível observar que a molécula *HLA-E* poderia formar complexos e apresentar antígenos derivados também de vírus (Tomasec *et al.*, 2000), bactérias (Salerno-Goncalves *et al.*, 2004), e proteínas de choque térmico (HS) (Michaelsson *et al.*, 2002).

A expressão de *HLA-E* na superfície celular requer a disponibilidade de peptídeos capazes de se ligarem a essa molécula, bem como da afinidade entre a molécula de *HLA-E* e o peptídeo (Iwaszko e Bogunia-Kubik, 2011). A capacidade de peptídeos derivados de sequências líderes de produtos protéicos *HLA* de Classe I, incluindo *HLA-G*, de modular os

níveis de expressão de *HLA-E*, representa um método adicional de refinamento dos padrões de expressão das moléculas HLA de Classe I não clássicas e de regulação da função de células imunes efetoras (Paul, Rouas-Freiss, *et al.*, 2000).

Dentre os antígenos de Classe I não clássicos, HLA-E é o melhor compreendido do ponto de vista imunológico, expressando-se diferentemente dos outros antígenos de Classe I não clássicos. HLA-E é expresso na maioria dos tecidos (rins, pele, fígado, glândulas salivares, tireóide, estômago, endométrio, células endoteliais de todos os tipos de vasos, entre outros), embora em menores concentrações do que as moléculas de Classe I clássicas. A expressão de *HLA-E* entre células mesenquimais, epiteliais e hematopoiéticas aumenta durante um episódio inflamatório, podendo liberar antígenos HLA-E solúveis na circulação (sHLA-E) (Ravindranath *et al.*, 2011).

Originalmente reconhecido por seu papel na imunidade inata, estudos recentes são sugestivos de uma participação mais ampla de HLA-E, tanto na colaboração de ligação das células T, quanto na resposta imune em transplantes (Kraemer *et al.*, 2014).

2.5.2. Estrutura e função de HLA-E

O gene *HLA-E* codifica uma cadeia pesada de 41kDa que pode associar-se não-covalentemente a uma cadeia polipeptídica leve de β 2-microglobulina. Esse heterodímero, à semelhança das moléculas MHC de Classe I, liga-se e apresenta peptídeos derivados de proteínas próprias e não-próprias após episódios de inflamações, imunizações ou transplantes (Tomasec *et al.*, 2000; Romagnani *et al.*, 2002; Tripathi *et al.*, 2006).

O gene *HLA-E* consiste de 8 exons. O primeiro exon codifica um peptídeo sinal, os exons 2, 3 e 4 codificam os domínios α 1, α 2 e α 3 da molécula, respectivamente. O quinto exon codifica a região transmembrana, e os exons restantes codificam a porção intracelular da proteína (Iwaszko e Bogunia-Kubik, 2011). Os resíduos de aminoácidos contidos nos domínios α 1 e α 2 da cadeia pesada da molécula de HLA-E são importantes para interação e cristalização dos receptores NKG2. Diferentemente dos sítios de ligação de peptídeos das proteínas MHC de Classe I, os quais são constituídos por somente duas ou três posições de ancoragem, as moléculas de HLA-E contém cinco resíduos de ancoragem de peptídeos nas posições P2, P3, P6, P7 e P9. O aumento do número de resíduos de ancoragem impõe maior estringência às sequências de peptídeos capazes de se ligar às moléculas de HLA-E (Sullivan *et al.*, 2008). Essa observação pode explicar a baixa afinidade da cadeia pesada de HLA-E pelos peptídeos resultantes de produtos protéicos codificados por *HLA-B*, que contém uma treonina no sítio de ancoragem P2 (Strong *et al.*, 2003).

Os peptídeos que se ligam à molécula de HLA-E são derivados dos resíduos 6 a 11 de aminoácidos de peptídeos líderes provenientes de outras moléculas MHC de Classe I (Lee *et al.*, 1998). Esses peptídeos são transportados para o citoplasma após terem sido

clivados por uma peptidase. A molécula TAP (transportador associado ao processamento de antígenos) é responsável por transportar peptídeos curtos do citoplasma para o retículo endoplasmático, fazendo com que esses possam interagir com as moléculas HLA-E recém sintetizadas (O'callaghan, 2000). Devido à disponibilidade de peptídeos para a formação de complexos com a molécula HLA-E ser dependente da expressão de outras proteínas HLA de Classe I e da funcionalidade da proteína TAP, a expressão de HLA-E na superfície celular seria um indicativo de que tanto a maquinaria de processamento de antígenos quanto a expressão de proteínas HLA de Classe I estariam normais e ativas (Sullivan *et al.*, 2008).

O complexo peptídeo-HLA-E é um reconhecido ligante dos receptores CD94/NKG2A e CD94/NKG2C expressos nas células NK e em alguns subtipos de células T (Braud *et al.*, 1998). Esses receptores são membros da superfamília de lectinas do tipo C e consistem de uma subunidade invariante CD94 ligada por uma ponte dissulfídrica a um membro da família NKG2. A família NKG2 é composta por isoformas inibidoras (2A e 2B) e isoformas ativadoras (2C, 2E e 2H) (Brostjan *et al.*, 2002). A interação da molécula de HLA-E com o receptor CD94/NKG2A resulta na inibição da citotoxicidade das células NK e dos linfócitos T citotóxicos dependentes de lise (LTC's) (Borrego *et al.*, 1998).

A molécula de HLA-E complexada com peptídeo pode ainda interagir com receptores de células T $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ (TCR's) expressos em células T CD8⁺, desencadeando, dessa forma, as funções convencionais dos linfócitos T citotóxicos (Li *et al.*, 2001). Os fatos apresentados sugerem que as moléculas HLA-E possuem função regulatória tanto na resposta imune inata quanto na resposta imune adaptativa (Coupel *et al.*, 2007).

A Figura 5 representa esquematicamente a formação do complexo peptídeo-HLA-E e a apresentação de antígeno aos receptores CD94/NKG2.

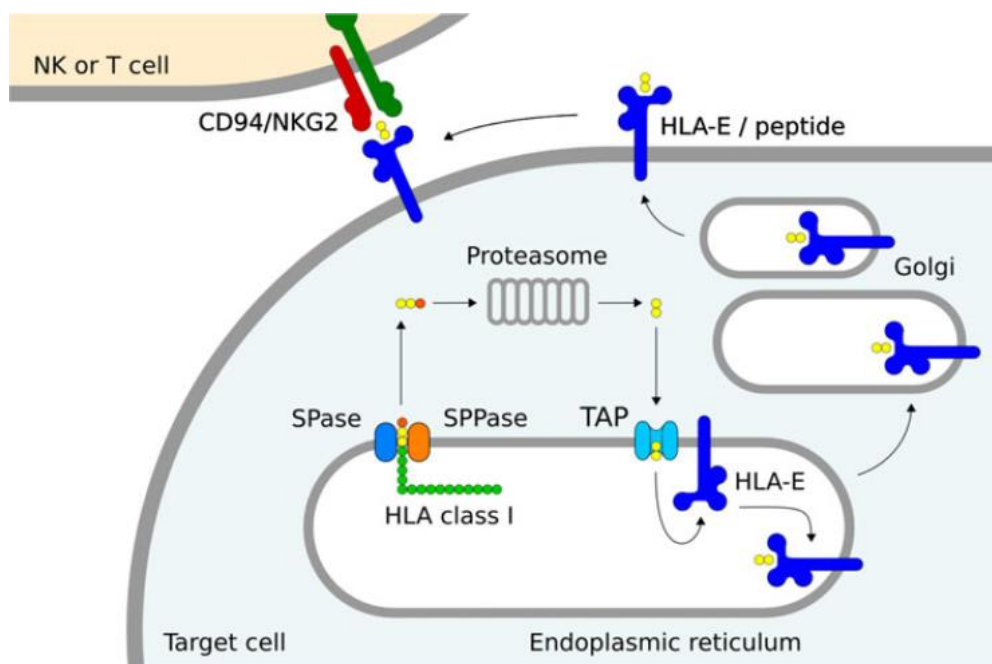


Figura 5. Formação do complexo peptídeo-HLA-E e sua ligação com os receptores CD94/NKG2. As moléculas HLA-E são formadas *no* retículo endoplasmático (RE) da célula. Os peptídeos clivados são transportados, com o auxílio das moléculas TAP, até o RE onde se ligam às moléculas de HLA-E. O complexo peptídeo-HLA-E é transportado do RE até a superfície celular, onde interage com os receptores CD94/NKG2 expressos pelas células NK ou pelos LTC.
Fonte: (Iwaszko e Bogunia-Kubik, 2011).

2.5.3. Polimorfismo do gene *HLA-E*

Se comparado aos genes *MHC* de Classe I, o loco *HLA-E* é o mais conservado. Esse gene apresenta o menor número de alelos entre os genes *MHC* de Classe I clássicos e não-clássicos (Veiga-Castelli *et al.*, 2012). Até o momento, 18 alelos do gene *HLA-E* foram descritos, resultando em 8 proteínas distintas (*HLA-E*01:01*, **01:03*, **01:04*, **01:05*, **01:06*, **01:07* e **01:09*) e um alelo nulo (*HLA-G*01:09N*) (The International Immunogenetics Database – IMGT/HLA, database 3.22.0, janeiro de 2016).

Somente dois grupos alélicos distintos (*HLA-E*01:01* e *HLA-E*01:03*) têm sido descritos com maior frequência nas diversas populações humanas; os demais grupos alélicos são de ocorrência bem mais rara, sendo de frequências nulas na maioria das populações estudadas. A existência do grupo alélico *HLA-E*01:04*, por exemplo, é controversa. Muitos autores sugerem que esse grupo alélico seria, de fato, uma consequência de artefatos de sequenciamento, devido ao fato dessa variante alélica não ter sido descrita em nenhuma outra população estudada, incluindo estudos brasileiros (Veiga-Castelli *et al.*, 2012).

Os grupos alélicos *HLA-E*01:01* e *HLA-E*01:03* codificam produtos que diferem em apenas um aminoácido - *HLA-E^R* (*E*01:01*) e *HLA-E^G* (*E*01:03*) - devido a presença de uma arginina (-*E^R*) e de uma glicina (-*E^G*) na posição 107 do domínio $\alpha 2$ da proteína (exon 3)

(Geraghty, Pei, *et al.*, 1992). Os alelos *HLA-E*01:01* e *HLA-E*01:03* são encontrados com uma frequência similar nas diferentes populações, em torno de 50%, indicando que uma seleção balanceadora poderia estar atuando nesse loco, implicando em uma possível diferença funcional entre eles (Ishitani *et al.*, 2006).

De um estudo realizado em 2003, pode-se concluir que a expressão na superfície celular da proteína $-E^G$ é maior do que a expressão da proteína $-E^R$ (Strong *et al.*, 2003). Evidências preliminares foram sugestivas de que essa expressão diferencial atribuída aos alelos *HLA-E^R* (*E*01:01*) e *HLA-E^G* (*E*01:03*) poderiam alterar a habilidade das moléculas de HLA-E de proteger as células contra a citotoxicidade das células NK. No entanto, não foram observadas diferenças na estrutura entre *HLA-E^R* e *HLA-E^G* que pudessem afetar direta ou indiretamente a interação com o receptor CD94/NKG2. A possibilidade de que os TCR's reconheçam as moléculas HLA-E diretamente, aumentam os indícios de que a diferença na posição 107 da proteína possa afetar a interação com outros receptores além de CD94/NKG2. Portanto, essa variação alélica poderia resultar em dois efeitos na interação com seus ligantes. O primeiro determinaria diferenças quantitativas no número de complexos peptídeo-HLA-E que poderiam ser formados a qualquer momento na superfície celular, e o segundo estaria relacionado à distinção qualitativa das moléculas quanto à sua afinidade de interação com os receptores (Strong *et al.*, 2003).

As regiões homólogas ao gene *HLA-E* em outros primatas também mostram uma menor variação alélica, apresentando a maioria das suas diferenças em regiões não codificadoras. Além disso, regiões homólogas da proteína HLA-E de murinos são capazes de ligarem-se a peptídeos derivados de produtos MHC de Classe I humanos, enquanto regiões homólogas de HLA-E de humanos são capazes de ligarem-se a peptídeos derivados de murinos. A conservação evolucionária das estruturas proteicas, do seu modo de ligação aos peptídeos e da sua funcionalidade refletem a importância do papel dessas moléculas no sistema imune (Sullivan *et al.*, 2008; Veiga-Castelli *et al.*, 2015).

2.5.4. HLA-E e gestação

As células NK uterinas (uNK), caracterizadas fenotipicamente como CD56^{bright}, CD16⁻ e CD3⁻, compõe a população celular dominante na decídua materna, compreendendo aproximadamente 70% da população leucocitária total na mucosa uterina (King *et al.*, 1998; Chantakru *et al.*, 2002; Trundley e Moffett, 2004), enquanto mais de 90% das células NK do sangue periférico apresentam níveis relativamente baixos de CD56 e são positivas para CD16 (CD56^{dim} CD16⁺) (Ishitani *et al.*, 2006). O subtipo celular CD56^{bright} expressa altos níveis do receptor CD94/NKG2 e demonstra possuir baixos níveis de citotoxicidade, se comparadas ao subtipo CD56^{dim}, as quais apresentam altos níveis de citotoxicidade (Cooper, Fehniger, Turner, *et al.*, 2001). As células CD56^{bright} são acumuladas em grande

número no sítio implantacional, local onde o citotrofoblasto extraviloso invade durante a placentação (Ashkar *et al.*, 2003).

A célula mais abundante na decídua materno-fetal, CD56^{bright}, secreta várias citocinas, mesmo quando ativadas sem uma resposta citotóxica concomitante. Entre as citocinas induzidas pelas células CD56^{bright} estão proteínas inflamatórias de macrófago-1 α (MIP-1 α), fator estimulador de colônia granulócitos-macrófagos (GM-CSF) (Trundley e Moffett, 2004), fator de necrose tumoral α (TNF- α), fator inibidor de leucemia (LIF), interferon γ (IFN- γ) (Saito *et al.*, 1993) e fator de crescimento tumoral β (TGF- β) (Higuma-Myojo *et al.*, 2005), as quais estão envolvidas no processo inflamatório de vascularização. Consequentemente, mecanismos tanto de inibição da citotoxicidade das células NK quanto de ativação da citotoxicidade das células NK são de extrema importância para a manutenção gestacional. Um mecanismo óbvio para esse reconhecimento é a interação entre as células que expressam altos níveis de receptores CD94/NKG2 e o complexo HLA-E/HLA-G-peptídeo ou HLA-E/HLA-I-peptídeo no citotrofoblasto extraviloso. Esses complexos, principalmente HLA-E/HLA-G-peptídeo, atuam inibindo a citotoxicidade das células NK através da interação com receptores CD94/NKG2A, e ativando a citotoxicidade das células NK através da interação com receptores CD94/NKG2C (Ishitani *et al.*, 2006).

A manutenção de dois alelos do gene *HLA-E* com similar frequência entre as populações poderia atuar regulando as funções das células NK, o reconhecimento imune mediado por patógeno ou ambos. Uma relativa diferença na afinidade de ligação derivada da alteração na habilidade das moléculas *HLA-E^R* (*E*01:01*) e *HLA-E^G* (*E*01:03*) em promover o dobramento de peptídeos derivados de nonâmeros de HLA-G foi observada, sugerindo uma diferença nos níveis de expressão na superfície celular entre essas duas moléculas na placenta (Strong *et al.*, 2003; Djuricic e Hviid, 2014). Essa diferença de expressão pode ter consequências nos efeitos inibitórios de HLA-E em células NK e linfócitos T. Uma vez que, os níveis relativos de expressão do complexo HLA-E/HLA-G-peptídeo (nonâmero) na superfície celular pode exercer uma influência direta, tanto na estimulação quanto na inibição da citotoxicidade das células NK via CD94/NKG2, é plausível que o papel imunomodulador de HLA-E na área de interação placentária seja o de estimular a secreção de citocinas apropriadas para um ambiente imunológico estável para a gestação (Strong *et al.*, 2003). Pelo fato de a expressão de HLA-E ser considerada importante no contexto da gestação, a investigação da associação entre os níveis de expressão de HLA-E e de polimorfismos de *HLA-E* em casos de insucesso gestacional, como falha de implantação embrionária, se torna relevante.

2.6. Genes relacionados ao MHC de classe I - (MIC)

2.6.1. Histórico e expressão dos genes MIC

Em 1994, um novo conjunto de loci relacionados aos genes *MHC de classe I* chamados *MHC class I chain-related genes (MIC)* ou *Perth beta block transcript 11 (PERB11)* foi identificado independentemente por Bahram e colaboradores (Bahram *et al.*, 1994) e por Leelayuwat e colaboradores (Leelayuwat *et al.*, 1994), respectivamente. A nomenclatura deste loco foi padronizada atualmente como *MIC* (Stephens, 2001).

A família gênica *MIC*, no momento de sua descoberta, atendia a pelo menos cinco critérios para sua inserção no grupo dos genes pertencentes ao MHC de Classe I não clássicos como, por exemplo, as dissimilaridades nas sequências, a distribuição tecido específica, a presença de pseudogenes, o diminuído número de alelos e as diferenças funcionais, se comparados aos genes MHC de Classe I clássicos. No entanto, anos mais tarde, um membro da família *MIC*, *MICA*, se mostrou como sendo o gene pertencente ao MHC de Classe I não clássico com maior divergência alélica (Choy e Phipps, 2010).

Estudos de mapeamento gênico identificaram, até o momento, sete genes *MIC* (*MICA*, *MICB*, *MICC*, *MICD*, *MICE*, *MICF*, *MICG*), dos quais apenas os loci *MICA* e *MICB* expressam transcritos funcionais. Os demais loci (*MICC* - *MICG*) não codificam nenhum transcrito detectável e são, de fato, pseudogenes, devido a muitas mutações de ponto e uma grande quantidade de deleções nessas regiões (Ando *et al.*, 1997; Collins *et al.*, 2002).

Em condições fisiológicas, o RNAm do gene *MICA* pode ser encontrado em diversas células e tecidos, principalmente no epitélio gastrointestinal, células endoteliais e fibroblastos (Stephens, 2001). No entanto, esse padrão de expressão é alterado sob condições de estresse celular, casos em que os transcritos do gene *MICA* são observados na maioria dos órgãos, com exceção do cérebro (Schrambach *et al.*, 2007). A transcrição do gene *MICA* parece ser induzida após choque térmico devido ao fato desse gene possuir em seu promotor elementos similares aos do gene *Hsp70* (proteínas de choque térmico – 70 kDa) (Bahram *et al.*, 1996). O aumento no nível de transcrição do gene *MICA* também é induzido por danos ao DNA, infecções virais e inflamação, levando essas moléculas à condição de sinalizadoras de estresse celular (Groh *et al.*, 2001; Gasser *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2008).

2.6.2. Estrutura e função de MIC

Os genes *MICA* e *MICB* estão localizados, aproximadamente a 46,4 kb e 141,2 kb, centromericamente ao gene *HLA-B*, respectivamente. Os loci *MICC*, *MICD* e *MICE* localizam-se proximamente aos genes *HLA-E*, *-A* e *-F*, respectivamente. *MICG* é flanqueado

pelos genes *HLA-G* e *HLA-F*. O gene *MICF* foi identificado a 24 kb em direção ao centrômero de *HLA-G* (Figura 6) (Bahram, 2000).

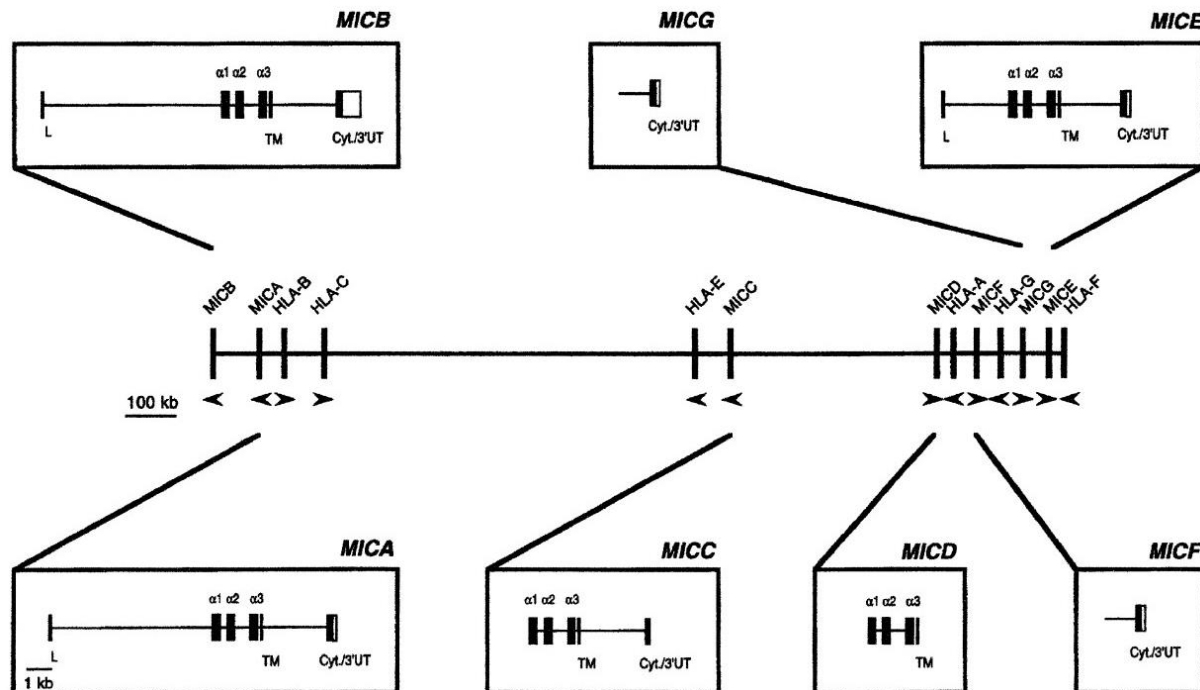


Figura 6. Esquema representativo da localização dos genes MIC na região de Classe I do MHC humano. Fonte: (Bahram, 2000).

Os genes *MIC* codificam glicoproteínas com estrutura similar às moléculas MHC de Classe I clássicas, porém apresentam algumas diferenças significativas: a sua estrutura não está associada à molécula β_2 -microglobulina, apresentam um padrão diferenciado de polimorfismo, são independentes de TAP e não possuem uma região de ligação com peptídeo (Birch *et al.*, 2008). Alguns resíduos de aminoácidos conhecidos por interagir com pequenos peptídeos, típicos das moléculas MHC de Classe I, são preservados na molécula MICA, sugerindo que essa molécula poderia ter a capacidade de se associar a esse tipo de ligante, porém a angulação de sua fenda é imprópria para a ligação de peptídeos, uma vez que forma um ângulo de quase 90° com a membrana (Bahram *et al.*, 1994).

A estrutura dos produtos de *MIC* é similar a estrutura dos produtos das moléculas MHC de Classe I clássicas, incluindo três domínios externos ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$), um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático. O alinhamento entre as sequências de aminoácidos das moléculas MHC de Classe I clássicas e moléculas MIC mostram 15% e 21% de homologia nos domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$, respectivamente, e 32% a 36% de homologia no domínio $\alpha 3$ (Bahram *et al.*, 1994; Collins *et al.*, 2002).

Os genes *MICA* e *MICB* possuem seis exons, diferentemente das moléculas MHC de Classe I que possuem oito exons. O primeiro exon de *MICA* e o primeiro exon de *MICB* codificam uma sequência líder, o segundo, terceiro e quarto exons codificam as sequências

de domínios externos α -1, α -2 e α -3, respectivamente, semelhante às moléculas MHC de Classe I. O quinto exon codifica o segmento transmembrana da molécula. A cauda citoplasmática e as sequências 3'UTR estão fusionadas no último exon (Bahram *et al.*, 1994; Ando *et al.*, 1997).

O gene *MICA* possui uma única ORF (matriz de leitura aberta) de 1149 pb que se estende de um provável códon de iniciação (AUG) na posição +40 até um códon de término localizado na posição +1189. Essa sequência codifica um polipeptídeo ancorado à membrana de 383 aminoácidos com uma massa molecular de 43 kDa. O produto transcricional do loco *MICB* possui 2376 pb que codifica um polipeptídeo também de 43 kDa, possuindo 83% de similaridade de aminoácidos se comparado às moléculas de MICA (Bahram *et al.*, 1994; Collins *et al.*, 2002).

Um estudo realizado por Bauer e colaboradores, em 1999, demonstrou que as moléculas MICA atuam como ligantes de células NK, de células T $\gamma\delta$ e de células T CD8⁺ $\alpha\beta$, as quais expressam um receptor ativador de células NK em comum, o NKG2D (Bauer *et al.*, 1999). O receptor NKG2D reconhece a proteína MICA humana através da cooperação com uma proteína transmembrana adaptadora de sinal, proteína de ativação – DNAX (DAP) (Wu *et al.*, 1999). Essa resposta pode ser importante na eliminação de uma variedade de células sob estresse como ocorre em infecções virais, em processos autoimunes e também em casos de tumorigênese, locais onde os genes MICA são geralmente expressos (Marin *et al.*, 2004; Choy e Phipps, 2010).

Várias outras moléculas com expressão celular induzida por estresse, como a família de proteínas ligantes de UL-16 (ULBPs, glicoproteína de citomegalovírus), também são ligantes do receptor NKG2D (Radaev *et al.*, 2001). As moléculas ULBPs possuem 25% de similaridade de sequência com as moléculas MICA, sugerindo que o receptor ativador NKG2D possua a habilidade de ligar diversas moléculas do tipo MHC de Classe I (Birch *et al.*, 2008).

2.6.3. Polimorfismo do gene *MICA*

Conforme os genes MHC Classe I clássicos, o loco *MICA* possui uma grande variedade alélica. Esse gene apresenta o maior número de alelos entre os genes MHC de Classe I não-clássicos (Ji *et al.*, 2015). Até o momento, 103 alelos do gene *MICA* foram descritos, resultando em 83 proteínas distintas e 2 alelos nulos (The International Immunogenetics Database – IMGT/HLA, database 3.22.0, janeiro de 2016). As variações nucleotídicas de *MICA* são principalmente encontradas nos exons 2, 3 e 4, correspondentes aos domínios extracelulares da molécula (α -1, α -2 e α -3) (Ji *et al.*, 2015). Em contraste às moléculas MHC de Classe I clássicas, a maioria dos resíduos polimórficos do gene *MICA* se encontram nos exons correspondentes às regiões externas à fenda de ligação de peptídeos,

as quais se encontram distribuídas principalmente nas extremidades dos domínios α -1, α -2 e α -3 (Marin *et al.*, 2004). O fato de a maioria dos resíduos polimórficos conservados entre as espécies se encontrarem em regiões gênicas que correspondem à porção inferior dos domínios α -1 e α -2 da molécula, sítio que é normalmente associado à porção β ₂-microglobulina em moléculas MHC de Classe I clássicas, é possível hipotetizar que esse seja o local de ligação do receptor NKG2D nas moléculas MICA (Li *et al.*, 1999; Choy e Phipps, 2010).

Um dos pontos polimórficos mais estudados na sequência gênica *MICA* encontra-se no exon 5, o qual codifica a região transmembrana da proteína. Essa região apresenta um número variável de repetições de trincas de nucleotídeos (GCT), as quais codificam 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 resíduos de alanina, correspondendo aos alelos A4, A5, A6, A7, A8, A9 e A10, respectivamente (Bolognesi *et al.*, 2001; Rueda *et al.*, 2002; Marin *et al.*, 2004; Gambelungho *et al.*, 2006). Além disso, uma variante do alelo A5 (A5.1) apresenta uma inserção de nucleotídeo (GCT > GGCT), levando a uma mudança na matriz de leitura que resulta em um códon de parada prematuro no domínio transmembrana da molécula. Essa variante alélica (A5.1) codifica uma glicoproteína truncada de aproximadamente 35-40 kDa que perde sua porção intracitoplasmática (Mizuki *et al.*, 1997) e que aparentemente não consegue alcançar a superfície celular não sendo, portanto, uma molécula secretada (Bahram, 2000).

Vários estudos populacionais, que têm permitido uma avaliação do padrão de distribuição dos alelos de *MICA*, demonstram o alelo *MICA**008 como sendo o mais frequente, e este parece ser um fenômeno mundial (Bahram, 2000). Embora o significado funcional da diversidade do gene *MICA* seja ainda controverso (Campillo *et al.*, 2015), certas mudanças nas sequências de aminoácidos das proteínas de *MICA* poderiam influenciar na afinidade de ligação com o seu receptor cognato NKG2D (Steinle *et al.*, 2001). Polimorfismos do gene *MICA* tem sido associados à uma variedade de doenças, como doenças inflamatórias e autoimunes (Mizuki *et al.*, 2007; Lopez-Hernandez *et al.*, 2010), doenças infecciosas (Garcia *et al.*, 2011), tumores (Vallian *et al.*, 2012), doença do enxerto contra o hospedeiro (Boukouaci *et al.*, 2009) e abortos espontâneos recorrentes (Hizem *et al.*, 2014).

2.6.4. MIC e gestação

A expressão de receptores NKG2D induzida por estresse em células autólogas ou alogênicas e a sua ligação com moléculas MIC desencadeia funções imunes efetoras como a citotoxicidade das células NK e a produção de citocinas (Jinushi *et al.*, 2003; Andre *et al.*, 2004; Lanier, 2005), ambos mecanismos relevantes para o processo de implantação embrionária e para um desenvolvimento gestacional bem sucedido (Porcu-Buisson *et al.*,

2007). Mecanismos estimuladores, bem como mecanismos inibidores do sistema imune tem sido relacionados com a ligação das moléculas MIC pelo receptor NKG2D. De fato, a liberação da forma solúvel de moléculas MIC (sMIC) a partir de células de certos tipos de tumores no soro de pacientes podem induzir a internalização do receptor estimulador NKG2D em células efetoras NK e linfócitos T. As moléculas sMIC atuam como competidores inibidores das moléculas MIC ancoradas à membrana da célula, prejudicando as respostas imunes inatas e adaptativas e funcionando como um mecanismo de escape tumoral, favorecendo o seu crescimento (Groh *et al.*, 2002; Coudert *et al.*, 2005; Hayakawa e Smyth, 2006).

No contexto da gestação, a expressão de moléculas MIC na superfície de células do sinciotrofoblasto expõe a unidade fetoplacentária ao ataque citotóxico materno, porém, em analogia ao mecanismo de evasão imunológica de tumores, as moléculas sMIC expressas no soro de mulheres gestantes são capazes de diminuir a expressão de NKG2D na superfície de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), diminuindo a sua citotoxicidade (Mincheva-Nilsson *et al.*, 2006). A diminuição de receptores NKG2D em decorrência de sua internalização após ligação com moléculas sMIC no soro de gestantes, tem sido sugerido como um mecanismo de escape, podendo inibir a resposta do sistema imune materno durante a gestação (Mincheva-Nilsson, 2006).

Uma terceira forma de expressão de moléculas MICA e MICB se dá por meio de vesículas extracelulares. A expressão de moléculas MIC foi demonstrada tanto na superfície apical quanto interna de corpos multivesiculares (MVB; *do inglês: multivesicular bodys*) (Mincheva-Nilsson *et al.*, 2006). No entanto, os mecanismos que regulam a expressão, a distribuição e a internalização de proteínas em vesículas extracelulares ainda não foram esclarecidos. Mecanismos pós-transcricionais tem sido sugeridos como reguladores dos níveis das moléculas ligantes de NKG2D na superfície celular, conservando-as em compartimentos intracelulares, particularmente em MVBs (Eagle *et al.*, 2009). De fato, foi demonstrado que as moléculas MICB possuem um tempo de meia-vida muito curto na membrana plasmática, mas são acumulados em compartimentos endossomais tardios (Aguera-Gonzalez *et al.*, 2009). Desse modo, pode-se sugerir a liberação de vesículas extracelulares contendo moléculas MIC da interface materno-fetal para o sangue materno.

A estratégia da liberação de moléculas ligantes do receptor NKG2D, como MICA/B e ULBPs, carregadas por vesículas extracelulares do tipo exossomos provenientes da interface materno-fetal poderia ser um segundo, e não menos importante, mecanismo de diminuição do receptor NKG2D (Mincheva-Nilsson e Baranov, 2010). Esse mecanismo seria também um contraste com a expressão de moléculas ligantes de NKG2D ancoradas a membrana, que fariam do sinciotrofoblasto um alvo para o ataque de linfócitos maternos, assim como a expressão de moléculas sMIC.

Os mecanismos de tolerância imunológica descritos estão todos relacionados a uma gravidez normal. Fica em aberto e necessita ser elucidada a questão de como se estabeleceriam os níveis de expressão de moléculas sMIC e de moléculas MIC carregadas por vesículas extracelulares em casos de complicações gestacionais, como a falha de implantação embrionária se comparados a controles férteis.

2.7. Proteínas ligantes de UL-16 (ULBPs)

Uma segunda família de ligantes do receptor NKG2D são as ULBPs (proteínas ligantes de UL-16), moléculas mencionadas anteriormente. As moléculas ULBP são identificadas pela habilidade, de algumas delas, se ligarem a proteínas UL-16, codificadas pelo citomegalovírus (CMV) humano. Essa família de moléculas é composta por cinco glicoproteínas (ULBP-1,2,3,4,5) e, à semelhança das moléculas MIC, são relacionadas ao MHC de Classe I, não apresentam peptídeos e não dependem da ligação com o domínio β_2 -microglobulina para sua expressão na superfície celular (Cosman *et al.*, 2001). Em células tumorais, danos ao DNA induzem a expressão de MIC e ULBPs. No entanto, em contraste às moléculas MIC, numerosas formas de estresse celular, incluindo choque térmico, falharam na indução da expressão de moléculas ULBPs, sugestivo da atuação de mecanismos transcricionais distintos para MIC e ULBP (Gasser *et al.*, 2005). Em algumas linhagens de células tumorais, as moléculas ULBP-1, ULBP-2 e ULBP-3 podem ser clivadas em uma forma solúvel, capaz de diminuir a expressão do receptor NKG2D, promovendo o escape da resposta imune pelas células tumorais (Song *et al.*, 2006). Os níveis da isoforma solúvel de ULBP-2 (sULBP-2) no sangue periférico estão associados com um mau prognóstico em melanomas (Paschen *et al.*, 2009), leucemia linfocítica crônica (Nuckel *et al.*, 2010) e câncer de pulmão (Yamaguchi *et al.*, 2012). Essas evidências sugerem um papel de imunotolerância para essas moléculas (Hedlund *et al.*, 2009), fato que as torna relevantes para o processo de implantação embrionária e desenvolvimento gestacional.

Na prática, foi demonstrado que todas as 5 isoformas da proteína ULBP são constitutivamente transcritas e estocadas intracelularmente em vesículas extracelulares do tipo exossomos, no compartimento multivesicular endossomal tardio do sinciciotrofoblasto humano. Foi demonstrado também que as vesículas extracelulares que expressam ULBPs são capazes de diminuir a expressão do receptor NKG2D em linfócitos de sangue periférico (Hedlund *et al.*, 2009). Esses resultados sugerem que, a secreção pelas células do sinciciotrofoblasto de moléculas ULBPs via vesículas extracelulares, seria um novo mecanismo tanto de estocagem de ligantes de NKG2D quanto da geração de ULBPs solúveis (Hedlund *et al.*, 2009). Mais estudos são necessários, visando investigar possíveis diferenças nos níveis de moléculas ULBP-2 e seu papel imunomodulador na interface

materno-fetal e seu valor como marcador prognóstico em pacientes com falhas implantacionais.

2.8. Vesículas extracelulares

Vesículas extracelulares, simbolizadas pela sigla EVs (*do inglês: extracellular vesicles*), são secretadas por todos os tipos de células procarióticas (Kim *et al.*, 2015) e eucarióticas (Mantel e Marti, 2014; Cocucci e Meldolesi, 2015) estudadas até o momento. Diferentes termos tem sido utilizados para classificar subtipos distintos de EVs: (i) exossomos: vesículas que apresentam de 30 a 160 nm de diâmetro e são derivadas de corpos multivesiculares intracelulares, (ii) microvesículas: apresentam de 0,1 a 2 µm e são vesículas liberadas diretamente da membrana celular e (iii) corpos apoptóticos: apresentam um diâmetro bem variável, de 100 a 600 nm, e são derivadas de pequenas vesículas de membrana produzidas a partir de células em processo de morte celular por apoptose (Redman e Sargent, 2008; Ludwig e Giebel, 2012; Salomon *et al.*, 2014). Devido à sobreposição de tamanhos entre os diferentes subtipos de vesículas, as suspensões de vesículas extracelulares tendem a ser heterogêneas, sendo difícil a distinção entre os diferentes subtipos de EVs (Lotvall *et al.*, 2014).

Vesículas extracelulares são atualmente reconhecidas como um eficiente mecanismo de comunicação intercelular. Elas são carreadoras de proteínas, lipídeos, DNA, uma variedade de RNAs e microRNAs de suas células de origem para células alvo (Machtinger *et al.*, 2015). As proteínas normalmente expressas em EVs podem incluir tetraspaninas (CD9, CD81, CD63, CD82), proteínas de choque térmico (Hsp70, Hsp90), moléculas de adesão (ICAM-1), proteínas do citoesqueleto (tubulinas e actinas) e membros do complexo endossomal ESCRT (*do inglês: endosomal sorting complexes required for transport*) como TSG101, entre muitas outras (revisado por (Lin *et al.*, 2015)). É importante salientar que, apesar das vesículas extracelulares conterem muitos componentes em comum, o seu tamanho, a sua forma e o seu conteúdo são representativos do estado e da composição das suas células originárias e, é bem provável que essas características tenham papel essencial na função dessas vesículas.

A composição proteica das vesículas extracelulares pode influenciar na sua interação com células alvo de diferentes maneiras. Moléculas ancoradas à membrana de EVs podem promover a interação com outras células (i) através da adesão com lipídeos ou ligantes na superfície da célula alvo, (ii) através da internalização da vesícula na célula alvo, (iii) através da fusão da membrana de EVs com a membrana plasmática da célula alvo ou (iv) através da mudança no fenótipo da célula alvo pela transferência de receptores ativos para sua membrana (Al-Nedawi *et al.*, 2008; Yanez-Mo *et al.*, 2015).

O interesse em se estudar EVs foi influenciado pela descrição da sua secreção por células apresentadoras de antígeno, evidenciando seu papel na resposta imune (Raposo *et al.*, 1996). EVs podem atuar como vesículas imunoativadoras, carreando antígenos que estimulam diretamente as células T, transferindo antígenos para as células dendríticas para estimulação indireta de células, ou funcionando independentemente de antígenos, expondo as células a fatores estimuladores como HSP70 ou ligantes de NKG2D. Em contraste, elas podem funcionar como vesículas imunoinibidoras, causando a apoptose ou inibindo a atividade citotóxica de células NK e linfócitos T ou inibindo a maturação de células dendríticas (revisado por (Thery *et al.*, 2009)). Além de mediar a troca de informações por meio de moléculas de superfície, EVs tem-se mostrado carreadoras de mediadores solúveis importantes, como citocinas, ainda que a associação entre citocinas e EVs seja ainda mal compreendida (Yanez-Mo *et al.*, 2015).

Os exossomos representam o subtipo de vesícula extracelular secretada mais estudado atualmente. Desde sua descoberta, há 25 anos, os grupos de Philip Stahl, nos Estados Unidos, e de Rose Johnstone, no Canadá, demonstraram, em um experimento de microscopia ótica que, em reticulócitos em maturação, os endossomos tardios multivesiculares poderiam se fundir com a membrana da célula e liberar seu conteúdo através de exocitose, secretando numerosas vesículas pequenas (Pan *et al.*, 1985; Johnstone *et al.*, 1987). Mais de uma década depois, exossomos foram isolados de linfócitos B e foi demonstrado que exibiam características de células apresentadoras de antígenos, resultando na indução de resposta imune através de linfócitos T (Raposo *et al.*, 1996). Desde então, têm-se demonstrado a secreção de exossomos em uma grande variedade de células, incluindo as células T, os mastócitos, as células dendríticas, as células tumorais, as células mesenquimais, as células do sincitiotrofoblasto, os hepatócitos e têm-se demonstrado a existência de exossomos, *in vivo*, em vários fluidos biológicos como urina, soro, plasma, fluido epididimal, líquido amniótico, lavado bronco alveolar, leite materno entre outros (revisado por (Yanez-Mo *et al.*, 2015)).

Exossomos são pequenas vesículas com diâmetro de 30 a 160 nm, limitados por uma bicamada lipídica e com densidade entre 1,13 e 1,19 g/mL, dependendo do tipo celular em que foi produzido (Ludwig e Giebel, 2012). O mecanismo pelo qual os exossomos são formados está relacionado à invaginação da membrana limitante endossômica, de tal forma que o conteúdo acumulado no seu interior corresponda ao conteúdo citoplasmático, sendo essas vesículas chamadas de multivesículas endossômicas (MVE). No momento em que ocorre a fusão entre as MVEs e a membrana plasmática da célula, as microvesículas internas das MVEs são liberadas como exossomos, os quais podem se mover para tecidos distantes, influenciando vários aspectos do ambiente celular. Alternativamente, as MVEs

podem se fundir com lisossomos, os quais degradam o seu conteúdo interno (They, 2011) (Figura 7).

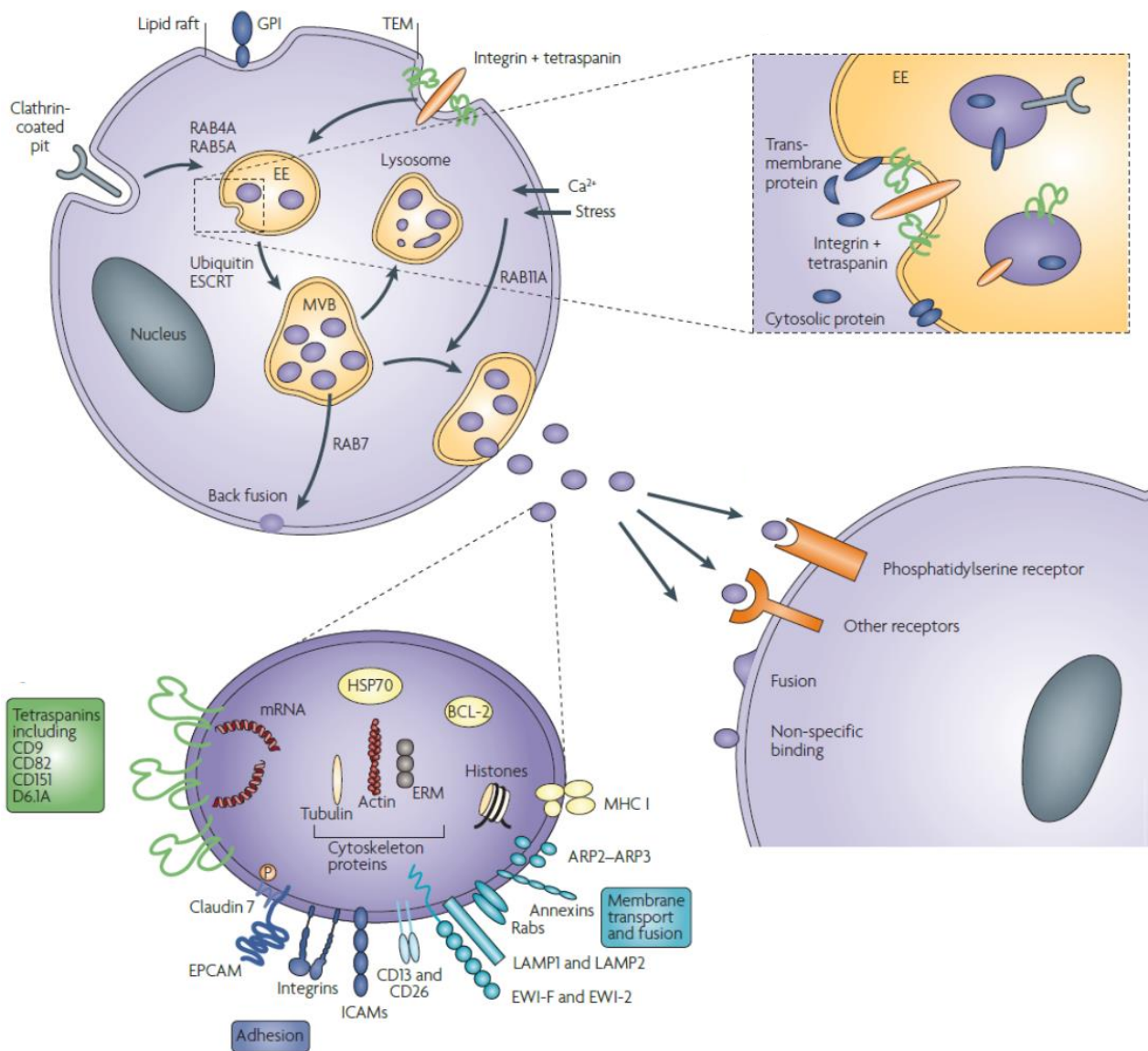


Figura 7. Formação e composição de vesículas extracelulares. As EVs são formadas pela invaginação de endossomos. No momento que estes endossomos, agora multivesiculares, se fusionam com a membrana plasmática da célula, as vesículas são secretadas, podendo carrear informação para células efectoras. As EVs podem se comunicar com as células alvo por diversas vias, como a via endocítica ou a fusão com a membrana da célula alvo, secretando o conteúdo diretamente dentro do citoplasma. Fonte: (Zoller, 2009).

As vantagens do transporte de proteínas e de moléculas de sinalização celular através de exossomos são muitas, como, por exemplo, a preservação da estrutura tridimensional e da atividade biológica das proteínas transportadas, a independência do contato célula-a-célula para o desenvolvimento de sinal, o carregamento de moléculas de

menor mobilidade, a alta concentração de moléculas carregadas, a independência da síntese de proteínas *de novo* e o efeito biológico à distância (Mincheva-Nilsson e Baranov, 2014).

Além do conjunto definido de proteínas que são expressas normalmente pelas vesículas extracelulares, mencionadas anteriormente, os exossomos apresentam moléculas que são específicas do tipo celular do qual o exossomo foi secretado como, por exemplo, receptor de linfócitos B em exossomos derivados de linfócitos B, CD11c (marcador específico de células dendríticas) em exossomos derivados de células dendríticas e moléculas envolvidas na apresentação de antígenos (moléculas MHC de Classe I e II, CD1) em exossomos derivados de células apresentadoras de antígenos (Chaput e Thery, 2011). Além disso, em 2007, um estudo de Valadi e colaboradores relatou a presença de RNAm's e microRNA's em exossomos derivados de mastócitos. O mesmo estudo demonstrou que alguns RNAm's presentes nesses exossomos puderam ser traduzidos em células alvo, sugerindo a transferência de informação genética por essas vesículas. Curiosamente, nem todos os RNAm's presentes na célula foram encontrados nos exossomos, havendo uma aparente especificidade por algumas sequências de RNAm's dentro das vesículas secretadas (Valadi *et al.*, 2007).

Em relação às respostas imunes mediadas por exossomos, evidências sugerem que exossomos carregadores de complexos peptídeo-MHC podem ligar-se diretamente aos receptores de células T, estimulando células TCD4⁺ e TCD8⁺. Por outro lado, alguns exossomos secretados de células tumorais apresentam moléculas imunossupressoras, as quais podem diminuir a proliferação de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, diminuir a proliferação de células NK e promover a diferenciação de linfócitos T reguladores (Bobrie *et al.*, 2011).

2.8.1. Vesículas extracelulares e gestação

O papel das vesículas extracelulares e a sua relação com complicações gestacionais tem sido investigados por diversos grupos de pesquisa. Estudos tem demonstrado que tanto a composição fenotípica, quanto o número de EVs circulantes estão alterados no sangue periférico de mulheres que apresentam problemas gestacionais, como pré-eclampsia e aborto espontâneo recorrente se comparados à controles férteis (Redman e Sargent, 2000; Carp *et al.*, 2004; Goswami *et al.*, 2006).

No que se refere a uma gestação de curso normal, EVs derivadas de tecidos placentários são um componente comum no sangue periférico materno. Quatro tipos de vesículas são liberadas pelos tecidos reprodutivos, incluindo exossomos, microvesículas, corpos apoptóticos e vesículas derivadas do sinciotrofoblasto (revisado por (Redman *et al.*, 2012; Tannetta *et al.*, 2014).

Várias são as evidências de que EVs secretadas pelas células do sinciotrofoblasto transportam importantes moléculas de sinalização e mediadores solúveis para alvos

específicos, tanto localmente quanto em nível sistêmico (Oreshkova *et al.*, 2012; Arck e Hecher, 2013). Muitas funções imunomoduladoras têm sido propostas para EVs derivados de tecidos reprodutivos, como a diminuição da proliferação e citotoxicidade de linfócitos T e diminuição da citotoxicidade de células NK pela supressão da expressão do receptor NKG2D (Hedlund *et al.*, 2009; Thery *et al.*, 2009). Outro mecanismo de imunomodulação estaria associado à expressão de moléculas Fas-ligante (FasL) por EVs derivadas do sinciciotrofoblasto, as quais são conhecidas por induzir a apoptose de linfócitos T ativados (Kim *et al.*, 2005). Dessa forma, se tornam evidentes os mecanismos envolvidos no controle da resposta imune por EVs na interface materno-fetal (Mincheva-Nilsson e Baranov, 2014). Os mecanismos imunomoduladores mediados por EVs durante a gestação parecem estar relacionados com a liberação de moléculas MIC e ULBP solúveis (Mincheva-Nilsson e Baranov, 2010) e, ainda, através da expressão de moléculas MHC de Classe I, como HLA-G, em EVs derivadas do sinciciotrofoblasto, capazes de modular a citotoxicidade das células NK e linfócitos T no curso da gestação (Kshirsagar *et al.*, 2012).

A chave para o sucesso da reprodução em mamíferos está diretamente relacionada à secreção de fatores imunoreguladores que modulam/alteram a resposta imune materna durante a gestação. Vesículas extracelulares carreadoras de moléculas ligantes e receptores imunomoduladores podem oferecer novas possibilidades de diagnóstico no acompanhamento da gravidez e durante os procedimentos e estratégias relacionadas à fertilização (Mitchell *et al.*, 2015). Levando em consideração que as diferenças e/ou semelhanças funcionais e de expressão entre moléculas solúveis totais e moléculas solúveis carreadas por EVs não são claras, as primeiras observações sobre as diferenças no perfil de expressão dessas moléculas em cenários distintos, como complicações gestacionais, são passos essenciais.

3. JUSTIFICATIVA

A linha de pesquisa em Imunologia da Reprodução constitui um capítulo adjuvante na compreensão e tentativa de resolução de casos de insucesso reprodutivo. O conhecimento das possíveis associações entre genes candidatos, considerados importantes no processo gestacional, e seus perfis de expressão em casais com casos de falha de implantação embrionária, poderia auxiliar na identificação e monitoramento de complicações gestacionais específicas, funcionando como um possível marcador prognóstico, ou como complemento de terapias que visam o sucesso implantacional.

Neste contexto, esse é um estudo pioneiro que investiga o impacto da diversidade genética e das diferenças no perfil de expressão de moléculas HLA de Classe I não clássicas e moléculas tipo HLA solúveis totais e carregadas por vesículas extracelulares em situações de falha de implantação embrionária. O campo de pesquisa sobre EVs relacionadas à gestação e a distúrbios gestacionais como abortos espontâneos recorrentes, falha de implantação embrionária e infertilidade está apenas no seu começo. Além disso, a utilização de vesículas extracelulares para intervenção terapêutica ou uso prognóstico está iniciando seus primeiros passos. Portanto, uma ampla investigação visando uma melhor compreensão sobre o papel e a relevância de EVs em diferentes situações gestacionais é necessária.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

O presente estudo tem por objetivo investigar a associação entre a variabilidade genética dos genes *HLA-G*, *HLA-E* e *MICA* e os níveis de expressão de moléculas HLA de Classe I não clássicas (*HLA-G*, *HLA-E*) e moléculas tipo-HLA (*MICA*, *MICB*, *ULBP-2*) solúveis totais e carregadas por vesículas extracelulares em casos de falha de implantação embrionária e controles férteis.

4.2. Objetivos Específicos

- Caracterização e comparação de vesículas extracelulares secretadas no sangue periférico de mulheres com falha de implantação embrionária, mulheres férteis não gestantes e mulheres férteis gestantes;

- Comparar as frequências alélicas e genótípicas dos genes *HLA-G*, *HLA-E* e *MICA* observadas no grupo de casais com falha de implantação embrionária e no grupo de casais controle férteis não gestantes;

- Comparar as frequências haplotípicas do gene *HLA-G* e do polimorfismo de *HLA-G* 14pb inserção/deleção observadas no grupo de mulheres com falha de implantação embrionária e mulheres férteis não gestantes;

- Comparar os níveis de expressão das moléculas *HLA-G*, *HLA-E*, *MICA*, *MICB* e *ULBP-2* solúveis totais e carregadas por vesículas extracelulares secretadas no sangue periférico de mulheres com falha de implantação embrionária e mulheres férteis não gestantes;

- Investigar a associação entre os haplótipos observados do gene *HLA-G* e do polimorfismo de *HLA-G* 14pb inserção/deleção e os níveis de expressão das moléculas *HLA-G* solúveis totais e carregadas por vesículas extracelulares secretadas no sangue periférico de mulheres com falha de implantação embrionária e mulheres férteis não gestantes;

- Investigar a associação entre os alelos observados dos genes *HLA-G*, *HLA-E* e *MICA* e os níveis de expressão das moléculas *HLA-G*, *HLA-E*, *MICA* solúveis totais e carregadas por vesículas extracelulares secretadas no sangue periférico de mulheres com falha de implantação embrionária e mulheres férteis não gestantes.

5. RESULTADOS

Os resultados serão apresentados em capítulos, no formato de artigos publicados nos periódicos científicos Immunobiology e American Journal of Reproductive Immunology, respectivamente.

Os resultados que foram analisados, mas que não fazem parte dos artigos científicos serão apresentados na forma de resultados complementares.

5.1. Capítulo I

Manuscrito publicado no periódico científico **Immunobiology**.



Contents lists available at ScienceDirect

Immunobiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/imbio

High levels of circulating extracellular vesicles with altered expression and function during pregnancy

Fabiola da Silva Nardi^{a,b,c}, Tatiana Ferreira Michelon^d, Jorge Neumann^d,
Luis Felipe Santos Manvailer^{b,c}, Bettina Wagner^b, Peter A. Horn^b,
Maria da Graça Bicalho^a, Vera Rebmann^{b,*}

^a Genetics Department, Laboratory of Immunogenetics and Histocompatibility (LIGH), Federal University of Paraná, 19031 Curitiba, Brazil

^b Institute for Transfusion Medicine, University Hospital Essen, 45147 Essen, Germany

^c CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil, Brasília—DF 70, 040-020, Brazil

^d Reproductive Immunology Centre, 90470-280 Porto Alegre, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 December 2015

Accepted 11 March 2016

Available online xxx

Keywords:

Pregnancy
Extracellular vesicles
TGFβ-1
IL-10
NK cells
Caspase-3 activity

ABSTRACT

Extracellular vesicles (EVs) are widely considered important modulators of cell–cell communication and may interact with target cells locally and on a systemic level. Several studies had shown that circulating EVs' levels are increased during pregnancy. However, EVs characteristics, composition and biological functions in pregnancy still need to be clarified. This study aims to determine if circulating EVs during pregnancy are modified regarding levels, markers and cytokine profile as well as their reactivity towards peripheral blood cells. 26 pregnant women (PW) being in the second gestational trimester and 59 non-pregnant women (NPW) were investigated. EVs enrichment was performed by ExoQuick™ or ultracentrifugation; nanoparticle tracking analysis, SDS-PAGE followed by Western Blotting and densitometry, and IFN-γ, IL-10 and TGF-β1 ELISA for EVs characterization; imaging flow cytometry to analyze EVs' uptake by peripheral blood cells and flow cytometry were performed to analyze EVs function regarding induction of caspase-3 activity. Circulating EVs' levels were increased during pregnancy [26.9×10^6 EVs/ml (range: 6.4–46.3); $p = 0.003$] vs NPW [18.9×10^6 EVs/ml (range: 2.5–61.3)]. Importantly, the immunosuppressive TGF-β1 and IL-10 cytokine cargo were increased in EVs of PW even after normalization to 1 million EVs [TGF-β1: 0.25 pg/10⁶ EVs (range: 0.0–2.0); $p < 0.0001$] and [IL-10: 0.21 pg/10⁶ EVs (range: 0.0–16.8); $p = 0.006$] vs NPW. Although EVs derived from non-pregnant and pregnant women were taken up by NK cells, the latter exclusively enhanced the caspase-3 activity in CD56^{dim} NK cells (8.2 ± 0.9 ; $p = 0.02$). The qualitative and quantitative pregnancy-related alterations of circulating EVs provide first hints for an immune modulating role of circulating EVs during pregnancy.

© 2016 Published by Elsevier GmbH.

1. Introduction

Extracellular vesicles (EVs) are secreted membrane vesicles released by most cell types (Ludwig and Giebel, 2012). EVs are widely considered to be important modulators of cell–cell communication and may interact with target cells either locally or in a systemic level. EVs have been detected in a wide range of fluids,

including amniotic fluids, urine (Keller et al., 2007) and peripheral blood (Hunter et al., 2008). They are heterogeneous with regard to their size and molecular composition. According to their size EVs can be stratified into apoptotic bodies (100–600 nm), microvesicles (0.1–2 μm) and exosomes (30–160 nm). They carry a conserved set of proteins including tetraspanins (CD9, CD81, CD63, CD82), heat shock proteins (Hsp70, Hsp90), adhesion molecules (ICAM-1), cytoskeletal proteins (tubulin, actin) and members of endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT) like TSG101 (for overview see (Ludwig and Giebel, 2012; Mincheva-Nilsson and Baranov, 2014; Sokolova et al., 2011; Tannetta et al., 2014; Toth et al., 2007)). In addition, EVs bear several types of antigens, cell surface expressed receptors or ligands. Furthermore, EVs can serve as transport cassettes or disseminated storage pools of mRNA, microRNA (Liu and Lu, 2015) or bioactive effector molecules e.g. cytokines transcription factors or onco-proteins (Sohda et al., 2015;

* Corresponding author: Institute for Transfusion Medicine, University Hospital Essen, Germany Transplantationsdiagnostik und FuE Virchowstraße, 179 D-45147 Essen, Germany.

E-mail addresses: fsnardi@gmail.com (F.d.S. Nardi), tatimich@yahoo.com (T.F. Michelon), jorge.neumann@uol.com.br (J. Neumann), felipemanva@hotmail.com (L.F.S. Manvailer), bettina.wagner@uk-essen.de (B. Wagner), peter.horn@uk-essen.de (P.A. Horn), ligh@ufpr.br (M.d.G. Bicalho), vera.rebmann@uk-essen.de (V. Rebmann).

Balaj et al., 2011). In this way EVs can stimulate target cells directly via a ligand-receptor-mediated interaction or may transfer genetic information/bioactive molecules to target cells. Consequently, EVs have been reported to be involved in the modulation of immune response, in the cell migration, angiogenesis and cell proliferation (for overview see (Kharaziha et al., 2012; van Dommelen et al., 2012; Vlassov et al., 2012; Zhang et al., 2012)). It is important to note that their size, shape, content and mode of generation mostly reflect the state and the composition of the cellular sources and these features probably influence their function.

Regarding immune modulation, EVs like exosomes can act as immunoactivating vesicles by presentation of MHC-peptide complexes to T cells and/or to dendritic cells (DC) resulting in the stimulation of these effector cells (Admyre et al., 2006; Thery et al., 2002). On the other hand, they can act as immunosuppressive vesicles, introducing homeostasis or immune tolerance by the induction of T cell apoptosis, impairment of DC maturation or preventing NK and T cell cytotoxicity “(for overview see (Southcombe et al., 2011; Thery et al., 2009)). For all those reasons, EVs are discussed to be operative in pathophysiological processes of autoimmunity, cancer, transplantation or pregnancy. Recently, EVs like exosomes have been used in a clinical setting for the treatment of therapy-refractory graft-versus-host disease (Kordelas et al., 2014).

In pregnancy there is a growing body of evidence that the human placenta cells, including syncytiotrophoblast and cytotrophoblast, release EVs carrying signaling molecules and genetic information to specific targets locally at the maternal-fetal interface or systemically through the peripheral blood, contributing to promote intracellular signaling for endometrial receptivity (Mincheva-Nilsson and Baranov, 2014; Redman and Sargent, 2007; Salomon et al., 2014). EVs like exosomes trafficking within the pregnancy scenario are proposed to have a role in modulation of immune cells involved in the maternal-fetal cross-talk e.g. influencing T and NK cell functions or introducing apoptotic activity through CD95 ligand (CD95L or Fas-L) mediated pathway (Abrahams et al., 2004; Frangsmyr et al., 2005; Hedlund et al., 2009; Stenqvist et al., 2013; Taylor et al., 2006) or modulating peripheral immune cells activation and dampening via trophoblast microvesicles (Holder et al., 2012). Furthermore, the maternal immune system has to reshape to an immune-tolerance-inducing status leading to a shift of effectors in the periphery including immune cells, cytokines, growth factors and EVs (Beer et al., 1996; Chernyshov et al., 2014), allowing the viability of the semi-allogeneic conceptus.

In the maternal blood circulation, a mixture of EVs population from distinct sources can be expected to be found, including vesicles derived from syncytiotrophoblasts, leukocytes, endothelial cells and platelets. Moreover, the placenta-derived EVs are a constitutive component in the peripheral blood during normal pregnancy and the placenta seems to release EVs in the maternal circulation of several sizes, sources and morphologies (reviewed by (Mincheva-Nilsson and Baranov, 2014)). Interestingly, a considerable number of recent studies revealed that the concentration of EVs like exosomes or syncytiotrophoblast microparticles present in the maternal circulation increase significantly during normal pregnancy compared to non-pregnant women (Salomon et al., 2014; Taylor et al., 2006; Germain et al., 2007; Sarker et al., 2014). The presence of increased levels of EVs in the blood circulation of pregnant women may directly be associated with the immune mechanisms supporting gestation. Thus, the identification and characterization of bioactive EVs in maternal blood during pregnancy open a new perspective to gain insight into novel aspects contributing to maternal immunomodulation favoring or maintaining pregnancy.

To establish qualitative and quantitative pregnancy-related alterations of EVs circulating in the maternal blood, EVs derived

from blood samples of pregnant women in the second gestational trimester were studied in comparison to EVs enriched from blood samples of healthy voluntary non-pregnant women regarding EVs concentration, their markers and cytokine profiles as well as their reactivity towards peripheral blood cells.

2. Material and methods

2.1. Study population and sample collection

26 pregnant women (PW) and 59 non-pregnant women (NPW) were enrolled in this study and analyzed for biologic and clinical characteristics including age, previous conceptions and previous abortions. The blood samples of PW and NPW groups were collected at the Clinical Hospital of Federal University of Paraná, Curitiba and at the Reproductive Immunology Centre, Porto Alegre, Brazil.

The blood samples belonging to the PW group were collected between 12 and 28 gestational weeks. The mean age of the PW group was 31.5 ± 8.3 (mean \pm SD) (range: 20–46) and the mean number of the PW group with previous conceptions ($n=16$, 61.5%) was 1.8 ± 2.9 (range: 0–14). The mean age for the NPW group was 37.1 ± 4.1 (range: 29–45) and the mean number of the NPW group with previous conceptions ($n=24$, 40.6%) was 0.9 ± 1.1 (range: 0–3). Two hours after blood collection, the samples were centrifuged at 1500 g for 20 min and the corresponding serum and plasma were stored at -80°C for subsequent biological analysis.

2.2. Enrichment of circulating EVs

For purification and precipitation of extracellular vesicles ExoQuick™ solution (System Biosciences, Inc.) was used according to manufacturer's instructions. Briefly, serum samples were centrifuged at 3000 g for 15 min to remove cells and cells debris. After centrifugation, 250 μl from samples were mixed with 63 μl of ExoQuick™ solution and incubated overnight at 4°C followed by a second centrifugation step at 1500 g for 30 min. The supernatant was discarded and tubes were centrifuged once more (1500 g for 5 min). All traces of fluid were aspirated, and then pellets were filled up to the starting volume (250 μl) with distilled water and stored at -80°C .

2.3. Identification of nanoparticles by nanoparticle tracking analysis (NTA)

NTA measurements were performed using ZetaView® Particlemetrix (Particle Metrix, GmbH) as previously described (Sokolova et al., 2011). The determination of vesicle concentration and size distribution in liquid suspension were based in the rate of Brownian motion and of nanoparticles in a light scattering system. The samples were diluted (1:10.000) with NaCl 0.9% and injected manually and data acquisition was undertaken at room temperature. Polystyrene Nanobeads Nist Traceable Particle Size of 0.1 μm (Polysciences, Inc.) were used as a size control. Data were analyzed by ZetaView version 8.02.24 software. NTA analysis showed a particle size distribution with an average of 145.0 ± 9.9 (mean \pm SD) (Fig. 1 Supplementary material). The coefficients of variation among different ZetaView measurements were 24.8% for the enumeration and 6.7% for the size.

2.4. SDS-PAGE and western blot analysis of EVs protein expression

The expression of typical EVs proteins were analyzed by Western blot after ExoQuick™ enrichment from serum samples. As recommended (Lotvall et al., 2014), we tested our EVs fractions under reducing conditions for the presence of transmembrane or

lipid-bound extracellular proteins like CD9, CD81, CD63 (SBI Systems Bioscience Inc., Mountain View, CA, USA) and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1, Immunotech, France); for cytosolic proteins, including TSG101 (Sigma-Aldrich, USA), being a member of the endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) (Babst, 2011) and for Heat-shock-protein 70 (Hsp70, R&D Systems, Germany). The antibody specific for the mitochondrial protein cytochrome C (CYC1, clone 7H8.2C12, BioLegend, USA) was used as negative control, to rule out the contamination of the EVs fractions with cells debris, as recommended as minimal experimental requirements for definition of EVs (Lotvall et al., 2014). Before SDS-PAGE and western blotting, ExoQuick™ reagent was removed from the EVs suspension by PD SpinTrap G-25 (GE Healthcare, Freiburg, Germany), according to manufacturer's instructions. The EVs markers and negative control (CYC1) were studied after precipitation by SDS-PAGE using a 10 or 12.5% polyacrylamide gel, according to the proteins' molecular weight, followed by Western blot. Western blotting membranes were blocked for at least 1 h with 5% fat-free powder milk (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA) in phosphate-buffered saline (PBS) with 0.05% Tween 20. For detection of the EVs marker specifically the respective rabbit monoclonal antibodies (anti-human CD9, CD81, CD63) were incubated overnight in a 1:2000 dilution, whereas the polyclonal antibodies were used in different dilutions (anti-human ICAM-1, 1:100; Hsp70, 1:500; TSG101, 1:1000 and CYC1, 1:500). After removing unbound antibodies by three washing steps with PBS/Tween 20 (0.05%), horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (H + L) or goat anti-mouse IgG (H + L) secondary antibodies (Pierce®, Thermo Scientific, USA) were applied for 45 min, followed by four washing steps. The western blot acquisition was performed in two steps. First, the stained protein ladder was acquired by white light separately and second, the bound immune complexes were visualized by chemiluminescence and merged with the protein ladder image, resulting in an increased background in the protein ladder images. The detection system Fusion Fx7 (Vilber Lourmat Germany, GmbH) and the software Bio-ID (Vilber Lourmat Germany, GmbH) were used for images acquisition. HEK cells (human embryonic kidney cells) lysate and EVs derived from HEK cells culture supernatants served as controls.

2.5. Cytokine ELISA

To quantify the content of interferon gamma (IFN- γ), interleukin-10 (IL-10) and transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) levels, serum derived EVs from PW and NPW were subjected to ultrasound for 10 min before measurement using commercial ELISA kits (eBioscience, Inc., San Diego, USA) according to their protocols. For IFN- γ , IL-10 and TGF- β 1 ELISA the detection limits were 1.95 pg/ml, 1.2 pg/ml and 1.95 pg/ml, respectively.

2.6. Analysis of EVs' uptake by peripheral blood cells using Image Stream—imaging flow cytometry

To test the capacity of EVs to be uptaken by certain peripheral blood cell populations, EVs were enriched from plasma samples of PW or NPW by differential centrifugation steps as previously described, with minor modifications (Caby et al., 2005). Each sample (2 ml) was initially centrifuged at 19,000 \times g for 5 min to sediment cell debris. The supernatants were transferred to ultracentrifuge tubes (Beckman Coulter, Inc., CA, USA) and ultracentrifuged at 139,000 g at 4 °C for 130 min (Beckman-Coulter, Inc., CA, USA). Thereafter the supernatants were discarded and the remaining pellets of EVs were re-suspended in 200 μ l NaCl 0.9%.

EVs were labeled with PKH26 (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA) according to the manufacturer's protocol. The labeling reaction was stopped by adding complete RPMI 1640 medium (Invitrogen™,

Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) containing 1% penicillin, 1% streptomycin, 1% L-glutamin, and 10% inactivated fetal bovine serum depleted from EVs by differential centrifugation steps. For enrichment and removing remained staining dye, EVs were ultracentrifuged at 139,000 g at 4 °C for 70 min and washed with PBS several times. Finally, the labeled pellets were filled up to the starting volume with complete medium.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from 3 different healthy non-pregnant women were isolated with Vacutainer tubes (BD Vacutainer® CPT™, Becton Dickinson Co., Franklin Lakes, USA), followed by several centrifugations steps to deplete platelets and granulocytes contamination. PBMCs were stimulated with IL-2 (interleukin-2, 200 U/ml) (PeproTech, Rocky Hill, USA) overnight at 37 °C, 5% CO₂. After overnight incubation the PBMCs were co-cultured with 25 μ l of extracellular vesicles suspension labeled with PKH26 for 2 h at 37 °C, 5% CO₂. The cells were stained according to the standard protocols with DAPI nucleic acid stain (Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany), anti-CD19 FITC (B cells; clone: HIB19; eBioscience, Inc., San Diego, USA), anti-CD8 FITC (cytotoxic T cells; SK1; Becton Dickinson Co., San Jose, USA), anti-CD3 ECD (T cells; Beckman Coulter, Co., Marseille, France), anti-CD56 ECD (NK cells; Beckman Coulter, Co., Marseille, France), anti-CD14 APC (myelomonocytic cells; clone: 61D3; eBioscience, Inc., San Diego, USA), and anti-CD4 APC (Th1 and Th2 T cells, monocytes and macrophages; SK3; Becton Dickinson Co., San Jose, USA).

The acquisition was performed by using ImageStream^X Imaging Flow Cytometer (Amnis Corporation, Seattle, USA) equipped with INSPIRE software. In total, 10,000 events per sample were analyzed with a 60 \times magnification. FITC, PKH26 and ECD were collected on channels 2 (480–560 nm), 3 (560–595 nm) and 4 (595–642 nm), respectively, excited by 488 nm laser with 100 mW. DAPI was collected on channel 7 (430–505 nm), excited by 375 nm laser with 7 mW and APC was collected on channel 11 (642–745 nm), excited by 642 nm laser with 120 mW. Brightfield and side scatter (SSC) images were collected on channels 1, 9 and 6, respectively.

Data analysis was performed by IDEAS Application software version 6.1. The compensation was performed by using singly stained samples to generate the compensation matrix with the software. The IDEAS wizard for internalization was used to calculate the proportion of certain cell populations showing a co-localization between the respective cell surface markers and the PKH26-labeled EVs. The proportion of EVs positive cell populations was only referred to live cells (DAPI negative cells).

2.7. Detection of caspase-3 expression, degranulation and IFN- γ response in PBMCs

The PBMCs response towards to the immortalized B-lymphoblastoid cell line (RSV) was investigated in presence and absence of EVs derived from samples from three patients of the PW group and three patients of the NPW group. We cultured PBMCs isolated from healthy non-pregnant women in the absence or presence of EVs in a concentration of 20.0 \times 10⁶ EVs/ml, being the mean EVs concentration of both groups, from three women of each group (PW and NPW) for 48 h at 37 °C, 5% CO₂. For CD107a—lysosome associated membrane protein-1 (lamp-1) mobilization, EVs-treated and untreated PBMCs cells were co-cultured with RSV cell line in the presence of phycoerythrin (PE) conjugated mouse anti-human CD107a (clone: H4A3; BD Bioscience, San Jose, CA, USA) in effector/target ratio of 10/1 in a total volume of 200 μ l complete medium at 37 °C, 5% CO₂. After 1 h incubation, Protein Transport Inhibitor Cocktail containing Monensin and Brefeldin A in a final concentration of 2 μ l/ml (eBioscience, Inc., San Diego, CA, USA) was added. After a total incubation time of six hours, the cells were stained with anti-human CD56 ECD and anti-human CD3 PECy7 (clone: SK7; BioLegend, San Diego, CA,

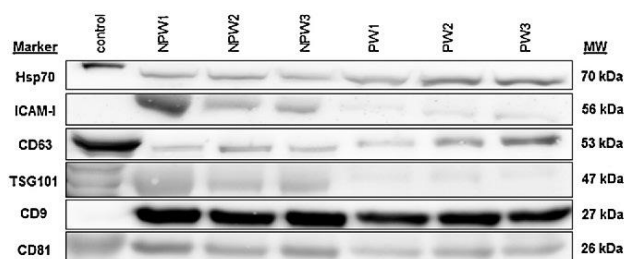


Fig. 1. EVs markers profile expression. EVs were enriched from serum of PW (n = 3) and NPW (n = 3) by precipitation using ExoQuick™ solution. The figure shows representative Western blots for the EVs enriched markers: Hsp70, ICAM-1, CD63, TSG101, CD9 and CD81. EVs derived from HEK cells supernatants were used as positive controls.

USA) to detect specifically NK cells and CD3⁺ T cells. After fixation and permeabilization (Fixation/Permeabilization Solution Kit, BD Bioscience, San Jose, CA, USA) cells were intracellularly stained for FITC conjugated anti-active caspase-3 (clone: C92-605; BD Bioscience, San Jose, CA, USA; (Dai and Krantz, 1999)) and APC conjugated anti-human IFN- γ (clone: 4S.B3; eBioscience, Inc., San Diego, CA, USA).

Isotype matched antibodies served as negative controls (BD Bioscience, San Jose, CA, USA). Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, Krefeld, Germany) was used for flow cytometry analysis of respective surface molecules. Data were acquired by CXP software (Beckman Coulter, Krefeld, Germany) and evaluated by Kaluza® Analysis Software (Beckman Coulter, Krefeld, Germany).

2.8. Statistical analysis

The data are presented either as mean \pm SD or as median with minimum and maximum or interquartile range. After testing for Gaussian distribution, continuous variables were compared by T-test and non-parametric Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, or Wilcoxon tests. Holm-Sidak's test was performed for multiple comparisons analysis. Pearson's coefficient was calculated for correlation tests. Statistical significance was defined as $p \leq 0.05$. Statistical analysis was performed by using either SPSS 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) or GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. Characterization of extracellular vesicles in PW and NPW

The enrichment of extracellular vesicles or exosome like vesicles by ExoQuick™ treatment was confirmed by the representative particles size with an average of about 145 nm, which corresponds to the known size of exosomes ranging between 30 and 160 nm (Ludwig and Giebel, 2012; Sokolova et al., 2011) and by the presence of the six typical EV markers, as well by the absence of CYC1 expression (Fig. 2 Supplementary material). The presence of the typical EV markers including CD9, CD81, CD63, ICAM-1, TSG101 and Hsp70 was analyzed after ExoQuick™ reagent removal by SDS-PAGE and Western blotting in 3 PW and 3 NPW. As shown in Fig. 1, all EVs fractions showed the typical EV markers profile in different expression intensities.

3.2. Concentration of EVs is increased during pregnancy

NTA showed that the concentration of circulating EVs was higher during pregnancy [26.9×10^6 EVs/ml (range: 6.4–46.3)] compared with NPW [18.9×10^6 EVs/ml (range: 2.5–61.3)]; $p = 0.003$; Fig. 2; Mann-Whitney test].

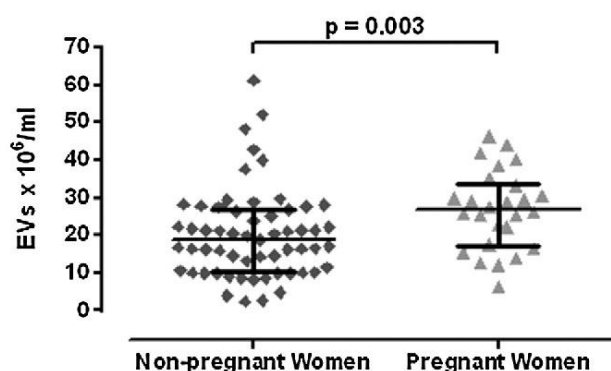


Fig. 2. Quantification of circulating EVs in non-pregnant and pregnant women by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). Circulating EVs were significantly increased in pregnant women (filled triangles, n = 26) compared to non-pregnant women (filled diamonds, n = 59) by Mann-Whitney test. Data are presented as median and interquartile range.

3.3. IL-10 and TGF- β 1 cargo are increased in circulating EVs during pregnancy

It is already known that during gestation the cytokines shift towards a Th2 profile. To study whether the EVs cargo is similarly modified, the total amount of the pro-inflammatory cytokine IFN- γ and the anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF β -1 were determined in EV preparations and related to the corresponding EVs concentration.

Regarding to the total EVs content, the cytokines IFN- γ [329.6 pg/ml (range: 84.8–4635.0)], IL-10 [5.7 pg/ml (range: 0.0–108.1)] and TGF- β 1 [8.5 pg/ml (range: 0.0–56.2)] were significantly increased during pregnancy compared with NPW [IFN- γ : 217.4 pg/ml (range: 0.0–4381.0), $p = 0.02$; IL-10: 0.0 pg/ml (range: 0.0–30.2), $p = 0.002$ and TGF- β 1: 0.0 pg/ml (range: 0.0–348.3), $p < 0.0001$, Mann-Whitney test, Fig. 3A]. However, the normalization of cytokine cargo to million EVs demonstrated that the immunosuppressive cytokines TGF- β 1 [0.25 pg/ 10^6 EVs (range: 0.0–2.0); $p < 0.0001$] and IL-10 [0.21 pg/ 10^6 EVs (range: 0.0–16.8); $p = 0.006$] but not the pro-inflammatory cytokine IFN- γ were significantly increased in PW compared with those of NPW (Fig. 3B). It is important to note that the unspecific enrichment of IFN- γ , IL-10 and TGF β -1 levels can be ruled out in our EVs suspensions, as vesicular levels of IFN- γ , IL-10 and TGF β -1 was null in 35 EVs suspensions despite considerable levels of IFN- γ , IL-10 and TGF β -1 circulating in peripheral blood.

Taken together these results indicate that the cytokine cargo of EVs and/or their cellular source are modified in pregnancy, which might contribute to re-shape the maternal immune response towards the fetal allograft.

3.4. EVs from pregnant women increase the caspase-3 activity in NK CD56^{dim} cells

To test the capacity of EVs uptake by peripheral blood cells, EVs derived from one PW and one NPW were labeled with PKH26 and co-cultured with IL-2 activated PBMCs of non-pregnant women (n = 3) for 2 h. The up-take of EVs by specific cell populations was analyzed by Imaging Flow Cytometer and quantified by the appropriate software wizard (Franzen et al., 2014). As shown in Fig. 4, significant variations ($p < 0.01$, One-way ANOVA) were observed in the proportion of certain cell populations being positive for PKH26, indicating the EVs uptake. The multiple comparisons of certain cell populations showed that, compared to T cells (CD4 or CD8) and monocytes, the proportion of NK and B cells being positive for PKH26 was increased after the co-culturing with EVs. Although very

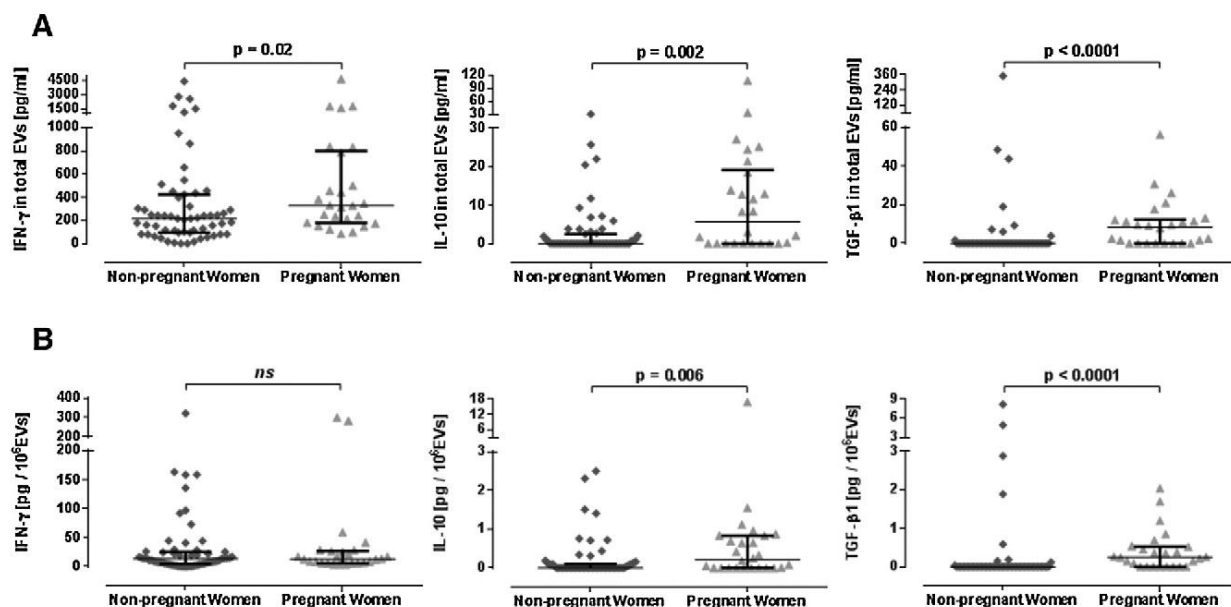


Fig. 3. IFN- γ , IL-10 and TGF- β 1 cytokines content in EVs of non-pregnant women and pregnant women. (A) The IFN- γ , IL-10 and TGF- β 1 (pg/ml) content in EVs were significantly increased during pregnancy ($n = 26$) compared with non-pregnant women ($n = 59$). (B) Among the three cytokines, the TGF- β 1 and IL-10 content per 1 million EVs (pg/ 10^6 EVs) was increased in women during pregnancy as compared to those non-pregnant. Data are presented as median and interquartile range and evaluated by Mann-Whitney test.

similar mean values for the proportions of PKH26 positive B cells and NK cells were found for EVs derived from NPW or PW, a statistical significance was only observed for EVs from NPW (for detailed statistical evaluation see Table 1 Supplementary material).

As NK cell functionality is considered to be an important component for the alloreactivity of the maternal immune system towards the fetus, we investigated the functional consequences of EVs uptake by NK cells. Due to the fact that after co-culturing of PBMCs with EVs, a substantial amount of dead cells was observed (for

details see Table 2 Supplementary material) and that CD56 $^+$ cells (NK cells) being positive for PKH26-labeled EVs appeared to exhibit at higher percentage of degranulation, the caspase-3 activity was analyzed in PBMCs of a healthy non-pregnant woman being co-cultured with and without EVs derived from PW ($n = 3$) and NPW ($n = 3$) by flow cytometry. After co-culturing of PBMCs with EVs derived from pregnant women, a significant increase of caspase-3 activity (mean \pm SD in%) was found in CD56 $^+$ NK cells (160.0 ± 16.2 ; $p = 0.007$) compared with non-treated PBMCs (100.0%).

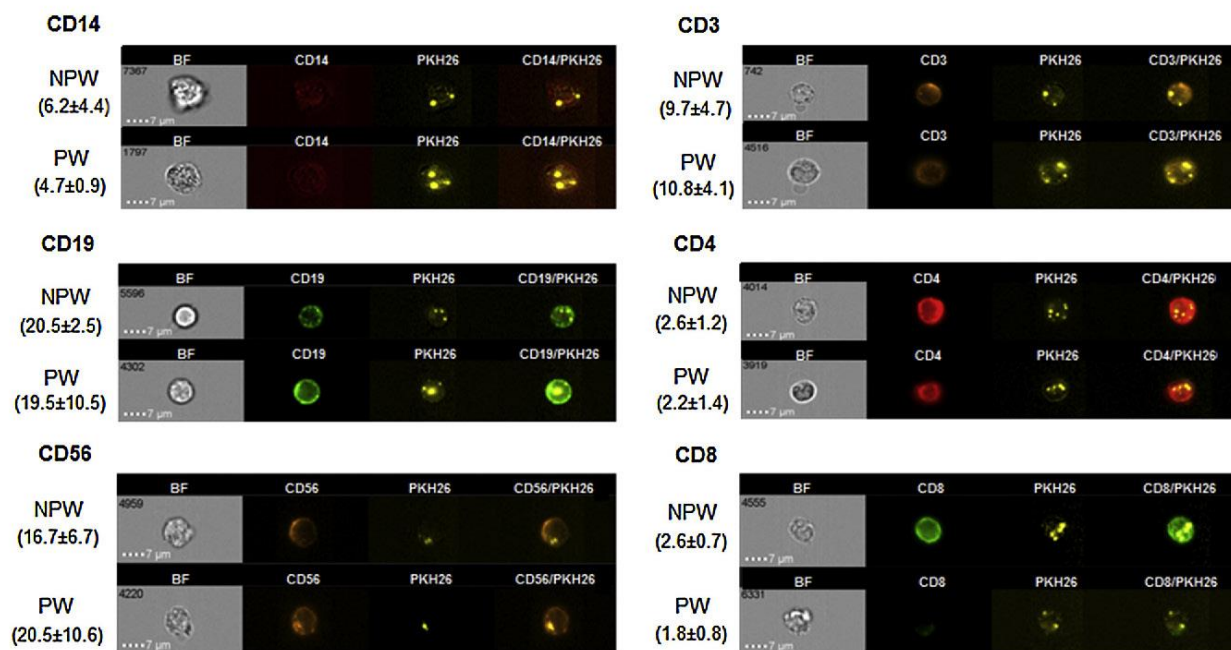


Fig. 4. Uptake of EVs derived from a non-pregnant woman and a pregnant woman by certain peripheral blood cell populations. Representative pictures from the Amnis ImageStreamX showing bright field (BF) images and the corresponding surface staining for monocytes (CD14), B cells (CD19), NK cells (CD56), or T cells (CD3, CD4, CD8), the PKH26 labeled EVs, and the merge of surface staining and PKH26-labeled EVs. On the left the proportion of the respective cell population positive for PKH26 (mean \pm SD in percentage) from three independent experiments is shown.

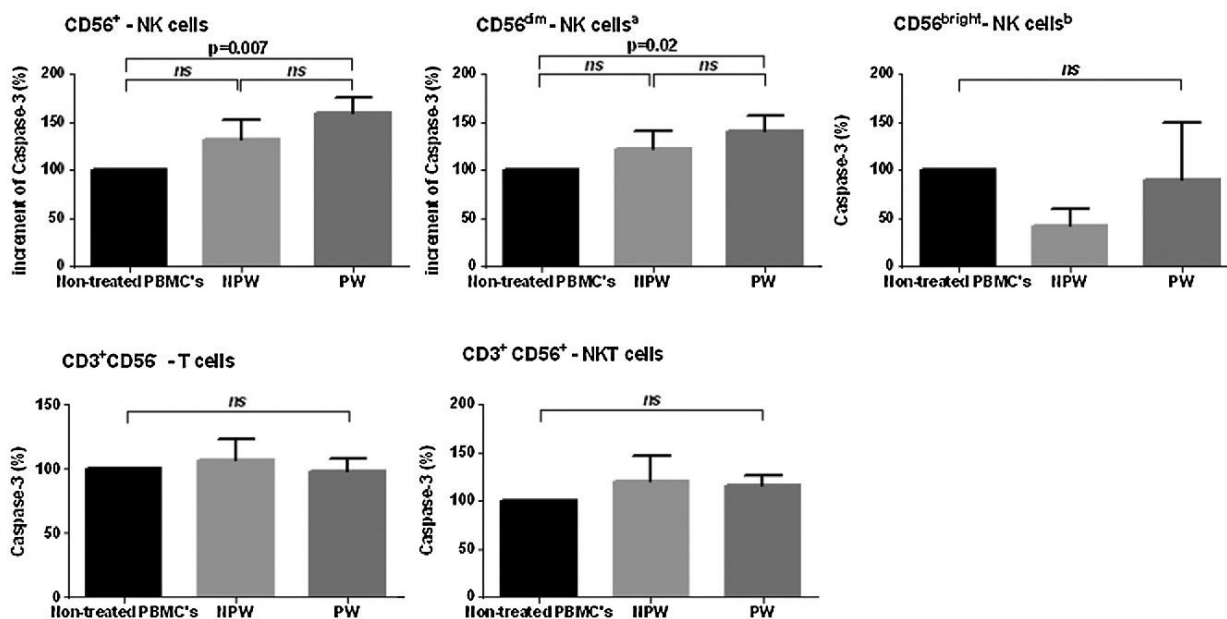


Fig. 5. Induction of caspase-3 activity in PBMCs by the co-culture with EVs derived from non-pregnant and pregnant women. After co-culture of PBMCs with EVs derived from pregnant women (PW, $n = 3$), but not with EVs derived from non-pregnant women (NPW, $n = 3$), the caspase-3 activity was found to be increased in NK cells, especially in CD56^{dim} NK cells compared to non-treated cells. No differences were found for CD56^{bright} NK cells, T (CD3⁺CD56⁻) or NKT (CD3⁺CD56⁺) cells. The data are shown as proportion of increment (%) compared to non-treated PBMCs. Data are presented in mean \pm SD. (a) indicates low-density expression of CD56⁺; (b) indicates high-density expression of CD56⁺.

Stratifying NK cells into CD56^{dim} and CD56^{bright} it became evident that the caspase-3 activity was increased in the CD56^{dim} NK cells (141.0 ± 15.3 ; $p = 0.02$) but not in the CD56^{bright} cells (89.7 ± 59.6). In agreement to the low EVs uptake rate by T cells evidenced by flow imaging cytometer results, no substantial effects on the caspase-3 activity in T cells (CD3⁺CD56⁻) or NKT cells (CD3⁺CD56⁺) were observed. Furthermore, for EVs enriched from NPW no differences of caspase-3 activity were found between EVs treated and non-treated PBMCs (Fig. 5). These results corroborate that EVs derived from pregnant women have the capacity to contribute to an immunosuppressive scenario during pregnancy by inducing apoptosis in cytotoxic CD56^{dim} NK cells via a caspase-3-mediated pathway.

Additionally, the mobilization of CD107a and IFN- γ response of PBMCs after a co-culturing with and without EVs derived from PW and NPW groups was investigated towards the RSV cell line. However, no differences were found in NK, T and NKT cells for CD107a mobilization and IFN- γ response.

4. Discussion

During pregnancy, the immune system of the mother has to fulfill paradoxical functions on the one hand allowing the survival of the allogeneic fetus by suppressing the allogeneic immune response, but facilitating a systemic inflammatory response for the maternal adaptation to vasculogenesis and angiogenesis at the maternal-fetal interface on the other hand (Yagel et al., 2005). Currently, EVs are discussed as part of this scenario, with functions in immune signaling, intercellular communication and/or immune regulation, taken place locally at the maternal-fetal interface (syncytiotrophoblast microparticles) or systemically in the maternal blood (exosomes) (for review see (Mincheva-Nilsson and Baranov, 2014)). In our study, we clearly demonstrate considerable qualitative and quantitative pregnancy-related alterations of EVs circulating in the maternal blood: EVs derived from pregnant women (i) have a higher concentration in peripheral blood. (ii) They display a significant increase of TGF- β 1 and IL-10 cargo,

whereas EVs markers profile is comparable to EVs derived from non-pregnant women. (iii) In view of function, exclusively EVs from pregnant women have the capacity to enhance caspase-3 activity in cytotoxic CD56^{dim} NK cells. These findings were carved out by case-controlled study comparing EVs derived from pregnant women, being in the second trimester of gestation, with the ones derived from non-pregnant women.

Concerning the concentration of EVs circulating in the blood, it became evident that pregnant women present a significantly higher EVs levels than non-pregnant women. This observation is in line with several studies analyzing the levels of circulating exosomes in relation to the gestational age (Salomon et al., 2014; Taylor et al., 2006; Sarker et al., 2014) or syncytiotrophoblast microparticles, cell derived microparticles or EVs in context with pregnancy-related complications (Germain et al., 2007; Alijotas-Reig et al., 2013; Dragovic et al., 2013). All these findings argue that higher levels of EVs support a successful pregnancy. Reasons for the higher numbers of EVs circulating in the blood are manifold, including (i) the release and accumulation of syncytiotrophoblast microvesicles (Southcombe et al., 2011) or placenta derived exosomes (Salomon et al., 2014) in the blood and (ii) the enhanced release of EVs from peripheral blood cells, endothelial cells or platelets upon activation, during apoptosis and under cellular stress (for review see (Yuana et al., 2013)). It will definitely be an intriguing idea to use the enumeration of circulating EVs or certain subsets of EVs in future to predict the pregnancy outcome.

The identification of EVs with certain protein composition might introduce novel perspectives to understand how EVs play a role in the establishment and/or maintenance of pregnancy and why certain cells release or do not release EVs. With regard to EV markers expression CD9, CD81, CD63, ICAM-1, TSG101 and Hsp70, no significant differences were found among the two cohorts supporting the specificity of our EVs isolation method.

The pro-inflammatory IFN- γ and also the anti-inflammatory IL-10 and TGF- β 1 cytokines, that we investigated in our study, are considered to be essential in the course of pregnancy: IFN- γ is directly related with cell mediated immunity, inhibition of

Th2 profile cell growth and induction of MHC class I molecules expression (Hunter and Reiner, 2000). Furthermore, IFN- γ is operative during activation of the maternal immune system via the induction of chemokine CXCL10, known to act as modulators of angiogenesis (Gotsch et al., 2007). IL-10 mainly works by inhibiting pro-inflammatory cytokines release (IL-1, IL-6, IL-12 and TNF- α) and preventing MHC class II expression. Additionally, IL-10 can act as an effective protector against vascular dysfunctions in pregnancy (Cheng and Sharma, 2014). The TGF- β 1 anti-inflammatory cytokine presents autocrine and paracrine effects in adult and embryonic development (Clark and Coker, 1998) and seems to play a crucial role in trophoblast differentiation and invasion (Graham et al., 1992; Simpson et al., 2002). Here, we raise the question whether the circulating EVs differ in their cytokine profile content in pregnant and non-pregnant women. Indeed, we are able to demonstrate that the total EV content of all three cytokines is significantly increased in PW compared with NPW group. By normalization to one million EVs, it appears that EVs from PW reveal an enhanced cargo of TGF- β 1 and IL-10 when compared with the group of non-pregnant women. These results are in line with other studies showing a general increase of TGF- β 1 in pregnant women compared with non-pregnant ones and an increased production of IL-10 in a gestational age-dependent manner, where the first and second trimester placental tissues from normal pregnancies predominantly express IL-10 anti-inflammatory cytokine (Hanna et al., 2000; Hernandez-Valencia et al., 2001; Singh et al., 2013). However, these studies did not investigate the cytokine content in EVs. This raises the question about the biological role of certain cytokines being present in EVs. The increased cytokines cargo in EVs derived from pregnant women suggests that the EVs serve as information packages over a long distance, releasing cytokines directly to specific effector cells. This may be partly regulated by the surface expression of receptors and ligands on these effectors cells. This notion is supported by the observation that in some cases EVs fractions contained substantial amounts of cytokines, whereas it was not detectable in the whole blood.

To study the up-take of EVs by certain peripheral blood cell populations, PKH26 labeled EVs (Franzen et al., 2014) have been co-cultured with PBMCs by Imaging Flow Cytometer analysis. Although the labeled EVs, in our study, can be taken up by virtually every cell type tested, the results display that the vesicles are taken up more efficiently by NK and B cells compared with T cells (CD4 or CD8) and monocytes independent of the study groups. Microparticles derived from syncytiotrophoblast are reported to have a high capacity to interact with B cells and monocytes (Southcombe et al., 2011), but a slight capacity to interact with T and NK cells. The ability of EVs to enter into recipient cells is directed by various mechanisms including clathrin-dependent endocytosis, and clathrin-independent pathways such as caveolin-mediated uptake, macropinocytosis, phagocytosis, and lipid raft-mediated internalization and seems to depend on proteins and glycoproteins being present on both, the surface of EV and the surface of recipient cells (Mulcahy et al., 2014). As our EVs are derived from blood samples and, thereby from numerous cell sources, it is not surprising that the EVs do access other recipients' cell types.

In view of the functional consequences of the EVs uptake by certain cell populations, it appears that the proportion of NK cells displaying caspase-3 activity are significantly higher after co-culture with EVs derived from PW than from NPW. By discriminating the NK cells into subpopulation of CD56^{dim} and CD56^{bright} surface expression, the proportion of cells positive for caspase-3 activity is found to be significantly more prominent in CD56^{dim} cells than in CD56^{bright} cells suggesting significantly higher caspase-3-mediated apoptosis rates in NK CD56^{dim} cells subset. It is important to note that the human NK cells present in maternal-fetal interface are the dominant cell population of leukocytes within uterine

tissue (\approx 70%) originated from peripheral blood CD56^{bright}NK cells (Chantakru et al., 2002; Tessier et al., 2014). The subpopulation CD56^{bright}NK cells present a low natural cytotoxicity and have the capacity to produce high levels of cytokines compared with CD56^{dim}NK cells exhibiting preferentially cytotoxic effector function (for overview see (Cooper et al., 2001)). These concurrent activities of EVs derived from pregnant women, the impairment of cytotoxicity but maintenance of cytokine production should contribute to the fetal survival and development.

We are aware that our study has two limitations—the choice of EV enrichment method and the low volume of blood samples. Due to the latter, ExoQuickTM precipitation solution has been used to obtain enriched extracellular vesicles population. The advantage of the ExoQuickTM usage is that it allows achieving effective pellets of EVs despite of low sample volume. Nevertheless, in comparison with other EV isolation methods, such as ultracentrifugation, EVs suspensions derived from ExoQuickTM precipitation contain a higher protein content and biological impurities (Van Deun et al., 2014; Zlotogorski-Hurvitz et al., 2014). However, EV markers such as CD9, were found to be equally expressed in both methods (Caradec et al., 2014). As all EVs were enriched under the same conditions, it is very unlikely that such uncertainty should substantially affect our results. Due to the restricted volume of blood samples, only a limited number of EVs preparations could be used to evaluate the functional role of EVs derived from pregnant women in the modulation of the immune maternal immune system.

5. Conclusion

In conclusion, our study establishes qualitative and quantitative pregnancy-related alterations of EVs circulating in the maternal blood: enhanced levels, increased TGF- β 1 and IL-10 cargo and enhanced capacity to induce caspase-3 activity in CD56^{dim} NK cells. Taken together, we provided strong evidence for a potential role of EVs during pregnancy. However, the precise mechanisms of secretion, action and function of EVs during normal and pathological processes of pregnancy remain to be established.

Conflict of interest

The author(s) declare that they have no conflict of interests regarding this manuscript.

Acknowledgements

We especially thank all the women that generously provided the blood samples for this study. We are grateful to Sabine Schramm and Monika Collenburg for their technical support and the Reproductive Immunology Centre and LIGH staff for sample collection. This work was partly supported by research Ph.D. scholarship funding from CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil, Brasília – DF 70.040-020, Brazil and by a grant of the State of North Rhine-Westphalia to P.A.H. (ref. 005-1403-0110).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2016.03.001>.

References

- Abrahams, V.M., Straszewski-Chavez, S.L., Guller, S., Mor, G., 2004. First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which induces immune cell apoptosis. *Mol. Hum. Reprod.* 10, 55.

- Admyre, C., Johansson, S.M., Paulie, S., Gabrielson, S., 2006. Direct exosome stimulation of peripheral human T cells detected by ELISPOT. *Eur. J. Immunol.* 36, 1772.
- Alijotas-Reig, J., Palacio-Garcia, C., Llorba, E., Vilardell-Tarres, M., 2013. Cell-derived microparticles and vascular pregnancy complications: a systematic and comprehensive review. *Fertil. Steril.* 99, 441.
- Babst, M., 2011. MVB vesicle formation: eSCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23, 452.
- Balaj, L., Lessard, R., Dai, L., Cho, Y.J., Pomeroy, S.L., Brakefield, X.O., Skog, J., 2011. Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nat. Commun.* 2, 180.
- Beer, A.E., Kwak, J.Y., Ruiz, J.E., 1996. Immunophenotypic profiles of peripheral blood lymphocytes in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with multiple failed in vitro fertilization cycles. *Am. J. Reprod. Immunol.* 35, 376.
- Caby, M.P., Lankar, D., Vincendeau-Scherrer, C., Raposo, G., Bonnerot, C., 2005. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int. Immunol.* 17, 879.
- Caradec, J., Kharmate, G., Hosseini-Beheshti, E., Adomat, H., Gleave, M., Guns, E., 2014. Reproducibility and efficiency of serum-derived exosome extraction methods. *Clin. Biochem.* 47, 1286.
- Chantakru, S., Miller, C., Roach, L.E., Kuziel, W.A., Maeda, N., Wang, W.C., Evans, S.S., Croy, B.A., 2002. Contributions from self-renewal and trafficking to the uterine NK cell population of early pregnancy. *J. Immunol.* 168, 22.
- Cheng, S.B., Sharma, S., 2014. Interleukin-10: a pleiotropic regulator in pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.*
- Chernyshov, V.P., Dons'koi, B.V., Sudoma, I.O., Goncharova, Y.O., 2014. Favorable immune phenotype predicts successful implantation and pregnancy. *Immunol. Lett.* 162, 217.
- Clark, D.A., Coker, R., 1998. Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30, 293.
- Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Caligiuri, M.A., 2001. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* 22, 633.
- Dai, C., Krantz, S.B., 1999. Interferon gamma induces upregulation and activation of caspases 1, 3, and 8 to produce apoptosis in human erythroid progenitor cells. *Blood* 93, 3309.
- Dragovic, R.A., Southcombe, J.H., Tannetta, D.S., Redman, C.W., Sargent, I.L., 2013. Multicolor flow cytometry and nanoparticle tracking analysis of extracellular vesicles in the plasma of normal pregnant and pre-eclamptic women. *Biol. Reprod.* 89, 151.
- Frangmyr, L., Baranov, V., Nagaeva, O., Stendahl, U., Kjellberg, L., Mincheva-Nilsson, L., 2005. Cytoplasmic microvesicular form of Fas ligand in human early placenta: switching the tissue immune privilege hypothesis from cellular to vesicular level. *Mol. Hum. Reprod.* 11, 35.
- Franzen, C.A., Simms, P.E., Van Huis, A.F., Foreman, K.E., Kuo, P.C., Gupta, G.N., 2014. Characterization of uptake and internalization of exosomes by bladder cancer cells. *Biomed. Res. Int.* 2014, 619829.
- Germain, S.J., Sacks, G.P., Sooranna, S.R., Sargent, I.L., Redman, C.W., 2007. Systemic inflammatory priming in normal pregnancy and preeclampsia: the role of circulating syncytiotrophoblast microparticles. *J. Immunol.* 178, 5949.
- Gotsch, F., Romero, R., Friel, L., Kusanovic, J.P., Espinoza, J., Erez, O., Than, N.G., Mittal, P., Edwin, S., Yoon, B.H., Kim, C.J., Mazaki-Tovi, S., Chaiworapongsa, T., Hassan, S.S., 2007. CXCL10/IP-10: a missing link between inflammation and anti-angiogenesis in preeclampsia? *J. Maternal-Fetal Neonatal Med.* 20, 777.
- Graham, C.H., Lysiak, J.J., McCrae, K.R., Lala, P.K., 1992. Localization of transforming growth factor-beta at the human fetal-maternal interface: role in trophoblast growth and differentiation. *Biol. Reprod.* 46, 561.
- Hanna, N., Hanna, I., Hleb, M., Wagner, E., Dougherty, J., Balkundi, D., Padbury, J., Sharma, S., 2000. Gestational age-dependent expression of IL-10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts. *J. Immunol.* 164, 5721.
- Hedlund, M., Stenqvist, A.C., Nagaeva, O., Kjellberg, L., Wulff, M., Baranov, V., Mincheva-Nilsson, L., 2009. Human placenta expresses and secretes NKG2D ligands via exosomes that down-modulate the cognate receptor expression: evidence for immunosuppressive function. *J. Immunol.* 183, 340.
- Hernandez-Valencia, M., Zarate, A., Ochoa, R., Fonseca, M.E., Amato, D., De Jesus Ortiz, M., 2001. Insulin-like growth factor I, epidermal growth factor and transforming growth factor beta expression and their association with intrauterine fetal growth retardation, such as development during human pregnancy. *Diabetes Obes. Metab.* 3, 457.
- Holder, B.S., Tower, C.L., Jones, C.J., Aplin, J.D., Abrahams, V.M., 2012. Heightened pro-inflammatory effect of preeclamptic placental microvesicles on peripheral blood immune cells in humans. *Biol. Reprod.* 86, 103.
- Hunter, C.A., Reiner, S.L., 2000. Cytokines and T cells in host defense. *Curr. Opin. Immunol.* 12, 413.
- Hunter, M.P., Ismail, N., Zhang, X., Aguda, B.D., Lee, E.J., Yu, L., Xiao, T., Schafer, J., Lee, M.L., Schmittgen, T.D., Nana-Sinkam, S.P., Jarjoura, D., Marsh, C.B., 2008. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One* 3, e3694.
- Keller, S., Rupp, C., Stoeck, A., Runz, S., Fogel, M., Lugert, S., Hager, H.D., Abdel-Bakky, M.S., Gutwein, P., Altevogt, P., 2007. CD24 is a marker of exosomes secreted into urine and amniotic fluid. *Kidney Int.* 72, 1095.
- Kharazilha, P., Ceder, S., Li, Q., Panaretakis, T., 2012. Tumor cell-derived exosomes: a message in a bottle. *Biochim. Biophys. Acta* 1826, 103.
- Kordelas, L., Reibmann, V., Ludwig, A.K., Radtke, S., Ruesing, J., Doepfner, T.R., Eppe, M., Horn, P.A., Beelen, D.W., Giebel, B., 2014. MSC-derived exosomes: a novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease. *Leukemia* 28, 970.
- Liu, Y., Lu, Q., 2015. Extracellular vesicle microRNAs: biomarker discovery in various diseases based on RT-qPCR. *Biomark. Med.* 9, 791.
- Lotvall, J., Hill, A.F., Hochberg, F., Buzas, E.I., Di Vizio, D., Gardiner, C., Gho, Y.S., Kurochkin, I.V., Mathivanan, S., Quesenberry, P., Sahoo, S., Tahara, H., Wauben, M.H., Witwer, K.W., Thery, C., 2014. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the international society for extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles* 3, 26913.
- Ludwig, A.K., Giebel, B., 2012. Exosomes: small vesicles participating in intercellular communication. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 11.
- Mincheva-Nilsson, L., Baranov, V., 2014. Placenta-derived exosomes and syncytiotrophoblast microparticles and their role in human reproduction: immune modulation for pregnancy success. *Am. J. Reprod. Immunol.* 72, 440.
- Mulcahy, L.A., Pink, R.C., Carter, D.R., 2014. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J. Extracell. Vesicles*, 3.
- Redman, C.W., Sargent, I.L., 2007. Microparticles and immunomodulation in pregnancy and pre-eclampsia. *J. Reprod. Immunol.* 76, 61.
- Salomon, C., Torres, M.J., Kobayashi, M., Scholz-Romero, K., Sobrevia, L., Dobierzewska, A., Illanes, S.E., Mitchell, M.D., Rice, G.E., 2014. A gestational profile of placental exosomes in maternal plasma and their effects on endothelial cell migration. *PLoS One* 9, e98667.
- Sarker, S., Scholz-Romero, K., Perez, A., Illanes, S.E., Mitchell, M.D., Rice, G.E., Salomon, C., 2014. Placenta-derived exosomes continuously increase in maternal circulation over the first trimester of pregnancy. *J. Transl. Med.* 12, 204.
- Simpson, H., Robson, S.C., Bulmer, J.N., Barber, A., Lyall, F., 2002. Transforming growth factor beta expression in human placenta and placental bed during early pregnancy. *Placenta* 23, 44.
- Singh, M., Orazulike, N.C., Ashmore, J., Konje, J.C., 2013. Changes in maternal serum transforming growth factor beta-1 during pregnancy: a cross-sectional study. *Biomed. Res. Int.* 2013, 318464.
- Sohda, M., Misumi, Y., Oda, K., 2015. TNFalpha triggers release of extracellular vesicles containing TNFR1 and TRADD, which can modulate TNFalpha responses of the parental cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 587, 31.
- Sokolova, V., Ludwig, A.K., Hornung, S., Rotan, O., Horn, P.A., Eppe, M., Giebel, B., 2011. Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy. *Colloids Surf. B* 87, 146.
- Southcombe, J., Tannetta, D., Redman, C., Sargent, I., 2011. The immunomodulatory role of syncytiotrophoblast microvesicles. *PLoS One* 6, e20245.
- Stenqvist, A.C., Nagaeva, O., Baranov, V., Mincheva-Nilsson, L., 2013. Exosomes secreted by human placenta carry functional Fas ligand and TRAIL molecules and convey apoptosis in activated immune cells, suggesting exosome-mediated immune privilege of the fetus. *J. Immunol.* 191, 5515.
- Tannetta, D., Dragovic, R., Alyahyaei, Z., Southcombe, J., 2014. Extracellular vesicles and reproduction-promotion of successful pregnancy. *Cell. Mol. Immunol.* 11, 548.
- Taylor, D.D., Akyol, S., Gercel-Taylor, C., 2006. Pregnancy-associated exosomes and their modulation of T cell signaling. *J. Immunol.* 176, 1534.
- Tessier, D.R., Yockell-Lelievre, J., Gruslin, A., 2014. Uterine spiral artery remodeling: the role of uterine natural killer cells and extravillous trophoblasts in normal and high-risk human pregnancies. *Am. J. Reprod. Immunol.*
- Thery, C., Duban, L., Segura, E., Veron, P., Lantz, O., Amigorena, S., 2002. Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat. Immunol.* 3, 1156.
- Thery, C., Ostrowski, M., Segura, E., 2009. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 581.
- Toth, B., Lok, C.A., Boing, A., Diamant, M., van der Post, J.A., Friese, K., Nieuwland, R., 2007. Microparticles and exosomes: impact on normal and complicated pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 58, 389.
- Van Deun, J., Mestdagh, P., Sormunen, R., Cocquyt, V., Vermaelen, K., Vandensompele, J., Bracke, M., De Wever, O., Hendrix, A., 2014. The impact of disparate isolation methods for extracellular vesicles on downstream RNA profiling. *J. Extracell. Vesicles*, 3.
- Vlassov, A.V., Magdalen, S., Setterquist, R., Conrad, R., 2012. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim. Biophys. Acta* 1820, 940.
- Yagel, S., Goldman-Wohl, D.S., Mandelboim, O., Hanna, Y., Hochner-Celnikier, D., 2005. Maternal adaptation to vasculogenesis and angiogenesis at the feto-maternal interface. *Thromb. Res.* 115 (Suppl. 1), 97.
- Yuana, Y., Sturk, A., Nieuwland, R., 2013. Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions. *Blood Rev.* 27, 31.
- Zhang, H.G., Zhuang, X., Sun, D., Liu, Y., Xiang, X., Grizzle, W.E., 2012. Exosomes and immune surveillance of neoplastic lesions: a review. *Biotech. Histochem.* 87, 161.
- Zlotogorski-Hurvitz, A., Dayan, D., Chaushu, G., Korvala, J., Salo, T., Sormunen, R., Vered, M., 2014. Human saliva-derived exosomes: comparing methods of isolation. *J. Histochem. Cytochem.*
- van Dommelen, S.M., Vader, P., Lakhal, S., Kooijmans, S.A., van Solinge, W.W., Wood, M.J., Schiffelers, R.M., 2012. Microvesicles and exosomes: opportunities for cell-derived membrane vesicles in drug delivery. *J. Controlled Release* 161, 635.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

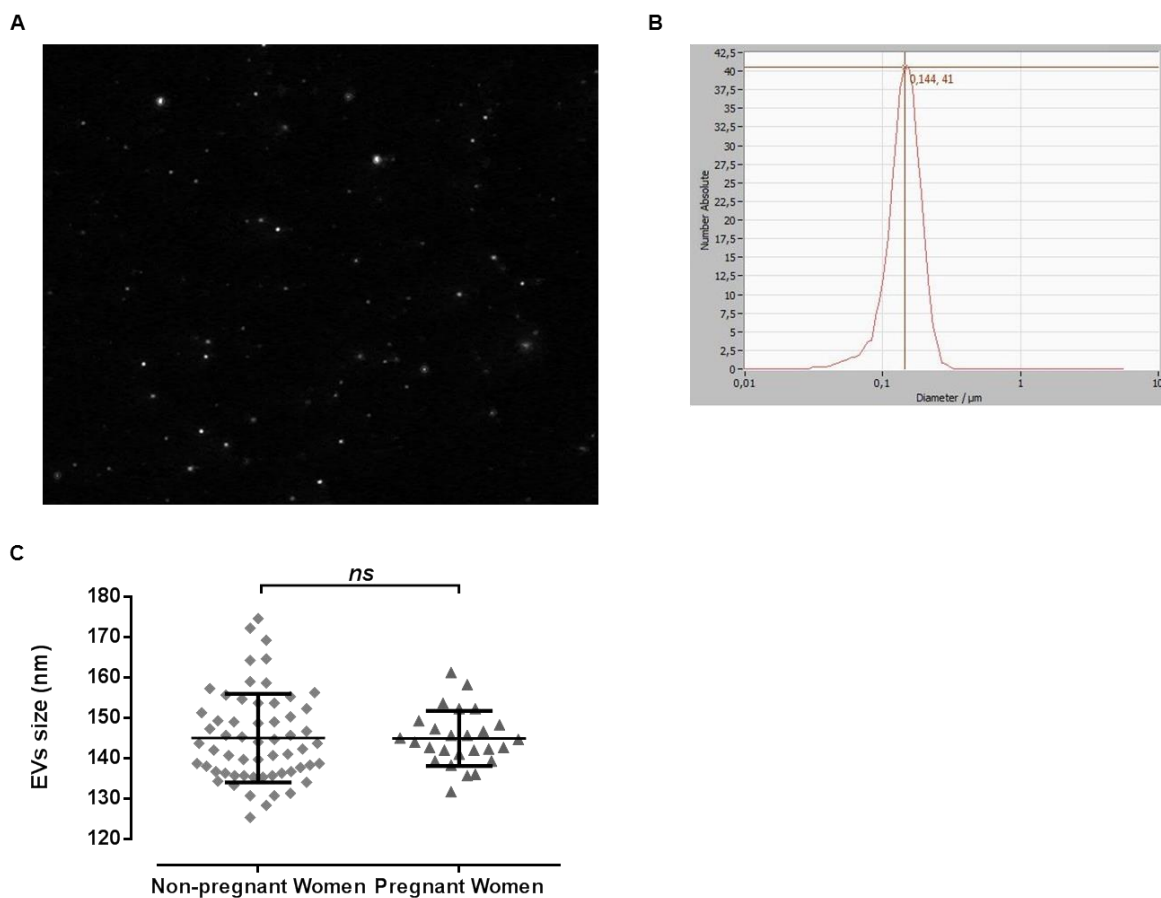


Figure 1 (Supplementary material): Determination of EVs' size by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). (A) Representative image showing the determination of EV's size, enriched by ExoQuick™ solution. (B) NTA analysis showed a particle size distribution with an average of 145.0 ± 9.9 (C) Size of EVs' derived from women during pregnancy ($n=26$) and non-pregnant women ($n=59$). Data are presented as mean \pm SD.

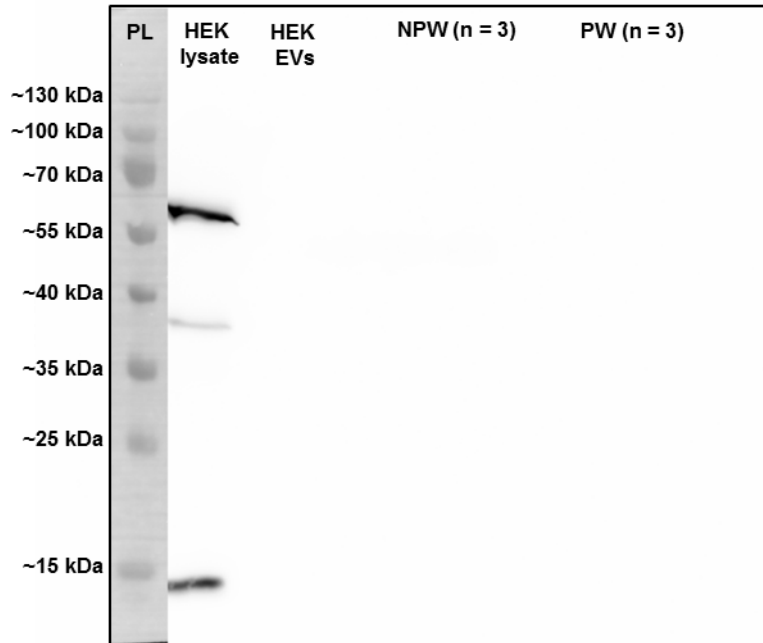


Figure 2 (Supplementary material): Western blot analysis of Cytochrome C expression in EVs fractions. Representative image showing the absent expression of the intracellular protein cytochrome C (CYC1 = 14 kDa) in ExoQuick™ EVs fractions derived from serum of pregnant women (PW; n = 3) and non-pregnant women (NPW; n = 3). HEK cells lysate and EVs derived from supernatants of HEK cells culture were used as positive and negative controls respectively. The stained protein ladder was acquired by white light separately and merged with the western blot developed by chemiluminescence. PL = protein ladder.

PBMCs (n = 3)								
	CD3	CD4	CD8	CD14	CD19	CD56	Kruskal-Wallis test	Multiple Comparisons*
NPW (n = 1)	9.7 ± 4.7*	2.6 ± 1.2	2.6 ± 0.7	6.2 ± 4.4	20.5 ± 2.5	16.7 ± 6.7	< 0.001	CD4 vs CD19: <0.01 CD4 vs CD56: <0.05 CD8 vs CD19: <0.01 CD8 vs CD56: <0.05
PW (n = 1)	10.8 ± 4.1	2.2 ± 1.4	1.8 ± 0.8	4.7 ± 0.9	19.5 ± 10.5	20.5 ± 10.6	< 0.01	<i>ns</i>

*Holm-Sidak's multiple comparisons test

*Data are presented as mean ± SD%

Table 1 (Supplementary material): Compared to T cells (CD4 or CD8), the proportion (mean ± SD %) of B cells and of NK cells being positive for PKH26 were increased.

		CD3 (%)	CD4 (%)	CD8 (%)	CD14 (%)	CD19 (%)	CD56 (%)	Kruskal-Wallis test
NPW	PBMC 1	18.5	11.1	11.0	20.9	17.0	11.7	<i>ns</i>
	PBMC 2	21.1	16.4	29.6	23.4	21.3	31.3	
	PBMC 3	17.8	12.5	13.2	18.8	20.7	13.0	
	Mean±SD	19.1 ± 1.7	13.3 ± 2.7	17.9 ± 10.2	21.0 ± 2.3	19.7 ± 2.3	18.7 ± 11.0	
PW	PBMC 1	14.8	14.7	14.9	18.3	15.2	15.9	<i>ns</i>
	PBMC 2	13.3	19.0	19.5	24.0	21.6	20.5	
	PBMC 3	16.2	16.6	17.2	18.8	15.0	15.0	
	Mean±SD	14.8 ± 1.4	16.8 ± 2.1	17.2 ± 2.3	20.4 ± 3.1	17.3 ± 3.7	17.1 ± 2.9	

Table 2 (Supplementary material): Proportion of dead cells after a co-culture of peripheral blood cells with EVs derived from non-pregnant and pregnant women. Three different PBMCs derived from healthy non-pregnant women were co-cultured with EVs. NPW = non-pregnant women, PW = pregnant women.

5.2 Capítulo II

Manuscrito publicado no periódico científico **American Journal of Reproductive Immunology**.

High Amounts of Total and Extracellular Vesicle-Derived Soluble HLA-G are Associated with HLA-G 14-bp Deletion Variant in Women with Embryo Implantation Failure

Fabiola da Silva Nardi^{1,2,3}, Renata Slowik², Tatiana Michelon⁴, Luis Felipe dos Santos Manvailer^{1,3}, Bettina Wagner¹, Jorge Neumann⁴, Peter Horn¹, Maria da Graça Bicalho^{2,†}, Vera Rebmann^{1,†}

¹Institute for Transfusion Medicine, University Hospital Essen, Essen, Germany;

²Laboratory of Immunogenetics and Histocompatibility (LIGH), Genetics Department, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil;

³Capes Foundation, Ministry of Education of Brazil, Brasília, Brazil;

⁴Reproductive Immunology Center, Porto Alegre, Brazil

Keywords

14-bp ins/del polymorphism, extracellular vesicles, human leukocyte antigen-G, implantation failure, soluble HLA-G, vesicular sHLA-G

Correspondence

Vera Rebmann, Institute for Transfusion Medicine, University Hospital Essen, Transplantationsdiagnostik und FuE, Virchowstraße, 179, D - 45147 Essen, Germany.
E-mail: vera.rebmann@uk-essen.de

[†]Authors share equal senior authorship.

Submission December 4, 2015;
accepted February 15, 2016.

Citation

Nardi FdaS, Slowik R, Michelon T, Manvailer LfdosS, Wagner B, Neumann J, Horn P, Bicalho MdaG, Rebmann V. High amounts of total and extracellular vesicle-derived soluble HLA-G are associated with HLA-G 14-bp deletion variant in women with embryo implantation failure. *Am J Reprod Immunol* 2016

doi:10.1111/aji.12507

Introduction

Membrane-bound or secreted forms of the non-classical human leukocyte antigen-G (HLA-G) are key molecules in the process of embryo implantation and embryo development. The expression of HLA-G proteins at the maternal–fetal interface plays a

Problem

Human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression is related to 14-bp insertion/deletion polymorphism at the 3'UTR of the HLA-G gene. Soluble forms of HLA-G are released as free molecules or via extracellular vesicles (EVs). Due to the crucial role of HLA-G during pregnancy, we analyzed the 14-bp polymorphism and the two secreted forms in implantation failure women (IF) and in fertile women (FW).

Method of study

For the genetic analysis, 49 IF and 34 FW were genotyped. For sHLA-G quantification, serum samples from 35 IF and 23 FW were available. ExoQuick™ kit was used for EVs precipitation. The total soluble HLA-G (sHLA-G_{tot}) and vesicular sHLA-G_{EV} were quantified by ELISA. The EVs size and concentration were determined by nanoparticle tracking analysis (NTA).

Results

An increased proportion of IF presented high levels of sHLA-G_{tot} ($P = 0.02$) and vesicular sHLA-G_{EV} ($P = 0.0003$) compared to FW. The 14-bp deletion allele is more frequent in IF ($P = 0.0002$) and associated with high levels of sHLA-G_{tot} and vesicular sHLA-G_{EV}.

Conclusion

The high expression of sHLA-G_{tot} and sHLA-G_{EV}, together with the presence of the 14-bp deletion allele, might be involved in implantation failure.

crucial role in the establishment and maintenance of pregnancy. These molecules are operative at the maternal–fetal interface, modulating the local and/or systemic immune response toward the fetus,^{1,2} thereby preventing a maternal immune rejection.

HLA-G is a non-classical class I molecule that has a similar structure as classical HLA class I molecules

but displays a low degree of polymorphism and a restricted expression profile under physiological conditions. The HLA-G gene transcribes an mRNA that is processed in different ways, resulting in seven different molecular structures. Four of these isoforms are membrane-anchored proteins (HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3, and HLA-G4), and three isoforms are soluble proteins as they do not contain membrane-anchoring regions (HLA-G5, HLA-G6, and HLA-G7). In addition, soluble HLA-G (sHLA-G) proteins can be generated by mechanisms of shedding or proteolytic cleavage of membrane-anchored molecules.^{3–6} The HLA-G1 and HLA-G5 molecules represent the full extracellular length composed of three alpha domains assembled with β 2-microglobulin (β 2m) in the endoplasmic reticulum. Variants of these molecules can also exist in non- β 2m-associated structures.^{7,8} Regarding different HLA-G structures, the extravillous trophoblast cells express preferentially the membrane-bound HLA-G1 isoforms; however, the HLA-G5 and the shed HLA-G1 isoforms are located at the maternal–fetal interface.^{7,9–11}

Interestingly, it has been shown recently that membrane-anchored HLA-G can additionally be released via extracellular vesicles (EVs).^{12–14} It is important to note (i) that EVs are secreted by most cell types; (ii) that their size, shape, and protein composition mostly reflect the state and the composition of the cellular sources^{15–17}; and (iii) that dependent of the protein composition, EVs can either act as immune-activating vesicles or as immune-suppressive vesicles.^{18–20} In pregnancy, EVs are discussed to be involved in the maternal–fetal cross-talk and in the modulation of the maternal effector cells.^{21,22}

Despite the limited number of allelic variations, there is growing evidence for a genetic regulation of membrane-anchored HLA-G or sHLA-G protein expression.²³ One of the most relevant positions for the RNA stability and its regulation protein expression is the 14-bp insertion/deletion (14-bp ins/del) polymorphism, located in exon 8 at the 3' untranslated region (3'UTR).^{24–26} Studies in normal or pathological pregnancies have been shown that low-soluble HLA-G levels are related to the presence of 14-bp ins phenotype, whereas high amounts of sHLA-G are associated to 14-bp del phenotype.^{27,28} Of note, during the first trimester of gestation low or even undetectable sHLA-G levels seem to be related with gestational complications, such as preeclampsia and spontaneous

abortion.^{29–31} Based on all these studies, it seems that the 14-bp ins/del polymorphism and its influence in the HLA-G protein expression might be an important aspect for the modulation of maternal immune response. Consequently, certain 14-bp phenotypes and/or sHLA-G levels are suggested to be of diagnostic relevance for pregnancy complications.

In assisted reproductive techniques (ART), the implantation failure of the embryo represents a severe problem. Although there is some evidence that the 14-bp ins/del polymorphism is related to recurrent implantation failure,^{32,33} the immunological role of HLA-G and its genetic impact are not well understood in this disorder. It remains to clarify whether the total amount of sHLA-G or the membrane-anchored HLA-G molecules secreted via EVs (sHLA-G_{EV}) are associated to implantation failure. In particular, the genetic impact of 14-bp polymorphism on the secretion of membrane-anchored HLA-G via EVs has not been studied so far. Therefore, we analyzed the HLA-G 14-bp polymorphism and the amount of total and vesicular sHLA-G_{EV} in the peripheral blood of women with at least two embryo implantation failures and of non-pregnant fertile women.

Material and methods

Subjects

For the genetic analysis, a total of 49 women with recurrent embryo implantation failures (IF) and 34 non-pregnant fertile women (FW) were enrolled. For the sHLA-G measurement, serum samples of 35 IF and 23 FW were available. The criteria for the inclusion of patients were at least two unsuccessful embryo transfers in ART for the IF group and at least two successful previous pregnancies without a history of gestational complications for the FW group. The age of IF and FW did not differ, with 36.04 ± 0.5 (mean \pm S.E.M.) and 36.1 ± 1.0 (mean \pm S.E.M.), respectively. The blood samples of the FW group were collected at the Clinical Hospital of Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil, and the blood samples of IF patients group were collected at the Reproductive Immunology Center, Porto Alegre, Brazil. Blood samples were centrifuged for 20 min at 1500 *g*. Buffy coat for HLA-G typing and serum for sHLA-G measurements were stored at -80°C until usage.

Enrichment of Circulating EVs

For purification and precipitation of extracellular vesicles, ExoQuick™ solution (System Biosciences, Inc.) was used according to manufacturer's instructions. Briefly, the serum sample was centrifuged at 3000 *g* for 15 min to remove cells and cells' debris. After centrifugation, 250 μ L from the samples was mixed with 63 μ L of ExoQuick™ solution and incubated overnight at 4°C followed by a second centrifugation step at 1500 *g* for 30 min. The supernatant was discarded, and the tubes were centrifuged once more (1500 *g* for 5 min). All traces of fluid were aspirated, and then, pellets were filled-up to the starting volume (250 μ L) with distilled water and stored at -80°C.

Identification of Nanoparticles by Nanoparticle Tracking Analysis

Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) measurements were performed using a ZetaView® Particlemetrix (Particle Metrix, GmbH) as previously described.¹⁵ The determination of vesicle concentration and size distribution in liquid suspension was based in the rate of Brownian motion of nanoparticles in a light scattering system. The samples were measured in three different camera positions, and the data of vesicles concentration and size distribution were presented as a mean of the triplicates. Polystyrene Nanobeads Nist Traceable Particle Size of 0.1 μ m (Polysciences, Inc.) was used as a size control. Data were analyzed by ZetaVIEW version 8.02.24 software. The coefficients of variation among different Zeta view measurements were 24.8% for the enumeration and 6.7% for the size.

SDS-PAGE and Western Blot Analysis of EVs Protein Expression

The typical EVs marker proteins were immune precipitated after ExoQuick™ enrichment from 250 μ L plasma samples using paramagnetic beads (Dynabeads® MyOne™ Carboxylic acid, Life Technologies As, Oslo, Norway) covalently coupled with antibodies specific for human CD9 (In-home mAb), CD81 (clone 5A6; BioLegend, San Diego, CA, USA), CD63 (clone MEM-259; BioLegend), intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-I; Immunotech, Marseille, France), heat-shock protein 70 (Hsp70; R&D Systems, Wiesbaden, Germany), and tumor susceptibility gene 101

(TSG101; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), respectively, according to manufacturer's instructions. The antibody specific for the mitochondrial protein cytochrome C (CYC1, clone 6H2.B4; BioLegend) was used as negative control to rule out the contamination of the EV fractions with cells' debris, as recommended as minimal experimental requirements for definition of EVs.³⁴ The EV markers were studied after precipitation by SDS-PAGE using an 8, 10, or 12.5% polyacrylamide gel, according to the proteins' molecular weight, in reducing conditions, followed by Western blotting. Western blotting membranes were blocked for at least 1 h with 5% fat-free powder milk (Sigma-Aldrich, Co) in phosphate-buffered saline (PBS) with 0.05% Tween-20. For the detection of the EV markers, specifically the respective mouse monoclonal antibodies (anti-human CD9, CD81, CD63) were incubated overnight in a 1:1000 dilution and the anti-human cytochrome C (CYC1) was incubated overnight in a 1:500 dilution, whereas the rabbit polyclonal antibodies were used in different dilutions (anti-human ICAM-I, 1:100, Immunotech; Hsp70, 1:500, R&D Systems; TSG101 1:1000; Sigma-Aldrich). After removing unbound antibodies by three washing steps with PBS/Tween-20 (0.05%), horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (H + L) or goat anti-mouse IgG (H + L) secondary antibodies (Pierce®, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) was applied for 45 min, followed by four washing steps. Bound immune complexes were visualized by the chemiluminescence detection system Fusion Fx7 (Vilber Lourmat Germany, Eberhardzell, Germany) and densitometrically analyzed (Bio-ID software; Vilber Lourmat Germany, GmbH), whereas the EVs marker expression was quantified as percentage of respective positive control.

HLA-G Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

The determination of sHLA-G was performed as described previously.³⁵ As a capture antibody for sHLA-G, the monoclonal antibody (mAb) MEM-G/9 (Exbio, Praha, Czech Republic) was used for the simultaneous determination of shed HLA-G1 and sHLA-G5 (sHLA-G1 + G5). Bound molecules were detected by anti- β 2-microglobulin (β 2m) followed by Streptavidin HRP (R&D, Minneapolis, USA). 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine Super Slow (Sigma, Munich, Germany) served as substrate solution. The optical density was measured at 450 nm (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA) after stopping

the enzyme reaction with 1M H₂SO₄. Determination of sHLA-G serum levels was performed by four-parameter curve fitting. Purified sHLA-G5 protein served as standard reagent.³⁶ The detection limit of HLA-G ELISA was 0.25 ng/mL. The total soluble HLA-G (sHLA-G_{tot}) and HLA-G levels in ExoQuick-derived EV fractions (sHLA-G_{EV}) were quantified (ng/mL) by this ELISA. The vesicular sHLA-G_{EV} levels were further normalized to 1 million EVs [sHLA-G_{EV} (ng/10⁶ EVs)]. The coefficient of variation among different ExoQuick preparations of the same samples was 9.4% for the amount of vesicular sHLA-G_{EV}.

HLA-G 14-bp ins/del Polymorphism Genotyping

Genomic DNAs were extracted from peripheral blood by salting-out technique described previously.³⁷ HLA-G exon 8 was amplified by polymerase chain reaction (PCR) with the forward primer 5'-GTGATGGGCTGTTTAAAGTGTCACC-3' and the reverse primer 5'-GGAAGGAATGCAGTTCAGCATGA-3' as previously described by Hviid, et al., 2002.³⁸ The PCR amplification was performed as follows: denaturation at 96°C for 5 min; 35 cycles at 96°C for 30 s, 64°C for 90 s, and 72°C for 1 min; and a final extension step at 72°C for 5 min. The PCR products were electrophoresed in a 2.5% agarose gel for 75 min at 100 V and stained with ethidium bromide to allow scoring of the three different genotypes. The results were confirmed by electrophoresis in an 8% non-denaturing polyacrylamide gel for 150 min at 270 V and scored by two different observers. The number of 14-bp ins/del allele variants was calculated by direct counting.

Statistical Analysis

Statistical analysis was conducted using either SPSS 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) or GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). After testing for Gaussian distribution, continuous variables were compared either by Student's *t*-test or by nonparametric Mann-Whitney test. For categorical data, the Fisher's exact test and Chi-square test were used. The cutoff values for sHLA-G quantification were determined regarding optimal values of sensitivity and specificity using the receiver operating characteristic (ROC) curve analysis. Differences with a *P*-value less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

Increased Levels of Circulating EVs in Women with Recurrent Implantation Failure

To explore the relationship between the distinct HLA-G secreted molecules with implantation disorders, EVs were isolated by ExoQuick™ from serum samples. The presence of typical EV markers, including CD9, CD81, CD63, ICAM-1, TSG101, and Hsp70, was analyzed for ExoQuick™ fractions derived from IF (*n* = 10) and FW (*n* = 10) by SDS-PAGE separation followed by Western blot. All EV fractions expressed the 6 typical markers representatively shown in Fig. 1. In none of the EV fractions cytochrome C, being used as a negative marker for EVs,³⁴ was detectable (data not shown). NTA showed (Fig. S1A,B) a particle size with an average of 148.3 ± 1.3 nm (mean ± S.E.M.) without significant differences between the two groups (Fig. S1C). However, the number of EVs [(mean ± S.E.M.) particles 10⁶/mL] was significantly increased (*P* = 0.006, unpaired Student's *t*-test) in IF (17.1 ± 1.2) compared to FW (11.8 ± 1.2) (Fig. S1D).

Increased Levels of Circulating sHLA-G_{tot} in Women with Recurrent Implantation Failure

The levels [median (range) ng/mL] of sHLA-G_{tot}, sHLA-G_{EV}, sHLA-G_{EV}/10⁶ EVs were analyzed in the group of IF (*n* = 35) and of FW (*n* = 23). As shown in Fig. 2a, the levels of sHLA-G_{tot} were significantly (*P* = 0.005; Mann-Whitney test) increased in IF

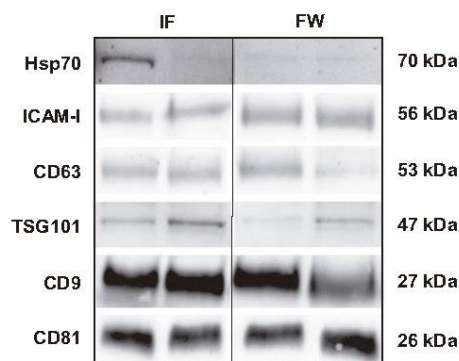


Fig. 1 EVs typical markers profile expression. Representative Western blots for EVs enriched markers: Hsp70, ICAM-1, CD63, TSG101, CD9, and CD81. EVs were enriched from serum of IF (*n* = 10) and FW (*n* = 10) by precipitation using ExoQuick™ solution.

HLA-G IN WOMEN WITH EMBRYO IMPLANTATION FAILURE

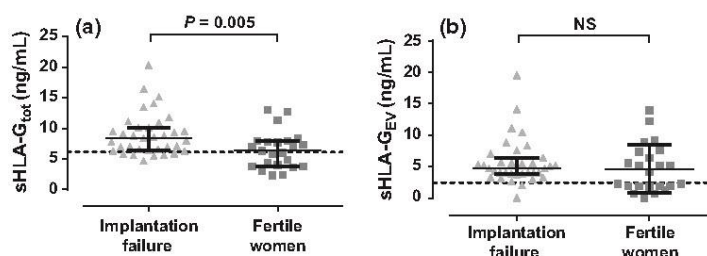


Fig. 2 sHLA-G levels in IF and FW. (a) sHLA-G_{tot} levels are increased in IF ($n = 35$) compared with FW ($n = 23$). The dashed line in the graphic indicates the cutoff level for sHLA-G_{tot} defined by ROC curve analysis (cutoff: 6.125 ng/mL); (b) No statistical differences were found in the comparison of sHLA-G_{EV} levels and the study groups. The dashed line in the graphic indicates the cutoff level for sHLA-G_{EV} defined by ROC curve analysis (cutoff: 2.47 ng/mL). IF, implantation failure; FW, fertile women; Mann Whitney test; Data are presented as median and interquartile range.

Table I Cutoff for sHLA-G_{tot} Levels (ng/mL) Discriminating Implantation Failure (IF) from Fertile Women (FW)

	≤6.125 ng/mL ^a (n)	>6.125 ng/mL ^a (n)	Total (n)	P	Value ^b
IF	6	29	35	0.02	
FW	11	12	23		

^aCutoff value defined by ROC curve analysis (sensitivity: 85.4%; specificity: 53.1%).

^bFisher's exact test.

Table II Cutoff for Vesicular sHLA-G_{EV} Levels (ng/mL) Discriminating Implantation Failure (IF) from Fertile Women (FW)

	≤2.47 ng/mL ^a (n)	>2.47 ng/mL ^a (n)	Total (n)	P	Value ^b
IF	2	33	35	0.0003	
FW	11	12	23		

^aCutoff value defined by ROC curve analysis (sensitivity: 94.3%; specificity: 44.0%).

^bFisher's exact test.

patients [8.4 (4.7–20.3)] compared with FW [6.3 (2.3–13.0)]. To define a cutoff for sHLA-G_{tot} discriminating IF patients from FW, a ROC curve analysis was performed. Using a sHLA-G_{tot} value of 6.125 ng/mL (sensitivity: 85.4%; specificity: 53.1%), 82.8% (29 of 35) of IF patients but only 52.2% (12 of 23) of women from the FW group displayed higher sHLA-G_{tot} levels than 6.125 ng/mL ($P = 0.02$; Fisher's exact test; Table I). The vesicular sHLA-G_{EV} levels (Fig. 2b) were not found to be different in the two groups. Interestingly, in two EV fractions no sHLA-G was detectable despite considerable levels of sHLA-G_{tot}. Regarding the amount of vesicular sHLA-G_{EV}, it became evident that 94% (33 of 35) of IF patients and only 52.2% (12 of 23) of FW group showed sHLA-G_{EV} levels above a cutoff value of 2.47 ng/mL (sensitivity: 94.3%; specificity: 44.0%, $P = 0.0003$; Fisher's exact test; Table II).

Increasing Frequencies of HLA-G 14-bp del Allele in Women with Implantation Failure

As sHLA-G protein expression is regulated by the HLA-G 14-bp ins/del polymorphism at exon 8, the

14-bp ins/del genotypes in 49 IF and 34 FW were investigated (Table III). The genotype frequencies in IF and FW groups were consistent with the Hardy–Weinberg equilibrium ($\chi^2 = 2.79$; $P = 0.90$; Qui-square test). The 14-bp del allele frequency was predominant [$P = 0.0002$; OR = 3.3 (95% CI 1.72–6.30)] in IF patients (64.3%) compared with FW (35.3%). The homozygous 14-bp del/del genotype was significantly increased [$P = 0.01$; OR = 5.01 (95% CI 1.33–18.9)] in IF (32.6%) compared to the ones in FW (8.8%). Accordingly, the frequency of the homozygous 14-bp ins/ins genotype was decreased [$P < 0.0001$; OR = 1.5 (95% CI 0.63–3.7)] in IF women (4.1%) compared with FW (38.2%). No statistically significant differences were observed between the two women study groups regarding the heterozygous 14-bp ins/del genotype ($P = 0.34$).

Regarding the incidence of 14-bp del alleles carriers and the incidence of 14-bp ins alleles carriers in IF and FW study groups, we observed that 47 of 49 IF (95.9%) presented the 14-bp del variant [$P < 0.0001$; OR = 14.5 (95% CI 3.0–70.3)] whereas only 21 of 34 FW (61.8%) showed the 14-bp del allele. Consequently, the presence of the 14-bp ins

Table III Distribution of Allelic and Genotypic Frequencies of HLA-G 14-bp ins/del Polymorphism in Implantation Failure and Fertile Women

	Implantation Failure (N = 49) n (%)	Fertile Women (N = 34) n (%)	χ^2 *	P Value*	OR* [95% CI]
Alleles					
Deletion	63 (64.3)	24 (35.3)	13.53	0.0002	3.3 [1.73 6.30]
Insertion	35 (35.7)	44 (64.7)			
Genotypes					
del/del	16 (32.6)	3 (8.8)	6.46	0.01	5.01 [1.33 18.9]
ins/del	31 (63.3)	18 (52.4)	0.88	0.34	1.5 [0.63 3.7]
ins/ins	2 (4.1)	13 (38.2)	15.81	<0.0001 [†]	0.07 [0.01 0.3]
ins/ins+ins/del	33 (67.3)	31 (91.2)	6.46	0.01	0.2 [0.05 0.75]
del/del+ins/del	47 (95.9)	21 (61.8)	15.81	<0.0001	14.5 [3.0 70.3]

del: deletion; ins: insertion; χ^2 : Qui-square value; P Value, Qui-square test; OR, odds ratio; 95% CI, 95% confidence interval.

* χ^2 , P Values and ORs were calculated using the del allele and the del/del genotype as reference; [†] χ^2 , P values and ORs were calculated using the ins/ins genotype.

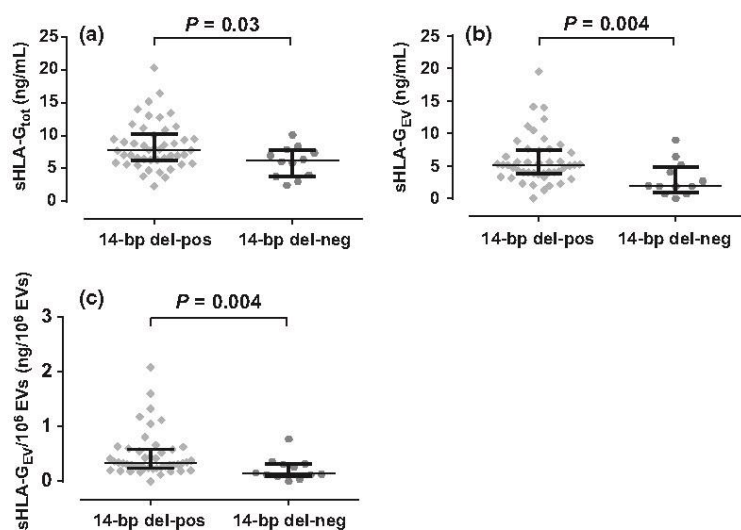


Fig. 3 Association of 14-bp del allele with sHLA-G levels independent of the study group. (a) sHLA-G_{tot} levels are increased in 14-bp del-pos women ($n = 46$) compared with 14-bp del-neg women ($n = 12$); (b) The women carrying the 14-bp del variant ($n = 46$) present increased levels of sHLA-G_{EV} compared with 14-bp del-neg women; (c) The levels of sHLA-G_{EV}/10⁶ EVs were higher in 14-bp del-pos women ($n = 46$) compared with 14-bp del-neg women ($n = 12$). 14-bp del-pos: presence of 14-bp deletion allele; 14-bp del-neg: absence of 14-bp deletion allele; Mann-Whitney test; Data presented as median and interquartile range.

allele was decreased [$P = 0.01$; OR = 0.2 (95% CI 0.05–0.75)] in IF (67.3%) in comparison with FW patients (91.2%). In sum, the 14-bp del carriers and genotype were more prominent in women with recurrent implantation failure.

14-bp del Allele is Associated with High Levels of sHLA-G_{tot} and Vesicular sHLA-G_{EV}

As shown in Fig. 3, without dividing the women in IF and FW, the HLA-G 14-bp del carriers displayed significantly higher levels of sHLA-G_{tot} ($P = 0.03$; Mann-Whitney test; Fig. 3a) and also of vesicular sHLA-G_{EV} ($P = 0.004$; Mann-Whitney test; Fig. 3b).

Yet, the levels of vesicular sHLA-G_{EV} per 10⁶ EVs were also significantly ($P = 0.004$; Mann-Whitney test; Fig. 3c) increased in 14-bp del carriers.

Dividing the women into IF and FW (Table IV), again in both study groups the 14-bp del allele was associated with higher amounts of vesicular sHLA-G_{EV} compared to non-carriers. However, a significance ($P = 0.02$; Mann-Whitney test) was only obtained for the FW due to the low number of IF group patients not presenting the 14-bp del allele. In addition, levels of sHLA-G_{EV}/10⁶ EVs were more than twofold higher in IF patients ($P = 0.02$; Mann-Whitney test) and in FW ($P = 0.007$; Mann-Whitney test) that have the 14-bp del allele than in

HLA-G IN WOMEN WITH EMBRYO IMPLANTATION FAILURE

Table IV Soluble HLA-G Levels in HLA-G 14-bp deletion positive Women According to Implantation Failure Women (IF) and Fertile Women (FW) Groups

	14 bp del-pos	<i>n</i>	14 bp del-neg	<i>n</i>	<i>P</i> Value ^a
(A) IF HLA-G 14-bp deletion positive					
sHLA-G _{tot} (ng/mL; median, range)	8.4 (4.7 20.3)	33	8.5 (6.9 10.1)	2	0.79
sHLA-G _{EV} (ng/mL; median, range)	5.0 (0.0 19.5)	33	3.4 (2.7 4.0)	2	0.23
HLA-G/10 ⁶ EVs (ng/10 ⁶ EVs; median, range)	0.3 (0.0 2.1)	33	0.13 (0.12 0.15)	2	0.02
(B) FW HLA-G 14-bp deletion positive					
sHLA-G _{tot} (ng/mL; median, range)	7.0 (2.3 13.0)	13	5.9 (2.4 8.3)	10	0.30
sHLA-G _{EV} (ng/mL; median, range)	5.1 (1.2 14.0)	13	1.8 (0.0 8.9)	10	0.02
HLA-G/10 ⁶ EVs (ng/10 ⁶ EVs; median, range)	0.4 (0.2 1.6)	13	0.2 (0.0 0.8)	10	0.007

14-bp del-pos = presence of 14-bp deletion allele.

14-bp del-neg = absence of 14-bp deletion allele.

^aMann-Whitney test.

non-carriers. Again due to the limited number of 14-bp del-pos vs. del-neg patients in both study groups, no association of the presence of 14-bp del allele and higher levels of sHLA-G_{tot} was observed. Taken together, this study demonstrates for the first time that vesicular sHLA-G_{EV} protein expression is regulated by the HLA-G 14-bp ins/del polymorphism at exon 8.

Discussion

It is well accepted that the expression of HLA-G and its soluble forms play a pivotal role for the implantation and maintenance of pregnancy. Notably, the HLA-G protein expression is regulated by certain polymorphic variations within the non-coding region, of which the 14-bp ins/del polymorphism in the exon 8 is one of the most important positions. Studies have demonstrated that the 14-bp del allele is associated with higher values of circulating sHLA-G molecules.^{28,39} Nevertheless, the impact of the distinct 14-bp genotypes with its corresponding sHLA-G levels is still controversially discussed in embryo implantation failures after ART procedures and in pregnancy disorders.⁴⁰⁻⁴² Here, the question is whether the regulatory power of 14-bp genotypes covers also HLA-G secreted via EVs. Indeed, various mechanisms are operative for the delivery of sHLA-G as truncated molecule,⁴ as shed molecule⁴³ or as part of extracellular vesicles.¹²

Therefore, we analyzed the total amount of sHLA-G_{tot} and the vesicular sHLA-G_{EV} in implantation failure patients and fertile controls and related the results to the 14-bp polymorphism. The enrichment

of extracellular vesicles or exosome-like vesicles by ExoQuickTM treatment was confirmed by the representative particles size of about 148 nm and by the presence of six typical EV markers.⁴⁴ As recommended,³⁴ we tested our EV fractions for the presence of transmembrane or lipid-bound extracellular proteins (CD9, CD81, CD63, and ICAM-1), cytosolic proteins, including TSG101, being a member of the endosomal sorting complex required for transport (ESCRT)⁴⁵ and intracellular proteins (CYC1), which are absent or under-represented in EV enrichments. The unspecific enrichment of sHLA-G molecules can be ruled out in the EV suspensions as vesicular sHLA-G_{EV} was lacking in two suspensions despite high sHLA-G_{tot} levels. Due to the monoclonal antibody used for determination of sHLA-G levels, our analysis is restricted to the HLA-G1 and HLA-G5 isoforms. Consequently, sHLA-G_{tot} should consist of HLA-G1 and/or HLA-G5 isoforms, whereas vesicular sHLA-G_{EV} should be exclusively consisted of HLA-G1. Based on our experimental study design, we were able to demonstrate that (i) an increased proportion of implantation failure women presented high levels of sHLA-G_{tot} compared to fertile controls; (ii) the 14-bp del allele is more frequent in embryo implantation failure women; (iii) the 14-bp del variant is associated with high levels of sHLA-G_{tot} and vesicular sHLA-G_{EV}, independent of the clinical condition of the group.

Surprisingly, more than 80% of IF presented levels of sHLA-G_{tot} >6.1 ng/mL or vesicular sHLA-G_{EV} >2.5 ng/mL, whereas such high levels were found in only 50% of FW. Recently, it has been shown that secreted vesicular HLA-G1 molecules can

be ubiquitinated,¹² which is a post-translational modification. Ubiquitination is a critical regulatory step in the downregulation of antigen surface expression and endocytosis. It is often operative to terminate signaling responses of receptors.⁴⁶ An increased ubiquitination is a feature of cellular stress and inflammatory reactions,^{47,48} being linked to reproductive failure such as implantation failure.⁴⁹ This begs the question, whether HLA-G is indeed ubiquitinated in EVs. Thus, in further studies it is intriguing to investigate whether vesicular sHLA-G_{EV} are especially ubiquitinated in implantation failure.

So far, the function of vesicular sHLA-G_{EV} is not explored in depth. If sHLA-G_{EV} exist as dimers, they display a higher affinity and avidity to the immune-suppressive receptors, for example, ILT-2, and thereby induce immune suppression. However, only one study demonstrated the immune-suppressive properties of tumor-derived vesicular sHLA-G_{EV}.¹⁴ Nevertheless, due to the antigen/ligand or cytokine/chemokine composition of EVs, they can act in opposite immune regulatory directions – either as immunoactivating or as immunosuppressive vesicles.²⁰ Thus, the function of vesicular sHLA-G_{EV} remains for further investigations.

The second aim of this study addressed the genetic background in implantation failure with regard to the 14-bp polymorphism. The 14-bp ins/del polymorphism (rs66554220) is related to stability of the HLA-G transcript and to mechanisms of post-transcriptional control (alternative splicing).²⁵ Importantly, the 14-bp ins variant is associated with a stable transcript and increased surface expression of HLA-G, but with lower soluble HLA-G levels.^{26,50} The other way round, higher levels of sHLA-G were found in individuals homozygous for the 14-bp del/del genotype as compared to individuals having a 14-bp ins/del genotype or a 14-bp ins/ins genotype.³⁹ In context with reproduction issues, the 14-bp ins/ins genotype was reported to be associated with reduced fertility concerning unsuccessful *in vitro* fertilization (IVF) treatments and increased risk of recurrent miscarriage.⁵¹ The same genotype (14-bp ins/ins) was more frequent in women with more than three recurrent spontaneous abortions compared to fertile controls.³⁸ However, in several studies, no relationship of the 14-bp ins/ins genotype was reported for pregnancy complications such as preeclampsia, restricted intrauterine growth, recurrent spontaneous abortion, and implantation failure.^{33,52–55}

We found an increased incidence of HLA-G 14-bp del allele and higher sHLA-G_{tot} levels in women with implantation failure. This association of 14-bp deletion and high levels of soluble HLA-G is in accordance with the majority of previous studies,^{25,26} although the 14-bp deletion variant is associated with a less stable HLA-G transcript.⁵⁰ This leads to the concept that the higher amount of transcripts produced by 14-bp del allele may compensate the low mRNA stability generated by this allele.⁵⁶ The high abundance of mRNAs for one allele over the other^{56,57} might be due to other regulatory polymorphisms in the 5'-upstream regulatory region (5'-URR) and in the 3'UTR region.

In our results, we demonstrate that the 14-bp del variant is associated as well with high levels of vesicular sHLA-G_{EV}, suggesting that the individual 14-bp genotype may have an impact in the molecule release process and HLA-G expression pathway. So far, the most common pathway for the release of HLA-G is the shedding of membrane-anchored isoforms via proteolytic metalloprotease (MMPs),⁴³ of which HLA-G1 is the most abundant one. Alternative splicing generating truncated molecules such as HLA-G5 or HLA-G7 missing the transmembrane region^{4,43} is another common pathway. However, only few studies placed emphasis on the secretion of HLA-G via EVs.^{12,14,58} One of these studies provided evidence that EVs such as exosomes, originated from the mononuclear cytotrophoblast cells, contain HLA-G5 protein.⁵⁸ Due to the lack of transmembrane region of HLA-G5, these molecules should not be on the outer surface of EVs and consequently be hidden. As we quantify sHLA-G_{EV} without any destruction of EVs, our vesicular sHLA-G_{EV} should be present as membrane-anchored molecule on the outer membrane of the EVs. Thus, it is very likely that the measured amounts of sHLA-G are of the HLA-G1 isoform. Thus, the secretion of HLA-G1 via EVs appears to be an additional pathway to deliver HLA-G molecules, which is strikingly associated with 14-bp polymorphism. It is important to consider that the 14-bp del allele was associated with high amounts of vesicular sHLA-G_{EV} independent of the study group. The levels of sHLA-G_{EV}/10⁶ EVs were significantly increased in IF as well as in FW women carrying the 14-bp del allele. This is not surprising, assuming a higher HLA-G1 expression on cell surface in individuals presenting 14 del allele. These membrane-bound HLA-G molecules – most probably HLA-G1 – can be secreted via EVs by outward

budding and fission of the plasma membrane as microvesicles. In addition, EVs can be formed as exosomes from inward budding of small-sized plasma membrane containing HLA-G, and enclosed in multivesicular bodies (MVB), which can be delivered into extracellular space after fusion of MVB with the plasma membrane.⁵⁹ Nevertheless, we cannot absolutely exclude the presence of HLA-G5 in EVs, even at the exterior of vesicle membrane. In this case, HLA-G5 should be associated to an adapter molecule, being expressed at EVs surface. On the other hand, the association with the interior vesicle membrane would require the transit of HLA-G5 into cytoplasm after biosynthesis by unknown pathways. In view of function, EVs containing such hidden HLA-G5 molecules can act as Trojan horses, without being exposed until they reach their target cells. HLA-G1 being present on the outer membrane of EVs (i) can execute already known immune suppression functions, (ii) can act as an address code for release of EVs cargo to certain target cells or, (iii) can be involved in exchange of membrane patches (trogonocytosis). Trogonocytosis is one of the possible pathways that allow the interaction between EVs harboring HLA-G with immune effector cells. It is characterized by the transfer of cell surface membrane proteins and membrane patches from one cell to another at the time of contact.⁶⁰ The acquisition of HLA-G from antigen-presenting cells (APC) and from tumor cells to T and NK cells rendered these cells immunosuppressive in a fast and temporary cell-to-cell contact.^{61,62} One can speculate that this mechanism might be helpful as an 'emergency immune suppression system' in situations where immune modulation is quickly required, such as the maternal-fetal interface.⁶² In any case the question is: What is the contribution of the EVs composition to HLA-G function? Is it a cooperative process in a synergic fashion or is it a way to counterbalance the usual HLA-G immune-suppressive functions?

The role of the 14-bp ins/del polymorphism itself as a genetic marker, harboring functional significance or even influencing in HLA-G release pathway, needs further investigations. In addition, the effect of genetic, clinical, and lifestyle covariates are as well relevant on circulating protein levels. Thus, genetic plus environmental factors probably are associated with the higher amounts of sHLA-G_{tot} showed in implantation failure patients. Bearing in mind that the functional differences and/or similarities between vesicular sHLA-G_{EV} and total amount of

sHLA-G_{tot} are not clear, the first insights about the differential sHLA-G expression profile in distinct scenarios, for example, pregnancy complications are essential steps. Although our study indeed includes a limited number of patients and needs further confirmation, the current results introduce future directions for investigations to understand why certain cells release or do not release vesicular sHLA-G_{EV} molecules and whether the HLA-G-positive vesicles play a distinct role in the establishment and/or maintenance of pregnancy.

Acknowledgements

We especially thank the women that generously provided the blood samples for this study. We are grateful to Sabine Schramm and Monika Collenburg for their technical support and to Reproductive Immunology Center and LIGH staff for technical support and sample collection. This study was financially supported by FUNPAR-LIGH agreement and by a grant of the State of North Rhine-Westphalia to P.A.H. (ref. 005-1403-0110).

References

- Rizzo R, Vercammen M, van de Velde H, Horn PA, Rebmann V: The importance of HLA-G expression in embryos, trophoblast cells, and embryonic stem cells. *Cell Mol Life Sci* 2011; 68:341–352.
- Roussev RG, Coulam CB: HLA-G and its role in implantation (review). *J Assist Reprod Genet* 2007; 24:288–295.
- Fujii T, Ishitani A, Geraghty DE: A soluble form of the HLA-G antigen is encoded by a messenger ribonucleic acid containing intron 4. *J Immunol* 1994; 153:5516–5524.
- Ishitani A, Geraghty DE: Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:3947–3951.
- Paul P, Cabestre FA, Ibrahim EC, Lefebvre S, Khalil-Daher I, Vazeux G, Quiles RM, Bermond F, Dausset J, Carosella ED: Identification of HLA-G7 as a new splice variant of the HLA-G mRNA and expression of soluble HLA-G5, -G6, and -G7 transcripts in human transfected cells. *Hum Immunol* 2000; 61:1138–1149.
- Park GM, Lee S, Park B, Kim E, Shin J, Cho K, Ahn K: Soluble HLA-G generated by proteolytic shedding inhibits NK-mediated cell lysis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313:606–611.
- Gonen-Gross T, Goldman-Wohl D, Huppertz B, Lankry D, Greenfield C, Natanson-Yaron S, Hamani Y, Gilad R, Yagel S, Mandelboim O: Inhibitory NK receptor recognition of HLA-G: regulation by contact residues and by cell specific expression at the fetal-maternal interface. *PLoS One* 2010; 5:e8941.
- Zhao L, Purandare B, Zhang J, Hantash BM: β 2-Microglobulin-free HLA-G activates natural killer cells by increasing cytotoxicity and proinflammatory cytokine production. *Hum Immunol* 2013; 74:417–424.

- 9 Ishitani A, Sageshima N, Lee N, Dorofeeva N, Hatake K, Marquardt H, Geraghty DE: Protein expression and peptide binding suggest unique and interacting functional roles for HLA-E, F, and G in maternal-placental immune recognition. *J Immunol* 2003; 171:1376–1384.
- 10 Kovats S, Main EK, Librach C, Stubblebine M, Fisher SJ, DeMars R: A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science* 1990; 248:220–223.
- 11 Morales PJ, Pace JL, Platt JS, Langat DK, Hunt JS: Synthesis of beta (2)-microglobulin-free, disulphide-linked HLA-G5 homodimers in human placental villous cytotrophoblast cells. *Immunology* 2007; 122:179–188.
- 12 Alegre E, Rebmann V, Lemaoult J, Rodriguez C, Horn PA, Diaz-Lagares A, Echeveste JI, Gonzalez A: In vivo identification of an HLA-G complex as ubiquitinated protein circulating in exosomes. *Eur J Immunol* 2013; 43:1933–1939.
- 13 Gonzalez A, Rebmann V, LeMaoult J, Horn PA, Carosella ED, Alegre E: The immunosuppressive molecule HLA-G and its clinical implications. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2012; 49:63–84.
- 14 Riteau B, Faure F, Menier C, Viel S, Carosella ED, Amigorena S, Rouas-Freiss N: Exosomes bearing HLA-G are released by melanoma cells. *Hum Immunol* 2003; 64:1064–1072.
- 15 Sokolova V, Ludwig AK, Hornung S, Rotan O, Horn PA, Epple M, Giebel B: Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2011; 87:146–150.
- 16 Tannetta D, Dragovic R, Alyahyaei Z, Southcombe J: Extracellular vesicles and reproduction-promotion of successful pregnancy. *Cell Mol Immunol* 2014; 11:548–563.
- 17 Toth B, Lok CA, Boing A, Diamant M, van der Post JA, Friese K, Nieuwland R: Microparticles and exosomes: impact on normal and complicated pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2007; 58:389–402.
- 18 Admyre C, Johansson SM, Paulie S, Gabrielsson S: Direct exosome stimulation of peripheral human T cells detected by ELISPOT. *Eur J Immunol* 2006; 36:1772–1781.
- 19 Thery C, Duban L, Segura E, Veron P, Lantz O, Amigorena S: Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat Immunol* 2002; 3:1156–1162.
- 20 Thery C, Ostrowski M, Segura E: Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* 2009; 9:581–593.
- 21 Mincheva-Nilsson L, Baranov V: Placenta-derived exosomes and syncytiotrophoblast microparticles and their role in human reproduction: immune modulation for pregnancy success. *Am J Reprod Immunol* 2014; 72:440–457.
- 22 Southcombe J, Tannetta D, Redman C, Sargent I: The immunomodulatory role of syncytiotrophoblast microvesicles. *PLoS One* 2011; 6:e20245.
- 23 Castelli EC, Mendes-Junior CT, Deghaide NH, de Albuquerque RS, Muniz YC, Simoes RT, Carosella ED, Moreau P, Donadi BA: The genetic structure of 3'untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes. *Genes Immunol* 2010; 11:134–141.
- 24 Harrison GA, Humphrey KE, Jakobsen IB, Cooper DW: A 14 bp deletion polymorphism in the HLA-G gene. *Hum Mol Genet* 1993; 2:2200.
- 25 Rousseau P, Le Discorde M, Mouillot G, Marcou C, Carosella ED, Moreau P: The 14 bp deletion-insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. *Hum Immunol* 2003; 64:1005–1010.
- 26 Hviid TV, Hylenius S, Rorbye C, Nielsen LG: HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels. *Immunogenetics* 2003; 55:63–79.
- 27 Hviid TV, Rizzo R, Christiansen OB, Melchiorri L, Lindhard A, Baricordi OR: HLA-G and IL-10 in serum in relation to HLA-G genotype and polymorphisms. *Immunogenetics* 2004; 56:135–141.
- 28 Chen XY, Yan WH, Lin A, Xu HH, Zhang JG, Wang XX: The 14 bp deletion polymorphisms in HLA-G gene play an important role in the expression of soluble HLA-G in plasma. *Tissue Antigens* 2008; 72:335–341.
- 29 Steinborn A, Varkonyi T, Scharf A, Bahlmann F, Klee A, Sohn C: Early detection of decreased soluble HLA-G levels in the maternal circulation predicts the occurrence of preeclampsia and intrauterine growth retardation during further course of pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2007; 57:277–286.
- 30 Alegre E, Diaz-Lagares A, Lemaoult J, Lopez-Moratalla N, Carosella ED, Gonzalez A: Maternal antigen presenting cells are a source of plasmatic HLA-G during pregnancy: longitudinal study during pregnancy. *Hum Immunol* 2007; 68:661–667.
- 31 Yie SM, Taylor RN, Librach C: Low plasma HLA-G protein concentrations in early gestation indicate the development of preeclampsia later in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 193:204–208.
- 32 Lashley LE, van der Westerlaken LA, Haasnoot GW, Drabbeels JJ, Spruyt-Gerritse MJ, Scherjon SA, Claas FH: Maternal HLA-C2 and 14 bp insertion in HLA-G is associated with recurrent implantation failure after in vitro fertilization treatment. *Tissue Antigens* 2014; 84:536–544.
- 33 Enghelabifar M, Allafan S, Khayatzaheh J, Shahrokh Abadi K, Hasanazadeh Nazarabadi M, Moradi F, Musavifar N, Jalali M, Mojarad M: Association of the maternal 14-bp insertion/deletion polymorphism in the histocompatibility leukocyte antigen G gene with recurrent implantation failure. *Iran J Reprod Med* 2014; 12:641–646.
- 34 Lotvall J, Hill AF, Hochberg F, Buzas EI, Di Vizio D, Gardiner C, Gho YS, Kurochkin IV, Mathivanan S, Quesenberry P, Sahoo S, Tahara H, Wauben MH, Witwer KW, Thery C: Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles* 2014; 3:26913.
- 35 Rebmann V, LeMaoult J, Rouas-Freiss N, Carosella ED, Grosse-Wilde H: Quantification and identification of soluble HLA-G isoforms. *Tissue Antigens* 2007; 69(Suppl 1):143–149.
- 36 Rebmann V, Lemaoult J, Rouas-Freiss N, Carosella ED, Grosse-Wilde H: Report of the wet workshop for quantification of soluble HLA-G in Essen, 2004. *Hum Immunol* 2005; 66:853–863.
- 37 Lahiri DK, Numberger JI Jr: A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991; 19:5444.
- 38 Hviid TV, Hylenius S, Hoegh AM, Kruse C, Christiansen OB: HLA-G polymorphisms in couples with recurrent spontaneous abortions. *Tissue Antigens* 2002; 60:122–132.
- 39 Twito T, Joseph J, Mociornita A, Rao V, Ross H, Delgado DH: The 14-bp deletion in the HLA-G gene indicates a low risk for acute cellular rejection in heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2011; 30:778–782.
- 40 Wang X, Jiang W, Zhang D: Association of 14-bp insertion/deletion polymorphism of HLA-G gene with unexplained recurrent spontaneous abortion: a meta-analysis. *Tissue Antigens* 2013; 81:108–115.
- 41 Rebmann V, da Silva Nardi F, Wagner B, Horn PA: HLA-G as a tolerogenic molecule in transplantation and pregnancy. *J Immunol Res* 2014; 2014:297073.

- 42 Rebmann V, Switala M, Bue I, Grosse-Wilde H: Soluble HLA-G is an independent factor for the prediction of pregnancy outcome after ART: a German multi-centre study. *Hum Reprod* 2010; 25:1691–1698.
- 43 Dong Y, Lieskovska J, Kedrin D, Porcelli S, Mandelboim O, Bushkin Y: Soluble nonclassical HLA generated by the metalloproteinase pathway. *Hum Immunol* 2003; 64:802–810.
- 44 Yoshioka Y, Konishi Y, Kosaka N, Katsuda T, Kato T, Ochiya T: Comparative marker analysis of extracellular vesicles in different human cancer types. *J Extracell Vesicles* 2013; 2:20424.
- 45 Babst M: Endosomal sorting complex required for transport (ESCRT). Editorial. *Traffic* 2011; 12:1281.
- 46 Boname JM, Thomas M, Stagg HR, Xu P, Peng J, Lehner PJ: Efficient internalization of MHC I requires lysine-11 and lysine-63 mixed linkage polyubiquitin chains. *Traffic* 2010; 11:210–220.
- 47 Flick K, Kaiser P: Protein degradation and the stress response. *Semin Cell Dev Biol* 2012; 23:515–522.
- 48 Finley D, Chau V: Ubiquitination. *Annu Rev Cell Biol* 1991; 7:25–69.
- 49 Kwak-Kim JY, Chung-Bang HS, Ng SC, Ntrivalas EI, Mangubat CP, Beaman KD, Beer AE, Gilman-Sachs A: Increased T helper 1 cytokine responses by circulating T cells are present in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with multiple implantation failures after IVF. *Hum Reprod* 2003; 18:767–773.
- 50 Svendsen SG, Hantash BM, Zhao L, Faber C, Bzorek M, Nissen MH, Hviid TV: The expression and functional activity of membrane-bound human leukocyte antigen-G1 are influenced by the 3'-untranslated region. *Hum Immunol* 2013; 74:818–827.
- 51 Hviid TV, Hylenius S, Lindhard A, Christiansen OB: Association between human leukocyte antigen-G genotype and success of in vitro fertilization and pregnancy outcome. *Tissue Antigens* 2004; 64:66–69.
- 52 Afkhami F, Shekari Khaniani M, Farzadi L, Paknejad Z, Mansoori Derakhshan S: The HLA-G 14 bp insertion/deletion polymorphism in women with recurrent spontaneous abortion. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2014; 13:364–369.
- 53 Mando C, Pileri P, Mazzocco MI, Lattuada D, Zolin A, Plebani M, Massari M, Calabrese S, Milani S, Cetin I: Maternal and fetal HLA-G 14 bp gene polymorphism in pregnancy-induced hypertension, preeclampsia, intrauterine growth restricted and normal pregnancies. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2015; 29:1–6.
- 54 Sipak-Szmigiel O, Cybulski C, Lubinski J, Ronin-Walknowska E: HLA-G polymorphism in a Polish population and reproductive failure. *Tissue Antigens* 2008; 71:67–71.
- 55 Tripathi P, Abbas A, Naik S, Agrawal S: Role of 14-bp deletion in the HLA-G gene in the maintenance of pregnancy. *Tissue Antigens* 2004; 64:706–710.
- 56 Djurisic S, Teiblum S, Tolstrup CK, Christiansen OB, Hviid TV: Allelic imbalance modulates surface expression of the tolerance-inducing HLA-G molecule on primary trophoblast cells. *Mol Hum Reprod* 2015; 21:281–295.
- 57 Ober C, Billstrand C, Kuldaneck S, Tan Z: The miscarriage-associated HLA-G -725G allele influences transcription rates in JEG-3 cells. *Hum Reprod* 2006; 21:1743–1748.
- 58 Kshirsagar SK, Alam SM, Jasti S, Hodes H, Nauser T, Gilliam M, Billstrand C, Hunt JS, Petroff MG: Immunomodulatory molecules are released from the first trimester and term placenta via exosomes. *Placenta* 2012; 33:982–990.
- 59 Yanez-Mo M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borrás FE, Buzas EI, Buzas K, Casal E, Cappello F, Carvalho J, Colas E, Cordeiro-da Silva A, Fais S, Falcon-Perez JM, Ghobrial IM, Giebel B, Gimona M, Graner M, Gursel I, Gursel M, Heegaard NH, Hendrix A, Kierulf P, Kokubun K, Kosanovic M, Kralj-Igljic V, Kramer-Albers EM, Laitinen S, Lasser C, Lener T, Ligeti B, Line A, Lipps G, Llorente A, Lotvall J, Mancek-Keber M, Marcilla A, Mittelbrunn M, Nazarenko I, Nolte-Hoen EN, Nyman TA, O'Driscoll L, Olivan M, Oliveira C, Pallinger E, Del Portillo HA, Reventos J, Rigau M, Rohde E, Sammar M, Sanchez-Madrid F, Santarem N, Schallmoser K, Ostenfeld MS, Stoorvogel W, Stukelj R, Van der Grein SG, Vasconcelos MH, Wauben MH, De Wever O: Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* 2015; 4:27066.
- 60 Joly E, Hudrisier D: What is trogocytosis and what is its purpose? *Nat Immunol* 2003; 4:815.
- 61 LeMaoult J, Caumartin J, Daouya M, Favier B, Le Rond S, Gonzalez A, Carosella ED: Immune regulation by pretenders: cell-to-cell transfers of HLA-G make effector T cells act as regulatory cells. *Blood* 2007; 109:2040–2048.
- 62 Caumartin J, Favier B, Daouya M, Guillard C, Moreau P, Carosella ED, LeMaoult J: Trogocytosis-based generation of suppressive NK cells. *EMBO J* 2007; 26:1423–1433.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. Determination of EVs size by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). (A) Representative image showing the determination of EVs size, enriched by ExoQuick™ solution; (B) The corresponding mean particles size (nm) according to NTA; (C) Distribution size of EVs derived from IF ($n = 35$) and FW ($n = 23$). Data are presented as mean \pm S.D.; (D) Circulating EVs were significantly increased in IF ($n = 35$) compared to FW ($n = 23$) by Mann–Whitney test. Data are presented as median and interquartile range.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

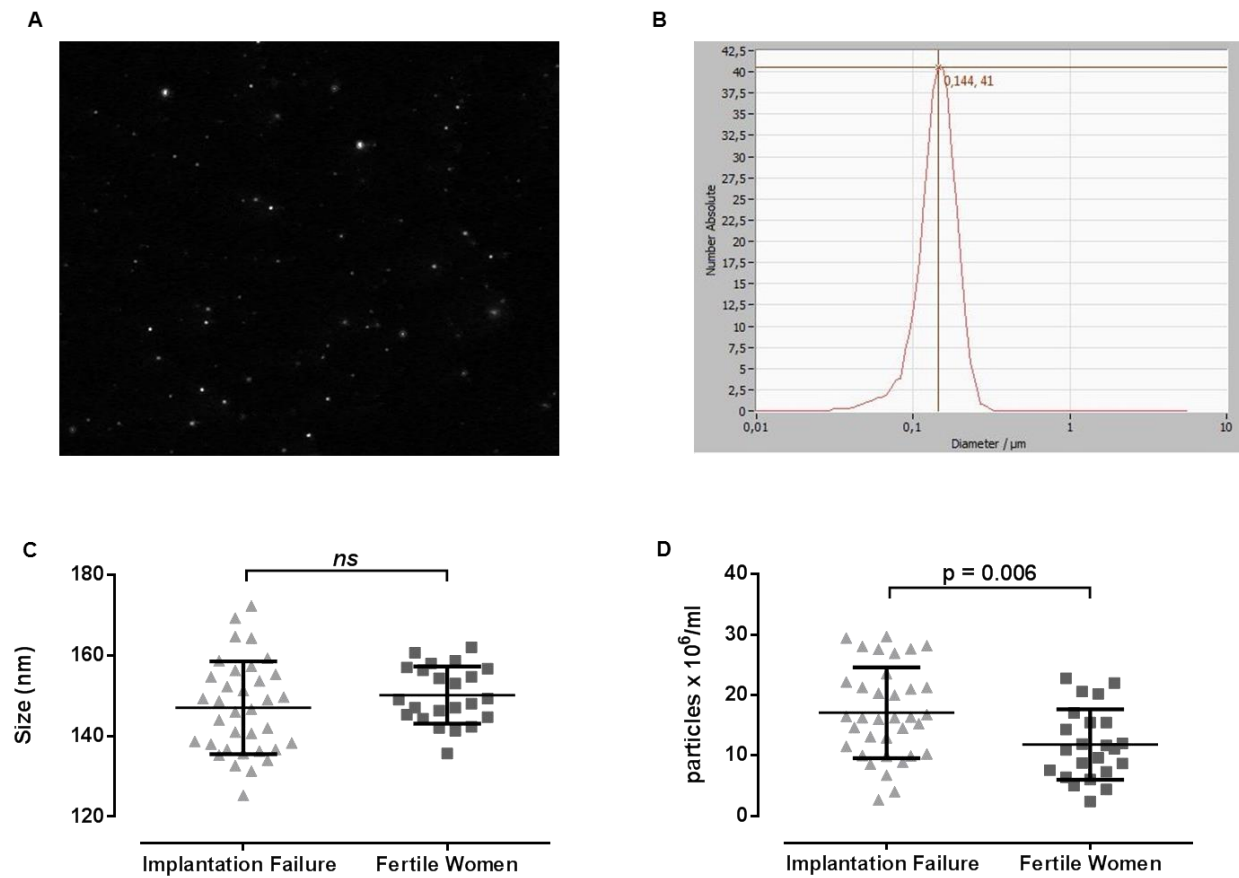


Figure 1 (Supplementary material): Determination of EVs size by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). (A) Representative image showing the determination of EVs size, enriched by ExoQuick™ solution; (B) The corresponding mean particles size (nm) according to NTA; (C) Distribution size of EVs derived from IF (n = 35) and FW (n = 23). Data are presented as mean ± SD. (D) Circulating EVs were significantly increased in IF (n = 35) compared to FW (n = 23) by Mann-Whitney test. Data are presented as median and interquartile range.

5.3. Resultados Complementares

5.3.1. Caracterização da amostra

A Tabela 1 faz um resumo das características clínicas principais das mulheres com falha de implantação embrionária, controles férteis não gestantes e controles férteis gestantes.

Tabela 1. Caracterização da amostra.

		Falha de implantação (n = 62)		Controles férteis não gestantes (n = 131)		Controles férteis gestantes (n = 29)	
		n	%	n	%	n	%
Idade	<35	20	32,2	31	23,7	17	58,6
	≥35	42	67,8	100	76,3	12	41,4
Nascimentos anteriores	0	62	100,0	-	-	11	37,9
	1	-	-	-	-	9	31,0
	2	-	-	97	74,0	4	13,8
	3	-	-	27	20,6	1	3,5
	≥4	-	-	07	5,4	4	13,8
Histórico familiar de infertilidade	Não	38	61,3	-	-	-	-
	Sim	24	38,7	-	-	-	-
Histórico de abortos	0	35	56,5	131	100,0	22	75,9
	1	15	24,2	-	-	5	17,2
	2	9	14,5	-	-	2	6,9
	3	3	4,8	-	-	-	-
Número de TRA prévios	2	20	32,3	-	-	-	-
	3	17	27,4	-	-	-	-
	4	15	24,2	-	-	-	-
	≥ 5	10	16,1	-	-	-	-
Procedimento de TRA realizado	IVF	54	87,1	-	-	-	-
	ICSI	8	12,9	-	-	-	-
Causa da infertilidade	Masculina	20	32,3	-	-	-	-
	Feminina	17	27,3	-	-	-	-
	Ambos	5	8,1	-	-	-	-
	Desconhecida	20	32,3	-	-	-	-

5.3.2. Frequências alélicas e genótípicas do gene *HLA-G* em pacientes com falha de implantação embrionária e controles férteis não gestantes

Neste estudo, 20 alelos e 56 genótipos distintos do gene *HLA-G* foram genotipados. A distribuição alélica mostrou-se em equilíbrio gênico de Hardy-Weinberg, exceto para os indivíduos do sexo masculino pertencentes ao grupo controle fértil não gestante ($p = 0.001$). A análise estatística foi realizada somente no caso em que as frequências alélicas e/ou genótípicas foram $\geq 5\%$ em pelo menos um dos grupos analisados. Foram observadas diferenças significativas na distribuição alélica referente aos casais pertencentes ao grupo com falha de implantação embrionária ($n = 121$; mulheres: 61, homens: 60) e ao grupo controle fértil não gestante ($n = 261$; mulheres: 131, homens: 130) (Tabela 2). As

frequências dos alelos *HLA-G*01:01:03* e *HLA-G*01:04:04* apresentaram-se significativamente mais frequentes nos casais pertencentes ao grupo controle fértil não gestante se comparadas ao grupo dos casais com falha de implantação embrionária.

Tabela 2. Comparação das frequências alélicas do gene *HLA-G* entre casais IF e casais FW.

Alelos	Casais com falha de implantação (2n = 242)		Casais férteis (2n = 522)		<i>p</i> -value/ <i>p</i> _c *	OR [IC 95%]*
	n	%	N	%		
<i>HLA-G*01:01:01</i>	96	39,67	205	39,27	<i>ns</i>	-
<i>HLA-G*01:01:02</i>	47	19,42	123	23,56	<i>ns</i>	-
<i>HLA-G*01:01:03</i>	05	2,07	32	6,13	0,017/0,344	0,32 [0,12-0,83]
<i>HLA-G*01:01:05</i>	01	0,41	04	0,77	-	-
<i>HLA-G*01:01:06</i>	04	1,65	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:01:07</i>	0	0	01	0,19	-	-
<i>HLA-G*01:01:08</i>	14	5,79	17	3,26	<i>ns</i>	-
<i>HLA-G*01:01:09</i>	01	0,41	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:01:14</i>	03	1,24	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:01:15</i>	0	0	01	0,19	-	-
<i>HLA-G*01:01:17</i>	01	0,41	02	0,38	-	-
<i>HLA-G*01:01:20</i>	02	0,83	01	0,19	-	-
<i>HLA-G*01:03</i>	0	0	13	2,49	-	-
<i>HLA-G*01:03:01</i>	20	8,26	30	5,75	<i>ns</i>	-
<i>HLA-G*01:04:01</i>	28	11,57	41	7,85	<i>ns</i>	-
<i>HLA-G*01:04:03</i>	02	0,83	01	0,19	-	-
<i>HLA-G*01:04:04</i>	04	1,65	27	5,17	0,028/0,560	0,3 [0,1-0,9]
<i>HLA-G*01:04:05</i>	0	0	01	0,19	-	-
<i>HLA-G*01:05N</i>	06	2,48	01	0,19	-	-
<i>HLA-G*01:06</i>	08	3,31	22	4,21	-	-

**p*-value: Fisher's exact test; *p*_c: valor de *p* multiplicado pelo número de alelos distintos encontrados (correção de Bonferroni); *OR: odds ratio; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; os resultados em negrito são estatisticamente significativos, *ns*: não significativo.

As comparações entre os grupos de acordo com o gênero revelou a presença de um alelo mais frequente (*HLA-G*01:04:01*) nas mulheres pertencentes ao grupo IF (n = 61) se comparado ao grupo de mulheres FW (n = 131), sugerindo um possível fator de risco à condição de falha de implantação embrionária para as mulheres deste estudo. Além disso, nenhum alelo se mostrou como fator de proteção, ou seja, mais frequente nas mulheres pertencentes ao grupo controle fértil não gestante. No que se refere às comparações entre os homens dos dois grupos (IF = 60 e FW = 130), somente um alelo (*HLA-G*01:01:03*) foi observado ser mais frequente nos homens pertencentes ao grupo controle fértil não gestante se comparado aos homens do grupo com falha de implantação, sugerindo um possível fator protetivo para os casais desse grupo. A Tabela 3 resume os resultados encontrados nas comparações por gênero. Nenhuma diferença na distribuição alélica mostrou-se estatisticamente significativa após a correção de Bonferroni.

Tabela 3. Comparação das frequências alélicas do gene *HLA-G* entre os grupos IF e FW de acordo com o gênero.

Alelos	Mulheres com falha de implantação (2n = 122)		Mulheres férteis (2n = 262)		p-value/p _c *	OR [IC 95%]*
	n	%	n	%		
<i>HLA-G*01:01:01</i>	49	40,16	104	39,69	ns	-
<i>HLA-G*01:01:02</i>	20	16,39	61	23,28	ns	-
<i>HLA-G*01:01:03</i>	03	2,46	15	5,73	ns	-
<i>HLA-G*01:01:05</i>	0	0	03	1,15	-	-
<i>HLA-G*01:01:06</i>	02	1,64	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:01:07</i>	0	0	01	0,38	-	-
<i>HLA-G*01:01:08</i>	05	4,10	05	1,91	-	-
<i>HLA-G*01:01:09</i>	01	0,82	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:01:14</i>	03	2,46	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:01:15</i>	0	0	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:01:17</i>	01	0,82	01	0,38	-	-
<i>HLA-G*01:01:20</i>	02	1,64	01	0,38	-	-
<i>HLA-G*01:03</i>	0	0	09	3,44	-	-
<i>HLA-G*01:03:01</i>	09	7,38	15	5,73	ns	-
<i>HLA-G*01:04:01</i>	16	13,11	15	5,73	0,016/0,340	2,5 [1,2-5,2]
<i>HLA-G*01:04:03</i>	01	0,82	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:04:04</i>	03	2,46	16	6,11	ns	-
<i>HLA-G*01:04:05</i>	0	0	01	0,38	-	-
<i>HLA-G*01:05N</i>	04	3,28	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:06</i>	03	2,46	15	5,73	ns	-

Alelos	Homens com falha de implantação (2n = 120)		Homens férteis (2n = 260)		p-value/p _c *	OR [IC 95%]*
	n	%	n	%		
<i>HLA-G*01:01:01</i>	47	39,16	101	38,85	ns	-
<i>HLA-G*01:01:02</i>	27	22,50	62	23,85	ns	-
<i>HLA-G*01:01:03</i>	02	1,67	17	6,54	0,044/0,660	0,24 [0,05-1,0]
<i>HLA-G*01:01:05</i>	01	0,83	01	0,38	-	-
<i>HLA-G*01:01:06</i>	02	1,67	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:01:07</i>	0	0	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:01:08</i>	09	7,50	12	4,62	ns	-
<i>HLA-G*01:01:09</i>	0	0	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:01:14</i>	0	0	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:01:15</i>	0	0	01	0,38	-	-
<i>HLA-G*01:01:17</i>	0	0	01	0,38	-	-
<i>HLA-G*01:01:20</i>	0	0	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:03</i>	0	0	04	1,54	-	-
<i>HLA-G*01:03:01</i>	11	9,17	15	5,77	ns	-
<i>HLA-G*01:04:01</i>	12	10,00	26	10,00	ns	-
<i>HLA-G*01:04:03</i>	01	0,83	01	0,38	-	-
<i>HLA-G*01:04:04</i>	01	0,83	11	4,23	-	-
<i>HLA-G*01:04:05</i>	0	0	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:05N</i>	02	1,67	01	0,38	-	-
<i>HLA-G*01:06</i>	05	4,17	07	2,69	-	-

*p-value: Fisher's exact test; p_c: valor de p multiplicado pelo número de alelos distintos encontrados (correção de Bonferroni); *OR: odds ratio; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; os resultados em negrito são estatisticamente significativos; ns: não significativo.

Das análises estatísticas referentes aos 56 genótipos distintos de *HLA-G*, não foram encontradas diferenças significativas referente às comparações entre os casais pertencentes ao grupo com falha de implantação embrionária e casais pertencentes ao grupo controle fértil não gestante (Tabela 4).

Tabela 4. Comparação das frequências genótípicas do gene *HLA-G* entre casais IF e casais FW.

Genótipos	Casais com falha de implantação (n = 121)		Casais férteis (n = 261)		p-value/p _c *	OR [IC 95%]*
	n	%	n	%		
<i>HLA-G*01:01:01/*01:01:01</i>	24	19,83	47	18,00	<i>ns</i>	-
<i>HLA-G*01:01:01/*01:01:02</i>	14	11,57	38	14,55	<i>ns</i>	-
<i>HLA-G*01:01:01/*01:01:03</i>	01	0,83	04	1,53	-	-
<i>HLA-G*01:01:01/*01:01:05</i>	01	0,83	04	1,53	-	-
<i>HLA-G*01:01:01/*01:01:06</i>	02	1,65	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:01:01/*01:01:08</i>	01	0,83	08	3,06	-	-
<i>HLA-G*01:01:01/*01:01:09</i>	01	0,83	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:01:01/*01:01:14</i>	01	0,83	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:01:01/*01:01:17</i>	01	0,83	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:01:01/*01:01:20</i>	01	0,83	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:01:01/*01:03</i>	0	0	06	2,29	-	-
<i>HLA-G*01:01:01/*01:03:01</i>	10	8,26	13	4,98	<i>ns</i>	-
<i>HLA-G*01:01:01/*01:04:01</i>	09	7,43	18	6,89	<i>ns</i>	-
<i>HLA-G*01:01:01/*01:04:03</i>	01	0,83	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:01:01/*01:04:04</i>	02	1,65	09	3,44	-	-
<i>HLA-G*01:01:01/*01:04:05</i>	0	0	01	0,38	-	-
<i>HLA-G*01:01:01/*01:06</i>	03	2,47	10	3,83	-	-
<i>HLA-G*01:01:02/*01:01:02</i>	04	3,30	18	6,89	<i>ns</i>	-
<i>HLA-G*01:01:02/*01:01:03</i>	01	0,83	11	4,21	-	-
<i>HLA-G*01:01:02/*01:01:06</i>	02	1,65	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:01:02/*01:01:08</i>	06	4,69	01	0,38	-	-
<i>HLA-G*01:01:02/*01:01:20</i>	0	0	01	0,38	-	-
<i>HLA-G*01:01:02/*01:03</i>	0	0	04	1,53	-	-
<i>HLA-G*01:01:02/*01:03:01</i>	04	3,30	08	3,06	-	-
<i>HLA-G*01:01:02/*01:04:01</i>	07	5,78	07	2,68	<i>ns</i>	-
<i>HLA-G*01:01:02/*01:04:03</i>	01	0,83	01	0,38	-	-
<i>HLA-G*01:01:02/*01:04:04</i>	01	0,83	10	3,83	-	-
<i>HLA-G*01:01:02/*01:05N</i>	03	2,47	01	0,38	-	-
<i>HLA-G*01:01:02/*01:06</i>	0	0	05	1,91	-	-
<i>HLA-G*01:01:03/*01:01:03</i>	0	0	02	0,76	-	-
<i>HLA-G*01:01:03/*01:01:17</i>	0	0	01	0,38	-	-
<i>HLA-G*01:01:03/*01:03:01</i>	02	1,65	03	1,15	-	-
<i>HLA-G*01:01:03/*01:04:01</i>	01	0,83	05	1,91	-	-
<i>HLA-G*01:01:03/*01:04:04</i>	0	0	02	0,76	-	-
<i>HLA-G*01:01:03/*01:06</i>	0	0	02	0,76	-	-
<i>HLA-G*01:01:07/*01:03</i>	0	0	01	0,38	-	-
<i>HLA-G*01:01:08/*01:01:08</i>	0	0	03	1,15	-	-
<i>HLA-G*01:01:08/*01:01:14</i>	01	0,83	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:01:08/*01:03</i>	0	0	01	0,38	-	-
<i>HLA-G*01:01:08/*01:04:01</i>	05	4,13	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:01:08/*01:04:04</i>	0	0	01	0,38	-	-
<i>HLA-G*01:01:08/*01:05N</i>	01	0,83	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:01:14/*01:03:01</i>	01	0,83	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:01:15/*01:04:04</i>	0	0	01	0,38	-	-
<i>HLA-G*01:01:17/*01:04:04</i>	0	0	01	0,38	-	-
<i>HLA-G*01:01:20/*01:05N</i>	01	0,83	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:03/*01:04:01</i>	0	0	01	0,38	-	-
<i>HLA-G*01:03:01/*01:04:01</i>	02	1,65	04	1,53	-	-
<i>HLA-G*01:03:01/*01:04:04</i>	0	0	02	0,76	-	-
<i>HLA-G*01:03:01/*01:06</i>	01	0,83	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:04:01/*01:04:01</i>	0	0	01	0,38	-	-
<i>HLA-G*01:04:01/*01:04:04</i>	0	0	01	0,38	-	-
<i>HLA-G*01:04:01/*01:05N</i>	01	0,83	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:04:01/*01:06</i>	03	2,47	03	1,15	-	-
<i>HLA-G*01:04:04/*01:06</i>	01	0,83	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:06/*01:06</i>	0	0	01	0,38	-	-

*p-value: Fisher's exact test; p_c: valor de p multiplicado pelo número de genótipos distintos encontrados (correção de Bonferroni); *OR: odds ratio; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; os resultados em negrito são estatisticamente significativos; ns: não significativo.

Nas comparações por gênero, não foram encontradas diferenças significativas na distribuição de genótipos quando se comparou mulheres com falha implantacional (IF) e mulheres férteis não gestantes (FW) (Tabela 5). No entanto, os genótipos *HLA-G*01:01:02/*01:01:08* e *HLA-G*01:01:08/*01:04:01* mostraram-se significativamente mais frequentes nos homens pertencentes ao grupo com falha de implantação embrionária quando comparados aos homens pertencentes ao grupo controle fértil não gestante (Tabela 6). Devido ao número elevado de variantes genóticas encontradas na população em estudo, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi mantida após a correção de Bonferroni ter sido aplicada.

Tabela 5. Comparação das frequências genóticas do gene *HLA-G* entre as mulheres pertencentes aos grupos falha de implantação e controle fértil não gestante.

Genótipos	Mulheres com falha de implantação (n = 61)		Mulheres férteis (n = 131)		p-value/p _c *	OR [IC 95%]*
	n	%	n	%		
<i>HLA-G*01:01:01/*01:01:01</i>	12	19,67	24	18,32	ns	-
<i>HLA-G*01:01:01/*01:01:02</i>	08	13,11	20	15,26	ns	-
<i>HLA-G*01:01:01/*01:01:03</i>	01	1,64	02	1,52	-	-
<i>HLA-G*01:01:01/*01:01:05</i>	0	0	03	2,29	-	-
<i>HLA-G*01:01:01/*01:01:06</i>	01	1,64	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:01:01/*01:01:08</i>	0	0	04	3,00	-	-
<i>HLA-G*01:01:01/*01:01:09</i>	01	1,64	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:01:01/*01:01:14</i>	01	1,64	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:01:01/*01:01:17</i>	01	1,64	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:01:01/*01:01:20</i>	01	1,64	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:01:01/*01:03</i>	0	0	04	3,00	-	-
<i>HLA-G*01:01:01/*01:03:01</i>	04	6,56	07	5,34	ns	-
<i>HLA-G*01:01:01/*01:04:01</i>	05	8,20	04	3,00	ns	-
<i>HLA-G*01:01:01/*01:04:03</i>	0	0	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:01:01/*01:04:04</i>	01	1,64	05	3,81	-	-
<i>HLA-G*01:01:01/*01:04:05</i>	0	0	01	0,75	-	-
<i>HLA-G*01:01:01/*01:06</i>	01	1,64	06	4,58	-	-
<i>HLA-G*01:01:02/*01:01:02</i>	01	1,64	07	5,34	ns	-
<i>HLA-G*01:01:02/*01:01:03</i>	0	0	04	3,00	-	-
<i>HLA-G*01:01:02/*01:01:06</i>	01	1,64	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:01:02/*01:01:08</i>	01	1,64	01	0,75	-	-
<i>HLA-G*01:01:02/*01:01:20</i>	0	0	01	0,75	-	-
<i>HLA-G*01:01:02/*01:03</i>	0	0	04	3,00	-	-
<i>HLA-G*01:01:02/*01:03:01</i>	01	1,64	04	3,00	-	-
<i>HLA-G*01:01:02/*01:04:01</i>	04	6,56	03	2,29	ns	-
<i>HLA-G*01:01:02/*01:04:03</i>	01	1,64	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:01:02/*01:04:04</i>	01	1,64	08	6,10	ns	-
<i>HLA-G*01:01:02/*01:05N</i>	01	1,64	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:01:02/*01:06</i>	0	0	02	1,52	-	-
<i>HLA-G*01:01:03/*01:01:03</i>	0	0	02	1,52	-	-
<i>HLA-G*01:01:03/*01:01:17</i>	0	0	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:01:03/*01:03:01</i>	01	1,64	01	0,75	-	-
<i>HLA-G*01:01:03/*01:04:01</i>	01	1,64	01	0,75	-	-
<i>HLA-G*01:01:03/*01:04:04</i>	0	0	01	0,75	-	-
<i>HLA-G*01:01:03/*01:06</i>	0	0	02	1,52	-	-
<i>HLA-G*01:01:07/*01:03</i>	0	0	01	0,75	-	-
<i>HLA-G*01:01:08/*01:01:08</i>	0	0	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:01:08/*01:01:14</i>	01	1,64	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:01:08/*01:03</i>	0	0	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:01:08/*01:04:01</i>	02	3,27	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:01:08/*01:04:04</i>	0	0	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:01:08/*01:05N</i>	01	1,64	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:01:14/*01:03:01</i>	01	1,64	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:01:15/*01:04:04</i>	0	0	0	0	-	-

HLA-G*01:01:17/ *01:04:04	0	0	01	0,75	-	-
HLA-G*01:01:20/ *01:05N	01	1,64	0	0	-	-
HLA-G*01:03/ *01:04:01	0	0	0	0	-	-
HLA-G*01:03:01/ *01:04:01	02	3,27	02	2,29	-	-
HLA-G*01:03:01/ *01:04:04	0	0	01	0,75	-	-
HLA-G*01:03:01/ *01:06	0	0	0	0	-	-
HLA-G*01:04:01/ *01:04:01	0	0	01	0,75	-	-
HLA-G*01:04:01/ *01:04:04	0	0	0	0	-	-
HLA-G*01:04:01/ *01:05N	01	1,64	0	0	-	-
HLA-G*01:04:01/ *01:06	01	1,64	03	2,29	-	-
HLA-G*01:04:04/ *01:06	01	1,64	0	0	-	-
HLA-G*01:06/ *01:06	0	0	01	0,75	-	-

*p-value: Fisher's exact test; p_c : valor de p multiplicado pelo número de genótipos distintos encontrados (correção de Bonferroni); *OR: odds ratio; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; os resultados em negrito são estatisticamente significativos; ns: não significativo.

Tabela 6. Comparação das frequências genotípicas do gene *HLA-G* entre os homens pertencentes aos grupos falha de implantação e controle fértil não gestante.

Genótipos	Homens com falha de implantação (n = 60)		Homens férteis (n = 130)		p-value*/ p_c	OR*[IC 95%]
	n	%	n	%		
HLA-G*01:01:01/ *01:01:01	12	20,00	23	17,70	ns	-
HLA-G*01:01:01/ *01:01:02	06	10,00	18	13,84	ns	-
HLA-G*01:01:01/ *01:01:03	0	0	02	1,53	-	-
HLA-G*01:01:01/ *01:01:05	0	0	01	0,77	-	-
HLA-G*01:01:01/ *01:01:06	01	1,67	0	0	-	-
HLA-G*01:01:01/ *01:01:08	01	1,67	04	3,07	-	-
HLA-G*01:01:01/ *01:01:09	0	0	0	0	-	-
HLA-G*01:01:01/ *01:01:14	0	0	0	0	-	-
HLA-G*01:01:01/ *01:01:17	0	0	0	0	-	-
HLA-G*01:01:01/ *01:01:20	0	0	0	0	-	-
HLA-G*01:01:01/ *01:03	0	0	02	1,53	-	-
HLA-G*01:01:01/ *01:03:01	06	10,00	06	4,61	ns	-
HLA-G*01:01:01/ *01:04:01	04	6,66	14	10,80	ns	-
HLA-G*01:01:01/ *01:04:03	01	1,67	0	0	-	-
HLA-G*01:01:01/ *01:04:04	01	1,67	04	3,07	-	-
HLA-G*01:01:01/ *01:04:05	0	0	0	0	-	-
HLA-G*01:01:01/ *01:06	02	3,33	04	3,07	-	-
HLA-G*01:01:02/ *01:01:02	03	5,00	11	8,50	ns	-
HLA-G*01:01:02/ *01:01:03	01	1,67	07	5,40	ns	-
HLA-G*01:01:02/ *01:01:06	01	1,67	0	0	-	-
HLA-G*01:01:02/ *01:01:08	05	8,32	0	0	0,002/0,074	25,9 [1,4-476,1]
HLA-G*01:01:02/ *01:01:20	0	0	0	0	-	-
HLA-G*01:01:02/ *01:03	0	0	0	0	-	-
HLA-G*01:01:02/ *01:03:01	03	5,00	04	3,07	ns	-
HLA-G*01:01:02/ *01:04:01	03	5,00	04	3,07	ns	-
HLA-G*01:01:02/ *01:04:03	0	0	01	0,77	-	-
HLA-G*01:01:02/ *01:04:04	0	0	02	1,53	-	-
HLA-G*01:01:02/ *01:05N	02	3,33	01	0,77	-	-
HLA-G*01:01:02/ *01:06	01	1,67	03	2,30	-	-
HLA-G*01:01:03/ *01:01:03	0	0	0	0	-	-
HLA-G*01:01:03/ *01:01:17	0	0	01	0,77	-	-
HLA-G*01:01:03/ *01:03:01	01	1,67	02	1,53	-	-
HLA-G*01:01:03/ *01:04:01	0	0	04	3,07	-	-
HLA-G*01:01:03/ *01:04:04	0	0	01	0,77	-	-
HLA-G*01:01:03/ *01:06	0	0	0	0	-	-
HLA-G*01:01:07/ *01:03	0	0	0	0	-	-
HLA-G*01:01:08/ *01:01:08	0	0	03	2,30	-	-
HLA-G*01:01:08/ *01:01:14	0	0	0	0	-	-
HLA-G*01:01:08/ *01:03	0	0	01	0,77	-	-
HLA-G*01:01:08/ *01:04:01	03	5,00	0	0	0,030/1,080	15,9 [0,8-312,8]
HLA-G*01:01:08/ *01:04:04	0	0	01	0,77	-	-
HLA-G*01:01:08/ *01:05N	0	0	0	0	-	-
HLA-G*01:01:14/ *01:03:01	0	0	0	0	-	-
HLA-G*01:01:15/ *01:04:04	0	0	01	0,77	-	-
HLA-G*01:01:17/ *01:04:04	0	0	0	0	-	-

<i>HLA-G*01:01:20/*01:05N</i>	0	0	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:03/*01:04:01</i>	0	0	01	0,77	-	-
<i>HLA-G*01:03:01/*01:04:01</i>	0	0	02	1,53	-	-
<i>HLA-G*01:03:01/*01:04:04</i>	0	0	01	0,77	-	-
<i>HLA-G*01:03:01/*01:06</i>	01	1,67	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:04:01/*01:04:01</i>	0	0	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:04:01/*01:04:04</i>	0	0	01	0,77	-	-
<i>HLA-G*01:04:01/*01:05N</i>	0	0	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:04:01/*01:06</i>	02	3,33	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:04:04/*01:06</i>	0	0	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:06/*01:06</i>	0	0	0	0	-	-

**p-value*: Fisher's exact test; *p_c*: valor de *p* multiplicado pelo número de genótipos distintos encontrados (correção de Bonferroni); *OR: odds ratio; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; os resultados em negrito são estatisticamente significativos; ns: não significativo.

5.3.3. Níveis de HLA-G solúvel em mulheres com falha de implantação embrionária e controles férteis não gestantes

Os níveis de HLA-G solúvel (sHLA-G) circulante nas mulheres pertencentes ao grupo com falha de implantação embrionária ($n = 40$) e nas mulheres pertencentes ao grupo controle fértil não gestante ($n = 97$) foram quantificados no soro, os quais foram considerados como níveis de HLA-G solúvel total (sHLA-G_{tot}), e nas suspensões de vesículas extracelulares derivadas do soro das mesmas mulheres, os quais foram considerados como níveis de HLA-G solúvel vesicular (sHLA-G_{EV}). Nesta análise, os níveis de sHLA-G_{tot} (mediana + variação, ng/ml) demonstram ser significativamente mais altos em mulheres com falha de implantação embrionária [8,7 (4,7 – 25,1); $p = 0,0001$] se comparados aos níveis de sHLA-G_{tot} em mulheres férteis não gestantes [6,3 (0,0 – 22,8); Figura 8A]. Os níveis de sHLA-G_{EV} também mostraram níveis significativamente elevados em mulheres com falha de implantação embrionária [4,7 (0,0 – 23,1); $p < 0,0001$] se comparados aos níveis de sHLA-G_{EV} em mulheres férteis não gestantes [3,0 (0,0 – 20,7); Figura 8B].

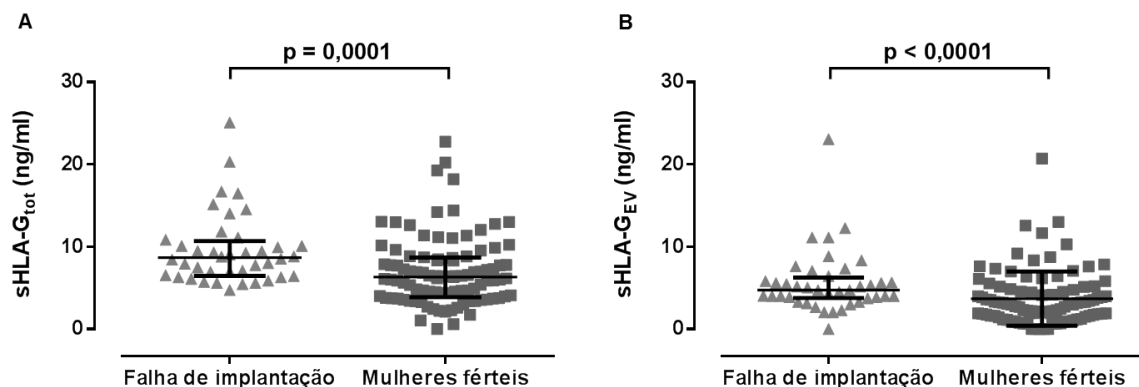


Figura 8. Níveis de sHLA-G em mulheres com falha de implantação embrionária e em mulheres férteis não gestantes. (A) Níveis de sHLA-G_{tot} elevados no grupo IF (n = 40) se comparados ao grupo FW (n = 97). (B) Níveis de sHLA-G_{EV} elevados no grupo IF (n = 40) se comparados ao grupo FW (n = 97). Os dados estão apresentados em mediana + amplitude inter-quartil; Mann-Whitney test; IF: falha de implantação; FW: mulheres férteis não gestantes.

5.3.4. Associação de alelos do gene *HLA-G* com níveis de HLA-G solúvel

Alguns alelos do gene *HLA-G* mostraram-se associados tanto aos níveis totais, quanto aos níveis vesiculares de sHLA-G. Todas as amostras de soro e suspensões de vesículas extracelulares derivadas de mulheres pertencentes aos grupos IF (n = 40) e FW (n = 97), previamente genotipadas e quantificadas para sHLA-G (sHLA-G_{tot} e sHLA-G_{EV}) participaram dessa análise. As mulheres foram categorizadas como portadoras ou não portadoras do alelo estudado. Somente foram testados para associação com os níveis de sHLA-G_{tot} e com os níveis de sHLA-G_{EV} os alelos do gene *HLA-G* que apresentaram um número de portadoras suficientes (n ≥ 5). Os resultados obtidos demonstraram que o alelo *HLA-G*01:01:01* está associado à níveis elevados de sHLA-G_{tot} e de sHLA-G_{EV} em mulheres com falha de implantação. Por outro lado, o alelo *HLA-G*01:01:02* está associado à níveis reduzidos de sHLA-G_{EV} em mulheres do mesmo grupo. Os resultado referentes às mulheres férteis não gestantes mostraram que o alelo *HLA-G*01:01:03* estaria associado à valores aumentados de sHLA-G_{tot} (Tabela 7). Após a correção de Bonferroni ter sido aplicada, somente a associação entre o alelo *HLA-G*01:01:01* e valores aumentados de sHLA-G_{EV} em mulheres com falha de implantação se manteve.

Tabela 7. Associação dos alelos do gene *HLA-G* com os níveis de sHLA-G_{tot} e sHLA-G_{EV} em mulheres pertencentes aos grupos falha de implantação e controle fértil não gestante.

Mulheres com Falha de Implantação Embrionária					
Alelos <i>HLA-G</i>	Portadoras do alelo		Não portadoras do alelo		
	sHLA-G _{tot} ng/ml (mediana, variação)	N	sHLA-G _{tot} ng/ml (mediana, variação)	n	<i>p</i> -value/ <i>p</i> _c *
<i>HLA-G*01:01:01</i>	9,3 (5,4 – 25,1)	23	7,5 (4,7 – 11,1)	17	0,04/0,16
<i>HLA-G*01:01:02</i>	8,5 (4,7 – 16,5)	12	8,9 (5,4 – 25,1)	28	<i>ns</i>
<i>HLA-G*01:03:01</i>	8,5 (5,7 – 20,3)	06	8,7 (4,7 – 25,1)	34	<i>ns</i>
<i>HLA-G*01:04:01</i>	8,3 (5,6 – 25,1)	12	8,7 (4,7 – 20,3)	28	<i>ns</i>
Mulheres com Falha de Implantação Embrionária					
Alelos <i>HLA-G</i>	Portadoras do alelo		Não portadoras do alelo		
	sHLA-G _{EV} ng/ml (mediana, variação)	N	sHLA-G _{EV} ng/ml (mediana, variação)	n	<i>p</i> -value/ <i>p</i> _c *
<i>HLA-G*01:01:01</i>	5,4 (2,3 – 23,1)	23	4,0 (0,0 – 8,3)	17	0,008/0,03
<i>HLA-G*01:01:02</i>	3,8 (0,0 – 11,1)	12	5,2 (2,0 – 23,1)	28	0,02/0,08
<i>HLA-G*01:03:01</i>	5,2 (3,9 – 8,3)	06	4,6 (0,0 – 23,1)	34	<i>ns</i>
<i>HLA-G*01:04:01</i>	5,1 (0,0 – 23,1)	12	4,6 (2,0 – 12,3)	28	<i>ns</i>
Mulheres Férteis					
Alelos <i>HLA-G</i>	Portadoras do alelo		Não portadoras do alelo		
	sHLA-G _{tot} ng/ml (mediana, variação)	N	sHLA-G _{tot} ng/ml (mediana, variação)	n	<i>p</i> -value/ <i>p</i> _c *
<i>HLA-G*01:01:01</i>	6,5 (0,0 – 20,2)	60	7,2 (1,0 – 22,8)	37	<i>ns</i>
<i>HLA-G*01:01:02</i>	6,5 (1,0 – 13,0)	40	6,0 (0,0 – 22,8)	57	<i>ns</i>
<i>HLA-G*01:01:03</i>	7,7 (6,0 – 22,8)	07	6,1 (0,0 – 20,2)	90	0,04/0,16
<i>HLA-G*01:03</i>	6,9 (3,7 – 12,8)	05	6,5 (0,0 – 22,8)	92	<i>ns</i>
<i>HLA-G*01:03:01</i>	5,3 (2,3 – 19,3)	13	6,4 (0,0 – 22,8)	84	<i>ns</i>
<i>HLA-G*01:04:01</i>	4,3 (2,7 – 14,2)	12	6,4 (0,0 – 22,8)	85	<i>ns</i>
<i>HLA-G*01:04:04</i>	8,3 (0,0 – 13,0)	11	6,2 (0,6 – 22,8)	86	<i>ns</i>
<i>HLA-G*01:06</i>	4,2 (0,6 – 14,2)	12	6,4 (0,0 – 22,8)	85	<i>ns</i>
Mulheres Férteis					
Alelos <i>HLA-G</i>	Portadoras do alelo		Não portadoras do alelo		
	sHLA-G _{EV} ng/ml (mediana, variação)	N	sHLA-G _{EV} ng/ml (mediana, variação)	n	<i>p</i> -value/ <i>p</i> _c *
<i>HLA-G*01:01:01</i>	2,4 (0,0 – 13,0)	60	3,2 (0,0 – 20,7)	37	<i>ns</i>
<i>HLA-G*01:01:02</i>	2,7 (0,0 – 11,6)	40	3,0 (0,0 – 20,7)	57	<i>ns</i>
<i>HLA-G*01:01:03</i>	5,2 (0,6 – 20,7)	07	2,7 (0,0 – 13,0)	90	<i>ns</i>
<i>HLA-G*01:03</i>	3,4 (1,6 – 7,3)	05	2,8 (0,0 – 20,7)	92	<i>ns</i>
<i>HLA-G*01:03:01</i>	2,2 (0,6 – 6,1)	13	2,9 (0,0 – 20,7)	84	<i>ns</i>
<i>HLA-G*01:04:01</i>	2,2 (0,6 – 7,1)	12	2,9 (0,0 – 20,7)	85	<i>ns</i>
<i>HLA-G*01:04:04</i>	4,4 (0,0 – 10,3)	11	2,6 (0,0 – 20,7)	86	<i>ns</i>
<i>HLA-G*01:06</i>	2,5 (0,0 – 7,8)	12	2,9 (0,0 – 20,7)	85	<i>ns</i>

**p*-value: Mann-Whitney test; *p*_c: valor de *p* multiplicado pelo número de alelos distintos (correção de Bonferroni); *ns*: não significativo.

5.3.5. Frequências haplotípicas do gene *HLA-G* e do polimorfismo 14pb ins/del em mulheres com falha de implantação embrionária e controles férteis não gestantes

A análise da possível influência do polimorfismo de *HLA-G* 14pb ins/del nos resultados da associação entre alelos do gene *HLA-G* e a expressão de *HLA-G* solúvel (sHLA-G_{tot} e sHLA-G_{EV}) foi realizada através da inferência de haplótipos. Neste estudo, 19 haplótipos distintos do gene *HLA-G* e do polimorfismo do gene *HLA-G* 14pb ins/del foram inferidos. A distribuição haplotípica se mostrou em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Nesta análise foram incluídas somente as mulheres genotipadas para *HLA-G*, incluindo-se o polimorfismo de *HLA-G* 14pb ins/del, bem como todas as amostras de mulheres que possuíam resultados da quantificação de sHLA-G (sHLA-G_{tot} e sHLA-G_{EV}) simultaneamente.

A análise estatística foi realizada somente no caso em que as frequências haplotípicas foram $\geq 5\%$ em pelo menos um dos grupos analisados. Foram observadas diferenças significativas na distribuição haplotípica referente às mulheres pertencentes ao grupo com falha de implantação embrionária ($n = 32$) e ao grupo controle fértil não gestante ($n = 35$) (Tabela 8). A frequência do haplótipo *HLA-G*01:01:08/-14pb* mostrou-se significativamente aumentada no grupo de mulheres com falha de implantação embrionária, quando comparada ao grupo de mulheres controle fértil não gestante e o haplótipo *HLA-G*01:04:01/-14pb* apresentou uma tendência a ser mais frequente em mulheres com falha de implantação. Por outro lado, o haplótipo *HLA-G*01:03/+14pb* foi significativamente mais frequentes nas mulheres pertencentes ao grupo controle fértil não gestante, quando comparadas ao grupo de mulheres com falha de implantação embrionária. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada após a correção de Bonferroni ter sido aplicada.

Tabela 8. Comparação das frequências haplotípicas de *HLA-G* e polimorfismo de *HLA-G* 14pb ins/del (+14pb/-14pb) entre mulheres pertencentes aos grupos falha de implantação e controle fértil não gestante.

Haplótipos	Mulheres com falha de implantação (n = 32)		Mulheres férteis (n = 35)		p-value/ p_c *	OR [IC 95%]*
	n	%	n	%		
<i>HLA-G*01:01:01/+ 14pb</i>	01	1,63	02	4,40	-	-
<i>HLA-G*01:01:01/- 14pb</i>	18	37,42	19	37,02	ns	-
<i>HLA-G*01:01:02/+ 14pb</i>	11	18,75	14	24,28	ns	-
<i>HLA-G*01:01:03/+ 14pb</i>	01	1,56	04	5,51	ns	-
<i>HLA-G*01:01:03/- 14pb</i>	0	0	01	1,63	-	-
<i>HLA-G*01:01:06/+ 14pb</i>	01	1,49	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:01:06/- 14pb</i>	01	1,49	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:01:07/+ 14pb</i>	0	0	01	1,43	-	-
<i>HLA-G*01:01:08/- 14pb</i>	04	6,25	0	0	0,04/0,76	11,2 [0,6-217,2]
<i>HLA-G*01:01:14/+ 14pb</i>	02	3,12	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:03/+ 14pb</i>	0	0	06	8,45	0,02/0,38	0,07 [0,003-1,3]
<i>HLA-G*01:03/- 14pb</i>	0	0	01	1,55	-	-
<i>HLA-G*01:03:01/+ 14pb</i>	05	7,81	02	2,86	ns	-
<i>HLA-G*01:04:01/+ 14pb</i>	0	0	02	3,06	-	-
<i>HLA-G*01:04:01/- 14pb</i>	10	15,62	04	5,51	0,07/1,33	3,5 [0,9-12,7]
<i>HLA-G*01:04:03/- 14pb</i>	01	1,56	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:05N/+ 14pb</i>	01	1,56	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:05N/- 14pb</i>	01	1,56	0	0	-	-
<i>HLA-G*01:06/+ 14pb</i>	0	0	03	4,28	-	-

*p-value: Fisher's exact test; p_c : valor de p multiplicado pelo número de haplótipos distintos encontrados (correção de Bonferroni); *OR: odds ratio; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; os resultados em negrito são estatisticamente significativos; ns: não significativo.

5.3.6. Associação de haplótipos do gene *HLA-G* e polimorfismo 14pb ins/del com níveis de *HLA-G* solúvel

Alguns haplótipos do gene *HLA-G* mostraram-se associados aos níveis totais e vesiculares de sHLA-G em mulheres com falha de implantação embrionária. Por outro lado, nenhum haplótipo de *HLA-G* foi associado à níveis totais e vesiculares de sHLA-G em mulheres consideradas férteis. Todas as amostras de soro e suspensões de vesículas

extracelulares derivadas de mulheres pertencentes aos grupos IF (n = 32) e FW (n = 35), que foram quantificadas para sHLA-G (sHLA-G_{tot} e sHLA-G_{EV}) e que possuíam genótipo para o gene *HLA-G* e para o polimorfismo 14pb ins/del simultaneamente participaram dessa análise. As mulheres foram categorizadas como portadoras ou não portadoras do haplótipo estudado. Somente foram testados para associação com os níveis de sHLA-G_{tot} e com os níveis de sHLA-G_{EV} os haplótipos do gene *HLA-G* que apresentaram um número de portadoras suficientes (n ≥ 5). Os resultados obtidos demonstraram que o haplótipo *HLA-G*01:01:01/-14pb* apresenta uma tendência de associação à níveis elevados de sHLA-G_{tot} e está associado à níveis elevados de sHLA-G_{EV} em mulheres com falha de implantação. Por outro lado, o haplótipo *HLA-G*01:01:02/+14pb* está associado à níveis reduzidos de sHLA-G_{EV} em mulheres do mesmo grupo (Tabela 9). Após a correção de Bonferroni ter sido aplicada, as associações entre os haplótipos *HLA-G*01:01:01/-14pb* *HLA-G*01:01:02/+14pb* e os níveis de sHLA-G_{EV} em mulheres com falha de implantação se mantiveram.

Tabela 9. Associação dos haplótipos de *HLA-G* e polimorfismo de *HLA-G* 14pb ins/del (+14pb/-14pb) com os níveis de sHLA-G_{tot} e sHLA-G_{EV} em mulheres pertencentes aos grupos falha de implantação e controle fértil não gestante.

Mulheres com Falha de Implantação Embrionária					
Haplótipos	Portadoras do haplótipo		Não portadoras do haplótipo		
	sHLA-G _{tot} ng/ml (mediana, variação)	N	sHLA-G _{tot} ng/ml (mediana, variação)	n	p-value/p _c *
<i>HLA-G*01:01:01/-14pb</i>	9,2 (5,4 – 25,1)	18	7,0 (4,7 – 11,1)	14	0,06/0,24
<i>HLA-G*01:01:02/+14pb</i>	8,4 (4,7 – 16,5)	11	8,8 (5,4 – 25,1)	21	ns
<i>HLA-G*01:03:01/+14pb</i>	8,0 (5,7 – 20,3)	05	8,5 (4,7 – 25,1)	27	ns
<i>HLA-G*01:04:01/-14pb</i>	7,4 (5,6 – 25,1)	10	8,7 (4,7 – 20,3)	22	ns
Haplótipos	Portadoras do haplótipo		Não portadoras do haplótipo		
	sHLA-G _{EV} ng/ml (mediana, variação)	N	sHLA-G _{EV} ng/ml (mediana, variação)	n	p-value/p _c *
<i>HLA-G*01:01:01/-14pb</i>	5,4 (2,9 – 23,1)	18	3,9 (0,0 – 5,6)	14	0,003/0,01
<i>HLA-G*01:01:02/+14pb</i>	3,7 (0,0 – 11,1)	11	5,2 (2,9 – 23,1)	21	0,004/0,01
<i>HLA-G*01:03:01/+14pb</i>	5,0 (3,9 – 5,6)	05	4,3 (0,0 – 23,1)	27	ns
<i>HLA-G*01:04:01/-14pb</i>	4,7 (0,0 – 23,1)	10	4,4 (2,0 – 11,1)	22	ns
Mulheres Férteis					
Haplótipos	Portadoras do haplótipo		Não portadoras do haplótipo		
	sHLA-G _{tot} ng/ml (mediana, variação)	n	sHLA-G _{tot} ng/ml (mediana, variação)	n	p-value/p _c *
<i>HLA-G*01:01:01/-14pb</i>	6,5 (2,3 – 18,2)	19	6,2 (2,4 – 14,4)	16	ns
<i>HLA-G*01:01:02/+14pb</i>	6,7 (2,4 – 13,0)	14	6,4 (2,3 – 18,2)	21	ns
<i>HLA-G*01:03/+14pb</i>	6,7 (2,3 – 12,8)	06	6,3 (2,4 – 18,2)	29	ns
Haplótipos	Portadoras do haplótipo		Não portadoras do haplótipo		
	sHLA-G _{EV} ng/ml (mediana, variação)	n	sHLA-G _{EV} ng/ml (mediana, variação)	n	p-value/p _c *
<i>HLA-G*01:01:01/-14pb</i>	2,9 (0,8 – 12,5)	19	2,5 (0,0 – 9,2)	16	ns
<i>HLA-G*01:01:02/+14pb</i>	2,3 (0,0 – 9,2)	14	3,0 (0,8 – 12,5)	21	ns
<i>HLA-G*01:03/+14pb</i>	2,8 (1,6 – 7,3)	06	2,7 (0,0 – 12,5)	29	ns

*p-value: Mann-Whitney test; p_c: valor de p multiplicado pelo número de haplótipos distintos (correção de Bonferroni); ns: não significativo.

5.3.7. Frequências alélicas e genótípicas do gene *HLA-E* em pacientes com falha de implantação embrionária e controles férteis não gestantes

Neste estudo, 2 alelos e 3 genótipos distintos do gene *HLA-E* foram caracterizados. A distribuição alélica dessa população mostrou-se estar em equilíbrio gênico de Hardy-Weinberg. A análise estatística foi realizada somente no caso em que as frequências alélicas e/ou genótípicas foram $\geq 5\%$ em pelo menos um dos grupos analisados. Não foram observadas diferenças significativas na distribuição alélica e na distribuição genotípica referente aos casais pertencentes ao grupo com falha de implantação embrionária ($n = 106$; mulheres: 53, homens: 53) e ao grupo controle fértil não gestante ($n = 255$; mulheres: 129, homens: 126). As comparações alélicas e genótípicas de acordo com o gênero dos indivíduos também não mostraram diferenças significativas. A Tabela 10 resume os resultados encontrados.

Tabela 10. Frequências alélicas e genótípicas do gene *HLA-E*.

Casais	Casais com falha de implantação ($n = 106$) n (%)	Casais férteis ($n = 255$) n (%)	<i>p</i> -value/ <i>p</i> _c *
Alelos			
<i>HLA-E*01:01</i>	109 (51,42)	290 (56,86)	<i>ns</i>
<i>HLA-E*01:03</i>	103 (48,58)	220 (43,14)	
Genótipos			
<i>HLA-E*01:01/*01:01</i>	26 (24,53)	83 (32,55)	<i>ns</i>
<i>HLA-E*01:01/*01:03</i>	57 (53,77)	124 (48,63)	<i>ns</i>
<i>HLA-E*01:03/*01:03</i>	23 (21,70)	48 (18,82)	<i>ns</i>
<i>HLA-E*01:01/*01:01 + *01:01/*01:03</i>	83 (78,30)	207 (81,18)	<i>ns</i>
<i>HLA-E*01:03/*01:03 + *01:01/*01:03</i>	80 (75,47)	172 (67,45)	<i>ns</i>
Mulheres			
Mulheres	Mulheres com falha de implantação ($n = 53$) n (%)	Mulheres férteis ($n = 129$) n (%)	<i>p</i> -value/ <i>p</i> _c *
Alelos			
<i>HLA-E*01:01</i>	52 (49,06)	143 (55,43)	<i>ns</i>
<i>HLA-E*01:03</i>	54 (50,94)	115 (44,57)	
Genótipos			
<i>HLA-E*01:01/*01:01</i>	11 (20,76)	40 (31,00)	<i>ns</i>
<i>HLA-E*01:01/*01:03</i>	30 (56,60)	63 (48,84)	<i>ns</i>
<i>HLA-E*01:03/*01:03</i>	12 (22,64)	26 (20,16)	<i>ns</i>
<i>HLA-E*01:01/*01:01 + *01:01/*01:03</i>	41 (77,36)	103 (79,84)	<i>ns</i>
<i>HLA-E*01:03/*01:03 + *01:01/*01:03</i>	42 (79,24)	89 (68,99)	<i>ns</i>
Homens			
Homens	Homens com falha de implantação ($n = 53$) n (%)	Homens férteis ($n = 126$) n (%)	<i>p</i> -value/ <i>p</i> _c *
Alelos			
<i>HLA-E*01:01</i>	57 (53,77)	147 (58,33)	<i>ns</i>
<i>HLA-E*01:03</i>	49 (46,23)	105 (41,67)	
Genótipos			
<i>HLA-E*01:01/*01:01</i>	15 (28,30)	43 (34,13)	<i>ns</i>
<i>HLA-E*01:01/*01:03</i>	27 (50,94)	61 (48,41)	<i>ns</i>
<i>HLA-E*01:03/*01:03</i>	11 (20,75)	22 (17,46)	<i>ns</i>
<i>HLA-E*01:01/*01:01 + *01:01/*01:03</i>	42 (79,24)	104 (82,54)	<i>ns</i>
<i>HLA-E*01:03/*01:03 + *01:01/*01:03</i>	38 (71,69)	83 (65,87)	<i>ns</i>

**p*-value: Fisher's exact test; *p*_c: valor de *p* multiplicado pelo número de genótipos distintos encontrados (correção de Bonferroni); *ns*: não significativo.

5.3.8. Níveis de HLA-E solúvel em pacientes com falha de implantação embrionária e controles férteis não gestantes

Os níveis de HLA-E solúvel (sHLA-E) circulante nas mulheres pertencentes ao grupo com falha de implantação embrionária e nas mulheres pertencentes ao grupo controle fértil não gestante foram quantificados no soro, os quais foram considerados como HLA-E solúvel total (sHLA-E_{tot}), e nas suspensões de vesículas extracelulares derivadas do soro das mesmas mulheres, os quais foram considerados como HLA-E solúvel vesicular (sHLA-E_{EV}). Todas as amostras quantificadas com sucesso tanto para sHLA-E_{tot} quanto para sHLA-E_{EV} entraram na composição amostral para análises (IF = 32, FW = 42). Como mostra a Figura 9A e 9B, os níveis de sHLA-E (sHLA-E_{tot} e sHLA-E_{EV}) não mostraram diferenças significativas na comparações entre os grupos de estudo IF e FW.

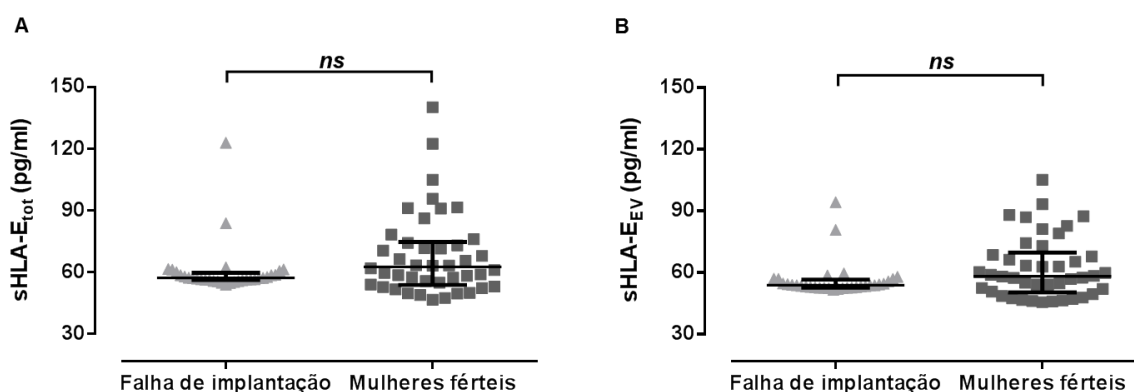


Figura 9. Níveis de sHLA-E em mulheres com falha de implantação e em mulheres férteis não gestantes. (A) Não foram encontradas diferenças significativas na concentração de sHLA-E_{tot} entre as mulheres dos grupos IF (n = 32) e FW (n = 42). (B) Não foram encontradas diferenças significativas na concentração de sHLA-E_{EV} entre as mulheres dos grupos IF (n = 32) e FW (n = 42). Os dados estão apresentados em mediana + amplitude inter-quartil; ns: não-significativo; Mann-Whitney test; IF: falha de implantação; FW: mulheres férteis não gestantes.

5.3.9. Associação de alelos do gene *HLA-E* com níveis de HLA-E solúvel

A análise da possível associação entre os dois diferentes alelos do gene *HLA-E* observados no presente estudo (*HLA-E*01:01* e *HLA-E*01:03*) e os níveis de HLA-E solúvel (sHLA-E_{tot} e sHLA-E_{EV}) não revelaram associações significativas (Tabela 11). Esses achados são sugestivos de que os diferentes alelos do gene *HLA-E* poderiam não ter influência direta nos níveis de expressão dessa proteína. As mulheres pertencentes aos grupos IF e FW, que foram quantificadas para sHLA-E (sHLA-E_{tot} e sHLA-E_{EV}) e previamente genotipadas para o gene *HLA-E* participaram dessa análise, totalizando 70 mulheres. Devido ao fato de não haver diferenças significativas entre os níveis de sHLA-E_{tot}

e sHLA-E_{EV} entre os dois grupos de estudo, a estratégia foi a de unir os dois grupos para essa análise. As mulheres foram categorizadas como portadoras ou não portadoras do alelo estudado.

Tabela 11. Associação dos alelos do gene *HLA-E* com os níveis de sHLA-E_{tot} e sHLA-E_{EV}.

Alelos <i>HLA-E</i>	Portadoras do alelo		Não portadoras do alelo		<i>p-value/p_c</i> *
	sHLA-E _{tot} ng/ml (mediana, variação)	n	sHLA-E _{tot} ng/ml (mediana, variação)	n	
<i>HLA-E*01:01</i>	58,6 (46,6 – 140,2)	52	58,1 (49,7 – 91,5)	18	<i>ns</i>
<i>HLA-E*01:03</i>	58,3 (46,6 – 122,3)	57	61,4 (51,8 – 140,2)	13	<i>ns</i>

Alelos <i>HLA-E</i>	Portadoras do alelo		Não portadoras do alelo		<i>p-value/p_c</i> *
	sHLA-E _{EV} ng/ml (mediana, variação)	n	sHLA-E _{EV} ng/ml (mediana, variação)	n	
<i>HLA-E*01:01</i>	54,9 (45,6 – 105,2)	52	54,5 (47,5 – 82,7)	18	<i>ns</i>
<i>HLA-E*01:03</i>	54,3 (45,6 – 93,2)	57	58,6 (47,2 – 105,2)	13	<i>ns</i>

**p-value*: Mann-Whitney test; *p_c*: valor de *p* multiplicado pelo número de alelos distintos (correção de Bonferroni); *ns*: não significativo.

5.3.10. Frequências alélicas e genotípicas do gene *MICA* em pacientes com falha de implantação embrionária e controles férteis não gestantes

Nesta população de estudo, 24 alelos e 93 genótipos distintos do gene *MICA* foram encontrados. A distribuição alélica se mostrou estar em equilíbrio gênico de Hardy-Weinberg. A análise estatística foi realizada somente no caso em que as frequências alélicas e/ou genotípicas foram $\geq 5\%$ em pelo menos um dos grupos analisados. Foram observadas diferenças significativas na distribuição alélica referente aos casais pertencentes ao grupo com falha de implantação embrionária ($n = 112$; mulheres: 58, homens: 54) e aos casais pertencentes ao grupo controle fértil não gestante ($n = 256$; mulheres: 127, homens: 129) (Tabela 12). A frequência do alelo *MICA*002:01* é significativamente elevada no grupo dos casais férteis não gestantes se comparada ao grupo dos casais com falha de implantação embrionária.

Tabela 12. Comparação das frequências alélicas do gene *MICA* entre casais IF e casais FW.

Alelos	Casais com falha de implantação (2n = 224)		Casais férteis (2n = 512)		<i>p-value/p_c</i> *	OR [IC 95%]*
	n	%	n	%		
<i>MICA*001:00</i>	05	2,23	07	1,37	-	-
<i>MICA*002:01</i>	27	12,05	97	18,95	0,024 /0,576	0,58 [0,37-0,92]
<i>MICA*004:00</i>	29	12,95	65	12,70	<i>ns</i>	-
<i>MICA*006:00</i>	0	0	01	0,20	-	-
<i>MICA*007:01</i>	07	3,12	17	3,32	-	-
<i>MICA*008:01/04</i>	64	28,57	116	22,66	<i>ns</i>	-
<i>MICA*008:01:02</i>	02	0,89	01	0,20	-	-
<i>MICA*008:02</i>	01	0,45	03	0,59	-	-
<i>MICA*009:01</i>	24	10,71	58	11,33	<i>ns</i>	-
<i>MICA*010:01</i>	13	5,80	32	6,25	<i>ns</i>	-
<i>MICA*011:00</i>	11	4,91	13	2,54	-	-

<i>MICA*012:01</i>	05	2,23	14	2,73	-	-
<i>MICA*015:00</i>	0	0	04	0,78	-	-
<i>MICA*016:00</i>	10	4,46	16	3,12	-	-
<i>MICA*017:00</i>	08	3,57	17	1,56	-	-
<i>MICA*018:01</i>	10	4,46	21	4,10	-	-
<i>MICA*019:00</i>	02	0,89	06	1,17	-	-
<i>MICA*020:00</i>	0	0	01	0,20	-	-
<i>MICA*027:00</i>	02	0,89	22	4,30	-	-
<i>MICA*041:00</i>	01	0,45	0	0	-	-
<i>MICA*045:00</i>	0	0	01	0,20	-	-
<i>MICA*049:00</i>	03	1,34	06	1,17	-	-
<i>MICA*052:00</i>	0	0	02	0,39	-	-
<i>MICA*057:00</i>	0	0	01	0,20	-	-

**p-value*: Fisher's exact test; *p_c*: valor de *p* multiplicado pelo número de alelos distintos encontrados (correção de Bonferroni); *OR: odds ratio; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; os resultados em negrito são estatisticamente significativos, *ns*: não significativo.

As comparações entre os grupos IF e FW de acordo com o gênero não revelou a presença de alelos associados a mulheres pertencentes ao grupo falha de implantação embrionária (*n* = 58) ou a mulheres pertencentes ao grupo controle fértil não gestante (*n* = 127) (Tabela 13).

Tabela 13. Comparação das frequências alélicas do gene *MICA* entre as mulheres pertencentes aos grupos falha de implantação e controle fértil não gestante.

Alelos	Mulheres com falha de implantação (2n = 116)		Mulheres férteis (2n = 254)		<i>p-value/p_c</i> *	OR [IC 95%]*
	n	%	n	%		
<i>MICA*001:00</i>	03	2,59	04	1,57	-	-
<i>MICA*002:01</i>	14	12,07	49	19,29	<i>ns</i>	-
<i>MICA*004:00</i>	15	12,93	38	14,96	<i>ns</i>	-
<i>MICA*006:00</i>	0	0	01	0,39	-	-
<i>MICA*007:01</i>	03	2,59	09	3,54	-	-
<i>MICA*008:01/04</i>	37	31,90	58	22,83	<i>ns</i>	-
<i>MICA*008:01:02</i>	02	1,72	0	0	-	-
<i>MICA*008:02</i>	0	0	01	0,39	-	-
<i>MICA*009:01</i>	09	7,76	21	8,27	<i>ns</i>	-
<i>MICA*010:01</i>	04	3,45	17	6,69	<i>ns</i>	-
<i>MICA*011:00</i>	08	6,90	07	2,76	<i>ns</i>	-
<i>MICA*012:01</i>	03	2,59	06	2,36	-	-
<i>MICA*015:00</i>	0	0	02	0,79	-	-
<i>MICA*016:00</i>	06	5,17	08	3,15	<i>ns</i>	-
<i>MICA*017:00</i>	01	0,86	05	1,97	-	-
<i>MICA*018:01</i>	06	5,17	10	3,94	<i>ns</i>	-
<i>MICA*019:00</i>	01	0,86	05	1,97	-	-
<i>MICA*020:00</i>	0	0	01	0,39	-	-
<i>MICA*027:00</i>	02	1,72	05	1,97	-	-
<i>MICA*041:00</i>	0	0	0	0	-	-
<i>MICA*045:00</i>	0	0	0	0	-	-
<i>MICA*049:00</i>	02	1,72	04	1,57	-	-
<i>MICA*052:00</i>	0	0	02	0,79	-	-
<i>MICA*057:00</i>	0	0	01	0,39	-	-

**p-value*: Fisher's exact test; *p_c*: valor de *p* multiplicado pelo número de alelos distintos encontrados (correção de Bonferroni); *OR: odds ratio; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; os resultados em negrito são estatisticamente significativos, *ns*: não significativo.

No que se refere às comparações entre os homens dos dois grupos (IF = 54 e FW = 129), o alelo *MICA*017:00* foi observado ser mais frequente nos homens pertencentes ao grupo com falha de implantação embrionária se comparado aos homens do grupo controle fértil não gestante, sugerindo um possível fator de suscetibilidade à condição de falha de

implantação para os casais desse grupo. No entanto, o alelo *MICA**027:00 foi mais frequentemente observado nos homens pertencentes ao grupo controle fértil não gestante, sugerindo um possível fator protetivo para esse grupo (Tabela 14). Devido ao número elevado de variantes alélicas encontradas na população em estudo, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi mantida após a correção de Bonferroni ter sido aplicada.

Tabela 14. Comparação das frequências alélicas do gene *MICA* entre os homens pertencentes aos grupos falha de implantação e controle fértil não gestante.

Alelos	Homens com falha de implantação (2n = 108)		Homens férteis (2n = 258)		p-value/p _c *	OR [IC 95%]*
	N	%	n	%		
<i>MICA</i> *001:00	02	1,85	03	1,16	-	-
<i>MICA</i> *002:01	13	12,04	48	18,60	ns	-
<i>MICA</i> *004:00	14	12,96	27	10,47	ns	-
<i>MICA</i> *006:00	0	0	0	0	-	-
<i>MICA</i> *007:01	04	3,70	08	3,10	-	-
<i>MICA</i> *008:01/04	27	25,00	58	22,48	ns	-
<i>MICA</i> *008:01:02	0	0	01	0,39	-	-
<i>MICA</i> *008:02	01	0,93	02	0,78	-	-
<i>MICA</i> *009:01	15	13,89	37	14,34	ns	-
<i>MICA</i> *010:01	09	8,33	15	5,81	ns	-
<i>MICA</i> *011:00	03	2,78	06	2,33	-	-
<i>MICA</i> *012:01	02	1,85	08	3,10	-	-
<i>MICA</i> *015:00	0	0	02	0,78	-	-
<i>MICA</i> *016:00	04	3,70	08	3,10	-	-
<i>MICA</i> *017:00	07	6,48	03	1,16	0,008/0,176	5,8 [1,5-23,2]
<i>MICA</i> *018:01	04	3,70	11	4,26	-	-
<i>MICA</i> *019:00	01	0,93	01	0,39	-	-
<i>MICA</i> *020:00	0	0	0	0	-	-
<i>MICA</i> *027:00	0	0	17	6,59	0,004/0,08	0,06 [0,003-1,0]
<i>MICA</i> *041:00	01	0,93	0	0	-	-
<i>MICA</i> *045:00	0	0	01	0,39	-	-
<i>MICA</i> *049:00	01	0,93	02	0,78	-	-
<i>MICA</i> *052:00	0	0	0	0	-	-
<i>MICA</i> *057:00	0	0	0	0	-	-

*p-value: Fisher's exact test; p_c: valor de p multiplicado pelo número de alelos distintos encontrados (correção de Bonferroni);

*OR: odds ratio; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; os resultados em negrito são estatisticamente significativos, ns: não significativo.

As análises estatísticas referentes aos 93 genótipos distintos encontrados do gene *MICA* não mostraram diferenças significativas em relação às comparações entre os casais pertencentes ao grupo controle fértil não gestante e os casais pertencentes ao grupo com falha de implantação embrionária (Tabela 15).

Tabela 15. Comparação das frequências genotípicas do gene *MICA* entre casais IF e casais FW.

Genótipos	Casais com falha de implantação (n = 112)		Casais férteis (n = 256)		p-value/p _c *	OR [IC 95%]*
	n	%	n	%		
<i>MICA</i> *001:00/*002:01	01	0,89	02	0,78	-	-
<i>MICA</i> *002:01/*002:01	04	3,57	06	2,34	-	-
<i>MICA</i> *001:00/*004:00	0	0	01	0,39	-	-
<i>MICA</i> *002:01/*004:00	02	1,79	16	6,25	ns	-
<i>MICA</i> *004:00/*004:00	04	3,57	05	1,95	-	-
<i>MICA</i> *002:01/*007:01	0	0	03	1,17	-	-
<i>MICA</i> *004:00/*007:01	0	0	01	0,39	-	-
<i>MICA</i> *001:00/*008:01/04	02	1,79	01	0,39	-	-

MICA*002:01/*008:01/04	10	8,93	24	9,38	ns	-
MICA*004:00/*008:01/04	08	7,14	13	5,08	ns	-
MICA*006:00/*008:01/04	0	0	01	0,39	-	-
MICA*007:01/*008:01/04	05	4,46	07	2,73	-	-
MICA*008:01/04/*008:01/04	06	5,36	16	6,25	ns	-
MICA*002:01/*008:01:02	0	0	01	0,39	-	-
MICA*007:01/*008:01:02	01	0,89	0	0	-	-
MICA*009:01/*008:02	0	0	02	0,78	-	-
MICA*018:01/*008:02	01	0,89	01	0,39	-	-
MICA*001:00/*009:01	01	0,89	0	0	-	-
MICA*002:01/*009:01	01	0,89	09	3,52	0,025/2,325	0,13 [0,02-1,0]
MICA*004:00/*009:01	02	1,79	08	3,13	-	-
MICA*007:01/*009:01	01	0,89	02	0,78	-	-
MICA*008:01/04/*009:01	06	5,36	13	5,08	ns	-
MICA*009:01/*009:01	01	0,89	06	2,34	-	-
MICA*001:00/*010:01	0	0	01	0,39	-	-
MICA*002:01/*010:01	0	0	09	3,52	-	-
MICA*004:00/*010:01	01	0,89	03	1,17	-	-
MICA*008:01/04/*010:01	05	4,46	04	1,56	-	-
MICA*009:01/*010:01	01	0,89	02	0,78	-	-
MICA*010:01/*010:01	01	0,89	01	0,39	-	-
MICA*002:01/*011:00	01	0,89	0	0	-	-
MICA*004:00/*011:00	02	1,79	02	0,78	-	-
MICA*008:01/04/*011:00	02	1,79	01	0,39	-	-
MICA*009:01/*011:00	02	1,79	0	0	-	-
MICA*010:01/*011:00	0	0	01	0,39	-	-
MICA*011:00/*011:00	01	0,89	01	0,39	-	-
MICA*002:01/*012:01	0	0	06	2,34	-	-
MICA*004:00/*012:01	01	0,89	0	0	-	-
MICA*007:01/*012:01	0	0	01	0,39	-	-
MICA*008:01/04/*012:01	03	2,68	02	0,78	-	-
MICA*009:01/*012:01	01	0,89	01	0,39	-	-
MICA*010:01/*012:01	0	0	02	0,78	-	-
MICA*011:00/*012:01	0	0	01	0,39	-	-
MICA*001:00/*015:00	0	0	01	0,39	-	-
MICA*008:01/04/*015:00	0	0	01	0,39	-	-
MICA*010:01/*015:00	0	0	01	0,39	-	-
MICA*002:01/*016:00	02	1,79	06	2,34	-	-
MICA*007:01/*016:00	0	0	01	0,39	-	-
MICA*008:01/04/*016:00	04	3,57	02	0,78	-	-
MICA*009:01/*016:00	01	0,89	01	0,39	-	-
MICA*010:01/*016:00	01	0,89	0	0	-	-
MICA*011:00/*016:00	01	0,89	04	1,56	-	-
MICA*001:00/*017:00	01	0,89	0	0	-	-
MICA*002:01/*017:00	0	0	03	1,17	-	-
MICA*004:00/*017:00	01	0,89	0	0	-	-
MICA*007:01/*017:00	0	0	01	0,39	-	-
MICA*008:01/04/*017:00	01	0,89	02	0,78	-	-
MICA*009:01/*017:00	02	1,79	0	0	-	-
MICA*010:01/*017:00	03	2,68	0	0	-	-
MICA*011:00/*017:00	0	0	01	0,39	-	-
MICA*001:00/*018:01	0	0	01	0,39	-	-
MICA*002:01/*018:01	0	0	02	0,78	-	-
MICA*004:00/*018:01	01	0,89	04	1,56	-	-
MICA*008:01/04/*018:01	05	4,46	02	0,78	-	-
MICA*009:01/*018:01	02	1,79	04	1,56	-	-
MICA*010:01/*018:01	0	0	02	0,78	-	-
MICA*012:01/*018:01	0	0	01	0,39	-	-
MICA*015:00/*018:01	0	0	01	0,39	-	-
MICA*016:00/*018:01	01	0,89	0	0	-	-
MICA*017:00/*018:01	0	0	01	0,39	-	-
MICA*002:01/*019:00	0	0	01	0,39	-	-
MICA*004:00/*019:00	0	0	02	0,78	-	-
MICA*008:01/04/*019:00	0	0	01	0,39	-	-
MICA*009:01/*019:00	01	0,89	0	0	-	-
MICA*010:01/*019:00	0	0	01	0,39	-	-
MICA*011:00/*019:00	01	0,89	0	0	-	-
MICA*002:01/*020:00	0	0	01	0,39	-	-

<i>MICA*002:01/*027:00</i>	01	0,89	02	0,78	-	-
<i>MICA*004:00/*027:00</i>	01	0,89	02	0,78	-	-
<i>MICA*007:01/*027:00</i>	0	0	01	0,39	-	-
<i>MICA*008:01/04/*027:00</i>	0	0	05	1,95	-	-
<i>MICA*009:01/*027:00</i>	0	0	03	1,17	-	-
<i>MICA*010:01/*027:00</i>	0	0	04	1,56	-	-
<i>MICA*011:00/*027:00</i>	0	0	01	0,39	-	-
<i>MICA*016:00/*027:00</i>	0	0	02	0,78	-	-
<i>MICA*018:01/*027:00</i>	0	0	02	0,78	-	-
<i>MICA*004:00/*041:00</i>	01	0,89	0	0	-	-
<i>MICA*004:00/*045:00</i>	0	0	01	0,39	-	-
<i>MICA*004:00/*049:00</i>	01	0,89	01	0,39	-	-
<i>MICA*008:01/04/*049:00</i>	01	0,89	03	1,17	-	-
<i>MICA*009:01/*049:00</i>	01	0,89	01	0,39	-	-
<i>MICA*019:00/*049:00</i>	0	0	01	0,39	-	-
<i>MICA*008:01/04/*052:00</i>	0	0	02	0,78	-	-
<i>MICA*004:00/*057:00</i>	0	0	01	0,39	-	-

**p-value*: Fisher's exact test; *p_c*: valor de *p* multiplicado pelo número de alelos distintos encontrados (correção de Bonferroni);

*OR: odds ratio; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; os resultados em negrito são estatisticamente significativos, *ns*: não significativo.

Nas comparações por gênero, o genótipo *MICA*008:01/04/*016:00* foi significativamente mais frequente nas mulheres pertencentes ao grupo com falha de implantação embrionária se comparadas as mulheres pertencentes ao grupo controle fértil não gestante (Tabela 16). No entanto, não foram encontradas diferenças significativas entre os genótipos distintos do gene *MICA* pertencentes aos homens dos dois grupos de estudo (IF e FW) (Tabela 17). Devido ao número elevado de variantes genótípicas encontradas na população em estudo, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi mantida após a correção de Bonferroni ter sido aplicada.

Tabela 16. Comparação das frequências genótípicas do gene *MICA* entre as mulheres pertencentes aos grupos falha de implantação e controle fértil não gestante.

Genótipos	Mulheres com falha de implantação (n = 58)		Mulheres férteis (n = 127)		<i>p-value/p_c</i> *	OR [IC 95%]*
	n	%	n	%		
<i>MICA*001:00/*002:01</i>	01	1,72	02	1,57	-	-
<i>MICA*002:01/*002:01</i>	01	1,72	02	1,57	-	-
<i>MICA*001:00/*004:00</i>	0	0	0	0	-	-
<i>MICA*002:01/*004:00</i>	0	0	08	6,30	<i>ns</i>	-
<i>MICA*004:00/*004:00</i>	03	5,17	05	3,94	<i>ns</i>	-
<i>MICA*002:01/*007:01</i>	0	0	01	0,79	-	-
<i>MICA*004:00/*007:01</i>	0	0	01	0,79	-	-
<i>MICA*001:00/*008:01/04</i>	02	3,45	01	0,79	-	-
<i>MICA*002:01/*008:01/04</i>	06	10,34	14	11,02	<i>ns</i>	-
<i>MICA*004:00/*008:01/04</i>	05	8,62	07	5,51	<i>ns</i>	-
<i>MICA*006:00/*008:01/04</i>	0	0	01	0,79	-	-
<i>MICA*007:01/*008:01/04</i>	01	1,72	03	2,36	-	-
<i>MICA*008:01/04/*008:01/04</i>	03	5,17	07	5,51	<i>ns</i>	-
<i>MICA*002:01/*008:01:02</i>	01	1,72	0	0	-	-
<i>MICA*007:01/*008:01:02</i>	01	1,72	0	0	-	-
<i>MICA*009:01/*008:02</i>	0	0	0	0	-	-
<i>MICA*018:01/*008:02</i>	0	0	01	0,79	-	-
<i>MICA*001:00/*009:01</i>	0	0	0	0	-	-
<i>MICA*002:01/*009:01</i>	01	1,72	02	1,57	-	-
<i>MICA*004:00/*009:01</i>	0	0	04	3,15	-	-
<i>MICA*007:01/*009:01</i>	01	1,72	01	0,79	-	-
<i>MICA*008:01/04/*009:01</i>	02	3,45	04	3,15	-	-

MICA*009:01/*009:01	0	0	02	1,57	-	-
MICA*001:00/*010:01	0	0	01	0,79	-	-
MICA*002:01/*010:01	0	0	06	4,72	-	-
MICA*004:00/*010:01	01	1,72	02	1,57	-	-
MICA*008:01/04/*010:01	03	5,17	03	2,36	ns	-
MICA*009:01/*010:01	0	0	0	0	-	-
MICA*010:01/*010:01	0	0	0	0	-	-
MICA*002:01/*011:00	01	1,72	0	0	-	-
MICA*004:00/*011:00	01	1,72	02	1,57	-	-
MICA*008:01/04/*011:00	02	3,45	01	0,79	-	-
MICA*009:01/*011:00	02	3,45	0	0	-	-
MICA*010:01/*011:00	0	0	0	0	-	-
MICA*011:00/*011:00	0	0	01	0,79	-	-
MICA*002:01/*012:01	0	0	02	1,57	-	-
MICA*004:00/*012:01	0	0	0	0	-	-
MICA*007:01/*012:01	0	0	01	0,79	-	-
MICA*008:01/04/*012:01	02	3,45	01	0,79	-	-
MICA*009:01/*012:01	01	1,72	0	0	-	-
MICA*010:01/*012:01	0	0	02	1,57	-	-
MICA*011:00/*012:01	0	0	0	0	-	-
MICA*001:00/*015:00	0	0	0	0	-	-
MICA*008:01/04/*015:00	0	0	01	0,79	-	-
MICA*010:01/*015:00	0	0	01	0,79	-	-
MICA*002:01/*016:00	01	1,72	03	2,36	-	-
MICA*007:01/*016:00	0	0	0	0	-	-
MICA*008:01/04/*016:00	03	5,17	0	0	0,029/1,914	16,1 [0,8-316,8]
MICA*009:01/*016:00	0	0	01	0,79	-	-
MICA*010:01/*016:00	0	0	0	0	-	-
MICA*011:00/*016:00	01	1,72	02	1,57	-	-
MICA*001:00/*017:00	0	0	0	0	-	-
MICA*002:01/*017:00	0	0	03	2,36	-	-
MICA*004:00/*017:00	0	0	0	0	-	-
MICA*007:01/*017:00	0	0	01	0,79	-	-
MICA*008:01/04/*017:00	01	1,72	01	0,79	-	-
MICA*009:01/*017:00	0	0	0	0	-	-
MICA*010:01/*017:00	0	0	0	0	-	-
MICA*011:00/*017:00	0	0	0	0	-	-
MICA*001:00/*018:01	0	0	0	0	-	-
MICA*002:01/*018:01	0	0	02	1,57	-	-
MICA*004:00/*018:01	01	1,72	02	1,57	-	-
MICA*008:01/04/*018:01	03	5,17	01	0,79	ns	-
MICA*009:01/*018:01	01	1,72	03	2,36	-	-
MICA*010:01/*018:01	0	0	01	0,79	-	-
MICA*012:01/*018:01	0	0	0	0	-	-
MICA*015:00/*018:01	0	0	0	0	-	-
MICA*016:00/*018:01	01	1,72	0	0	-	-
MICA*017:00/*018:01	0	0	0	0	-	-
MICA*002:01/*019:00	0	0	01	0,79	-	-
MICA*004:00/*019:00	0	0	01	0,79	-	-
MICA*008:01/04/*019:00	0	0	01	0,79	-	-
MICA*009:01/*019:00	0	0	0	0	-	-
MICA*010:01/*019:00	0	0	01	0,79	-	-
MICA*011:00/*019:00	01	1,72	0	0	-	-
MICA*002:01/*020:00	0	0	01	0,79	-	-
MICA*002:01/*027:00	01	1,72	0	0	-	-
MICA*004:00/*027:00	01	1,72	0	0	-	-
MICA*007:01/*027:00	0	0	01	0,79	-	-
MICA*008:01/04/*027:00	0	0	01	0,79	-	-
MICA*009:01/*027:00	0	0	01	0,79	-	-
MICA*010:01/*027:00	0	0	0	0	-	-
MICA*011:00/*027:00	0	0	0	0	-	-
MICA*016:00/*027:00	0	0	02	1,57	-	-
MICA*018:01/*027:00	0	0	0	0	-	-
MICA*004:00/*041:00	0	0	0	0	-	-
MICA*004:00/*045:00	0	0	0	0	-	-
MICA*004:00/*049:00	0	0	0	0	-	-
MICA*008:01/04/*049:00	01	1,72	02	1,57	-	-
MICA*009:01/*049:00	01	1,72	01	0,79	-	-

<i>MICA</i> *019:00/*049:00	0	0	01	0,79	-	-
<i>MICA</i> *008:01/04/*052:00	0	0	02	1,57	-	-
<i>MICA</i> *004:00/*057:00	0	0	01	0,79	-	-

**p*-value: Fisher's exact test; *p_c*: valor de *p* multiplicado pelo número de alelos distintos encontrados (correção de Bonferroni); *OR: odds ratio; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; os resultados em negrito são estatisticamente significativos, *ns*: não significativo.

Tabela 17. Comparação das frequências genotípicas do gene *MICA* entre os homens pertencentes aos grupos falha de implantação e controle fértil não gestante.

Genótipos	Homens com falha de implantação (n = 54)		Homens férteis (n = 129)		<i>p</i> -value/ <i>p_c</i> *	OR [IC 95%]*
	n	%	n	%		
<i>MICA</i> *001:00/*002:01	0	0	0	0	-	-
<i>MICA</i> *002:01/*002:01	03	5,56	04	3,10	<i>ns</i>	-
<i>MICA</i> *001:00/*004:00	0	0	01	0,78	-	-
<i>MICA</i> *002:01/*004:00	02	3,70	08	6,20	<i>ns</i>	-
<i>MICA</i> *004:00/*004:00	01	1,85	0	0	-	-
<i>MICA</i> *002:01/*007:01	0	0	02	1,55	-	-
<i>MICA</i> *004:00/*007:01	0	0	0	0	-	-
<i>MICA</i> *001:00/*008:01/04	0	0	0	0	-	-
<i>MICA</i> *002:01/*008:01/04	04	7,41	10	7,75	<i>ns</i>	-
<i>MICA</i> *004:00/*008:01/04	03	5,56	06	4,65	<i>ns</i>	-
<i>MICA</i> *006:00/*008:01/04	0	0	0	0	-	-
<i>MICA</i> *007:01/*008:01/04	04	7,41	04	3,10	<i>ns</i>	-
<i>MICA</i> *008:01/04/*008:01/04	03	5,56	09	6,98	<i>ns</i>	-
<i>MICA</i> *002:01/*008:01:02	0	0	01	0,78	-	-
<i>MICA</i> *007:01/*008:01:02	0	0	0	0	-	-
<i>MICA</i> *009:01/*008:02	0	0	02	1,55	-	-
<i>MICA</i> *018:01/*008:02	01	1,85	0	0	-	-
<i>MICA</i> *001:00/*009:01	01	1,85	0	0	-	-
<i>MICA</i> *002:01/*009:01	0	0	07	5,43	<i>ns</i>	-
<i>MICA</i> *004:00/*009:01	02	3,70	04	3,10	-	-
<i>MICA</i> *007:01/*009:01	0	0	01	0,78	-	-
<i>MICA</i> *008:01/04/*009:01	04	7,41	09	6,98	<i>ns</i>	-
<i>MICA</i> *009:01/*009:01	01	1,85	04	3,10	-	-
<i>MICA</i> *001:00/*010:01	0	0	0	0	-	-
<i>MICA</i> *002:01/*010:01	0	0	03	2,33	-	-
<i>MICA</i> *004:00/*010:01	0	0	01	0,78	-	-
<i>MICA</i> *008:01/04/*010:01	02	3,70	01	0,78	-	-
<i>MICA</i> *009:01/*010:01	01	1,85	02	1,55	-	-
<i>MICA</i> *010:01/*010:01	01	1,85	01	0,78	-	-
<i>MICA</i> *002:01/*011:00	0	0	0	0	-	-
<i>MICA</i> *004:00/*011:00	01	1,85	0	0	-	-
<i>MICA</i> *008:01/04/*011:00	0	0	0	0	-	-
<i>MICA</i> *009:01/*011:00	0	0	0	0	-	-
<i>MICA</i> *010:01/*011:00	0	0	01	0,78	-	-
<i>MICA</i> *011:00/*011:00	01	1,85	0	0	-	-
<i>MICA</i> *002:01/*012:01	0	0	04	3,10	-	-
<i>MICA</i> *004:00/*012:01	01	1,85	0	0	-	-
<i>MICA</i> *007:01/*012:01	0	0	0	0	-	-
<i>MICA</i> *008:01/04/*012:01	01	1,85	01	0,78	-	-
<i>MICA</i> *009:01/*012:01	0	0	01	0,78	-	-
<i>MICA</i> *010:01/*012:01	0	0	0	0	-	-
<i>MICA</i> *011:00/*012:01	0	0	01	0,78	-	-
<i>MICA</i> *001:00/*015:00	0	0	01	0,78	-	-
<i>MICA</i> *008:01/04/*015:00	0	0	0	0	-	-
<i>MICA</i> *010:01/*015:00	0	0	0	0	-	-
<i>MICA</i> *002:01/*016:00	01	1,85	03	2,33	-	-
<i>MICA</i> *007:01/*016:00	0	0	01	0,78	-	-
<i>MICA</i> *008:01/04/*016:00	01	1,85	02	1,55	-	-
<i>MICA</i> *009:01/*016:00	01	1,85	0	0	-	-
<i>MICA</i> *010:01/*016:00	01	1,85	0	0	-	-
<i>MICA</i> *011:00/*016:00	0	0	02	1,55	-	-
<i>MICA</i> *001:00/*017:00	01	1,85	0	0	-	-
<i>MICA</i> *002:01/*017:00	0	0	0	0	-	-
<i>MICA</i> *004:00/*017:00	01	1,85	0	0	-	-

MICA*007:01/*017:00	0	0	0	0	-	-
MICA*008:01/04/*017:00	0	0	01	0,78	-	-
MICA*009:01/*017:00	02	3,70	0	0	-	-
MICA*010:01/*017:00	03	5,56	0	0	-	-
MICA*011:00/*017:00	0	0	01	0,78	-	-
MICA*001:00/*018:01	0	0	01	0,78	-	-
MICA*002:01/*018:01	0	0	0	0	-	-
MICA*004:00/*018:01	0	0	02	1,55	-	-
MICA*008:01/04/*018:01	02	3,70	01	0,78	-	-
MICA*009:01/*018:01	01	1,85	01	0,78	-	-
MICA*010:01/*018:01	0	0	01	0,78	-	-
MICA*012:01/*018:01	0	0	01	0,78	-	-
MICA*015:00/*018:01	0	0	01	0,78	-	-
MICA*016:00/*018:01	0	0	0	0	-	-
MICA*017:00/*018:01	0	0	01	0,78	-	-
MICA*002:01/*019:00	0	0	0	0	-	-
MICA*004:00/*019:00	0	0	01	0,78	-	-
MICA*008:01/04/*019:00	0	0	0	0	-	-
MICA*009:01/*019:00	01	1,85	0	0	-	-
MICA*010:01/*019:00	0	0	0	0	-	-
MICA*011:00/*019:00	0	0	0	0	-	-
MICA*002:01/*020:00	0	0	0	0	-	-
MICA*002:01/*027:00	0	0	02	1,55	-	-
MICA*004:00/*027:00	0	0	02	1,55	-	-
MICA*007:01/*027:00	0	0	0	0	-	-
MICA*008:01/04/*027:00	0	0	04	3,10	-	-
MICA*009:01/*027:00	0	0	02	1,55	-	-
MICA*010:01/*027:00	0	0	04	3,10	-	-
MICA*011:00/*027:00	0	0	01	0,78	-	-
MICA*016:00/*027:00	0	0	0	0	-	-
MICA*018:01/*027:00	0	0	02	1,55	-	-
MICA*004:00/*041:00	01	1,85	0	0	-	-
MICA*004:00/*045:00	0	0	01	0,78	-	-
MICA*004:00/*049:00	01	1,85	01	0,78	-	-
MICA*008:01/04/*049:00	0	0	01	0,78	-	-
MICA*009:01/*049:00	0	0	0	0	-	-
MICA*019:00/*049:00	0	0	0	0	-	-
MICA*008:01/04/*052:00	0	0	0	0	-	-
MICA*004:00/*057:00	0	0	0	0	-	-

**p-value*: Fisher's exact test; *p_c*: valor de *p* multiplicado pelo número de alelos distintos encontrados (correção de Bonferroni); *OR: odds ratio; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; os resultados em negrito são estatisticamente significativos, *ns*: não significativo.

5.3.11. Níveis de MICA solúvel em pacientes com falha de implantação embrionária e controles férteis não gestantes

Os níveis de MICA solúvel (sMICA) circulante nas mulheres pertencentes ao grupo com falha de implantação embrionária ($n = 45$) e nas mulheres pertencentes ao grupo controle fértil não gestante ($n = 110$) foram quantificados no soro, os quais foram considerados como níveis de MICA solúvel total (sMICA_{tot}), e nas suspensões de vesículas extracelulares derivadas do soro das mesmas mulheres, os quais foram considerados como níveis de MICA solúvel vesicular (sMICA_{EV}). Nesta análise, os níveis de sMICA_{tot} (mediana + variação, ng/ml) demonstram ser significativamente mais altos em mulheres pertencentes ao grupo controle fértil não gestante [0,6 (0,0 – 2,2); $p = 0,02$] se comparados aos níveis de sMICA_{tot} em mulheres com falha de implantação [0,3 (0,0 – 2,2); Figura 10A]. Os níveis de sMICA_{EV} também mostraram níveis significativamente mais elevados em mulheres férteis

não gestantes [0,03 (0,0 – 0,2); $p < 0,0001$] se comparados aos níveis de sMICA_{EV} em mulheres com falha de implantação embrionária [0,0 (0,0 – 0,1); Figura 10B].

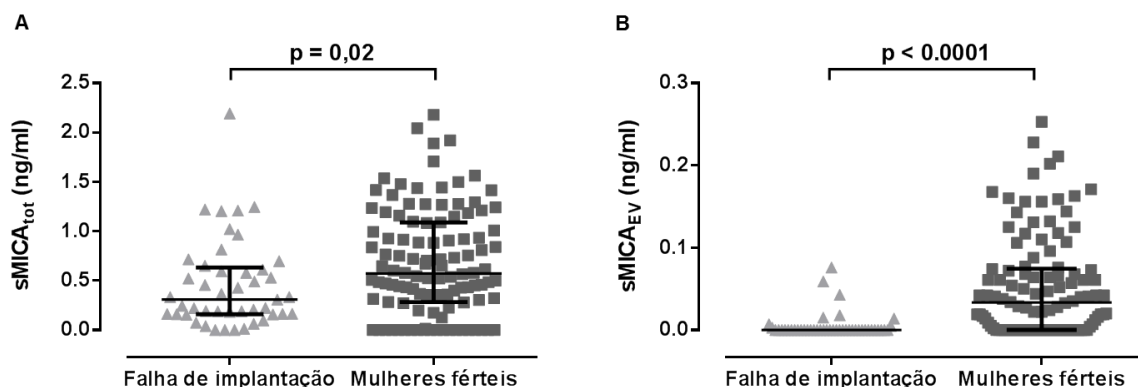


Figura 10. Níveis de sMICA em mulheres com falha de implantação embrionária e em mulheres férteis não gestantes. (A) Níveis de sMICA_{tot} elevados no grupo FW (n = 110) se comparados ao grupo IF (n = 45). (B) Níveis de sMICA_{EV} elevados no grupo FW (n = 110) se comparados ao grupo IF (n = 45). Os dados estão apresentados em mediana + amplitude inter-quartil; Mann-Whitney test; IF: falha de implantação; FW: mulheres férteis não gestantes.

5.3.12. Associação de alelos do gene *MICA* com níveis de MICA solúvel

Alguns alelos do gene *MICA* mostraram estar particularmente relacionados tanto aos níveis totais de sMICA quanto aos níveis vesiculares de sMICA. Todas as amostras de soro e suspensões de vesículas extracelulares derivadas de mulheres pertencentes aos grupos IF (n = 45) e FW (n = 110), que foram quantificadas para sMICA (sMICA_{tot} e sMICA_{EV}) e que possuem genótipo para o gene *MICA* simultaneamente participaram dessa análise. As mulheres foram categorizadas como portadoras ou não portadoras do alelo estudado. Somente foram testados para associação com os níveis de sMICA_{tot} e com os níveis de sMICA_{EV} os alelos do gene *MICA* que apresentaram um número de portadoras suficientes ($n \geq 5$). Os resultados obtidos demonstraram que nas análises referentes ao grupo de mulheres com falha de implantação, os alelos *MICA**004:00 e *MICA**008:01/04 estão associados à níveis elevados de sMICA_{tot} e o alelo *MICA**002:01 está associado à níveis reduzidos de sMICA_{tot}. No entanto, nenhum alelo mostrou relação com os níveis de sMICA_{EV} neste grupo. Nas análises referentes ao grupo de mulheres férteis não gestantes os alelos *MICA**004:00, *MICA**009:01 e *MICA**008:01/04 mostraram associação com níveis aumentando de sMICA_{tot}, enquanto os alelos *MICA**002:01 e *MICA**010:01 mostraram associação com níveis reduzidos de sMICA_{tot}. Na análise referente a associação entre os alelos do gene *MICA* com os níveis de sMICA_{EV} e mulheres férteis não gestantes, o alelo *MICA**008:01/04 mostrou associação com níveis aumentados de sMICA_{EV}, enquanto os alelos *MICA**002:01 e *MICA**010:01 mostraram associação com níveis reduzidos de

sMICA_{EV} (Tabela 18). Interessante notar que os alelos *MICA*008:01/04*, *MICA*004:00* e *MICA*002:01* estão associados com níveis de expressão das moléculas sMICA_{tot} independente da condição dos grupos de estudo. Devido ao número elevado de variantes alélicas analisadas, somente algumas associações estatisticamente significativas se mantiveram após a correção de Bonferroni ter sido aplicada.

Tabela 18. Associação dos alelos do gene *MICA* com os níveis de sMICA_{tot} e sMICA_{EV} em mulheres pertencentes aos grupos falha de implantação e controle fértil não gestante.

Mulheres com Falha de Implantação embrionária					
Alelos <i>MICA</i>	Portadoras do alelo		Não portadoras do alelo		<i>p</i> -value/ <i>p</i> _c *
	sMICA _{tot} ng/ml (mediana, variação)	n	sMICA _{tot} ng/ml (mediana, variação)	n	
<i>MICA*002:01</i>	0,15 (0,0 – 2,2)	09	0,4 (0,04 – 1,2)	36	0,01/0,07
<i>MICA*004:00</i>	0,55 (0,2 – 1,2)	10	0,2 (0,0 – 2,2)	35	0,03/0,21
<i>MICA*008:01/04</i>	0,5 (0,1 – 1,2)	23	0,2 (0,0 – 2,2)	22	0,01/0,07
<i>MICA*009:01</i>	0,2 (0,1 – 1,0)	07	0,3 (0,0 – 2,2)	38	ns
<i>MICA*011:00</i>	0,2 (0,01 – 0,3)	07	0,4 (0,0 – 2,2)	38	ns
<i>MICA*016:00</i>	0,3 (0,0 – 1,2)	06	0,3 (0,0 – 2,2)	39	ns
<i>MICA*018:01</i>	0,2 (0,04 – 0,2)	05	0,3 (0,0 – 2,2)	40	ns
Mulheres com Falha de Implantação embrionária					
Alelos <i>MICA</i>	Portadoras do alelo		Não portadoras do alelo		<i>p</i> -value/ <i>p</i> _c *
	sMICA _{EV} ng/ml (mediana, variação)	n	sMICA _{EV} ng/ml (mediana, variação)	n	
<i>MICA*002:01</i>	0,0 (0,0 – 0,01)	09	0,0 (0,0 – 0,1)	36	ns
<i>MICA*004:00</i>	0,0 (0,0 – 0,01)	10	0,0 (0,0 – 0,1)	35	ns
<i>MICA*008:01/04</i>	0,0 (0,0 – 0,1)	23	0,0 (0,0 – 0,05)	22	ns
<i>MICA*009:01</i>	0,0 (0,0 – 0,04)	07	0,0 (0,0 – 0,1)	38	ns
<i>MICA*011:00</i>	0,0 (0,0 – 0,05)	07	0,0 (0,0 – 0,1)	38	ns
<i>MICA*016:00</i>	0,0 (0,0 – 0,1)	06	0,0 (0,0 – 0,1)	39	ns
<i>MICA*018:01</i>	0,0 (0,0 – 0,1)	05	0,0 (0,0 – 0,1)	40	ns
Mulheres Férteis					
Alelos <i>MICA</i>	Portadoras do alelo		Não portadoras do alelo		<i>p</i> -value/ <i>p</i> _c *
	sMICA _{tot} ng/ml (mediana, variação)	n	sMICA _{tot} ng/ml (mediana, variação)	n	
<i>MICA*002:01</i>	0,3 (0,0 – 1,0)	42	0,9 (0,0 – 2,2)	68	<0,0001/0,0009
<i>MICA*004:00</i>	0,9 (0,1 – 1,9)	30	0,4 (0,0 – 2,2)	80	0,0007/0,006
<i>MICA*007:01</i>	0,4 (0,0 – 0,7)	07	0,6 (0,0 – 2,2)	103	ns
<i>MICA*008:01/04</i>	0,8 (0,2 – 2,2)	45	0,5 (0,0 – 1,9)	65	0,00020/0,001
<i>MICA*009:01</i>	1,0 (0,4 – 2,2)	16	0,5 (0,0 – 2,0)	94	0,002/0,01
<i>MICA*010:01</i>	0,0 (0,0 – 0,8)	15	0,6 (0,0 – 2,2)	95	<0,0001/0,0009
<i>MICA*016:00</i>	0,6 (0,3 – 1,2)	06	0,6 (0,0 – 2,2)	104	ns
<i>MICA*018:01</i>	0,5 (0,0 – 0,7)	09	0,6 (0,0 – 2,2)	101	ns
<i>MICA*019:00</i>	1,4 (0,3 – 1,9)	05	0,5 (0,0 – 2,2)	105	ns
Mulheres Férteis					
Alelos <i>MICA</i>	Portadoras do alelo		Não portadoras do alelo		<i>p</i> -value/ <i>p</i> _c *
	sMICA _{EV} ng/ml (mediana, variação)	n	sMICA _{EV} ng/ml (mediana, variação)	n	
<i>MICA*002:01</i>	0,0 (0,0 – 0,1)	42	0,05 (0,0 – 0,25)	68	<0,0001/0,0009
<i>MICA*004:00</i>	0,04 (0,0 – 0,25)	30	0,02 (0,0 – 0,2)	80	ns
<i>MICA*007:01</i>	0,0 (0,0 – 0,1)	07	0,03 (0,0 – 0,25)	103	ns
<i>MICA*008:01/04</i>	0,06 (0,0 – 0,25)	45	0,01 (0,0 – 0,2)	65	0,0001/0,0009
<i>MICA*009:01</i>	0,04 (0,0 – 0,2)	16	0,02 (0,0 – 0,25)	94	ns
<i>MICA*010:01</i>	0,0 (0,0 – 0,1)	15	0,03 (0,0 – 0,25)	95	0,03/0,27
<i>MICA*016:00</i>	0,1 (0,02 – 0,13)	06	0,02 (0,0 – 0,25)	104	ns
<i>MICA*018:01</i>	0,0 (0,0 – 0,15)	09	0,03 (0,0 – 0,25)	101	ns
<i>MICA*019:00</i>	0,05 (0,0 – 0,2)	05	0,03 (0,0 – 0,25)	105	ns

**p*-value: Mann-Whitney test; *p*_c: valor de *p* multiplicado pelo número de alelos distintos (correção de Bonferroni); ns: não significativo.

5.3.13. Níveis de MICB solúvel em pacientes com falha de implantação embrionária e controles férteis não gestantes

Os níveis de MICB solúvel (sMICB) circulante nas mulheres pertencentes ao grupo com falha de implantação embrionária e nas mulheres pertencentes ao grupo controle fértil não gestante foram quantificados no soro, os quais foram considerados como níveis de MICB solúvel total (sMICB_{tot}), e nas suspensões de vesículas extracelulares derivadas do soro das mesmas mulheres, os quais foram considerados como níveis de MICB solúvel vesicular (sMICB_{EV}). Todas as amostras quantificadas com sucesso tanto para sMICB_{tot} quanto para sMICB_{EV} entraram nesta análise (IF = 42, FW = 113). Como mostra a Figura 11A e 11B, os níveis de sMICB (sMICB_{tot} e sMICB_{EV}) não mostraram diferenças significativas na comparações entre os grupos de estudo IF e FW.

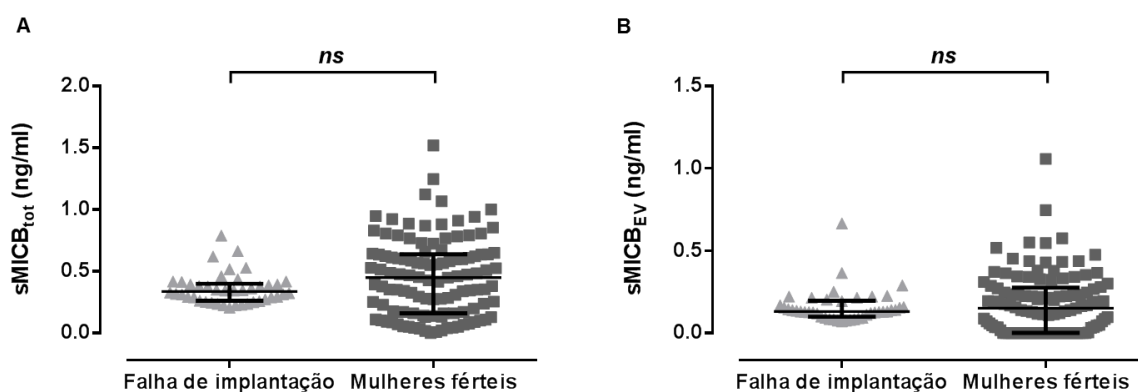


Figura 11. Níveis de sMICB em mulheres com falha de implantação e em mulheres férteis não gestantes. (A) Não foram encontradas diferenças significativas na concentração de sMICB_{tot} entre as mulheres dos grupos IF (n = 42) e FW (n = 113). (B) Não foram encontradas diferenças significativas na concentração de sMICB_{EV} entre as mulheres dos grupos IF (n = 42) e FW (n = 113). Os dados estão apresentados em mediana + amplitude inter-quartil; *ns*: não-significativo; Mann-Whitney test; IF: falha de implantação; FW: mulheres férteis não gestantes.

5.3.14 Níveis de ULBP-2 solúvel em pacientes com falha de implantação embrionária e controles férteis não gestantes

Os níveis de ULBP-2 solúvel (sULBP-2) circulante nas mulheres pertencentes ao grupo com falha de implantação embrionária e nas mulheres pertencentes ao grupo controle fértil não gestante foram quantificados no soro, os quais foram considerados como níveis de ULBP-2 solúvel total (sULBP-2_{tot}), e nas suspensões de vesículas extracelulares derivadas do soro das mesmas mulheres, os quais foram considerados como níveis de ULBP-2 solúvel vesicular (sULBP-2_{EV}). Todas as amostras quantificadas com sucesso tanto para sULBP-2_{tot} quanto para sULBP-2_{EV} foram analisadas (IF = 27, FW = 89). Os resultados demonstram

que os níveis de sULBP-2_{tot} (mediana + variação, ng/ml) são significativamente mais altos em mulheres pertencentes ao grupo com falha de implantação embrionária [0,03 (0,0 – 0,1); $p < 0,0001$] se comparados aos níveis de sULBP-2_{tot} em mulheres férteis não gestantes [0,0 (0,0 – 0,4); Figura 12A]. Os níveis de sULBP-2_{EV} também mostraram níveis significativamente mais elevados em mulheres com falha de implantação [0,01 (0,0 – 0,1); $p < 0,0001$] se comparados aos níveis de sULBP-2_{EV} em mulheres férteis não gestantes [0,0 (0,0 – 0,1); Figura 12B].

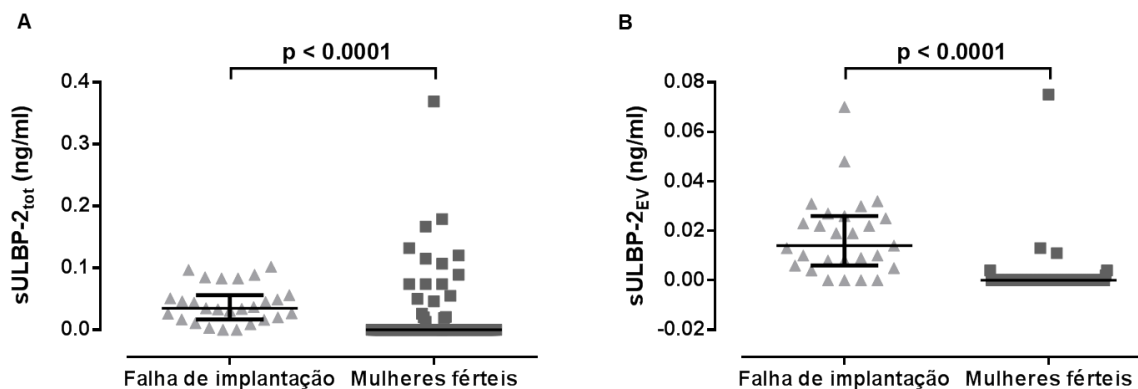


Figura 12. Níveis de sULBP-2 em mulheres com falha de implantação embrionária e em mulheres férteis não gestantes. (A) Níveis de sULBP-2_{tot} elevados no grupo IF (n = 27) se comparados ao grupo FW (n = 89). (B) Níveis de sULBP-2_{EV} elevados no grupo IF (n = 27) se comparados ao grupo FW (n = 89). Os dados estão apresentados em mediana + amplitude interquartil; Mann-Whitney test; IF: falha de implantação; FW: mulheres férteis não gestantes.

6. DISCUSSÃO

Repetidas falhas de implantação embrionária continuam sendo um sério problema para as clínicas de medicina reprodutiva. As ferramentas de diagnóstico para identificação de pacientes em risco de falha de implantação são limitadas e as opções terapêuticas para essas pacientes estão longe de serem estabelecidas (Toth *et al.*, 2011). Conseqüentemente, marcadores diagnósticos para a ocorrência e compreensão de distúrbios implantacionais, que em última análise auxiliariam na prática clínica, são desejáveis. As moléculas HLA de Classe I não clássicas e moléculas do tipo-HLA são candidatas promissoras, uma vez que (i) representam papéis essenciais durante o período gestacional, como a imunossupressão e imunoestimulação sistêmica materna (Djurisic e Hviid, 2014), (ii) podem ser secretadas como moléculas solúveis livres ou via vesículas extracelulares no sangue periférico materno e (iii) os níveis de expressão de algumas dessas moléculas estão relacionados com polimorfismos de seu gene cognato.

Os resultados apresentados no Capítulo I desta Tese se constituem numa das primeiras indicações sobre um papel imunomodulador de EVs circulantes durante o período gestacional. EVs derivadas do sangue periférico de mulheres no segundo trimestre gestacional, apresentaram uma concentração aumentada das citocinas TGF- β 1 e IL-10 e a capacidade de intensificar a atividade de caspase-3 em células NK CD56^{dim} citotóxicas. Essas observações são importantes na medida em que introduzem novas evidências para entender como EVs desempenham um papel no estabelecimento e/ou manutenção da gravidez e porque certas células secretam ou não EVs no curso gestacional. No entanto, observações no perfil de expressão em EVs relacionadas à processos gestacionais patológicos aguardam por ser avaliadas.

Com esse intuito, investigou-se a associação entre a variabilidade dos genes *HLA-G*, *HLA-E* e *MICA* e o perfil de expressão de moléculas HLA não clássicas (*HLA-G/E*) e moléculas tipo-HLA (*MICA/B* e *ULBP-2*) em sangue periférico nas suas duas formas solúveis, total e carregadas por EVs, em casos de falha de implantação embrionária e em controles férteis não gestantes. Os nossos resultados foram fortemente sugestivos sobre a existência de alterações alélicas, genotípicas e haplotípicas com o perfil de expressão das moléculas analisadas neste estudo.

Em relação ao gene *HLA-G* e conforme resultados apresentados e já discutidos no Capítulo II desta Tese, observou-se frequência aumentada da variante alélica *HLA-G* 14pb/del e, conseqüentemente, níveis aumentados de *HLA-G* solúvel total em mulheres com falha de implantação embrionária. Os resultados evidenciam que o alelo *HLA-G* 14pb/del mostra-se associado com níveis aumentados de *HLA-G* solúvel vesicular, também é sugestivo de que o genótipo *HLA-G* de cada indivíduo pode ter um impacto no processo de

secreção e na via de expressão da molécula de HLA-G. No entanto, no que se refere às associações entre este polimorfismo e complicações gestacionais, os resultados são ainda controversos e as evidências insuficientes para uma relação conclusiva entre o polimorfismo 14pb ins/del e o risco de falha de implantação, abortamento recorrente ou pré-eclampsia (Hviid, Hylenius, *et al.*, 2004; Enghelabifar *et al.*, 2014; Fan *et al.*, 2014; Mando *et al.*, 2015).

Outras associações alélicas e genótípicas que não mantiveram a significância estatística após a correção de Bonferroni, merecem ser comentadas. Os alelos *HLA-G*01:01:03* e *HLA-G*01:04:04* mostraram-se como possíveis fatores de proteção às falhas implantacionais, na medida em que foram significativamente mais frequentes em casais férteis não gestantes. A associação entre casais férteis não gestantes e o alelo *HLA-G*01:04:04* está sendo mencionada pela primeira vez. A associação entre complicações gestacionais e o alelo *HLA-G*01:01:03* já havia sido reportada anteriormente, porém apresentando resultados controversos. Num estudo realizado anteriormente por nosso grupo, em casais com abortamento recorrente e controles férteis, observou-se que o alelo referido como *G*01:01A* (compreendendo as variantes alélicas: *G*01:01:01*, *G*01:01:02*, *G*01:01:03*, *G*01:01:04*, *G*01:01:05* e *G*01:01:06*) apresentou maior frequência em mulheres consideradas férteis (Vargas *et al.*, 2011). Por outro lado, outro estudo, também relacionado a aborto de repetição, demonstrou que o alelo *HLA-G*01:01:03* foi mais frequente nos casos de aborto, representando neste caso um fator de risco (Abbas *et al.*, 2004). A diferença entre o número de indivíduos genotipados nos estudos reportados, pode estar relacionada com a divergência nos resultados encontrados. No presente estudo, nas comparações entre os grupos de acordo com o gênero, o alelo *HLA-G*01:01:03* manteve-se como um fator de proteção, na medida em que foi significativamente mais frequente em homens considerados férteis. A genotipagem do gene *HLA-G* em uma coorte maior de indivíduos pertencentes aos dois grupos de estudo seria necessária para a confirmação desses resultados.

Em relação aos genótipos do gene *HLA-G*, este estudo evidencia pela primeira vez a associação dos genótipos *HLA-G*01:01:02/*01:01:08* e *HLA-G*01:01:08/*01:04:01* com o risco de falha de implantação. Estes dois genótipos foram observados com maior frequência tanto nos casais com falha de implantação embrionária quando comparados à casais férteis não gestantes, quanto nos homens com falha de implantação embrionária nas comparações de acordo com o gênero.

A interpretação dos resultados relacionados ao gene *HLA-G* torna-se mais complexa quando incluímos seus níveis de expressão, assumindo-se serem os mesmos afetados por fatores genéticos. Num estudo conduzido por Rebmann e colaboradores, em indivíduos considerados saudáveis, os alelos *HLA-G*01:01:03* e *HLA-G*01:05N* foram reportados como baixos secretores de sHLA-G, enquanto o alelo *HLA-G*01:04:01* foi reportado como

alto secretor de sHLA-G (Rebmann *et al.*, 2001). Diferentes associações foram encontradas no nosso estudo. O alelo *HLA-G*01:01:01*, considerado isoladamente, está associado à valores significativamente mais altos de sHLA-G_{tot} e sHLA-G_{EV} em mulheres com falha de implantação embrionária. Resultado que pode estar relacionado diretamente ao fato de as mulheres com falha de implantação apresentarem um valor aumentado de sHLA-G se comparadas à mulheres férteis não gestantes, na medida em que esse alelo foi o mais frequente na população de mulheres com falha de implantação (40,16%). Em outro estudo do nosso grupo, comparações entre mulheres que apresentaram sucesso no tratamento de reprodução assistida *versus* insucesso, observou-se que o alelo *HLA-G*01:01:01* foi significativamente mais frequente nas mulheres que responderam favoravelmente ao tratamento (Costa *et al.*, 2016 (Print)). O alelo *HLA-G*01:01:03* está associado à níveis aumentados de sHLA-G_{tot} em mulheres férteis não gestantes, contrariando o estudo mencionado acima, e o alelo *HLA-G*01:01:02* está associado à níveis reduzidos de sHLA-G_{EV} em mulheres com falha de implantação embrionária. No caso de associações isoladas de alelos de *HLA-G* com os níveis de expressão dessa molécula, é importante considerar a provável influência de outros polimorfismos em regiões regulatórias do gene como 5'URR (região 5' reguladora a montante do promotor) e 3'UTR (região 3' não traduzida).

De fato, como mencionado anteriormente, no presente estudo observou-se uma frequência aumentada do alelo *HLA-G* 14pb/del e níveis aumentados de sHLA-G_{tot} em mulheres com falha de implantação. Evidência que nos levou a investigação de haplótipos entre os alelos do gene *HLA-G* e o polimorfismo 14pb ins/del e a sua provável influência nos níveis de moléculas sHLA-G. Os haplótipos *HLA-G*01:01:08/14pb del* e *HLA-G*01:04:01/14pb del* estão associados à mulheres com falha de implantação embrionária. Os mesmos haplótipos foram encontrados com frequências aumentadas em pacientes com abortamento recorrente no estudo de (Vargas *et al.*, 2011) citado anteriormente, sugerindo prováveis haplótipos de risco para complicações gestacionais. Em relação aos níveis de moléculas de sHLA-G circulantes, dois perfis haplotípicos foram observados em mulheres com falha de implantação: o haplótipo *HLA-G*01:01:01/ 14pb del* associado à níveis elevados de sHLA-G_{tot} e sHLA-G_{EV} e o haplótipo *HLA-G*01:01:02/ 14pb ins* associado à níveis diminuídos de sHLA-G_{EV} em mulheres com falha de implantação embrionária. Esses resultados em conjunto corroboram a hipótese de que o alelo 14pb/del está associado à falha de implantação embrionária e conseqüentemente à níveis aumentados de sHLA-G, influenciando, desta maneira, a via de expressão da molécula de HLA-G, independente da forma, o que estaria relacionado com a estabilidade do RNA mensageiro gerado pelos portadores desta variante alélica (Djurisic *et al.*, 2015).

Os resultados da genotipagem do gene *HLA-E* não revelaram qualquer diferença significativa entre os grupos com falha de implantação embrionária e controles férteis não

gestantes. Os receptores inibidores CD94/NKG2A, receptores do tipo lectina, são expressos nos linfócitos decíduais (Miki *et al.*, 1998) e a molécula de HLA-E é o principal ligante conhecido deste receptor (Borrego *et al.*, 1998). Assumindo-se que os linfócitos decíduais possam reconhecer HLA-E e admitindo-se papéis diferenciais entre os alelos *HLA-E*01:01* e *HLA-E*01:03* (Celik *et al.*, 2016), poderíamos especular que os polimorfismos do gene *HLA-E* de alguma forma condicionariam as reações imunológicas entre os linfócitos decíduais e o trofoblasto. Em estudos prévios, a distribuição alélica de *HLA-E* foi similar entre casais com complicações gestacionais, como aborto espontâneo recorrente e casais controle férteis, corroborando nossos resultados (Steffensen *et al.*, 1998; Kanai, Fujii, Keicho, *et al.*, 2001; Pfeiffer *et al.*, 2001). As frequências dos dois alelos de *HLA-E* definidos pela substituição não sinônima na posição 107 (*HLA-E*01:01* e *-E*01:03*) são igualmente distribuídas nas diferentes populações, em torno de 50% (Geraghty, Stockscheider, *et al.*, 1992; Grimsley e Ober, 1997), o que foi também observado no presente estudo. Não foram observadas diferenças significativas entre os níveis de proteína HLA-E solúvel no sangue periférico de mulheres com falha de implantação embrionária e mulheres férteis não gestantes, tanto em níveis totais de HLA-E (sHLA-E_{tot}) quanto em níveis de HLA-E circulante carregados por vesículas extracelulares (sHLA-E_{EV}). E de acordo com esses resultados, não encontramos relação significativa entre a expressão de moléculas HLA-E (sHLA-E_{tot} e sHLA-E_{EV}) e os diferentes alelos do gene *HLA-E* (*HLA-E*01:01* e *-E*01:03*). Com base nestes dados, as diferenças alélicas, os polimorfismos de *HLA-E* e os níveis de expressão dessa molécula parecem ter pouco ou quase nenhum envolvimento na patogênese de casos de falha de implantação embrionária. No entanto, seria interessante examinar se os polimorfismos do gene *HLA-E* e os níveis de expressão desta molécula teriam alguma relação com outros distúrbios reprodutivos, tais como pré-eclampsia e restrição de crescimento intra-uterino, condições nas quais alterações na interação imunológica da interface materno-fetal estariam também envolvidas.

A investigação de moléculas do tipo-HLA, ligantes do receptor NKG2D, como MICA/B e ULBPs também tem relevância na medida em que a sua expressão é induzida por estresse celular e representam um papel importante na imunomodulação durante o processo gestacional (Mincheva-Nilsson e Baranov, 2014). A investigação das variantes alélicas e genóticas do gene *MICA* revelou associações que merecem ênfase, como por exemplo, o alelo *MICA*002:01*, que apresentou-se como um fator de proteção, por sua maior frequência em casais férteis não gestantes quando comparados à casais com falha de implantação. Nas comparações de acordo com o gênero, o alelo *MICA*027:00* foi mais frequente nos homens férteis e o alelo *MICA*017:00* foi mais frequente nos homens com falha de implantação. Em relação à análise genotípica, nas comparações de acordo com o gênero o genótipo *MICA*008:01/04/*016:00* foi mais frequente nas mulheres com falha de

implantação embrionária. No entanto, uma possível associação entre polimorfismos de *MICA* e situações de complicações gestacionais devem ser levadas em consideração com cautela. A importância de polimorfismos nos genes de moléculas ligantes do receptor NKG2D ainda não é clara, uma vez que a plasticidade na interação NKG2D/NKG2D-ligante permite a este receptor reconhecer um número grande de moléculas distintas mesmo na ausência de uma modificação conformacional após a interação com o ligante (Radaev *et al.*, 2001). No contexto dos polimorfismos do gene *MICA* especificamente, é importante notar que apesar de algumas alterações alélicas de aminoácidos serem bastante significativas (Pro/His) e alguns resíduos polimórficos situarem-se muito perto do local de contato com o receptor NKG2D, apenas uma variante do gene *MICA* mostrou afetar a afinidade de ligação à NKG2D, mesmo sendo esta uma substituição conservativa (Met/Val, resíduo 129) (Steinle *et al.*, 2001; Fernandez-Messina *et al.*, 2012). Por outro lado, variações nas sequências gênicas provavelmente estão relacionadas à regulação dos níveis de expressão desta molécula (Hue *et al.*, 2004).

Nossos resultados mais interessantes vinculados às moléculas imunoestimulatórias relacionadas ao MHC de Classe I induzidas por estresse são relativos aos seus níveis de expressão. Foram observados: (i) níveis diminuídos de sMICA_{tot} e sMICA_{EV} em mulheres com falha de implantação quando comparados à mulheres férteis não gestantes; (ii) níveis de sMICB_{tot} e sMICB_{EV} sem diferenças significativas nas comparações entre mulheres férteis não gestantes e mulheres com falha de implantação e (iii) níveis aumentados de ULBP-2_{tot} e ULBP-2_{EV} em mulheres com falha de implantação quando comparados à mulheres férteis não gestantes. Embora o RNAm das proteínas MICA/B e ULBP possa ser encontrado em baixos níveis em células consideradas normais (Schrambach *et al.*, 2007), existe um consenso geral de que a expressão dos ligantes de NKG2D apresentam níveis aumentados quando a célula passa por diferentes tipos de estresse (Fernandez-Messina *et al.*, 2012). Alguns pontos importantes devem ser considerados ao compararmos moléculas ligantes de NKG2D no contexto de patologias: os mecanismos moleculares envolvidos na regulação da expressão dessas moléculas sob estresse ainda não é claro, no entanto têm-se demonstrado que choque-térmico, estresse oxidativo, danos ao DNA e inibição de proteassomos induzem a expressão de moléculas ligantes de NKG2D (revisado por (Mistry e O'callaghan, 2007)); os efeitos destes diferentes estímulos podem levar à expressões diferenciais entre os distintos ligantes de NKG2D, podendo depender do subtipo e/ou do status metabólico celular (Fernandez-Messina *et al.*, 2012); análises quanto à estabilidade das moléculas ligantes de NKG2D na superfície celular revelaram importantes diferenças na meia-vida dessas moléculas que não estão relacionadas à sua forma de ancoragem: MICA e ULBP2 são moléculas bastante estáveis (Fernandez-Messina *et al.*, 2011) enquanto MICB apresenta uma meia-vida muito curta na membrana plasmática (Aguera-Gonzalez *et al.*,

2009); a secreção de citocinas, como IFN- γ e IFN- α , pode modular os níveis de expressão de ligantes de NKG2D (Zhang *et al.*, 2008; Yadav *et al.*, 2009). Entrando em um nível ainda maior de complexidade, em diferentes tipos de câncer, a expressão de diferentes moléculas ligantes de NKG2D podem estar associadas com um bom ou um mal prognóstico (revisado por (Fernandez-Messina *et al.*, 2012)). É extremamente difícil prever os níveis e como a expressão dos ligantes de NKG2D poderia afetar a intensidade da resposta imune de uma mulher com falha de implantação, uma vez que a expressão destas moléculas depende de inúmeros fatores, em particular as citocinas presentes no ambiente que podem tanto induzir quanto bloquear a imunomodulação materno-fetal através dos níveis de ligantes de NKG2D no soro. Levando em conta todas as variáveis que estão relacionadas aos níveis de expressão dessas moléculas, o seu papel isoladamente como possíveis marcadores prognósticos em casos de falha de implantação necessita mais estudos. Além disso, o efeito de co-variáveis clínicas, de estilo de vida e, acima de tudo genéticas, são relevantes sobre os níveis circulantes destas proteínas, podendo explicar as diferenças encontradas entre os grupos de estudo.

A maneira mais comum conhecida de secreção de ligantes de NKG2D é através da clivagem de moléculas ancoradas à membrana celular via metaloproteases (Fernandez-Messina *et al.*, 2010). No entanto, a secreção destas moléculas parece ser regulada em diferentes níveis, incluindo níveis transcricionais, pós-transcricionais (estabilidade de RNAm e microRNAs) (Heinemann *et al.*, 2012), pós-traducionais (modificações de proteínas, tráfego intercelular e clivagem) (Fernandez-Messina *et al.*, 2010) e, ainda, a secreção destas moléculas como parte de vesículas extracelulares (Ashiru *et al.*, 2010). As consequências dos diferentes mecanismos de liberação de ligantes de NKG2D parecem ser relevantes em relação ao reconhecimento imunológico. Além disso, as isoformas de ligantes de NKG2D encontradas no sangue periférico de pacientes podem variar dependendo das transformações celulares que cada condição pode causar nas vias necessárias para a molécula atingir a superfície celular ou o meio extracelular ou pelo efeito dos diferentes alelos codificados por cada indivíduo (Fernandez-Messina *et al.*, 2012).

Em relação aos alelos de *MICA* codificados por cada indivíduo e a sua associação com os níveis de expressão de moléculas sMICA no sangue periférico, nós demonstramos que o alelo *MICA*002:01* está associado à níveis diminuídos de sMICA_{tot} independente da condição do grupo de estudo e o alelo *MICA*010:01* está associado à níveis diminuídos de sMICA_{EV} em mulheres férteis não gestantes. Por outro lado, o alelo *MICA*009:01* está associado à níveis aumentados de sMICA_{tot} em mulheres férteis não gestantes e os alelos *MICA*004:00* e *MICA*008:01/04* estão associados à níveis aumentados de sMICA_{tot} independente da condição do grupo de estudo e à níveis aumentados de sMICA_{EV} em mulheres férteis não gestantes. Incluindo os resultados deste estudo, o alelo *MICA*008* é o

mais frequente em quase todas as populações estudadas (Zhang *et al.*, 2001; Marin *et al.*, 2004), embora este alelo seja distinto dos outros alelos *MICA* devido ao fato da presença de uma inserção de nucleotídeo único na região transmembrana, resultando em uma proteína truncada (Mizuki *et al.*, 1997). Além disso, diferentemente dos outros alelos *MICA*, os quais são clivados da superfície celular, resultando em moléculas truncadas após proteólise, o alelo *MICA*008* possui um mecanismo diferente de liberação da superfície celular, sendo geralmente secretado via EVs (Waldhauer *et al.*, 2008). Esta evidência não exclui o fato de moléculas sMICA serem encontradas no soro de pacientes, independente de diferenças alélicas. De fato, níveis aumentados de sMICA em sangue periférico têm sido associados ao alelo *MICA*008*, corroborando nossos resultados (Hue *et al.*, 2004).

Enquanto o alelo *MICA*008* é geralmente liberado via EVs, muitas moléculas MICA/B e ULBP-2 podem ser liberadas como proteínas solúveis ou secretadas via EVs dependendo da atividade de metaloproteases na célula de origem (Fernandez-Messina *et al.*, 2010). Esta é uma evidência importante, na medida em que torna as vesículas extracelulares potentes apresentadoras de ligantes de NKG2D para células imunes efectoras. Estudos têm demonstrado que ligantes de NKG2D secretados via EVs são moduladores de receptores NKG2D mais efetivos do que moléculas solúveis clivadas de membrana (Ashiru *et al.*, 2010; Fernandez-Messina *et al.*, 2012). Ainda assim, os mecanismos que associam moléculas sMIC com implantação e perda gestacional, em particular a sua origem e o impacto sobre a função das células NK decíduais ainda precisam ser elucidados.

7. CONCLUSÕES

No presente estudo as seguintes conclusões merecem ser reportadas:

EVs:

- Evidências de um papel imunomodulador de EVs circulantes durante o período gestacional, como a concentração aumentada das citocinas TGF- β 1 e IL-10 e a capacidade de intensificar a atividade de caspase-3 em células NK CD56^{dim} citotóxicas em EVs derivadas de mulheres no segundo trimestre gestacional;

HLA-G:

- Foram observados níveis de sHLA-G (sHLA-G_{tot} e sHLA-G_{EV}) aumentados em mulheres com falha de implantação embrionária;
- Os alelos *HLA-G*01:01:03* e *HLA-G*01:04:04* apresentaram-se mais frequentes em casais férteis não gestantes. O alelo *HLA-G*01:01:03* mostrou-se mais frequente em homens férteis, enquanto o alelo *HLA-G*01:04:01* mostrou-se mais frequente em mulheres com falha de implantação. Os genótipos *HLA-G*01:01:02/01:01:08* e *HLA-G*01:01:08/01:04:01* apresentaram-se como possíveis fatores de risco para falha de implantação embrionária;
- Maior frequência do alelo *HLA-G 14pb del* e, conseqüentemente, níveis aumentados de sHLA-G_{tot} em mulheres com falha de implantação;
- Os haplótipos *HLA-G*01:01:08/ 14pb del* e *HLA-G*01:04:01/ 14pb del* mostraram-se como prováveis haplótipos de risco para falha de implantação embrionária;
- O haplótipo *HLA-G*01:01:01/ 14pb del* mostrou-se associado à níveis elevados de sHLA-G_{tot} e sHLA-G_{EV} em mulheres com falha de implantação, enquanto o haplótipo *HLA-G*01:01:02/ 14pb ins* mostrou-se associado à níveis reduzidos de sHLA-G_{EV} em mulheres com falha de implantação embrionária;
- O alelo *HLA-G*01:01:01*, considerado isoladamente, mostrou-se associado à níveis significativamente mais altos de sHLA-G_{tot} e sHLA-G_{EV} em mulheres com falha de implantação embrionária, enquanto o alelo *HLA-G*01:01:02* está associado à níveis reduzidos de sHLA-G_{EV} em mulheres do mesmo grupo;

MICA, MICB, ULBP-2:

- Em relação ao gene *MICA*, o alelo *MICA*002:01* mostrou-se mais frequente em casais férteis não gestantes. Nas comparações de acordo com o gênero, o alelo *MICA*017:00* é mais frequente em homens com falha de implantação, enquanto o

alelo *MICA*027:00* é mais frequente em homens férteis. O genótipo *MICA*008:01/04/016:00* é mais frequente em mulheres com falha de implantação;

- Foram observados níveis de sMICA (sMICA_{tot} e sMICA_{EV}) aumentados em mulheres férteis não gestantes;
- O alelo *MICA*002:01* está associado à níveis diminuídos de sMICA_{tot} independente da condição do grupo de estudo;
- Os alelos *MICA*004:00* e *MICA*008:01/04* estão associados à níveis aumentados de sMICA_{tot} independente da condição do grupo de estudo;
- Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de sMICB (sMICB_{tot} e sMICB_{EV}) entre mulheres com falha de implantação e mulheres férteis não gestantes;
- Foram observados níveis de sULBP-2 (sULBP-2_{tot} e sULBP-2_{EV}) aumentados em mulheres com falha de implantação embrionária;

HLA-E:

- Não foram encontradas diferenças em relação à diversidade alélica e genotípica e níveis de expressão de HLA-E, sugerindo seu pouco envolvimento na patogênese de casos de falha de implantação;

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A taxa de sucesso de tratamentos reprodutivos depende de inúmeros fatores. A etiologia de repetidas falhas de implantação embrionária é multifatorial, envolvendo fatores ambientais, genéticos e, mais especificamente a interação entre células imunes e moléculas HLA de Classe I não-clássicas. Uma vez que esta interação, na sua essência, é uma ação ou influência recíproca, qualquer contribuição genética ou imunológica desfavorável tanto da mãe, quanto do pai ou do feto, podem fazer pender o estado de equilíbrio imunológico em uma direção que seria desfavorável para a gestação, levando aos casos de falha de implantação embrionária. Há dificuldade ainda em se alcançar um real consenso sobre o papel da influência genética das moléculas HLA de Classe I não clássicas e os seus níveis de expressão no curso gestacional. Além disso, as interações entre células imunes efectoras e EVs derivados da interface materno-fetal podem oferecer novas possibilidades de diagnóstico, monitoramento e novas ferramentas de estratégia de fertilização. Levando em consideração que as diferenças e/ou semelhanças funcionais entre moléculas HLA de Classe I não clássicas e moléculas tipo-HLA solúveis e carregadas por EVs ainda não são claras, as primeiras observações sobre o perfil de expressão dessas moléculas em cenários distintos são etapas investigativas essenciais e justificam o estudo dessas vesículas no contexto da gestação normal e de complicações gestacionais.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAGAARD-TILLERY, K. M.; SILVER, R.; DALTON, J. Immunology of normal pregnancy. **Semin Fetal Neonatal Med**, v. 11, n. 5, p. 279-95, Oct 2006. ISSN 1744-165X (Print)

1744-165X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16784908> >.

ABBAS, A. et al. Analysis of human leukocyte antigen (HLA)-G polymorphism in normal women and in women with recurrent spontaneous abortions. **Eur J Immunogenet**, v. 31, n. 6, p. 275-8, Dec 2004. ISSN 0960-7420 (Print)

0960-7420 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15548266> >.

ABRAHAMS, V. M. et al. First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which induces immune cell apoptosis. **Mol Hum Reprod**, v. 10, n. 1, p. 55-63, Jan 2004. ISSN 1360-9947 (Print)

1360-9947 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14665707> >.

ABSALAN, F. et al. Value of sperm chromatin dispersion test in couples with unexplained recurrent abortion. **J Assist Reprod Genet**, v. 29, n. 1, p. 11-4, Jan 2012. ISSN 1573-7330 (Electronic)

1058-0468 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22009642> >.

ADMYRE, C. et al. Direct exosome stimulation of peripheral human T cells detected by ELISPOT. **Eur J Immunol**, v. 36, n. 7, p. 1772-81, Jul 2006. ISSN 0014-2980 (Print)

0014-2980 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16761310> >.

AFKHAMI, F. et al. The HLA-G 14bp insertion/deletion polymorphism in women with recurrent spontaneous abortion. **Iran J Allergy Asthma Immunol**, v. 13, n. 5, p. 364-9, Oct 2014. ISSN 1735-1502 (Print)

1735-1502 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25150078> >.

AGUERA-GONZALEZ, S. et al. Brief residence at the plasma membrane of the MHC class I-related chain B is due to clathrin-mediated cholesterol-dependent endocytosis and shedding. **J Immunol**, v. 182, n. 8, p. 4800-8, Apr 15 2009. ISSN 1550-6606 (Electronic)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19342658> >.

AL-NEDAWI, K. et al. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. **Nature Cell Biology**, v. 10, n. 5, p. 619-24, May 2008. ISSN 1476-4679 (Electronic)

1465-7392 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18425114> >.

ALDRICH, C. L. et al. HLA-G genotypes and pregnancy outcome in couples with unexplained recurrent miscarriage. **Mol Hum Reprod**, v. 7, n. 12, p. 1167-72, Dec 2001. ISSN 1360-9947 (Print)

1360-9947 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11719594> >.

ALEGRE, E. et al. Maternal antigen presenting cells are a source of plasmatic HLA-G during pregnancy: longitudinal study during pregnancy. **Hum Immunol**, v. 68, n. 8, p. 661-7, Aug 2007. ISSN 0198-8859 (Print)

0198-8859 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17678720> >.

ALEGRE, E. et al. In vivo identification of an HLA-G complex as ubiquitinated protein circulating in exosomes. **Eur J Immunol**, v. 43, n. 7, p. 1933-9, Jul 2013. ISSN 1521-4141 (Electronic)

0014-2980 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23589311> >.

ALIJOTAS-REIG, J. et al. Cell-derived microparticles and vascular pregnancy complications: a systematic and comprehensive review. **Fertil Steril**, v. 99, n. 2, p. 441-9, Feb 2013. ISSN 1556-5653 (Electronic)

0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23122952> >.

AMODIO, G. et al. HLA-G expressing DC-10 and CD4(+) T cells accumulate in human decidua during pregnancy. **Hum Immunol**, v. 74, n. 4, p. 406-11, Apr 2013. ISSN 1879-1166 (Electronic)

0198-8859 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23238214> >.

ANDO, H. et al. Allelic variants of the human MHC class I chain-related B gene (MICB). **Immunogenetics**, v. 46, n. 6, p. 499-508, 1997. ISSN 0093-7711 (Print)

0093-7711 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9321430> >.

ANDRE, P. et al. Comparative analysis of human NK cell activation induced by NKG2D and natural cytotoxicity receptors. **Eur J Immunol**, v. 34, n. 4, p. 961-71, Apr 2004. ISSN 0014-2980 (Print)

0014-2980 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15048706> >.

APPS, R. et al. Human leucocyte antigen (HLA) expression of primary trophoblast cells and placental cell lines, determined using single antigen beads to characterize allotype specificities of anti-HLA antibodies. **Immunology**, v. 127, n. 1, p. 26-39, May 2009. ISSN 1365-2567 (Electronic)

0019-2805 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19368562> >.

ARCK, P. C.; HECHER, K. Fetomaternal immune cross-talk and its consequences for maternal and offspring's health. **Nat Med**, v. 19, n. 5, p. 548-56, May 2013. ISSN 1546-170X (Electronic)

1078-8956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23652115> >.

ASHIRU, O. et al. Natural killer cell cytotoxicity is suppressed by exposure to the human NKG2D ligand MICA*008 that is shed by tumor cells in exosomes. **Cancer Res**, v. 70, n. 2, p. 481-9, Jan 15 2010. ISSN 1538-7445 (Electronic)

0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20068167> >.

ASHKAR, A. A. et al. Assessment of requirements for IL-15 and IFN regulatory factors in uterine NK cell differentiation and function during pregnancy. **J Immunol**, v. 171, n. 6, p. 2937-44, Sep 15 2003. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12960317> >.

BABST, M. Endosomal sorting complex required for transport (ESCRT). Editorial. **Traffic**, v. 12, n. 10, p. 1281, Oct 2011a. ISSN 1600-0854 (Electronic)

1398-9219 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21749590> >.

BABST, M. MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between. **Curr Opin Cell Biol**, v. 23, n. 4, p. 452-7, Aug 2011b. ISSN 1879-0410 (Electronic) 0955-0674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21570275> >.

BAHRAM, S. MIC genes: from genetics to biology. **Adv Immunol**, v. 76, p. 1-60, 2000. ISSN 0065-2776 (Print) 0065-2776 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11079097> >.

BAHRAM, S. et al. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 14, p. 6259-63, Jul 5 1994. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8022771> >.

BAHRAM, S. et al. Nucleotide sequence of the human MHC class I MICA gene. **Immunogenetics**, v. 44, n. 1, p. 80-1, 1996. ISSN 0093-7711 (Print) 0093-7711 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8613147> >.

BALAJ, L. et al. Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. **Nat Commun**, v. 2, p. 180, 2011. ISSN 2041-1723 (Electronic) 2041-1723 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21285958> >.

BAN-FRANGEZ, H. et al. The outcome of singleton pregnancies after IVF/ICSI in women before and after hysteroscopic resection of a uterine septum compared to normal controls. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 146, n. 2, p. 184-7, Oct 2009. ISSN 1872-7654 (Electronic) 0301-2115 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18524455> >.

BAUER, S. et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. **Science**, v. 285, n. 5428, p. 727-9, Jul 30 1999. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10426993> >.

BEER, A. E.; KWAK, J. Y.; RUIZ, J. E. Immunophenotypic profiles of peripheral blood lymphocytes in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with multiple failed in vitro fertilization cycles. **Am J Reprod Immunol**, v. 35, n. 4, p. 376-82, Apr 1996. ISSN 1046-7408 (Print) 1046-7408 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8739457> >.

BELL, J. Chromosome crawling in the MHC. **Trends Genet**, v. 5, n. 9, p. 289-90, Sep 1989. ISSN 0168-9525 (Print) 0168-9525 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2686120> >.

BIRCH, J. et al. Genomic location and characterisation of MIC genes in cattle. **Immunogenetics**, v. 60, n. 8, p. 477-83, Aug 2008. ISSN 0093-7711 (Print) 0093-7711 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18548244> >.

BOBRIE, A. et al. Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. **Traffic**, v. 12, n. 12, p. 1659-68, Dec 2011. ISSN 1600-0854 (Electronic) 1398-9219 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21645191> >.

BOLOGNESI, E. et al. MICA and MICB microsatellite alleles in HLA extended haplotypes. **Eur J Immunogenet**, v. 28, n. 5, p. 523-30, Oct 2001. ISSN 0960-7420 (Print) 0960-7420 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11881819> >.

BONAME, J. M. et al. Efficient internalization of MHC I requires lysine-11 and lysine-63 mixed linkage polyubiquitin chains. **Traffic**, v. 11, n. 2, p. 210-20, Feb 2010. ISSN 1600-0854 (Electronic) 1398-9219 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19948006> >.

BORREGO, F. et al. Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis. **J Exp Med**, v. 187, n. 5, p. 813-8, Mar 2 1998. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9480992> >.

BOUKOUACI, W. et al. MICA-129 genotype, soluble MICA, and anti-MICA antibodies as biomarkers of chronic graft-versus-host disease. **Blood**, v. 114, n. 25, p. 5216-24, Dec 10 2009. ISSN 1528-0020 (Electronic) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19786616> >.

BOYSON, J. E. et al. Disulfide bond-mediated dimerization of HLA-G on the cell surface. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 25, p. 16180-5, Dec 10 2002. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12454284> >.

BRAUD, V. M. et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 795-9, Feb 19 1998. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9486650> >.

BROSTJAN, C. et al. Differential expression of inhibitory and activating CD94/NKG2 receptors on NK cell clones. **J Immunol Methods**, v. 264, n. 1-2, p. 109-19, Jun 1 2002. ISSN 0022-1759 (Print) 0022-1759 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12191515> >.

BULMER, J. N.; PACE, D.; RITSON, A. Immunoregulatory cells in human decidua: morphology, immunohistochemistry and function. **Reprod Nutr Dev**, v. 28, n. 6B, p. 1599-613, 1988. ISSN 0181-1916 (Print) 0181-1916 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3073448> >.

BURNETT, L. A.; NOWAK, R. A. Exosomes mediate embryo and maternal interactions at implantation and during pregnancy. **Front Biosci (Schol Ed)**, v. 8, p. 79-96, 2016. ISSN 1945-0524 (Electronic) 1945-0516 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26709898> >.

CABY, M. P. et al. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. **Int Immunol**, v. 17, n. 7, p. 879-87, Jul 2005. ISSN 0953-8178 (Print) 0953-8178 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15908444> >.

CAMPILLO, J. A. et al. MHC class I chain-related gene a diversity in patients with cutaneous malignant melanoma from southeastern Spain. **Dis Markers**, v. 2015, p. 831864, 2015. ISSN 1875-8630 (Electronic) 0278-0240 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25838620> >.

CARADEC, J. et al. Reproducibility and efficiency of serum-derived exosome extraction methods. **Clin Biochem**, v. 47, n. 13-14, p. 1286-92, Sep 2014. ISSN 1873-2933 (Electronic) 0009-9120 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24956264> >.

CAROSELLA, E. D. et al. HLA-G: a tolerance molecule from the major histocompatibility complex. **Immunol Today**, v. 20, n. 2, p. 60-2, Feb 1999. ISSN 0167-5699 (Print) 0167-5699 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10098322> >.

CARP, H. et al. Prevalence of circulating procoagulant microparticles in women with recurrent miscarriage: a case-controlled study. **Hum Reprod**, v. 19, n. 1, p. 191-5, Jan 2004. ISSN 0268-1161 (Print) 0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14688181> >.

CARROLL, M. C. et al. Deletion of complement C4 and steroid 21-hydroxylase genes in the HLA class III region. **Embo Journal**, v. 4, n. 10, p. 2547-52, Oct 1985. ISSN 0261-4189 (Print) 0261-4189 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2996881> >.

CARVER, J. et al. An in-vitro model for stromal invasion during implantation of the human blastocyst. **Hum Reprod**, v. 18, n. 2, p. 283-90, Feb 2003. ISSN 0268-1161 (Print) 0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12571163> >.

CASTELLI, E. C. et al. The genetic structure of 3'untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes. **Genes Immun**, v. 11, n. 2, p. 134-41, Mar 2010. ISSN 1476-5470 (Electronic) 1466-4879 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19798077> >.

CASTELLI, E. C. et al. A comprehensive study of polymorphic sites along the HLA-G gene: implication for gene regulation and evolution. **Mol Biol Evol**, v. 28, n. 11, p. 3069-86, Nov 2011. ISSN 1537-1719 (Electronic) 0737-4038 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21622995> >.

CAUMARTIN, J. et al. Trogocytosis-based generation of suppressive NK cells. **EMBO J**, v. 26, n. 5, p. 1423-33, Mar 7 2007. ISSN 0261-4189 (Print) 0261-4189 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17318190> >.

CELIK, A. A. et al. The diversity of the HLA-E-restricted peptide repertoire explains the immunological impact of the Arg107Gly mismatch. **Immunogenetics**, v. 68, n. 1, p. 29-41, Jan 2016. ISSN 1432-1211 (Electronic) 0093-7711 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26552660> >.

CHANTAKRU, S. et al. Contributions from self-renewal and trafficking to the uterine NK cell population of early pregnancy. **J Immunol**, v. 168, n. 1, p. 22-8, Jan 1 2002. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11751942> >.

CHAPUT, N.; THERY, C. Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. **Semin Immunopathol**, v. 33, n. 5, p. 419-40, Sep 2011. ISSN 1863-2300 (Electronic) 1863-2297 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21174094> >.

CHEN, X. Y. et al. The 14 bp deletion polymorphisms in HLA-G gene play an important role in the expression of soluble HLA-G in plasma. **Tissue Antigens**, v. 72, n. 4, p. 335-41, Oct 2008. ISSN 1399-0039 (Electronic)

0001-2815 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18700878> >.

CHENG, S. B.; SHARMA, S. Interleukin-10: A Pleiotropic Regulator in Pregnancy. **Am J Reprod Immunol**, Oct 1 2014. ISSN 1600-0897 (Electronic)

1046-7408 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25269386> >.

CHERNYSHOV, V. P. et al. Favorable immune phenotype predicts successful implantation and pregnancy. **Immunol Lett**, v. 162, n. 2 Pt B, p. 217-21, Dec 2014. ISSN 1879-0542 (Electronic)

0165-2478 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25445617> >.

CHOY, M. K.; PHIPPS, M. E. MICA polymorphism: biology and importance in immunity and disease. **Trends Mol Med**, v. 16, n. 3, p. 97-106, Mar 2010. ISSN 1471-499X (Electronic)

1471-4914 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20153697> >.

CLARK, D. A.; COKER, R. Transforming growth factor-beta (TGF-beta). **Int J Biochem Cell Biol**, v. 30, n. 3, p. 293-8, Mar 1998. ISSN 1357-2725 (Print)

1357-2725 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9611771> >.

COCUCCI, E.; MELDOLESI, J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. **Trends Cell Biol**, v. 25, n. 6, p. 364-72, Jun 2015. ISSN 1879-3088 (Electronic)

0962-8924 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25683921> >.

COLLINS, R. W. Human MHC class I chain related (MIC) genes: their biological function and relevance to disease and transplantation. **Eur J Immunogenet**, v. 31, n. 3, p. 105-14, Jun 2004. ISSN 0960-7420 (Print)

0960-7420 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15182323> >.

COLLINS, R. W. et al. High resolution molecular phototyping of MICA and MICB alleles using sequence specific primers. **Hum Immunol**, v. 63, n. 9, p. 783-94, Sep 2002. ISSN 0198-8859 (Print)

0198-8859 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12175734> >.

COLONNA, M. et al. A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. **J Exp Med**, v. 186, n. 11, p. 1809-18, Dec 1 1997. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9382880> >.

CONTINI, P. et al. Soluble HLA-A,-B,-C and -G molecules induce apoptosis in T and NK CD8+ cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation. **Eur J Immunol**, v. 33, n. 1, p. 125-34, Jan 2003. ISSN 0014-2980 (Print)

0014-2980 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12594841> >.

COOPER, M. A.; FEHNIGER, T. A.; CALIGIURI, M. A. The biology of human natural killer-cell subsets. **Trends Immunol**, v. 22, n. 11, p. 633-40, Nov 2001. ISSN 1471-4906 (Print)

1471-4906 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11698225> >.

COOPER, M. A. et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. **Blood**, v. 97, n. 10, p. 3146-51, May 15 2001. ISSN 0006-4971 (Print)

0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11342442> >.

COSMAN, D. et al. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. **Immunity**, v. 14, n. 2, p. 123-33, Feb 2001. ISSN 1074-7613 (Print)

1074-7613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11239445> >.

COUDERT, J. D. et al. Altered NKG2D function in NK cells induced by chronic exposure to NKG2D ligand-expressing tumor cells. **Blood**, v. 106, n. 5, p. 1711-7, Sep 1 2005. ISSN 0006-4971 (Print)

0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15886320> >.

COUGHLAN, C. et al. Recurrent implantation failure: definition and management. **Reprod Biomed Online**, v. 28, n. 1, p. 14-38, Jan 2014. ISSN 1472-6491 (Electronic)

1472-6483 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24269084> >.

COUPEL, S. et al. Expression and release of soluble HLA-E is an immunoregulatory feature of endothelial cell activation. **Blood**, v. 109, n. 7, p. 2806-14, Apr 1 2007. ISSN 0006-4971 (Print)

0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17179229> >.

DAI, C.; KRANTZ, S. B. Interferon gamma induces upregulation and activation of caspases 1, 3, and 8 to produce apoptosis in human erythroid progenitor cells. **Blood**, v. 93, n. 10, p. 3309-16, May 15 1999. ISSN 0006-4971 (Print)

0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10233883> >.

DJURISIC, S.; HVIID, T. V. HLA Class Ib Molecules and Immune Cells in Pregnancy and Preeclampsia. **Front Immunol**, v. 5, p. 652, 2014. ISSN 1664-3224 (Electronic)

1664-3224 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25566263> >.

DJURISIC, S. et al. Allelic imbalance modulates surface expression of the tolerance-inducing HLA-G molecule on primary trophoblast cells. **Mol Hum Reprod**, v. 21, n. 3, p. 281-95, Mar 2015. ISSN 1460-2407 (Electronic)

1360-9947 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25425608> >.

DONADI, E. A. et al. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. **Cell Mol Life Sci**, v. 68, n. 3, p. 369-95, Feb 2011. ISSN 1420-9071 (Electronic)

1420-682X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21107637> >.

DONG, Y. et al. Soluble nonclassical HLA generated by the metalloproteinase pathway. **Hum Immunol**, v. 64, n. 8, p. 802-10, Aug 2003. ISSN 0198-8859 (Print)

0198-8859 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12878359> >.

DRAGOVIC, R. A. et al. Multicolor flow cytometry and nanoparticle tracking analysis of extracellular vesicles in the plasma of normal pregnant and pre-eclamptic women. **Biol Reprod**, v. 89, n. 6, p. 151, Dec 2013. ISSN 1529-7268 (Electronic) 0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24227753> >.

DUNHAM, I. et al. Molecular mapping of the human major histocompatibility complex by pulsed-field gel electrophoresis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 84, n. 20, p. 7237-41, Oct 1987. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3118362> >.

EAGLE, R. A.; JAFFERJI, I.; BARROW, A. D. Beyond Stressed Self: Evidence for NKG2D Ligand Expression on Healthy Cells. **Curr Immunol Rev**, v. 5, n. 1, p. 22-34, Feb 2009. ISSN 1573-3955 (Print) 1573-3955 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19626129> >.

ELLIS, S. A.; PALMER, M. S.; MCMICHAEL, A. J. Human trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA Class I molecule. **J Immunol**, v. 144, n. 2, p. 731-5, Jan 15 1990. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2295808> >.

ENGHELABIFAR, M. et al. Association of the maternal 14-bp insertion/deletion polymorphism in the histocompatibility leukocyte antigen G gene with recurrent implantation failure. **Iran J Reprod Med**, v. 12, n. 9, p. 641-6, Sep 2014. ISSN 1680-6433 (Print) 1680-6433 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25469137> >.

FAN, W. et al. Relationship between HLA-G polymorphism and susceptibility to recurrent miscarriage: a meta-analysis of non-family-based studies. **J Assist Reprod Genet**, v. 31, n. 2, p. 173-84, Feb 2014. ISSN 1573-7330 (Electronic) 1058-0468 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24346507> >.

FERNANDEZ-MESSINA, L. et al. The human NKG2D ligand ULBP2 can be expressed at the cell surface with or without a GPI anchor and both forms can activate NK cells. **J Cell Sci**, v. 124, n. Pt 3, p. 321-7, Feb 1 2011. ISSN 1477-9137 (Electronic) 0021-9533 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21224393> >.

FERNANDEZ-MESSINA, L. et al. Differential mechanisms of shedding of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored NKG2D ligands. **J Biol Chem**, v. 285, n. 12, p. 8543-51, Mar 19 2010. ISSN 1083-351X (Electronic) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20080967> >.

FERNANDEZ-MESSINA, L.; REYBURN, H. T.; VALES-GOMEZ, M. Human NKG2D-ligands: cell biology strategies to ensure immune recognition. **Front Immunol**, v. 3, p. 299, 2012. ISSN 1664-3224 (Electronic) 1664-3224 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23056001> >.

FERRARETTI, A. P. et al. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. **Hum Reprod**, v. 26, n. 7, p. 1616-24, Jul 2011. ISSN 1460-2350 (Electronic) 0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21505041> >.

FINLEY, D.; CHAU, V. Ubiquitination. **Annu Rev Cell Biol**, v. 7, p. 25-69, 1991. ISSN 0743-4634 (Print)
0743-4634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1667082> >.

FLICK, K.; KAISER, P. Protein degradation and the stress response. **Semin Cell Dev Biol**, v. 23, n. 5, p. 515-22, Jul 2012. ISSN 1096-3634 (Electronic)
1084-9521 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22414377> >.

FONS, P. et al. Soluble HLA-G1 inhibits angiogenesis through an apoptotic pathway and by direct binding to CD160 receptor expressed by endothelial cells. **Blood**, v. 108, n. 8, p. 2608-15, Oct 15 2006. ISSN 0006-4971 (Print)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16809620> >.

FOURNEL, S. et al. Cutting edge: soluble HLA-G1 triggers CD95/CD95 ligand-mediated apoptosis in activated CD8+ cells by interacting with CD8. **J Immunol**, v. 164, n. 12, p. 6100-4, Jun 15 2000. ISSN 0022-1767 (Print)
0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10843658> >.

FRANGSMYR, L. et al. Cytoplasmic microvesicular form of Fas ligand in human early placenta: switching the tissue immune privilege hypothesis from cellular to vesicular level. **Mol Hum Reprod**, v. 11, n. 1, p. 35-41, Jan 2005. ISSN 1360-9947 (Print)
1360-9947 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15579659> >.

FRANZEN, C. A. et al. Characterization of uptake and internalization of exosomes by bladder cancer cells. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 619829, 2014. ISSN 2314-6141 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24575409> >.

FUJII, T.; ISHITANI, A.; GERAGHTY, D. E. A soluble form of the HLA-G antigen is encoded by a messenger ribonucleic acid containing intron 4. **J Immunol**, v. 153, n. 12, p. 5516-24, Dec 15 1994. ISSN 0022-1767 (Print)
0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7989753> >.

FUZZI, B. et al. HLA-G expression in early embryos is a fundamental prerequisite for the obtainment of pregnancy. **Eur J Immunol**, v. 32, n. 2, p. 311-5, Feb 2002. ISSN 0014-2980 (Print)
0014-2980 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11807769> >.

GAMBELUNGHE, G. et al. MICA A8: a new allele within MHC class I chain-related A transmembrane region with eight GCT repeats. **Hum Immunol**, v. 67, n. 12, p. 1005-7, Dec 2006. ISSN 0198-8859 (Print)
0198-8859 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17174750> >.

GARCIA, G. et al. Association of MICA and MICB alleles with symptomatic dengue infection. **Hum Immunol**, v. 72, n. 10, p. 904-7, Oct 2011. ISSN 1879-1166 (Electronic)
0198-8859 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21762746> >.

GASSER, S. et al. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. **Nature**, v. 436, n. 7054, p. 1186-90, Aug 25 2005. ISSN 1476-4687 (Electronic)
0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15995699> >.

GERAGHTY, D. E.; KOLLER, B. H.; ORR, H. T. A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 84, n. 24, p. 9145-9, Dec 1987. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3480534> >.

GERAGHTY, D. E. et al. Cloning and physical mapping of the HLA class I region spanning the HLA-E-to-HLA-F interval by using yeast artificial chromosomes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 7, p. 2669-73, Apr 1 1992. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1557372> >.

GERAGHTY, D. E. et al. Polymorphism at the HLA-E locus predates most HLA-A and -B polymorphism. **Hum Immunol**, v. 33, n. 3, p. 174-84, Mar 1992. ISSN 0198-8859 (Print) 0198-8859 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1618657> >.

GERMAIN, S. J. et al. Systemic inflammatory priming in normal pregnancy and preeclampsia: the role of circulating syncytiotrophoblast microparticles. **J Immunol**, v. 178, n. 9, p. 5949-56, May 1 2007. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17442979> >.

GIVAN, A. L. et al. Flow cytometric analysis of leukocytes in the human female reproductive tract: comparison of fallopian tube, uterus, cervix, and vagina. **Am J Reprod Immunol**, v. 38, n. 5, p. 350-9, Nov 1997. ISSN 1046-7408 (Print) 1046-7408 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9352027> >.

GONEN-GROSS, T. et al. Inhibitory NK receptor recognition of HLA-G: regulation by contact residues and by cell specific expression at the fetal-maternal interface. **PLoS One**, v. 5, n. 1, p. e8941, 2010. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20126612> >.

GONZALEZ, A. et al. The immunosuppressive molecule HLA-G and its clinical implications. **Crit Rev Clin Lab Sci**, v. 49, n. 3, p. 63-84, May-Jun 2012. ISSN 1549-781X (Electronic) 1040-8363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22537084> >.

GOSWAMI, D. et al. Excess syncytiotrophoblast microparticle shedding is a feature of early-onset pre-eclampsia, but not normotensive intrauterine growth restriction. **Placenta**, v. 27, n. 1, p. 56-61, Jan 2006. ISSN 0143-4004 (Print) 0143-4004 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16310038> >.

GOTSCH, F. et al. CXCL10/IP-10: a missing link between inflammation and anti-angiogenesis in preeclampsia? **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 20, n. 11, p. 777-92, Nov 2007. ISSN 1476-7058 (Print) 1476-4954 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17943641> >.

GRAHAM, C. H. et al. Localization of transforming growth factor-beta at the human fetal-maternal interface: role in trophoblast growth and differentiation. **Biol Reprod**, v. 46, n. 4, p. 561-72, Apr 1992. ISSN 0006-3363 (Print) 0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1374270> >.

GREGORI, S. et al. HLA-G Orchestrates the Early Interaction of Human Trophoblasts with the Maternal Niche. **Front Immunol**, v. 6, p. 128, 2015. ISSN 1664-3224 (Electronic)

1664-3224 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25870595> >.

GRIMSLEY, C.; OBER, C. Population genetic studies of HLA-E - Evidence for selection. **Human Immunology**, v. 52, n. 1, p. 33-40, Jan 1997. ISSN 0198-8859. Disponível em: < <Go to ISI>://A1997WF18600005 >.

GROH, V. et al. Costimulation of CD8 α T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. **Nat Immunol**, v. 2, n. 3, p. 255-60, Mar 2001. ISSN 1529-2908 (Print)
1529-2908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11224526> >.

GROH, V. et al. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. **Nature**, v. 419, n. 6908, p. 734-8, Oct 17 2002. ISSN 0028-0836 (Print)
0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12384702> >.

GROS, F. et al. Soluble HLA-G molecules impair natural killer/dendritic cell crosstalk via inhibition of dendritic cells. **Eur J Immunol**, v. 38, n. 3, p. 742-9, Mar 2008. ISSN 0014-2980 (Print)
0014-2980 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18266268> >.

GUILLAUDEUX, T. et al. The complete genomic sequence of 424,015 bp at the centromeric end of the HLA class I region: gene content and polymorphism. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 16, p. 9494-9, Aug 4 1998. ISSN 0027-8424 (Print)
0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9689108> >.

HACKMON, R. et al. HLA-G antigen and parturition: maternal serum, fetal serum and amniotic fluid levels during pregnancy. **Fetal Diagn Ther**, v. 19, n. 5, p. 404-9, Sep-Oct 2004. ISSN 1015-3837 (Print)
1015-3837 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15305096> >.

HANNA, N. et al. Gestational age-dependent expression of IL-10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts. **J Immunol**, v. 164, n. 11, p. 5721-8, Jun 1 2000. ISSN 0022-1767 (Print)
0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10820249> >.

HARRISON, G. A. et al. A 14 bp deletion polymorphism in the HLA-G gene. **Hum Mol Genet**, v. 2, n. 12, p. 2200, Dec 1993. ISSN 0964-6906 (Print)
0964-6906 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8111399> >.

HAYAKAWA, Y.; SMYTH, M. J. NKG2D and cytotoxic effector function in tumor immune surveillance. **Semin Immunol**, v. 18, n. 3, p. 176-85, Jun 2006. ISSN 1044-5323 (Print)
1044-5323 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16675266> >.

HEDLUND, M. et al. Human placenta expresses and secretes NKG2D ligands via exosomes that down-modulate the cognate receptor expression: evidence for immunosuppressive function. **J Immunol**, v. 183, n. 1, p. 340-51, Jul 1 2009. ISSN 1550-6606 (Electronic)
0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19542445> >.

HEINEMANN, A. et al. Tumor suppressive microRNAs miR-34a/c control cancer cell expression of ULBP2, a stress-induced ligand of the natural killer cell receptor NKG2D. **Cancer Res**, v. 72, n. 2, p. 460-71, Jan 15 2012. ISSN 1538-7445 (Electronic)

0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22102694> >.

HERNANDEZ-VALENCIA, M. et al. Insulin-like growth factor I, epidermal growth factor and transforming growth factor beta expression and their association with intrauterine fetal growth retardation, such as development during human pregnancy. **Diabetes Obes Metab**, v. 3, n. 6, p. 457-62, Dec 2001. ISSN 1462-8902 (Print)

1462-8902 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11903419> >.

HIGUMA-MYOJO, S. et al. Cytokine profile of natural killer cells in early human pregnancy. **Am J Reprod Immunol**, v. 54, n. 1, p. 21-9, Jul 2005. ISSN 1046-7408 (Print)

1046-7408 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15948769> >.

HIZEM, S. et al. Polymorphisms in genes coding for the NK-cell receptor NKG2D and its ligand MICA in recurrent miscarriage. **Am J Reprod Immunol**, v. 72, n. 6, p. 577-85, Dec 2014. ISSN 1600-0897 (Electronic)

1046-7408 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25203601> >.

HOLDER, B. S. et al. Heightened pro-inflammatory effect of preeclamptic placental microvesicles on peripheral blood immune cells in humans. **Biol Reprod**, v. 86, n. 4, p. 103, Apr 2012. ISSN 1529-7268 (Electronic)

0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22205696> >.

HORUZSKO, A. et al. Maturation of antigen-presenting cells is compromised in HLA-G transgenic mice. **Int Immunol**, v. 13, n. 3, p. 385-94, Mar 2001. ISSN 0953-8178 (Print)

0953-8178 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11222508> >.

HUE, S. et al. A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. **Immunity**, v. 21, n. 3, p. 367-77, Sep 2004. ISSN 1074-7613 (Print)

1074-7613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15357948> >.

HUNT, J. S. et al. Soluble HLA-G circulates in maternal blood during pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, v. 183, n. 3, p. 682-8, Sep 2000. ISSN 0002-9378 (Print)

0002-9378 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10992193> >.

HUNT, J. S. et al. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. **FASEB J**, v. 19, n. 7, p. 681-93, May 2005. ISSN 1530-6860 (Electronic)

0892-6638 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15857883> >.

HUNTER, C. A.; REINER, S. L. Cytokines and T cells in host defense. **Curr Opin Immunol**, v. 12, n. 4, p. 413-8, Aug 2000. ISSN 0952-7915 (Print)

0952-7915 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10899023> >.

HUNTER, M. P. et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. **PLoS One**, v. 3, n. 11, p. e3694, 2008. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19002258> >.

HVIID, T. V. et al. HLA-G polymorphisms in couples with recurrent spontaneous abortions. **Tissue Antigens**, v. 60, n. 2, p. 122-32, Aug 2002. ISSN 0001-2815 (Print)

0001-2815 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12392506> >.

HVIID, T. V. et al. Association between human leukocyte antigen-G genotype and success of in vitro fertilization and pregnancy outcome. **Tissue Antigens**, v. 64, n. 1, p. 66-9, Jul 2004. ISSN 0001-2815 (Print)

0001-2815 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15191524> >.

HVIID, T. V. et al. HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels. **Immunogenetics**, v. 55, n. 2, p. 63-79, May 2003. ISSN 0093-7711 (Print)

0093-7711 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12712263> >.

HVIID, T. V. et al. HLA-G and IL-10 in serum in relation to HLA-G genotype and polymorphisms. **Immunogenetics**, v. 56, n. 3, p. 135-41, Jun 2004. ISSN 0093-7711 (Print)

0093-7711 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15133645> >.

HVIID, T. V. et al. Polymorphism in the 5' upstream regulatory and 3' untranslated regions of the HLA-G gene in relation to soluble HLA-G and IL-10 expression. **Hum Immunol**, v. 67, n. 1-2, p. 53-62, Jan-Feb 2006. ISSN 0198-8859 (Print)

0198-8859 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16698426> >.

ISHITANI, A.; GERAGHTY, D. E. Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 9, p. 3947-51, May 1 1992. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1570318> >.

ISHITANI, A.; SAGESHIMA, N.; HATAKE, K. The involvement of HLA-E and -F in pregnancy. **J Reprod Immunol**, v. 69, n. 2, p. 101-13, Apr 2006. ISSN 0165-0378 (Print)

0165-0378 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16487601> >.

ISHITANI, A. et al. Protein expression and peptide binding suggest unique and interacting functional roles for HLA-E, F, and G in maternal-placental immune recognition. **J Immunol**, v. 171, n. 3, p. 1376-84, Aug 1 2003. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12874228> >.

IWASZKO, M.; BOGUNIA-KUBIK, K. Clinical significance of the HLA-E and CD94/NKG2 interaction. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 59, n. 5, p. 353-67, Oct 2011. ISSN 1661-4917 (Electronic)

0004-069X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21800130> >.

JANER, M.; GERAGHTY, D. E. The human major histocompatibility complex: 42,221 bp of genomic sequence, high-density sequence-tagged site map, evolution, and polymorphism for HLA class I. **Genomics**, v. 51, n. 1, p. 35-44, Jul 1 1998. ISSN 0888-7543 (Print)

0888-7543 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9693031> >.

Ji, M. et al. MICA polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis. **Int J Clin Exp Med**, v. 8, n. 1, p. 818-26, 2015. ISSN 1940-5901 (Electronic)

1940-5901 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25785062> >.

JINUSHI, M. et al. Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on IFN- α -stimulated dendritic cells in NK cell activation: impairment in chronic hepatitis C virus infection. **J Immunol**, v. 170, n. 3, p. 1249-56, Feb 1 2003. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12538683> >.

JOHNSTONE, R. M. et al. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). **J Biol Chem**, v. 262, n. 19, p. 9412-20, Jul 5 1987. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3597417> >.

JOLY, E.; HUDRISIER, D. What is trogocytosis and what is its purpose? **Nat Immunol**, v. 4, n. 9, p. 815, Sep 2003. ISSN 1529-2908 (Print)
1529-2908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12942076> >.

KANAI, T. et al. Polymorphism of human leukocyte antigen-E gene in the Japanese population with or without recurrent abortion. **Am J Reprod Immunol**, v. 45, n. 3, p. 168-73, Mar 2001. ISSN 1046-7408 (Print)
1046-7408 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11270642> >.

KANAI, T. et al. Soluble HLA-G influences the release of cytokines from allogeneic peripheral blood mononuclear cells in culture. **Mol Hum Reprod**, v. 7, n. 2, p. 195-200, Feb 2001. ISSN 1360-9947 (Print)
1360-9947 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11160846> >.

KAUFMAN, J. F. et al. The class II molecules of the human and murine major histocompatibility complex. **Cell**, v. 36, n. 1, p. 1-13, Jan 1984. ISSN 0092-8674 (Print)
0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6198089> >.

KELLER, S. et al. CD24 is a marker of exosomes secreted into urine and amniotic fluid. **Kidney Int**, v. 72, n. 9, p. 1095-102, Nov 2007. ISSN 0085-2538 (Print)
0085-2538 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17700640> >.

KHARAZIHA, P. et al. Tumor cell-derived exosomes: a message in a bottle. **Biochim Biophys Acta**, v. 1826, n. 1, p. 103-11, Aug 2012. ISSN 0006-3002 (Print)
0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22503823> >.

KIM, J. H. et al. Gram-negative and Gram-positive bacterial extracellular vesicles. **Semin Cell Dev Biol**, v. 40, p. 97-104, Apr 2015. ISSN 1096-3634 (Electronic)
1084-9521 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25704309> >.

KIM, J. W. et al. Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 3, p. 1010-20, Feb 1 2005. ISSN 1078-0432 (Print)
1078-0432 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15709166> >.

KING, A. et al. Human uterine lymphocytes. **Hum Reprod Update**, v. 4, n. 5, p. 480-5, Sep-Oct 1998. ISSN 1355-4786 (Print)
1355-4786 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10027599> >.

KOOT, Y. E. et al. Molecular aspects of implantation failure. **Biochim Biophys Acta**, v. 1822, n. 12, p. 1943-50, Dec 2012. ISSN 0006-3002 (Print)
0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22683339> >.

KORDELAS, L. et al. MSC-derived exosomes: a novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease. **Leukemia**, v. 28, n. 4, p. 970-3, Apr 2014. ISSN 1476-5551 (Electronic)

0887-6924 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24445866> >.

KOVATS, S. et al. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. **Science**, v. 248, n. 4952, p. 220-3, Apr 13 1990. ISSN 0036-8075 (Print)
0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2326636> >.

KRAEMER, T.; BLASCZYK, R.; BADE-DOEDING, C. HLA-E: a novel player for histocompatibility. **J Immunol Res**, v. 2014, p. 352160, 2014. ISSN 2314-7156 (Electronic)
2314-7156 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25401109> >.

KSHIRSAGAR, S. K. et al. Immunomodulatory molecules are released from the first trimester and term placenta via exosomes. **Placenta**, v. 33, n. 12, p. 982-90, Dec 2012. ISSN 1532-3102 (Electronic)
0143-4004 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23107341> >.

KWAK-KIM, J. et al. Immunological modes of pregnancy loss. **Am J Reprod Immunol**, v. 63, n. 6, p. 611-23, Jun 2010. ISSN 1600-0897 (Electronic)
1046-7408 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20367626> >.

KWAK-KIM, J. Y. et al. Increased T helper 1 cytokine responses by circulating T cells are present in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with multiple implantation failures after IVF. **Hum Reprod**, v. 18, n. 4, p. 767-73, Apr 2003. ISSN 0268-1161 (Print)
0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12660269> >.

LAHIRI, D. K.; NURNBERGER, J. I., JR. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Res**, v. 19, n. 19, p. 5444, Oct 11 1991. ISSN 0305-1048 (Print)
0305-1048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1681511> >.

LAMAR, D. L.; WEYAND, C. M.; GORONZY, J. J. Promoter choice and translational repression determine cell type-specific cell surface density of the inhibitory receptor CD85j expressed on different hematopoietic lineages. **Blood**, v. 115, n. 16, p. 3278-86, Apr 22 2010. ISSN 1528-0020 (Electronic)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20194892> >.

LAMM, L. U.; OLAISEN, B. Report of the Committee on the Genetic Constitution of Chromosomes 5 and 6. **Cytogenet Cell Genet**, v. 40, n. 1-4, p. 128-55, 1985. ISSN 0301-0171 (Print)
0301-0171 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3864592> >.

LANIER, L. L. NK cell recognition. **Annu Rev Immunol**, v. 23, p. 225-74, 2005. ISSN 0732-0582 (Print)
0732-0582 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15771571> >.

LASHLEY, L. E. et al. Maternal HLA-C2 and 14 bp insertion in HLA-G is associated with recurrent implantation failure after in vitro fertilization treatment. **Tissue Antigens**, v. 84, n. 6, p. 536-44, Dec 2014. ISSN 1399-0039 (Electronic)
0001-2815 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25367742> >.

LE BOUTEILLER, P.; LEGRAND-ABRAVANEL, F.; SOLIER, C. Soluble HLA-G1 at the materno-foetal interface--a review. **Placenta**, v. 24 Suppl A, p. S10-5, Apr 2003. ISSN 0143-4004 (Print)

0143-4004 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12842408> >.

LE DISCORDE, M. et al. HLA-G*0105N null allele encodes functional HLA-G isoforms. **Biol Reprod**, v. 73, n. 2, p. 280-8, Aug 2005. ISSN 0006-3363 (Print)

0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15814900> >.

LEE, N. et al. HLA-E surface expression depends on binding of TAP-dependent peptides derived from certain HLA class I signal sequences. **Journal of Immunology**, v. 160, n. 10, p. 4951-4960, May 15 1998. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <Go to ISI>://000073500000035 >.

LEELAYUWAT, C. et al. A new polymorphic and multicopy MHC gene family related to nonmammalian class I. **Immunogenetics**, v. 40, n. 5, p. 339-51, 1994. ISSN 0093-7711 (Print)

0093-7711 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7927538> >.

LEMAOULT, J. et al. Immune regulation by pretenders: cell-to-cell transfers of HLA-G make effector T cells act as regulatory cells. **Blood**, v. 109, n. 5, p. 2040-8, Mar 1 2007. ISSN 0006-4971 (Print)

0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17077329> >.

LEMAOULT, J. et al. HLA-G1-expressing antigen-presenting cells induce immunosuppressive CD4+ T cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 18, p. 7064-9, May 4 2004. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15103024> >.

LEMAOULT, J.; ROUAS-FREISS, N.; CAROSELLA, E. D. Immuno-tolerogenic functions of HLA-G: relevance in transplantation and oncology. **Autoimmun Rev**, v. 4, n. 8, p. 503-9, Nov 2005. ISSN 1568-9972 (Print)

1568-9972 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16214086> >.

LI, J. et al. Induction of TCR Vbeta-specific CD8+ CTLs by TCR Vbeta-derived peptides bound to HLA-E. **J Immunol**, v. 167, n. 7, p. 3800-8, Oct 1 2001. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11564797> >.

LI, P. et al. Crystal structure of the MHC class I homolog MIC-A, a gammadelta T cell ligand. **Immunity**, v. 10, n. 5, p. 577-84, May 1999. ISSN 1074-7613 (Print)

1074-7613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10367903> >.

LIN, J. et al. Exosomes: novel biomarkers for clinical diagnosis. **ScientificWorldJournal**, v. 2015, p. 657086, 2015. ISSN 1537-744X (Electronic)

1537-744X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25695100> >.

LIU, X. X.; PAN, F. H.; TIAN, W. Characterization of HLA-E polymorphism in four distinct populations in Mainland China. **Tissue Antigens**, v. 80, n. 1, p. 26-35, Jul 2012. ISSN 1399-0039 (Electronic)

0001-2815 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22486789> >.

LIU, Y.; LU, Q. Extracellular vesicle microRNAs: biomarker discovery in various diseases based on RT-qPCR. **Biomark Med**, v. 9, n. 8, p. 791-805, 2015. ISSN 1752-0371 (Electronic) 1752-0363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26287938> >.

LLANO, M. et al. HLA-E-bound peptides influence recognition by inhibitory and triggering CD94/NKG2 receptors: preferential response to an HLA-G-derived nonamer. **Eur J Immunol**, v. 28, n. 9, p. 2854-63, Sep 1998. ISSN 0014-2980 (Print) 0014-2980 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9754572> >.

LOPEZ-HERNANDEZ, R. et al. Association analysis of MICA gene polymorphism and MICA-129 dimorphism with inflammatory bowel disease susceptibility in a Spanish population. **Hum Immunol**, v. 71, n. 5, p. 512-4, May 2010. ISSN 1879-1166 (Electronic) 0198-8859 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20152875> >.

LOTVALL, J. et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. **J Extracell Vesicles**, v. 3, p. 26913, 2014. ISSN 2001-3078 (Electronic) 2001-3078 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25536934> >.

LUDWIG, A. K.; GIEBEL, B. Exosomes: small vesicles participating in intercellular communication. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 44, n. 1, p. 11-5, Jan 2012. ISSN 1878-5875 (Electronic) 1357-2725 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22024155> >.

MACHTINGER, R.; LAURENT, L. C.; BACCARELLI, A. A. Extracellular vesicles: roles in gamete maturation, fertilization and embryo implantation. **Hum Reprod Update**, Dec 9 2015. ISSN 1460-2369 (Electronic) 1355-4786 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26663221> >.

MANDO, C. et al. Maternal and fetal HLA-G 14 bp gene polymorphism in pregnancy-induced hypertension, preeclampsia, intrauterine growth restricted and normal pregnancies. **J Matern Fetal Neonatal Med**, p. 1-6, Jun 26 2015. ISSN 1476-4954 (Electronic) 1476-4954 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26115230> >.

MANTEL, P. Y.; MARTI, M. The role of extracellular vesicles in Plasmodium and other protozoan parasites. **Cell Microbiol**, v. 16, n. 3, p. 344-54, Mar 2014. ISSN 1462-5822 (Electronic) 1462-5814 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24406102> >.

MARGALIOTH, E. J. et al. Investigation and treatment of repeated implantation failure following IVF-ET. **Hum Reprod**, v. 21, n. 12, p. 3036-43, Dec 2006. ISSN 0268-1161 (Print) 0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16905766> >.

MARIN, M. L. et al. MICA polymorphism in a sample of the Sao Paulo population, Brazil. **Eur J Immunogenet**, v. 31, n. 2, p. 63-71, Apr 2004. ISSN 0960-7420 (Print) 0960-7420 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15086345> >.

MEDAWAR, P. B. Some Immunological and Endocrinological Problems Raised by the Evolution of Viviparity in Vertebrates. **Symposia of the Society for Experimental Biology**,

v. 7, p. 320-338, 1953. ISSN 0081-1386. Disponível em: < <Go to ISI>://A1953YA05900019 >.

MICHAELSSON, J. et al. A signal peptide derived from hsp60 binds HLA-E and interferes with CD94/NKG2A recognition. **J Exp Med**, v. 196, n. 11, p. 1403-14, Dec 2 2002. ISSN 0022-1007 (Print)
0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12461076> >.

MIKI, A. et al. Human lymphocytes obtained from decidual tissue express killer activatory receptors as well as killer inhibitory receptors: analysis using a single strand conformation polymorphism method. **Am J Reprod Immunol**, v. 39, n. 4, p. 271-8, Apr 1998. ISSN 1046-7408 (Print)
1046-7408 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9553652> >.

MINCHEVA-NILSSON, L. Immune cells and molecules in pregnancy: friends or foes to the fetus? **Expert Rev Clin Immunol**, v. 2, n. 3, p. 457-70, May 2006. ISSN 1744-8409 (Electronic)
1744-666X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20476916> >.

MINCHEVA-NILSSON, L.; BARANOV, V. The role of placental exosomes in reproduction. **Am J Reprod Immunol**, v. 63, n. 6, p. 520-33, Jun 2010. ISSN 1600-0897 (Electronic)
1046-7408 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20331583> >.

MINCHEVA-NILSSON, L.; BARANOV, V. Placenta-derived exosomes and syncytiotrophoblast microparticles and their role in human reproduction: immune modulation for pregnancy success. **Am J Reprod Immunol**, v. 72, n. 5, p. 440-57, Nov 2014. ISSN 1600-0897 (Electronic)
1046-7408 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25164206> >.

MINCHEVA-NILSSON, L. et al. Placenta-derived soluble MHC class I chain-related molecules down-regulate NKG2D receptor on peripheral blood mononuclear cells during human pregnancy: a possible novel immune escape mechanism for fetal survival. **J Immunol**, v. 176, n. 6, p. 3585-92, Mar 15 2006. ISSN 0022-1767 (Print)
0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16517727> >.

MISTRY, A. R.; O'CALLAGHAN, C. A. Regulation of ligands for the activating receptor NKG2D. **Immunology**, v. 121, n. 4, p. 439-47, Aug 2007. ISSN 0019-2805 (Print)
0019-2805 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17614877> >.

MITCHELL, M. D. et al. Placental exosomes in normal and complicated pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, v. 213, n. 4 Suppl, p. S173-81, Oct 2015. ISSN 1097-6868 (Electronic)
0002-9378 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26428497> >.

MIZUKI, N. et al. Association of Major Histocompatibility Complex Class I Chain-Related Gene A and HLA-B Alleles with Behcet's Disease in Turkey. **Jpn J Ophthalmol**, v. 51, n. 6, p. 431-6, Nov-Dec 2007. ISSN 0021-5155 (Print)
0021-5155 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18158593> >.

MIZUKI, N. et al. Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: a strong association of six GCT repetitions with Behcet disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 4, p. 1298-303, Feb 18 1997. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9037047> >.

MORALES, P. J. et al. Synthesis of beta(2)-microglobulin-free, disulphide-linked HLA-G5 homodimers in human placental villous cytotrophoblast cells. **Immunology**, v. 122, n. 2, p. 179-88, Oct 2007. ISSN 0019-2805 (Print)

0019-2805 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17484767> >.

MUELLER-ECKHARDT, G. et al. Immunogenetic and serological investigations in nonpregnant and in pregnant women with a history of recurrent spontaneous abortions. German RSA/IVIG Study Group. **J Reprod Immunol**, v. 27, n. 2, p. 95-109, Oct 1994. ISSN 0165-0378 (Print)

0165-0378 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7884745> >.

MULCAHY, L. A.; PINK, R. C.; CARTER, D. R. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. **J Extracell Vesicles**, v. 3, 2014. ISSN 2001-3078 (Electronic)

2001-3078 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25143819> >.

MYERS, E. R. Repeated In Vitro Fertilization Cycles for Infertility. **JAMA**, v. 314, n. 24, p. 2627-9, Dec 22 2015. ISSN 1538-3598 (Electronic)

0098-7484 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26717028> >.

NUCKEL, H. et al. The prognostic significance of soluble NKG2D ligands in B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Leukemia**, v. 24, n. 6, p. 1152-9, Jun 2010. ISSN 1476-5551 (Electronic)

0887-6924 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20428196> >.

O'CALLAGHAN, C. A. Molecular basis of human natural killer cell recognition of HLA-E (human leucocyte antigen-E) and its relevance to clearance of pathogen-infected and tumour cells. **Clin Sci (Lond)**, v. 99, n. 1, p. 9-17, Jul 2000. ISSN 0143-5221 (Print)

0143-5221 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10887053> >.

OBBER, C.; ALDRICH, C. L. HLA-G polymorphisms: neutral evolution or novel function? **J Reprod Immunol**, v. 36, n. 1-2, p. 1-21, Nov 30 1997. ISSN 0165-0378 (Print)

0165-0378 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9430736> >.

OBBER, C. et al. Variation in the HLA-G promoter region influences miscarriage rates. **Am J Hum Genet**, v. 72, n. 6, p. 1425-35, Jun 2003. ISSN 0002-9297 (Print)

0002-9297 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12721954> >.

OBBER, C. et al. The miscarriage-associated HLA-G -725G allele influences transcription rates in JEG-3 cells. **Hum Reprod**, v. 21, n. 7, p. 1743-8, Jul 2006. ISSN 0268-1161 (Print)

0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16501035> >.

OLAISEN, B. et al. Gene order and gene distances in the HLA region studied by the haplotype method. **Ann Hum Genet**, v. 47, n. Pt 4, p. 285-92, Oct 1983. ISSN 0003-4800 (Print)

0003-4800 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6418058> >.

OMBELET, W. et al. Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries. **Hum Reprod Update**, v. 14, n. 6, p. 605-21, Nov-Dec 2008. ISSN 1460-2369 (Electronic)

1355-4786 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18820005> >.

ORESHKOVA, T.; DIMITROV, R.; MOURDJEVA, M. A cross-talk of decidual stromal cells, trophoblast, and immune cells: a prerequisite for the success of pregnancy. **Am J Reprod Immunol**, v. 68, n. 5, p. 366-73, Nov 2012. ISSN 1600-0897 (Electronic) 1046-7408 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22672047> >.

PAN, B. T. et al. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. **J Cell Biol**, v. 101, n. 3, p. 942-8, Sep 1985. ISSN 0021-9525 (Print) 0021-9525 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2993317> >.

PARK, G. M. et al. Soluble HLA-G generated by proteolytic shedding inhibits NK-mediated cell lysis. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 313, n. 3, p. 606-11, Jan 16 2004. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14697234> >.

PASCHEN, A. et al. Differential clinical significance of individual NKG2D ligands in melanoma: soluble ULBP2 as an indicator of poor prognosis superior to S100B. **Clin Cancer Res**, v. 15, n. 16, p. 5208-15, Aug 15 2009. ISSN 1078-0432 (Print) 1078-0432 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19671853> >.

PAUL, P. et al. Identification of HLA-G7 as a new splice variant of the HLA-G mRNA and expression of soluble HLA-G5, -G6, and -G7 transcripts in human transfected cells. **Hum Immunol**, v. 61, n. 11, p. 1138-49, Nov 2000. ISSN 0198-8859 (Print) 0198-8859 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11137219> >.

PAUL, P. et al. HLA-G, -E, -F preworkshop: tools and protocols for analysis of non-classical class I genes transcription and protein expression. **Hum Immunol**, v. 61, n. 11, p. 1177-95, Nov 2000. ISSN 0198-8859 (Print) 0198-8859 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11137224> >.

PAULI, S. A. et al. Current status of the approach to assisted reproduction. **Pediatr Clin North Am**, v. 56, n. 3, p. 467-88, Table of Contents, Jun 2009. ISSN 1557-8240 (Electronic) 0031-3955 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19501687> >.

PFEIFFER, K. A. et al. The HLA-G genotype is potentially associated with idiopathic recurrent spontaneous abortion. **Mol Hum Reprod**, v. 7, n. 4, p. 373-8, Apr 2001. ISSN 1360-9947 (Print) 1360-9947 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11279300> >.

PORCU-BUISSON, G. et al. Soluble MHC Class I chain-related molecule serum levels are predictive markers of implantation failure and successful term pregnancies following IVF. **Hum Reprod**, v. 22, n. 8, p. 2261-6, Aug 2007. ISSN 0268-1161 (Print) 0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17586836> >.

RADAEV, S. et al. Conformational plasticity revealed by the cocrystal structure of NKG2D and its class I MHC-like ligand ULBP3. **Immunity**, v. 15, n. 6, p. 1039-49, Dec 2001. ISSN 1074-7613 (Print) 1074-7613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11754823> >.

RAGHUPATHY, R. et al. Maternal Th1- and Th2-type reactivity to placental antigens in normal human pregnancy and unexplained recurrent spontaneous abortions. **Cell Immunol**, v. 196, n. 2, p. 122-30, Sep 15 1999. ISSN 0008-8749 (Print) 0008-8749 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10527564> >.

RAJAGOPALAN, S.; LONG, E. O. A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. **J Exp Med**, v. 189, n. 7, p. 1093-100, Apr 5 1999. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10190900> >.

RAMMENSEE, H. G.; FRIEDE, T.; STEVANOVIIC, S. MHC ligands and peptide motifs: first listing. **Immunogenetics**, v. 41, n. 4, p. 178-228, 1995. ISSN 0093-7711 (Print) 0093-7711 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7890324> >.

RAPOSO, G. et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. **J Exp Med**, v. 183, n. 3, p. 1161-72, Mar 1 1996. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8642258> >.

RAVINDRANATH, M. H. et al. Anti-HLA-E mAb 3D12 mimics MEM-E/02 in binding to HLA-B and HLA-C alleles: Web-tools validate the immunogenic epitopes of HLA-E recognized by the antibodies. **Mol Immunol**, v. 48, n. 4, p. 423-30, Jan 2011. ISSN 1872-9142 (Electronic) 0161-5890 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21145594> >.

RAZIEL, A. et al. Increased frequency of female partner chromosomal abnormalities in patients with high-order implantation failure after in vitro fertilization. **Fertil Steril**, v. 78, n. 3, p. 515-9, Sep 2002. ISSN 0015-0282 (Print) 0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12215326> >.

REBMANN, V. et al. HLA-G as a tolerogenic molecule in transplantation and pregnancy. **J Immunol Res**, v. 2014, p. 297073, 2014. ISSN 2314-7156 (Electronic) 2314-7156 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25143957> >.

REBMANN, V. et al. Report of the Wet Workshop for Quantification of Soluble HLA-G in Essen, 2004. **Hum Immunol**, v. 66, n. 8, p. 853-63, Aug 2005. ISSN 0198-8859 (Print) 0198-8859 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16216668> >.

_____. Quantification and identification of soluble HLA-G isoforms. **Tissue Antigens**, v. 69 Suppl 1, p. 143-9, Apr 2007. ISSN 0001-2815 (Print) 0001-2815 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17445190> >.

REBMANN, V. et al. Detection of soluble HLA-G molecules in plasma and amniotic fluid. **Tissue Antigens**, v. 53, n. 1, p. 14-22, Jan 1999. ISSN 0001-2815 (Print) 0001-2815 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10082427> >.

REBMANN, V. et al. Soluble HLA-G is an independent factor for the prediction of pregnancy outcome after ART: a German multi-centre study. **Hum Reprod**, v. 25, n. 7, p. 1691-8, Jul 2010. ISSN 1460-2350 (Electronic) 0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20488801> >.

REBMANN, V. et al. Rapid evaluation of soluble HLA-G levels in supernatants of in vitro fertilized embryos. **Hum Immunol**, v. 68, n. 4, p. 251-8, Apr 2007. ISSN 0198-8859 (Print) 0198-8859 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17400060> >.

REBMANN, V. et al. Association of soluble HLA-G plasma levels with HLA-G alleles. **Tissue Antigens**, v. 57, n. 1, p. 15-21, Jan 2001. ISSN 0001-2815 (Print) 0001-2815 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11169254> >.

REDMAN, C. W.; SARGENT, I. L. Placental debris, oxidative stress and pre-eclampsia. **Placenta**, v. 21, n. 7, p. 597-602, Sep 2000. ISSN 0143-4004 (Print) 0143-4004 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10985960> >.

REDMAN, C. W.; SARGENT, I. L. Microparticles and immunomodulation in pregnancy and pre-eclampsia. **J Reprod Immunol**, v. 76, n. 1-2, p. 61-7, Dec 2007. ISSN 0165-0378 (Print) 0165-0378 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17482271> >.

REDMAN, C. W.; SARGENT, I. L. Circulating microparticles in normal pregnancy and pre-eclampsia. **Placenta**, v. 29 Suppl A, p. S73-7, Mar 2008. ISSN 0143-4004 (Print) 0143-4004 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18192006> >.

REDMAN, C. W. et al. Review: Does size matter? Placental debris and the pathophysiology of pre-eclampsia. **Placenta**, v. 33 Suppl, p. S48-54, Feb 2012. ISSN 1532-3102 (Electronic) 0143-4004 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22217911> >.

RISTICH, V. et al. Tolerization of dendritic cells by HLA-G. **Eur J Immunol**, v. 35, n. 4, p. 1133-42, Apr 2005. ISSN 0014-2980 (Print) 0014-2980 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15770701> >.

RITEAU, B. et al. Exosomes bearing HLA-G are released by melanoma cells. **Hum Immunol**, v. 64, n. 11, p. 1064-72, Nov 2003. ISSN 0198-8859 (Print) 0198-8859 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14602237> >.

RITEAU, B. et al. HLA-G2, -G3, and -G4 isoforms expressed as nonmature cell surface glycoproteins inhibit NK and antigen-specific CTL cytotoxicity. **J Immunol**, v. 166, n. 8, p. 5018-26, Apr 15 2001. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11290782> >.

RIZZO, R. et al. The importance of HLA-G expression in embryos, trophoblast cells, and embryonic stem cells. **Cell Mol Life Sci**, v. 68, n. 3, p. 341-52, Feb 2011. ISSN 1420-9071 (Electronic) 1420-682X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21080028> >.

ROBINSON, J. et al. MICA sequences 2000. **Immunogenetics**, v. 53, n. 2, p. 150-69, Mar 2001. ISSN 0093-7711 (Print) 0093-7711 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11345592> >.

ROMAGNANI, C. et al. Identification of HLA-E-specific alloreactive T lymphocytes: a cell subset that undergoes preferential expansion in mixed lymphocyte culture and displays a broad cytolytic activity against allogeneic cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 17, p. 11328-33, Aug 20 2002. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12167676> >.

ROUAS-FREISS, N. et al. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytolysis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 21, p. 11520-5, Oct 14 1997. ISSN 0027-8424 (Print)
0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9326642> >.

ROUSSEAU, P. et al. The 14 bp deletion-insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. **Hum Immunol**, v. 64, n. 11, p. 1005-10, Nov 2003. ISSN 0198-8859 (Print)
0198-8859 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14602228> >.

ROUSSEV, R. G.; COULAM, C. B. HLA-G and its role in implantation (review). **J Assist Reprod Genet**, v. 24, n. 7, p. 288-95, Jul 2007. ISSN 1058-0468 (Print)
1058-0468 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17629722> >.

RUEDA, B. et al. A new allele within the transmembrane region of the human MICA gene with seven GCT repeats. **Tissue Antigens**, v. 60, n. 6, p. 526-8, Dec 2002. ISSN 0001-2815 (Print)
0001-2815 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12542746> >.

SAITO, S. et al. Cytokine production by CD16-CD56bright natural killer cells in the human early pregnancy decidua. **Int Immunol**, v. 5, n. 5, p. 559-63, May 1993. ISSN 0953-8178 (Print)
0953-8178 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7686393> >.

SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. **Cell**, v. 101, n. 5, p. 455-8, May 26 2000. ISSN 0092-8674 (Print)
0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10850488> >.

SALERNO-GONCALVES, R. et al. Identification of a human HLA-E-restricted CD8+ T cell subset in volunteers immunized with Salmonella enterica serovar Typhi strain Ty21a typhoid vaccine. **J Immunol**, v. 173, n. 9, p. 5852-62, Nov 1 2004. ISSN 0022-1767 (Print)
0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15494539> >.

SALOMON, C. et al. A gestational profile of placental exosomes in maternal plasma and their effects on endothelial cell migration. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e98667, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic)
1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24905832> >.

SARKER, S. et al. Placenta-derived exosomes continuously increase in maternal circulation over the first trimester of pregnancy. **J Transl Med**, v. 12, p. 204, 2014. ISSN 1479-5876 (Electronic)
1479-5876 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25104112> >.

SAVERINO, D. et al. The CD85/LIR-1/ILT2 inhibitory receptor is expressed by all human T lymphocytes and down-regulates their functions. **J Immunol**, v. 165, n. 7, p. 3742-55, Oct 1 2000. ISSN 0022-1767 (Print)
0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11034379> >.

SCHRAMBACH, S. et al. In vivo expression pattern of MICA and MICB and its relevance to auto-immunity and cancer. **PLoS One**, v. 2, n. 6, p. e518, 2007. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17565371> >.

SHER, G. et al. Soluble human leukocyte antigen G expression in phase I culture media at 46 hours after fertilization predicts pregnancy and implantation from day 3 embryo transfer. **Fertil Steril**, v. 83, n. 5, p. 1410-3, May 2005. ISSN 1556-5653 (Electronic)

0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15866577> >.

SIMPSON, H. et al. Transforming growth factor beta expression in human placenta and placental bed during early pregnancy. **Placenta**, v. 23, n. 1, p. 44-58, Jan 2002. ISSN 0143-4004 (Print)

0143-4004 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11869091> >.

SINGH, M. et al. Changes in maternal serum transforming growth factor beta-1 during pregnancy: a cross-sectional study. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 318464, 2013. ISSN 2314-6141 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24350258> >.

SIPAK-SZMIGIEL, O. et al. HLA-G polymorphism in a Polish population and reproductive failure. **Tissue Antigens**, v. 71, n. 1, p. 67-71, Jan 2008. ISSN 0001-2815 (Print)

0001-2815 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17971055> >.

SOHDA, M.; MISUMI, Y.; ODA, K. TNFalpha triggers release of extracellular vesicles containing TNFR1 and TRADD, which can modulate TNFalpha responses of the parental cells. **Arch Biochem Biophys**, v. 587, p. 31-37, Oct 16 2015. ISSN 1096-0384 (Electronic)

0003-9861 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26475675> >.

SOKOLOVA, V. et al. Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 87, n. 1, p. 146-50, Oct 1 2011. ISSN 1873-4367 (Electronic)

0927-7765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21640565> >.

SONG, H. et al. Soluble ULBP suppresses natural killer cell activity via down-regulating NKG2D expression. **Cell Immunol**, v. 239, n. 1, p. 22-30, Jan 2006. ISSN 0008-8749 (Print)

0008-8749 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16630603> >.

SOUTHCORBE, J. et al. The immunomodulatory role of syncytiotrophoblast microvesicles. **PLoS One**, v. 6, n. 5, p. e20245, 2011. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21633494> >.

STEFFENSEN, R. et al. HLA-E polymorphism in patients with recurrent spontaneous abortion. **Tissue Antigens**, v. 52, n. 6, p. 569-72, Dec 1998. ISSN 0001-2815 (Print)

0001-2815 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9894856> >.

STEINBORN, A. et al. Early detection of decreased soluble HLA-G levels in the maternal circulation predicts the occurrence of preeclampsia and intrauterine growth retardation during further course of pregnancy. **Am J Reprod Immunol**, v. 57, n. 4, p. 277-86, Apr 2007. ISSN 1046-7408 (Print)

1046-7408 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17362389> >.

STEINLE, A. et al. Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. **Immunogenetics**, v. 53, n. 4, p. 279-87, May-Jun 2001. ISSN 0093-7711 (Print)
0093-7711 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11491531> >.

STEINMETZ, M.; HOOD, L. Genes of the major histocompatibility complex in mouse and man. **Science**, v. 222, n. 4625, p. 727-33, Nov 18 1983. ISSN 0036-8075 (Print)
0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6356354> >.

STENQVIST, A. C. et al. Exosomes secreted by human placenta carry functional Fas ligand and TRAIL molecules and convey apoptosis in activated immune cells, suggesting exosome-mediated immune privilege of the fetus. **J Immunol**, v. 191, n. 11, p. 5515-23, Dec 1 2013. ISSN 1550-6606 (Electronic)
0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24184557> >.

STEPHENS, H. A. MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved? **Trends Immunol**, v. 22, n. 7, p. 378-85, Jul 2001. ISSN 1471-4906 (Print)
1471-4906 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11429322> >.

STERN, L. J.; WILEY, D. C. Antigenic peptide binding by class I and class II histocompatibility proteins. **Structure**, v. 2, n. 4, p. 245-51, Apr 15 1994. ISSN 0969-2126 (Print)
0969-2126 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8087551> >.

STRANDELL, A.; LINDHARD, A.; ECKERLUND, I. Cost-effectiveness analysis of salpingectomy prior to IVF, based on a randomized controlled trial. **Hum Reprod**, v. 20, n. 12, p. 3284-92, Dec 2005. ISSN 0268-1161 (Print)
0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16096324> >.

STRONG, R. K. et al. HLA-E allelic variants. Correlating differential expression, peptide affinities, crystal structures, and thermal stabilities. **J Biol Chem**, v. 278, n. 7, p. 5082-90, Feb 14 2003. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12411439> >.

SULLIVAN, L. C. et al. The major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E at the interface between innate and adaptive immunity. **Tissue Antigens**, v. 72, n. 5, p. 415-24, Nov 2008. ISSN 1399-0039 (Electronic)
0001-2815 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18946929> >.

SVENDSEN, S. G. et al. The expression and functional activity of membrane-bound human leukocyte antigen-G1 are influenced by the 3'-untranslated region. **Hum Immunol**, v. 74, n. 7, p. 818-27, Jul 2013. ISSN 1879-1166 (Electronic)
0198-8859 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23583363> >.

SZEKERES-BARTHO, J. Successful Implantation from the Embryonic Aspect. **Am J Reprod Immunol**, Nov 11 2015. ISSN 1600-0897 (Electronic)
1046-7408 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26554538> >.

TAN, B. K. et al. Investigation and current management of recurrent IVF treatment failure in the UK. **BJOG**, v. 112, n. 6, p. 773-80, Jun 2005. ISSN 1470-0328 (Print)
1470-0328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15924536> >.

TAN, Y. et al. A model for implantation: coculture of blastocysts and uterine endometrium in mice. **Biol Reprod**, v. 72, n. 3, p. 556-61, Mar 2005. ISSN 0006-3363 (Print) 0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15537866> >.

TAN, Z. et al. Allele-specific targeting of microRNAs to HLA-G and risk of asthma. **Am J Hum Genet**, v. 81, n. 4, p. 829-34, Oct 2007. ISSN 0002-9297 (Print) 0002-9297 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17847008> >.

TANG, K. F. et al. Decreased Dicer expression elicits DNA damage and up-regulation of MICA and MICB. **J Cell Biol**, v. 182, n. 2, p. 233-9, Jul 28 2008. ISSN 1540-8140 (Electronic) 0021-9525 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18644891> >.

TANNETTA, D. et al. Extracellular vesicles and reproduction-promotion of successful pregnancy. **Cell Mol Immunol**, v. 11, n. 6, p. 548-63, Nov 2014. ISSN 2042-0226 (Electronic) 1672-7681 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24954226> >.

TAYLOR, D. D.; AKYOL, S.; GERCEL-TAYLOR, C. Pregnancy-associated exosomes and their modulation of T cell signaling. **J Immunol**, v. 176, n. 3, p. 1534-42, Feb 1 2006. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16424182> >.

TESSIER, D. R.; YOCKELL-LELIEVRE, J.; GRUSLIN, A. Uterine Spiral Artery Remodeling: The Role of Uterine Natural Killer Cells and Extravillous Trophoblasts in Normal and High-Risk Human Pregnancies. **Am J Reprod Immunol**, Dec 3 2014. ISSN 1600-0897 (Electronic) 1046-7408 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25472023> >.

THE MHC SEQUENCING CONSORTIUM. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. **Letters to Nature**, v.401, p.921-923, 1999.

THERY, C. Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. **F1000 Biol Rep**, v. 3, p. 15, 2011. ISSN 1757-594X (Electronic) 1757-594X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21876726> >.

THERY, C. et al. Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. **Nat Immunol**, v. 3, n. 12, p. 1156-62, Dec 2002. ISSN 1529-2908 (Print) 1529-2908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12426563> >.

THERY, C.; OSTROWSKI, M.; SEGURA, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 8, p. 581-93, Aug 2009. ISSN 1474-1741 (Electronic) 1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19498381> >.

TOMASEC, P. et al. Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. **Science**, v. 287, n. 5455, p. 1031, Feb 11 2000. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10669413> >.

- TOTH, B. et al. Microparticles and exosomes: impact on normal and complicated pregnancy. **Am J Reprod Immunol**, v. 58, n. 5, p. 389-402, Nov 2007. ISSN 1046-7408 (Print) 1046-7408 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17922691> >.
- TOTH, B. et al. Disorders of implantation--are there diagnostic and therapeutic options? **J Reprod Immunol**, v. 90, n. 1, p. 117-23, Jun 2011. ISSN 1872-7603 (Electronic) 0165-0378 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21641658> >.
- TRIPATHI, P. et al. Role of 14-bp deletion in the HLA-G gene in the maintenance of pregnancy. **Tissue Antigens**, v. 64, n. 6, p. 706-10, Dec 2004. ISSN 0001-2815 (Print) 0001-2815 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15546345> >.
- TRIPATHI, P.; NAIK, S.; AGRAWAL, S. HLA-E and immunobiology of pregnancy. **Tissue Antigens**, v. 67, n. 3, p. 207-13, Mar 2006. ISSN 0001-2815 (Print) 0001-2815 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16573557> >.
- TRUNDLEY, A.; MOFFETT, A. Human uterine leukocytes and pregnancy. **Tissue Antigens**, v. 63, n. 1, p. 1-12, Jan 2004. ISSN 0001-2815 (Print) 0001-2815 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14651517> >.
- TWITO, T. et al. The 14-bp deletion in the HLA-G gene indicates a low risk for acute cellular rejection in heart transplant recipients. **J Heart Lung Transplant**, v. 30, n. 7, p. 778-82, Jul 2011. ISSN 1557-3117 (Electronic) 1053-2498 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21482149> >.
- VALADI, H. et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nature Cell Biology**, v. 9, n. 6, p. 654-9, Jun 2007. ISSN 1465-7392 (Print) 1465-7392 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17486113> >.
- VALLIAN, S. et al. Correlation of major histocompatibility complex class I related A (MICA) polymorphism with the risk of developing breast cancer. **Med Oncol**, v. 29, n. 1, p. 5-9, Mar 2012. ISSN 1559-131X (Electronic) 1357-0560 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21221852> >.
- VAN DEN ELSEN, P. J. et al. Transcriptional control of MHC genes in fetal trophoblast cells. **J Reprod Immunol**, v. 52, n. 1-2, p. 129-45, Oct-Nov 2001. ISSN 0165-0378 (Print) 0165-0378 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11600183> >.
- VAN DER VEN, K.; OBER, C. HLA-G polymorphisms in African Americans. **J Immunol**, v. 153, n. 12, p. 5628-33, Dec 15 1994. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7989762> >.
- VAN DER VEN, K.; PFEIFFER, K.; SKRABLIN, S. HLA-G polymorphisms and molecule function - Questions and more questions - A review. **Placenta**, v. 21, p. S86-S92, Mar-Apr 2000. ISSN 0143-4004. Disponível em: < <Go to ISI>://000086840500018 >.
- VAN DEUN, J. et al. The impact of disparate isolation methods for extracellular vesicles on downstream RNA profiling. **J Extracell Vesicles**, v. 3, 2014. ISSN 2001-3078 (Electronic) 2001-3078 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25317274> >.

VAN DOMMELEN, S. M. et al. Microvesicles and exosomes: opportunities for cell-derived membrane vesicles in drug delivery. **J Control Release**, v. 161, n. 2, p. 635-44, Jul 20 2012. ISSN 1873-4995 (Electronic) 0168-3659 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22138068> >.

VARGAS, R. G. et al. Association of HLA-G alleles and 3' UTR 14 bp haplotypes with recurrent miscarriage in Brazilian couples. **Hum Immunol**, v. 72, n. 6, p. 479-85, Jun 2011. ISSN 1879-1166 (Electronic) 0198-8859 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21354454> >.

VEIGA-CASTELLI, L. C. et al. Low variability at the HLA-E promoter region in the Brazilian population. **Hum Immunol**, Nov 17 2015. ISSN 1879-1166 (Electronic) 0198-8859 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26596885> >.

VEIGA-CASTELLI, L. C. et al. Non-classical HLA-E gene variability in Brazilians: a nearly invariable locus surrounded by the most variable genes in the human genome. **Tissue Antigens**, v. 79, n. 1, p. 15-24, Jan 2012. ISSN 1399-0039 (Electronic) 0001-2815 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22050290> >.

VIGANO, P. et al. Maternal-conceptus cross talk--a review. **Placenta**, v. 24 Suppl B, p. S56-61, Oct 2003. ISSN 0143-4004 (Print) 0143-4004 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14559031> >.

VLASSOV, A. V. et al. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. **Biochim Biophys Acta**, v. 1820, n. 7, p. 940-8, Jul 2012. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22503788> >.

WALDHAEUER, I. et al. Tumor-associated MICA is shed by ADAM proteases. **Cancer Res**, v. 68, n. 15, p. 6368-76, Aug 1 2008. ISSN 1538-7445 (Electronic) 0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18676862> >.

WANG, X.; JIANG, W.; ZHANG, D. Association of 14-bp insertion/deletion polymorphism of HLA-G gene with unexplained recurrent spontaneous abortion: a meta-analysis. **Tissue Antigens**, v. 81, n. 2, p. 108-15, Feb 2013. ISSN 1399-0039 (Electronic) 0001-2815 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23330721> >.

WU, J. et al. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. **Science**, v. 285, n. 5428, p. 730-2, Jul 30 1999. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10426994> >.

YADAV, D. et al. Cutting edge: down-regulation of MHC class I-related chain A on tumor cells by IFN-gamma-induced microRNA. **J Immunol**, v. 182, n. 1, p. 39-43, Jan 1 2009. ISSN 1550-6606 (Electronic) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19109132> >.

YAGEL, S. et al. Maternal adaptation to vasculogenesis and angiogenesis at the fetomaternal interface. **Thromb Res**, v. 115 Suppl 1, p. 97-9, Feb 2005. ISSN 0049-3848 (Print) 0049-3848 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15790169> >.

YAMAGUCHI, K. et al. Diagnostic and prognostic impact of serum-soluble UL16-binding protein 2 in lung cancer patients. **Cancer Sci**, v. 103, n. 8, p. 1405-13, Aug 2012. ISSN 1349-7006 (Electronic)

1347-9032 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22587355> >.

YAN, W. H.; FAN, L. A. Residues Met76 and Gln79 in HLA-G alpha1 domain involve in KIR2DL4 recognition. **Cell Res**, v. 15, n. 3, p. 176-82, Mar 2005. ISSN 1001-0602 (Print)

1001-0602 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15780179> >.

YANEZ-MO, M. et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. **J Extracell Vesicles**, v. 4, p. 27066, 2015. ISSN 2001-3078 (Electronic)

2001-3078 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25979354> >.

YIE, S. M. et al. A single base-pair mutation in the 3'-untranslated region of HLA-G mRNA is associated with pre-eclampsia. **Mol Hum Reprod**, v. 14, n. 11, p. 649-53, Nov 2008. ISSN 1460-2407 (Electronic)

1360-9947 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18952696> >.

YIE, S. M.; TAYLOR, R. N.; LIBRACH, C. Low plasma HLA-G protein concentrations in early gestation indicate the development of preeclampsia later in pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, v. 193, n. 1, p. 204-8, Jul 2005. ISSN 0002-9378 (Print)

0002-9378 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16021080> >.

YOSHIOKA, Y. et al. Comparative marker analysis of extracellular vesicles in different human cancer types. **J Extracell Vesicles**, v. 2, 2013. ISSN 2001-3078 (Electronic)

2001-3078 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24009892> >.

YUANA, Y.; STURK, A.; NIEUWLAND, R. Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions. **Blood Rev**, v. 27, n. 1, p. 31-9, Jan 2013. ISSN 1532-1681 (Electronic)

0268-960X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23261067> >.

ZAMOYSKA, R. CD4 and CD8: modulators of T-cell receptor recognition of antigen and of immune responses? **Curr Opin Immunol**, v. 10, n. 1, p. 82-7, Feb 1998. ISSN 0952-7915 (Print)

0952-7915 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9523116> >.

ZHANG, C. et al. Opposing effects of interferon-alpha and interferon-gamma on the expression of major histocompatibility complex class I chain-related A in tumors. **Cancer Sci**, v. 99, n. 6, p. 1279-86, Jun 2008. ISSN 1349-7006 (Electronic)

1347-9032 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18422748> >.

ZHANG, H. G. et al. Exosomes and immune surveillance of neoplastic lesions: a review. **Biotech Histochem**, v. 87, n. 3, p. 161-8, Apr 2012. ISSN 1473-7760 (Electronic)

1052-0295 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22216980> >.

ZHANG, Y. et al. Typing for all known MICA alleles by group-specific PCR and SSOP. **Hum Immunol**, v. 62, n. 6, p. 620-31, Jun 2001. ISSN 0198-8859 (Print)

0198-8859 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11390037> >.

ZHAO, L. et al. beta2-Microglobulin-free HLA-G activates natural killer cells by increasing cytotoxicity and proinflammatory cytokine production. **Hum Immunol**, v. 74, n. 4, p. 417-24, Apr 2013. ISSN 1879-1166 (Electronic) 0198-8859 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23228393> >.

ZLOTOGORSKI-HURVITZ, A. et al. Human Saliva-Derived Exosomes: Comparing Methods of Isolation. **J Histochem Cytochem**, Dec 3 2014. ISSN 1551-5044 (Electronic) 0022-1554 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25473095> >.

ZOLLER, MTetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. **Nature Reviews Cancer**, v.09, p. 40-55, 2009.

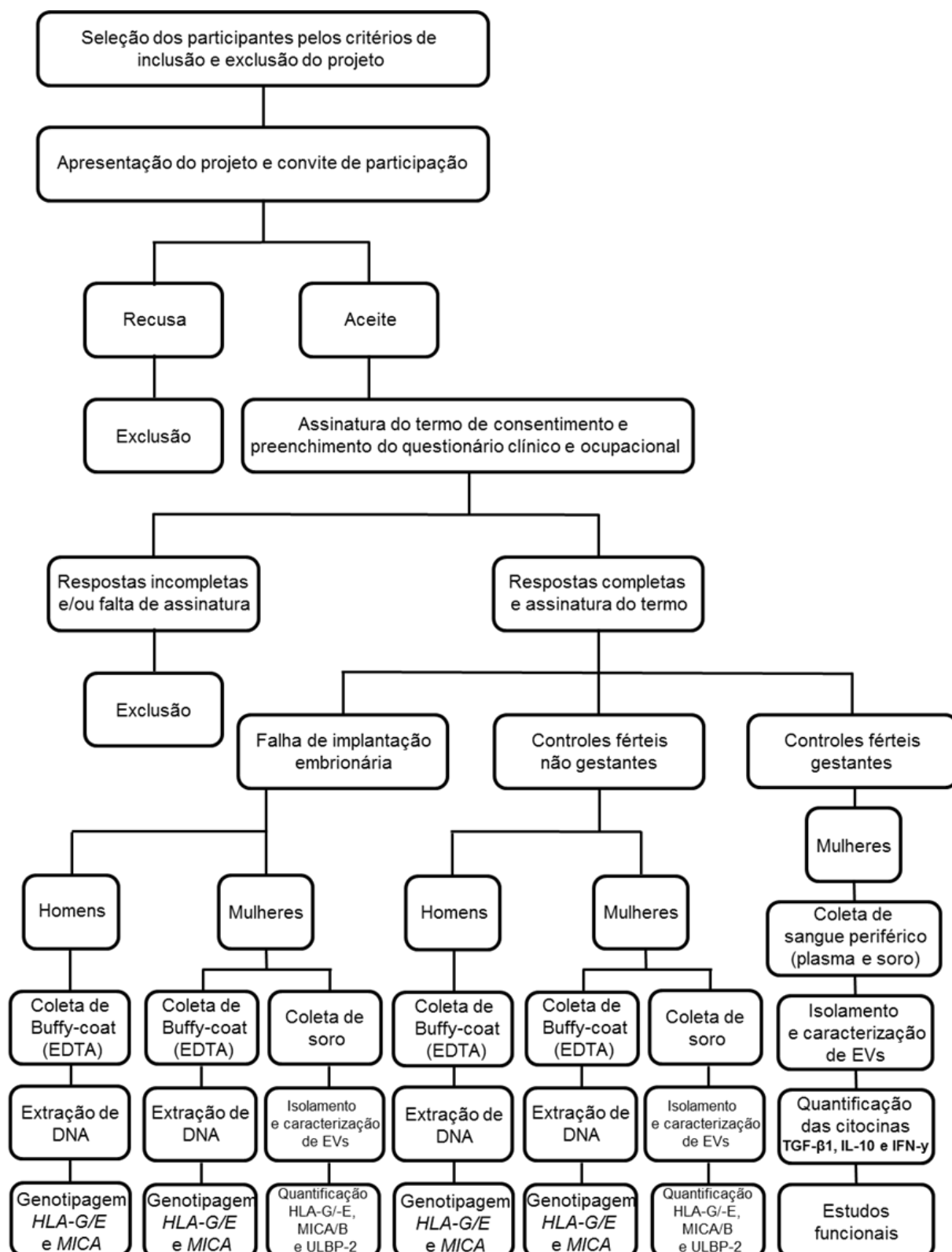
10. APÊNDICES

1. MATERIAIS E MÉTODOS	126
1.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	126
1.2. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	127
1.3. EXTRAÇÃO DE DNA	128
1.4. GENOTIPAGEM DOS GENES <i>HLA-G</i> E <i>HLA-E</i> PELO MÉTODO DE SEQUENCIAMENTO AUTOMATIZADO	128
1.4.1. <i>Purificação do produto amplificado</i>	130
1.4.2. <i>Reação de Sequenciamento</i>	130
1.4.3. <i>Precipitação do DNA sequenciado</i>	131
1.4.4. <i>Eletroforese Capilar</i>	131
1.4.5. <i>Definição alélica dos genes HLA-G e HLA-E</i>	132
1.5. GENOTIPAGEM DE 14PB INSERÇÃO/DELEÇÃO DA REGIÃO 3'UTR DO GENE <i>HLA-G</i>	132
1.6. GENOTIPAGEM DO GENE <i>MICA</i>	134
1.6.1. <i>Genotipagem do gene MICA pela técnica de PCR-SSOP</i>	134
1.6.2. <i>Caracterização do microssatélite do gene MICA</i>	135
1.6.3. <i>Definição alélica do gene MICA pela técnica de PCR-SSP</i>	137
1.7. PRECIPITAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES	139
1.8. CARACTERIZAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	139
1.9. VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE PROTEÍNAS TÍPICAS DE VESÍCULAS EXTRACELULARES POR SDS-PAGE E WESTERN BLOT	140
1.10. QUANTIFICAÇÃO DAS CITOCINAS IFN- γ , IL-10 E TGF- β 1	142
1.11. QUANTIFICAÇÃO DAS MOLÉCULAS <i>HLA-G</i> , <i>HLA-E</i> , <i>MICA/B</i> E <i>ULBP-2</i>	143
1.12. ESTUDOS FUNCIONAIS	144
1.12.1. <i>Captação de vesículas extracelulares por células de sangue periférico</i>	144
1.12.2. <i>Detecção da atividade de caspase-3, da expressão de IFN-γ e da degranulação em PBMCs na presença e na ausência de vesículas extracelulares</i>	145
1.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA	147
2. QUESTIONÁRIOS CLÍNICOS E DEMOGRÁFICOS	149
3. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	155

1. MATERIAIS E MÉTODOS

1.1. Delineamento do estudo

Estudo observacional, com caráter transversal e comparativo.



1.2. Caracterização da amostra

A amostra denominada paciente está composta de 62 casais, não aparentados, com diagnóstico de Falha de Implantação Embrionária (IF), que se caracteriza por ausência de gestação ou sua não evolução além de 12 – 20 semanas, após pelo menos duas transferências de embriões não-criopreservados (FIV/ICSI), independente da presença de algum fator identificado e controlado previamente (feminino e/ou masculino) (Tan, B. K. *et al.*, 2005; Margalioth *et al.*, 2006).

Todos os casais pertencentes ao grupo IF tiveram recomendação de investigação imunológica no Centro de Imunologia da Reprodução (CIR), em Porto Alegre – RS, após duas falhas em ciclos de ART. No mesmo local foram coletadas, anteriormente à investigação imunológica, amostras de sangue periférico dos casais deste grupo. A investigação consta de verificação de fatores aloimunes, além de pesquisa de trombofilias auto-imunes e de origem genética. Também faz parte desta avaliação a realização de cariótipo do casal. Devido ao fato de que as amostras para este estudo foram coletadas anteriormente à investigação imunológica citada acima, a listagem de exames para a realização da mesma foi mencionada somente a título de ilustração da investigação imunológica a qual são submetidas as pacientes de IF.

A amostra denominada controle fértil não gestante está composta de 131 casais (FW), provenientes da região sul do Brasil (RS/SC/PR), não aparentados, com pelo menos duas gestações clínicas naturais, a termo, sem complicações. Um segundo grupo também considerado controle fértil, composto de 29 mulheres gestantes (PW), entre a 12^o e 28^o semanas de gestação, provenientes da região sul do Brasil (RS/SC/PR), foi incluído no estudo para certas análises comparativas de proteínas circulantes e estudos funcionais. Todas as amostras de sangue periférico foram centrifugadas durante 20 minutos, 1500xg. Buffy-coat, plasma e soro foram coletados e armazenados a -80°C para subseqüentes análises biológicas.

O presente estudo faz parte de um projeto aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas da UFPR (CEP-HC n° 037ext.019/2001). Todos os indivíduos assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido concordando com a participação no estudo e consentindo a coleta de amostras de sangue periférico. Além disso, os participantes responderam um questionário de averiguação clínica e demográfica. O estudo foi conduzido no Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH) do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná em Curitiba, Brasil em colaboração com o Institute for Transfusion Medicine (Transplantation Diagnostics R&D), University Hospital Essen, Alemanha.

1.3. Extração de DNA

Oito mililitros (8 ml) de sangue periférico foram coletados de cada indivíduo, através de punção venosa, em tubos estéreis tipo *vacutainer* com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). As amostras foram centrifugadas para obtenção da camada de leucócitos da qual foi extraído o DNA pela técnica de “*salting-out*”, previamente descrita (Lahiri e Nurnberger, 1991). Essa técnica possibilita a obtenção de DNA pelo rompimento mecânico e/ou enzimático dos tecidos, extração de proteínas e ácidos graxos pela ação de solventes orgânicos e precipitação do DNA com etanol. O método desenvolve-se em cinco etapas:

- Obtenção da camada de leucócitos por centrifugação do sangue total;
- Lise de eritrócitos através do uso de tampão de lise de células vermelhas (RCLB), pH 7,6;
- Quebra da membrana nuclear com dodecil sulfato de sódio (SDS) a 20% e remoção de enzimas como DNases e RNases por meio de proteinase K e tampão de proteinase K;
- Precipitação de proteínas com NaCl 6M;
- Precipitação do DNA com etanol absoluto.

Após extração, as amostras de DNA foram quantificadas por leitura da densidade óptica (D.O.), através do espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA). A concentração de DNA de trabalho utilizada para a genotipagem dos genes *HLA-E*, *HLA-G* e *MICA* foi de 50ng/μl, sendo a diluição das amostras realizada utilizando-se água ultrapura.

1.4. Genotipagem dos genes *HLA-G* e *HLA-E* pelo método de sequenciamento automatizado

A reação de sequenciamento para definição alélica requer a etapa prévia de amplificação dos exons 2, 3 e 4 do gene *HLA-G* e amplificação dos exons 2 e 3 do gene *HLA-E*. As sequências de oligonucleotídeos iniciadores para amplificação e sequenciamento dos fragmentos alvo dos genes *HLA-G* e *HLA-E* foram desenhadas utilizando o software PrimerBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). A amplificação dos fragmentos gênicos foi realizada pela técnica de PCR (*polymerase chain reaction*), utilizando o aparelho termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems®). As Tabelas 19, 20 e 21 sintetizam o protocolo utilizado.

Tabela 19. Oligonucleotídeos iniciadores para amplificação dos genes *HLA-G* e *HLA-E*.

Iniciadores para amplificação do loco <i>HLA-G</i>	
EXON 2	G25S': GGGTCGGGCGGGTCTCAA - (421pb) G23S': TCCGTGGGGCATGGAGGT
EXON 3	G35S': CTCTCCTTGTGCTAGGCCAGGCTG - (547pb) G33S': CCCAGACCCTCTACCTGGGAGA
EXON 4	G45S': CCATGAGAGATGCAAAGTGCT - (364pb) G43S': TGCTTTCCCTAACAGACATGAT
Iniciadores para amplificação do loco <i>HLA-E</i>	
EXON 2 e 3	E25S': GGGGTCGGGATGGAAACGGC - (985pb) E35S': TGAGGTCTGTCAGCTGTGGG

Tabela 20. Reação de amplificação dos genes *HLA-G* e *HLA-E*.

Reagentes	<i>HLA-G</i>	<i>HLA-E</i>
DNA molde (50ng/μl)	60ng	60ng
Tampão Taq 10X	5,0μl	2,5μl
MgCl ₂ (50mM)	75mM	37,5mM
dNTP (1,8mM)	10,8mM	5,4mM
Primer 5' (100pMoles)	10pMoles	40pMoles
Primer 3' (100pMoles)	10pMoles	40pMoles
Enzima <i>Taq Platinum</i> (Invitrogen)	2,25U	1U
Água ultrapura (18,2MΩcm)	q.s.p. 50μl	q.s.p. 25μl

Tabela 21. Condições de amplificação para os genes *HLA-G* e *HLA-E*.

Número de ciclos	Temperatura	Tempo
1 ciclo (desnaturação inicial)	94�C	5 minutos
35 ciclos (desnaturação/anelamento/ alongamento)	94�C	30 segundos
	66�C (exon 2 – <i>HLA-G</i>)/	30 segundos
	70�C (exon 3 – <i>HLA-G</i>)/	
	62�C (exon 4 – <i>HLA-G</i>)/	
	68�C (exon 2 e 3 - <i>HLA-E</i>)	2 minutos
72�C		
1 ciclo (alongamento final)	72�C	5 minutos

1.4.1. Purificação do produto amplificado

Os produtos de PCR obtidos foram purificados através do método enzimático Exonuclease I (EXO I) e Fosfatase Alcalina de Camarão (SAP; *do inglês: Shrimp Alkaline Phosphatase*) da empresa USB Corporation®, com o objetivo de eliminar elementos residuais como oligonucleotídeos iniciadores não hibridizados, deoxinucleotídeos (dNTPs) e resíduos de DNA de fita simples. As concentrações dos reagentes utilizados encontram-se na Tabela 22 e as condições de ciclagem estão presentes na Tabela 23. O termociclador utilizado para esta etapa foi o GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems®).

Tabela 22. Reagentes utilizados na etapa de purificação.

Reagentes	Volume/Concentração
Produto de PCR	6,9µl
EXO I (10U/µl)	10U
SAP (1U/µl)	2U
Tampão de reação SAP 10X	2,0µl

Tabela 23. Condições de ciclagem utilizadas na etapa de purificação.

Número de ciclos	Temperatura	Tempo
1	37°C	60 minutos
1	80°C	15 minutos

1.4.2. Reação de Sequenciamento

A reação de sequenciamento foi realizada através do Kit *ABI PRISM® BigDye®* (Life Technologies™, Carlsbad, USA) e o termociclador utilizado para essa reação foi o Veriti 96 Well Thermal Cycler (Life Technologies™, Carlsbad, USA). O protocolo de sequenciamento esta descrito na Tabela 24 e as condições de ciclagem para o gene *HLA-G* e *HLA-E* são mostradas na Tabela 25. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de sequenciamento dos genes *HLA-G* e *HLA-E* estão descritos na Tabela 26.

Tabela 24. Reagentes utilizados na reação de sequenciamento.

Reagentes	Volume/Concentração
Produto de PCR purificado	10µl
Oligonucleotídeo iniciador (1,6 pMoles)	2,56pMoles
Big Dye	1,0µl
Tampão 10X	0,5µl

Tabela 25. Condições de ciclagem para reação de sequenciamento.

Número de ciclos	Temperatura	Tempo
1 ciclo	96°C	1 minutos
35 ciclos	96°C	15 segundos
	54°C	15 segundos
	60°C	2 minutos

Tabela 26. Oligonucleotídeos iniciadores para sequenciamento dos genes *HLA-G* e *HLA-E*.**Iniciadores para sequenciamento do loco *HLA-G***

EXON 2	G25S': GGGTCGGGCGGGTCTCAA G23S': TCCGTGGGGCATGGAGGT
EXON 3	G35S': CTCTCCTTGTGCTAGGCCAGGCTG G33S': CCCAGACCCTCTACCTGGGAGA
EXON 4	G45S': CCATGAGAGATGCAAAGTGCT G43S': TGCTTTCCCTAACAGACATGAT

Iniciadores para sequenciamento do loco *HLA-E*

EXON 2	E25S': GGGGTCGGGATGGAAACGGC E35S': GGTTCCGCAGCCTTGGGGTGA
EXON 3	E25S': CGGAACCCGCCAGACCCTA E35S': TGAGGTCTGTCAGCTGTGGG

1.4.3. Precipitação do DNA sequenciado

Solução salina NaOAc/EDTA (USB Corporation[®]) foi utilizada para a precipitação, onde foram realizados sucessivos passos de centrifugação em diferentes concentrações de etanol. O produto precipitado foi ressuspensionado em 12µl de formamida Hi-Di e desnaturado a 95°C por 3 minutos no termociclador TC-512 (Techne[®]), seguido por choque térmico (-80°C) durante 40 segundos.

1.4.4. Eletroforese Capilar

O produto da reação de sequenciamento precipitado e ressuspensionado em formamida foi submetido à corrida eletroforética em capilar de 36 cm, utilizando polímero POP 7 (Life Technologies[™], Carlsbad, USA) e sequenciador automático ABI Prism 3130 da empresa Applied Biosystems.

1.4.5. Definição alélica dos genes *HLA-G* e *HLA-E*

Os dados de sequenciamento obtidos foram visualizados através do programa Sequencing Analysis v.5.2 (Applied Biosystems®) e analisados com o auxílio dos programas SeqScape v.2.7 (Applied Biosystems®) e do programa FinchTv (Geospiza®). A identificação alélica ocorreu por pareamento com as sequências genômicas de alelos oficiais (Sistema de Informação Internacional de Imunogenética – IMGT) e cada SNP detectado foi individualmente anotado e analisado (Figura 13). As etapas de amplificação, sequenciamento e identificação alélica dos genes *HLA-G* e *HLA-E* ocorreram no Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH) do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, em Curitiba.

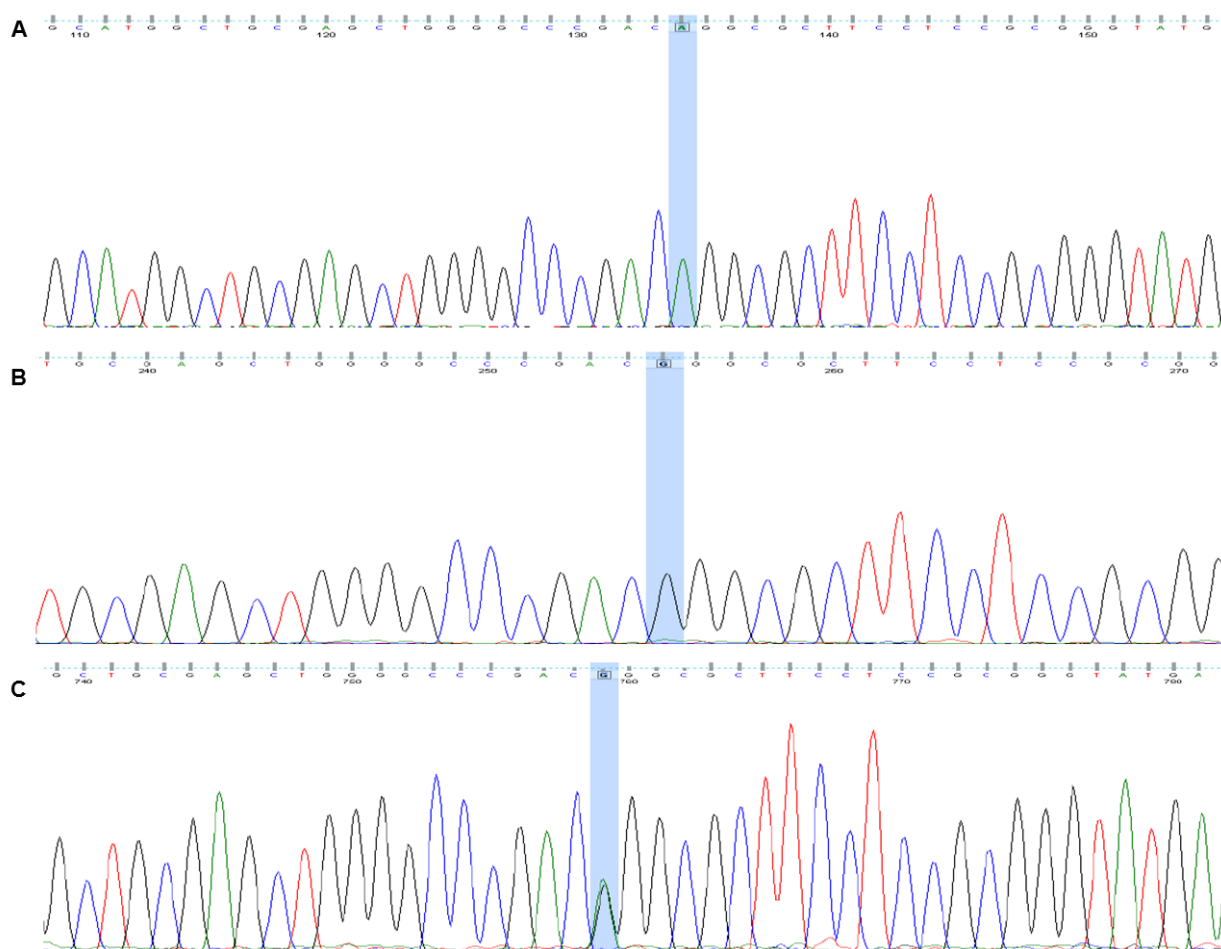


Figura 13. Eletroferograma Exon 3 – *HLA-E*. (A) SNP1446 A – Alelo *HLA-E**01:01; (B) SNP1446 G – Alelo *HLA-E**01:03; (C) SNP1446 A/G – Alelos *HLA-E**01:01/01:03

1.5. Genotipagem de 14pb inserção/deleção da região 3'UTR do gene *HLA-G*

O exon 8 do gene *HLA-G*, pertencente à região 3'UTR do gene, na qual está inserido o polimorfismo 14pb inserção/deleção (14pb ins/del), foi amplificado pela técnica de PCR

previamente descrita (Hviid *et al.*, 2002), gerando fragmentos gênicos correspondentes à 224pb referente à inserção de 14pb e 210pb referente à deleção de 14pb. As Tabelas 27, 28 e 29 sintetizam o protocolo utilizado.

Tabela 27. Oligonucleotídeos iniciadores para amplificação do exon 8 do gene *HLA-G*.

iniciadores para amplificação do exon 8 do gene <i>HLA-G</i>	
EXON 8	G25S': GGGTCGGGCGGGTCTCAA G23S': TCCGTGGGGCATGGAGGT

Tabela 28. Reação de amplificação do exon 8 do gene *HLA-G*.

Reagentes	Exon 8 de <i>HLA-G</i>
DNA molde (50ng/μl)	60ng
Tampão Taq 10X	6,0μl
MgCl ₂ (50mM)	75mM
dNTP (1,8mM)	10,8mM
Primer 5' (100pMoles)	10pMoles
Primer 3' (100pMoles)	10pMoles
Enzima <i>Taq Platinum</i> (Invitrogen)	0,75U
Água ultrapura (18,2MΩcm)	q.s.p. 50μl

Tabela 29. Condições de amplificação do exon 8 do gene *HLA-G*.

Número de ciclos	Temperatura	Tempo
1 ciclo (desnaturação inicial)	94°C	3 minutos
35 ciclos (desnaturação/anelamento/ alongamento)	94°C	30 segundos
	64°C	1 minuto
	74°C	2 minutos
1 ciclo (alongamento final)	72°C	5 minutos

Após a etapa de amplificação, os produtos de PCR obtidos foram analisados em gel de poliacrilamida à 8% (150 minutos, 270V), corado com nitrato de prata. A análise foi realizada em duas etapas, incluindo 2 observadores diferentes. A Figura 14 mostra um exemplo de gel de poliacrilamida mostrando os três genótipos possíveis referente à esse polimorfismo. As etapas de amplificação e identificação alélica dos 14pb ins/del do gene *HLA-G* ocorreram no Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH) do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, em Curitiba.

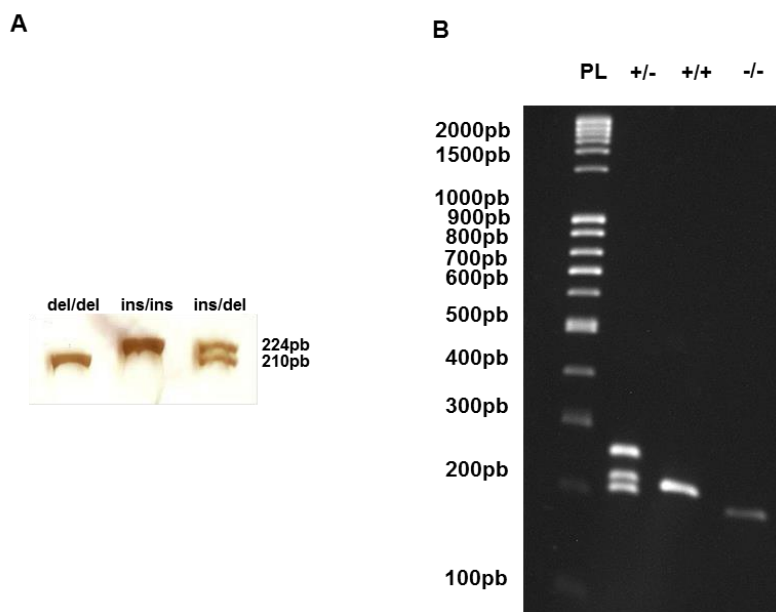


Figura 14. Detecção do polimorfismo 14pb ins/del do gene *HLA-G* em gel de poliacrilamida à 8%. (A) Genótipos da esquerda para a direita: del/del – genótipo homocigoto para deleção dos 14pb (210pb); ins/ins - genótipo homocigoto para inserção dos 14pb (224pb); ins/del - genótipo heterocigoto para inserção/deleção dos 14pb. (B) Verificação da amplificação dos produtos de PCR em gel de agarose 1,5%.

1.6. Genotipagem do gene *MICA*

1.6.1. Genotipagem do gene *MICA* pela técnica de PCR-SSOP

Na primeira etapa da caracterização dos alelos do gene *MICA* foi empregado o método da reação em cadeia da polimerase, utilizando sondas de oligonucleotídeos sequência-específicos (PCR-SSOP; do inglês: *Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Oligonucleotide Probes*) através do *Kit LABTypeMICA* (One Lambda Inc., USA).

Todos os procedimentos para o uso do *Kit LABTypeMICA* foram realizados conforme as instruções do fabricante, e consistem basicamente da amplificação dos exons 2, 3, 4 e 5 do gene *MICA*, sendo o produto desta amplificação biotilado. O produto de PCR marcado é desnaturado e mantido na forma de fita simples através do uso de tampões. O produto de PCR em fita simples é hibridizado com oligonucleotídeos-sonda sequência-específicos. Estas sondas estão conjugadas na superfície de microesferas fluorescentes. Após a re-hibridização é feita a marcação com estreptoavidina conjugada com phycoeritrina (SAPE). A leitura das reações foi realizada com o uso do fluorímetro de fluxo (LABScan™ 100), o qual emprega a tecnologia Luminex®, pela qual um laser de cor vermelha com comprimento de onda de 633nm reconhece a cor da microesfera e outro laser, de cor verde, com comprimento de onda de 532nm reconhece a intensidade da fluorescência emitida pela phycoeritrina presente na superfície de cada microesfera, identificando se a mesma é ou não positiva para a marcação com SAPE. As genotipagens foram realizadas com o auxílio

do software *HLA Fusion*TM (Research) v.2.0 que faz a análise dos dados coletados pelo LABScanTM 100 para a determinação dos alelos.

Toda a etapa de identificação alélica do gene *MICA* foi realizada no Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH) do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, em Curitiba. Duas técnicas adicionais foram empregadas para a genotipagem do gene *MICA* devido ao fato de os resultados gerados pela técnica de PCR-SSOP através do *Kit LABTypeMICA* apresentarem um número considerável de ambiguidades. A genotipagem do microssatélite localizado no exon 5 do gene *MICA* e a determinação de alelos específicos do gene *MICA* pela técnica de PCR-SSP foram decisivas no processo de genotipagem.

1.6.2. Caracterização do microssatélite do gene *MICA*

O microssatélite do gene *MICA* está localizado no exon 5 e está relacionado com variantes da região transmembrana da molécula. A partir do códon 291 até o códon 304, diferentes números de repetições GCT's podem ser encontradas, resultando em polialaninas de tamanhos variados. *A4*, *A5*, *A5.1*, *A6*, *A7*, *A9* e *A10* são as designações atribuídas as variantes de acordo com o número de códons GCT's repetidos (Tabela 30) (Robinson *et al.*, 2001; Collins, 2004). No caso da variante *A5.1*, além das 5 repetições, ocorre a inserção adicional de uma guanina após a segunda repetição GCT, resultando em um códon de parada na posição 304 e conseqüentemente em um término prematuro da proteína (Mizuki *et al.*, 1997).

Tabela 30. Microssatélite do exon 5 e sua associação com os alelos do gene *MICA*.

Número de repetições GCT no exon 5 (nomenclatura da variante)	Alelos <i>MICA</i>
4 (<i>A4</i>)	001, 00701/03, 01201, 018, 029, 043, 045, 051
5 (<i>A5</i>)	010, 016, 019, 027, 033, 048
5 (<i>A5.1</i>) – inserção de G após a 2º repetição	00801, 00802, 00804, 023, 028, 053
6 (<i>A6</i>)	004, 006, 009, 011, 020, 026, 047, 049
7 (<i>A7</i>)	050
9 (<i>A9</i>)	00201, 041, 046, 052
9 (<i>A9</i>) – deleção de G no início do exon 5	015, 017
10 (<i>A10</i>)	020

FONTE: (Collins, 2004)

A especificação de cada microssatélite foi realizada por método semi-automatizado que utiliza eletroforese capilar. Primeiramente, a região do microssatélite foi amplificada por PCR com o uso de oligonucleotídeos iniciadores marcados com fluorescência, gerando fragmentos gênicos de 180 a 200pb. As condições de PCR estão descritas na Tabela 31.

Tabela 31. Condições de amplificação do microssatélite do gene *MICA*.

Iniciadores para amplificação do microssatélite do exon 5 do gene <i>MICA</i>		
<i>STR-MICA</i>	5S': CCTTTTTTTCAGGGAAAGTGC	
	3S': CCTTACCATCTCCAGAACTGC	
Reação de amplificação do microssatélite do exon 5 do gene <i>MICA</i>		
Reagentes	<i>STR_MICA</i>	
DNA molde (50ng/μl)	60ng	
Tampão Taq 10X	1,0μl	
MgCl ₂ (50mM)	1,5mM	
dNTP (2,5mM)	0,25mM	
Primer 5' (20uMoles)	0,2uMoles	
Primer 3' (20uMoles)	0,2uMoles	
Enzima <i>Taq Platinum</i> (Invitrogen)	0,25U	
Água ultrapura (18,2MΩcm)	q.s.p. 10μl	
Condições de amplificação do microssatélite do exon 5 do gene <i>MICA</i>		
Número de ciclos	Temperatura	Tempo
1 ciclo (desnaturação inicial)	94°C	3 minutos
30 ciclos (desnaturação/anelamento/ alongamento)	94°C	30 segundos
	54,5°C	30 segundos
	72°C	1 minutos
1 ciclo (alongamento final)	72°C	40 minutos

Após a amplificação, os produtos de PCR foram preparados para serem submetidos à corrida eletroforética no aparelho sequenciador MegaBACE®1000 (GE Healthcare). Para este procedimento foi preparada uma solução com o detergente Tween 20 e o marcador de peso molecular ET-ROX 400 (GE Healthcare), necessário para a identificação dos tamanhos de fragmentos das amostras amplificadas. Para cada amostra foi adicionado 0,3ul do marcador de peso molecular, 6,7ul de Tween 0,02X e 2ul do produto de PCR. As amostras (contendo os reagentes citados) foram então desnaturadas por 3 minutos a 94°C e colocadas diretamente no gelo para manter a desnaturação. A injeção no sequenciador MegaBACE®1000 foi realizada com tensão de 3KV durante 80 segundos e a corrida eletroforética com 8KV por 90 minutos.

A designação alélica foi realizada com o uso do programa *Fragment Profiler 1.2* (GE Healthcare), no qual o marcador de peso molecular ET-ROX 400 é representado por 20 diferentes picos, cada um representando uma quantidade diferente de pares de base (Figura 15). Na análise, dois picos diferentes de tamanhos conhecidos representam indivíduos heterozigotos para a variante do microssatélite, por outro lado, um único pico de tamanho

também conhecido representa indivíduos homocigotos para a variante do microsatélite (Figura 16).

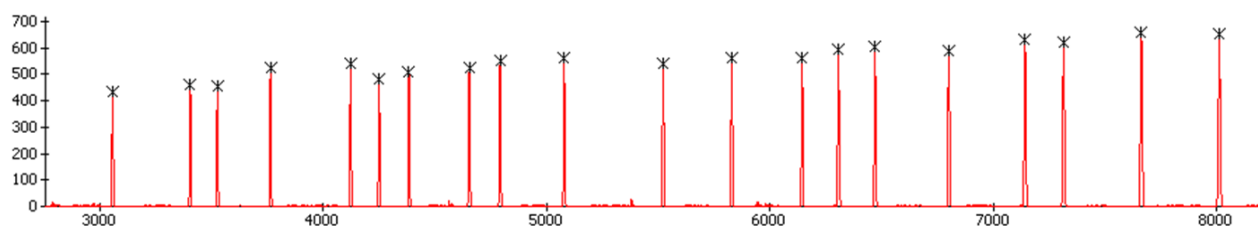


Figura 15. Representação do marcador de peso molecular ET-ROX 400 pelo software *Fragment Profiler 1.2*. Os picos representam oligonucleotídeos de tamanhos conhecidos citados da esquerda para a direita: 60, 90, 100, 120, 150, 160, 170, 190, 200, 220, 250, 270, 290, 300, 310, 330, 350, 360, 380 e 400pb.

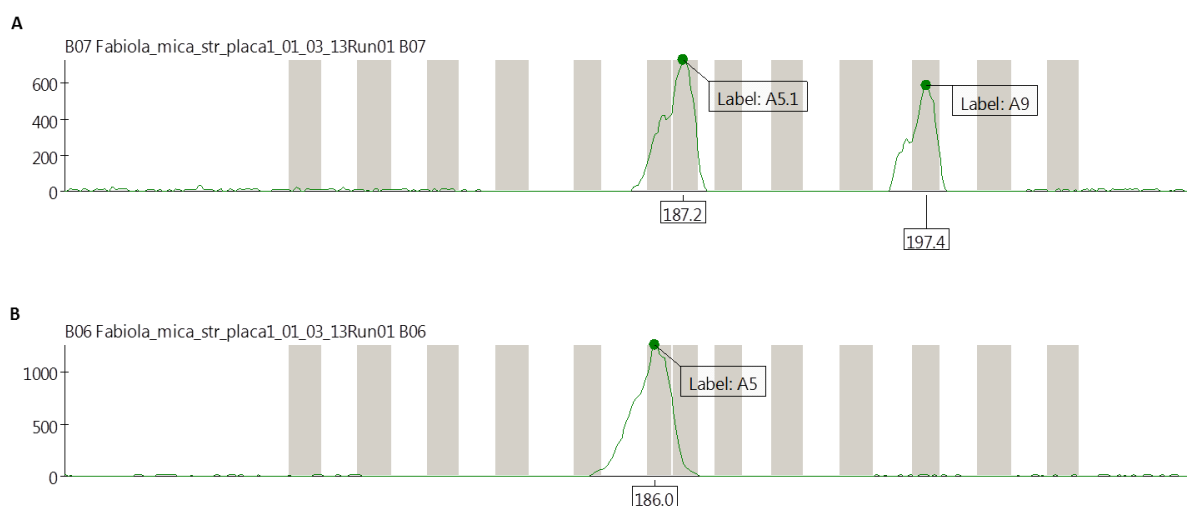


Figura 16. Representação da análise pelo programa *Fragment Profiler 1.2*. (A) Exemplo de indivíduo heterocigoto para as variantes de microsatélite do exon 5 do gene *MICA*; (B) Exemplo de indivíduo homocigoto para a variante de microsatélite do exon 5 do gene *MICA*.

1.6.3. Definição alélica do gene *MICA* pela técnica de PCR-SSP

A técnica de PCR-SSP para definição alélica do gene *MICA* foi empregada somente nos casos de resultado ambíguo gerado para determinação alélica pela técnica de PCR-SSOP e pela caracterização do microsatélite do gene *MICA*. Na metodologia de reação em cadeia da polimerase utilizando oligonucleotídeos iniciadores sequência-específicos (do inglês: *Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Primers*) os pares de oligonucleotídeos são produzidos para apresentar correspondências perfeitas com um único alelo ou grupo de alelos. Sob condições de PCR controladas, os pares de oligonucleotídeos permitem a amplificação de sequências alvo (resultado positivo), enquanto que pares de oligonucleotídeos sem correspondência não resultam em amplificação (resultado negativo).

A genotipagem do gene *MICA* por PCR-SSP foi baseada no protocolo proposto por Collins e colaboradores (Collins *et al.*, 2002), com algumas modificações nas condições da PCR que possibilitassem uma melhor sensibilidade e especificidade de algumas reações. As condições de PCR estão descritas na Tabela 32. Oligonucleotídeos iniciadores que reconhecem sequências conservadas do gene do hormônio de crescimento humano (HGH) foram utilizadas para controle interno da reação de PCR (5'-CAGTGCCTTCCCAACCATTCCTTA-3' e 5'-ATCCACTCACGGATTTCTGTTGTGT-3'). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados em cada reação de PCR, dependendo da ambiguidade, estão especificados na Tabela 33. A ambiguidade *MICA**008:01/04 não foi passível de resolução, sendo o alelo designado como *MICA**008 no estudo.

Tabela 32. Condições de amplificação para definição alélica do gene *MICA* por PCR-SSP.

Reagentes	<i>MICA</i>
DNA molde (50ng/μl)	50ng
Tampão Taq 10X	1,0μl
MgCl ₂ (50mM)	1,5mM
dNTP (2,0mM)	2,0mM
Primer 5' (10uM)	5uM
Primer 3' (10uM)	5uM
Primer HGH 5' (10uM)	1,6uM
Primer HGH 3' (10uM)	1,6uM
Enzima <i>Taq Platinum</i> (Invitrogen)	0,5U
Água ultrapura (18,2MΩcm)	q.s.p. 10μl

Número de ciclos	Temperatura	Tempo
1 ciclo (desnaturação inicial)	94°C	5 minutos
30 ciclos (desnaturação/anelamento/ alongamento)	94°C	20 segundos
	63°C	50 segundos
	72°C	30 segundos
1 ciclo (alongamento final)	72°C	30 segundos

Tabela 33. Oligonucleotídeos iniciadores específicos para resolução de ambiguidades *MICA*.

Alelos alvo <i>MICA</i>	Tamanho fragmento (pb)	Oligonucleotídeo (Forward 5' – 3')	Oligonucleotídeo (Reverse 5' – 3')
004,006,009,016,019,022, 032,033,036,044,049 030,047	818	CAGAGCCCCACAGTCTTCG	TTCTCCTCAGGACTACGCT
001,018 049	985	ATTTCTTGAAGGAAGATGCCA	CTCACCAGAGGGCACAGC
Deleção <i>MICA</i>	590	CATGGGACAGAGAGACCAGA	CTGCATGCATAGCGTGATAGT
00201/020,015,017,041,050	680	GAGGGTCAGGAGAGGCCA	GCATCCCTGTGGTCACTCA
048	696	GGCTAGTGGGACATGCACAC	TGACCCACATTTGGTCCG
	449	GCAGGGCTTCTGGCTTCTA	TTCTTCTTACAACAACAGACG
	1137	GGAACTACGGCGATATCTAG	GCTTTTCTCACCTGGACCA

FONTE: (Collins *et al.*, 2002)

1.7. Precipitação de vesículas extracelulares

A precipitação de vesículas extracelulares foi realizada a partir de alíquotas de soro provenientes de amostras de sangue periférico das mulheres pertencentes aos três grupos de estudo (IF, FW e PW). Primeiramente, as amostras foram submetidas à centrifugação (3000xg, 15 minutos) para remoção de células e restos celulares. Após esse passo, o kit de precipitação de exossomos – ExoQuick™ (SBI System Biosciences, Inc.) - foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante, partindo da adição de 63µl do reagente de precipitação de exossomos em 250µl de amostra que foram incubados por 12h à 4°C. Após a incubação as amostras passaram por centrifugação (1500xg, 30 minutos). O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensado em 250µl de água ultrapura e estocado a -80°C até o momento do seu uso. A escolha do uso do kit de precipitação de exossomos ExoQuick™ está atrelada ao fato de ele permitir uma eficaz obtenção de vesículas extracelulares apesar do baixo volume amostral necessário. As etapas referentes à precipitação, quantificação e caracterização de vesículas extracelulares foram realizadas no University Hospital Essen, Institute for Transfusion Medicine (Transplantation Diagnostics R&D), Essen, Alemanha.

1.8. Caracterização de vesículas extracelulares

A definição da quantidade (número de partículas x 10⁶/ml) e do tamanho (nm) das vesículas extracelulares de cada amostra foi determinada através da técnica de Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), utilizando o microscópio com dispersão de laser e vídeo de acompanhamento individual de partícula ZetaView® Particle Tracking Analyzer (Particle Metrix, GmbH). Nesse equipamento, a determinação da concentração de vesículas e a distribuição de tamanho em uma suspensão líquida é baseada na taxa de movimento Browniano das partículas em um sistema de dispersão de luz. O aparelho mede a direção e velocidade das partículas sob um campo elétrico, no qual a mobilidade eletroforética e polaridade de carga são determinadas. Todas as amostras foram diluídas (1:10.000) em

NaCl 0,9% e analisadas em três diferentes posições de câmera. Os dados de concentração de vesículas e distribuição de tamanho foram apresentados como a média das triplicatas. Beads de poliestireno (*Nanobeads Nist Traceable Particle Size* - Polysciences, Inc.) de 100nm foram utilizadas como controle de tamanho para a calibração do equipamento e analisadas em onze diferentes posições de câmera. Os dados foram analisados utilizando o programa ZetaVIEW versão 8.02.17. A Figura 17 mostra um exemplo de análise gerada pelo programa ZetaVIEW.

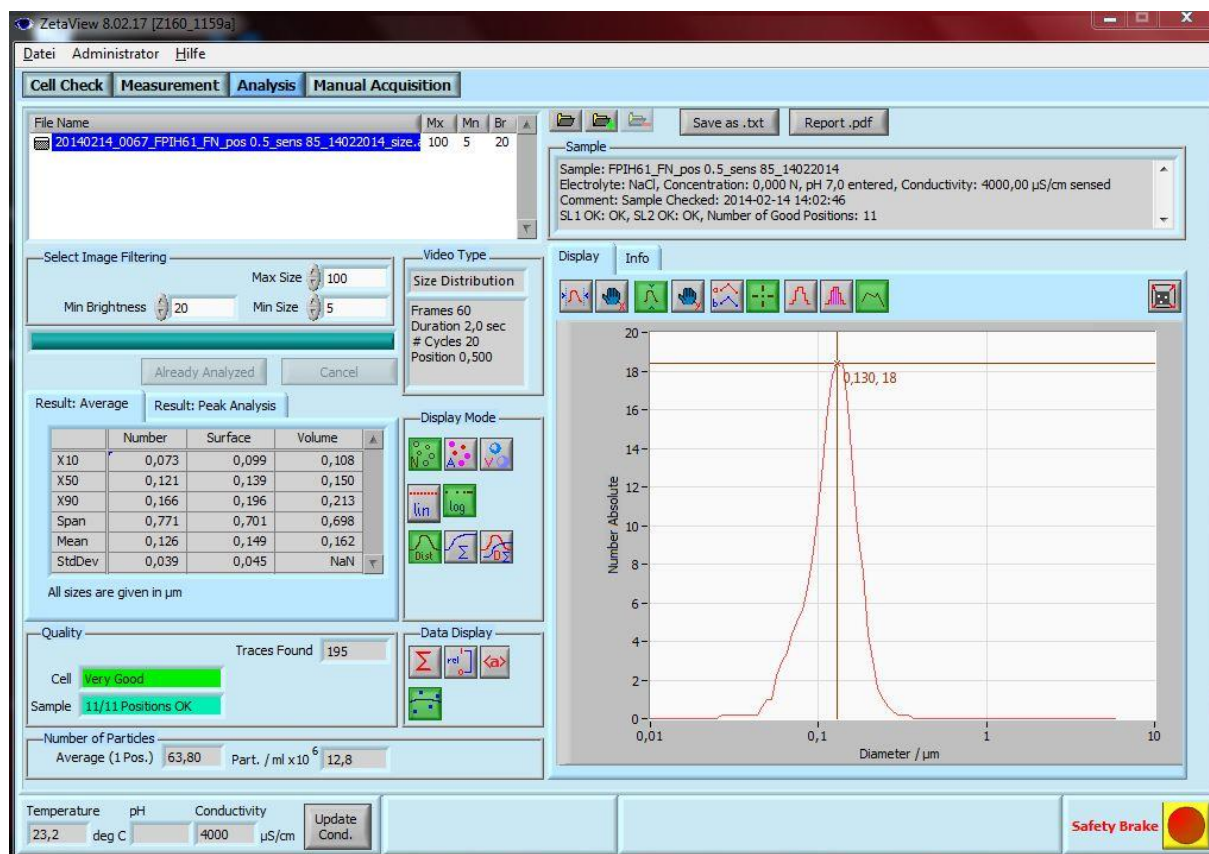


Figura 17. Representação da análise pelo programa ZetaVIEW versão 8.02.17. O gráfico mostra o número absoluto de vesículas extracelulares presente na amostra e a média de tamanho das partículas em uma posição de câmera.

1.9. Verificação da presença de proteínas típicas de vesículas extracelulares por SDS-PAGE e Western Blot

Conforme recomendado por Lotvall *et al.* (Lotvall *et al.*, 2014) como requisitos experimentais mínimos para identificação de vesículas extracelulares, dez amostras de isolados de vesículas extracelulares de cada grupo de estudo (IF, FW and PW) foram escolhidas randomicamente e testadas com e sem imunoprecipitação para a presença de proteínas transmembrana (CD9, CD81, CD63 e ICAM-I), proteínas citosólicas, incluindo TSG101 e proteínas intracelulares como Citocromo C (CYC1 - membrana interna da

mitocôndria), a qual estaria ausente ou pouco representada em isolados de vesículas extracelulares, servindo como controle negativo.

A imunoprecipitação se baseia no princípio de utilizar anticorpos específicos que se ligam a proteína de interesse com o objetivo de concentrar esse antígeno. Para isso, as proteínas foram imunoprecipitadas partindo de 250µl de isolados de vesículas extracelulares e utilizando beads magnéticas de ácido carboxílico (Dynabeads[®]MyOne[™] Carboxilic acid, Life Technologies As, Oslo) covalentemente ligadas com anticorpos específicos para as tetraspaninas CD9 (In-home mAb), CD81 (clone 5A6, BioLegend, USA) e CD63 (clone MEM-259, BioLegend, USA), para a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-I, Immunotech, France), para a proteína de choque térmico de 70 kDa (Hsp70, R&D Systems, Germany), para o gene de suscetibilidade tumoral 101 (TSG101, Sigma-Aldrich, USA) e para a proteína mitocondrial Citocromo C (CYC1, clone 7H8.2C12, BioLegend, USA) conforme recomendações do fabricante.

A presença dos marcadores foi analisada através de corrida eletroforética (200V, 1h30min) utilizando SDS-PAGE (do inglês: *sodium dodecyl sulfate - Polyacrylamide gel electrophoresis*) nas concentrações de 8%, 10% e 12,5% conforme o peso molecular da proteína. As amostras foram preparadas para a corrida eletroforética em condições reduzidas, utilizando β-mercaptoetanol 5% a uma temperatura de 94°C durante 5 minutos com o intuito de desnaturar proteínas através da quebra de pontes dissulfeto. A eletroforese em gel de poliacrilamida foi seguida da técnica de Western blot. A técnica de Western blot permite que as proteínas que foram desnaturadas e separadas por eletroforese em gel de acordo com o peso molecular sejam transferidas do gel para uma membrana de PVDF (Immobilon[®]-P, pore size: 45µm, Millipore[™]) através de corrente elétrica (400mA, 2h30min). Após a transferência, as ligações inespecíficas entre a membrana e o anticorpo utilizado para a detecção da proteína alvo foram bloqueadas através do uso de leite seco desnatado a 5% diluído em tampão fosfato-salino (PBS; do inglês: *phosphate-buffered saline*) com o detergente Tween 20 a 0,05% pelo período de pelo menos 1h.

Para a detecção dos marcadores específicos de vesículas extracelulares foram utilizados anticorpos denominados primários, por se ligarem diretamente à proteína de interesse. Os anticorpos monoclonais derivados de ratos (*anti-human* CD9, CD81, CD63) foram incubados pelo período de 12h em uma diluição de 1:1000 e o anticorpo *anti-human* CYC1 em uma diluição de 1:500 em PBS/Tween 20 (0,05%). Os anticorpos policlonais derivados de coelho foram incubados também pelo período de 12 horas em diferentes diluições (*anti-human* ICAM-I: 1:100; Hsp70: 1:500 e TSG101: 1:1000) em PBS/Tween 20 (0,05%). A remoção dos anticorpos que não se ligaram à proteínas foi realizada através de três passos de lavagem com PBS/Tween 20 (0,05%) por 10 minutos cada. Após as lavagens, as membranas foram expostas à anticorpos denominados secundários ligados a

uma enzima reveladora. As membranas foram expostas aos anticorpos Goat anti-rabbit IgG (H + L) conjugado com *horseradish peroxidase* (HRP) e Goat anti-mouse IgG (H + L) conjugado com HRP pelo período de 45min, em uma diluição de 1:200.000 em PBS/Tween 20 (0,05%) seguido de quatro passos de lavagem com PBS/Tween 20 (0,05%). Os complexos imunes foram visualizados através do sistema de detecção de quimioluminescência Fusion Fx7 (Vilber Lourmat Germany, GmbH) e densitometricamente analisados com o uso do programa Bio-ID (Vilber Lourmat Germany, GmbH). A análise densitométrica permite que a expressão das proteínas seja quantificada em porcentagem de acordo com os respectivos controles positivos. Como controles positivos foram utilizadas diferentes linhagens celulares, dependendo do marcador [CD81 e TSG101: *human B-lymphoblastoid cell line* (M1); CD9 e CD63: lisado de plaquetas; Hsp70: *Hela cell line*; ICAM-1: *neuroblastoma cell line* (SY5Y); CYC1: *human embryonic kidney cell line* (HEK)]. A análise da expressão de proteínas em vesículas extracelulares por Western blot foi realizada no University Hospital Essen, Institute for Transfusion Medicine (Transplantation Diagnostics R&D), Essen, Alemanha.

1.10. Quantificação das citocinas IFN- γ , IL-10 e TGF- β 1

A quantificação dos níveis de interferon-gamma (IFN- γ), interleucina-10 (IL-10) e o fator de crescimento tumoral- β 1 (TGF- β 1) presentes nas amostras de soro e nas amostras de precipitados de vesículas extracelulares derivadas de soro de mulheres pertencentes aos grupos de estudo (FW e PW) foi realizada através do ensaio imunoenzimático ELISA (do inglês: *enzyme-linked immunosorbent assay*) que permite a detecção e quantificação de anticorpos específicos. Os testes de ELISA foram realizados utilizando kits comerciais referentes a cada citocina (Ready-Set-Go[®]ELISA, eBioscience Inc., USA), seguindo os protocolos sugeridos pelo fabricante. Anteriormente ao ensaio imunoenzimático, as amostras de precipitados de vesículas extracelulares passaram por ultrassom, pelo período de 10 minutos, com o intuito de promover a ruptura de membrana das vesículas e expor seu conteúdo em suspensão líquida. A densidade óptica foi medida a 450nm através do equipamento BioTek[®]PowerWave XS (Biotek Instruments, Winooski, USA). Os limites de detecção para IFN- γ , IL-10 e TGF- β 1 foram 1,95 pg/ml, 1,2 pg/ml and 1,95 pg/ml, respectivamente. A quantificação inespecífica de citocinas presentes nas suspensões de vesículas extracelulares pôde ser descartada devido à presença de cerca de trinta amostras contendo níveis nulos de citocinas em frações de vesículas extracelulares, apesar de altos níveis presentes no sangue periférico. A etapa de quantificação dos níveis de IFN- γ , IL-10 e TGF- β 1 por ELISA foi realizada no University Hospital Essen, Institute for Transfusion Medicine (Transplantation Diagnostics R&D), Essen, Alemanha.

1.11. Quantificação das moléculas HLA-G, HLA-E, MICA/B e ULBP-2

A quantificação dos níveis de HLA-G, HLA-E, MICA/B e ULBP-2 presentes nas amostras de soro e nas amostras de precipitados de vesículas extracelulares derivadas de soro de mulheres pertencentes aos dois grupos de estudo (IF e FW) foi realizada através do ensaio imunoenzimático ELISA. O ensaio foi realizado em duplicatas para cada amostra, partindo de um anticorpo de captura aderido sobre fase sólida (placa de 384 poços) e incubado pelo período de 12h a 4°C:

- HLA-G: MEM-G/9, 1 mg/ml, 1:150 em PBS, Exbio;
- HLA-E: 3D12, 0,5 mg/ml, 1:150 em PBS, eBioscience;
- MICA: AMO1, 1 mg/ml, 1 mg/ml, 1:200 em PBS, BamOmaB;
- MICB: DuoSet ELISA kit, 720 µg/ml, 1:180 em PBS, R&D Systems;
- ULBP-2: BUM01, 1 mg/ml, 1:1000; BamOmaB.

O bloqueio de ligações inespecíficas foi realizado através da adição de PBS/1% albumina de soro bovino (BSA) para as moléculas MICA e MICB e PBS/3% BSA para as moléculas HLA-G e HLA-E. As placas foram incubadas pelo período de 2h a 37°C. Proteínas recombinantes comerciais (MICA/B e ULBP-2) e proteínas purificadas provenientes de linhagens celulares (HLA-G/E) em diferentes diluições foram utilizadas para o cálculo da curva padrão. As amostras de soro e de precipitados de vesículas extracelulares foram diluídas em 1:2 (HLA-G/E) e 1:3 (MICA/B e ULBP-2). Após incubação de 2h a 37°C, o anticorpo primário foi diluído e incubado com as amostras pelo período de 2h a 37°C:

- HLA-G: anti-β2-microglobulina, 4,6 g/L, 1:5000 em PBS, Dako;
- HLA-E: MEM-E/07 biotinilado, 1 mg/ml, 1:800 em PBS/3% BSA, Exbio;
- MICA: BAF1300 biotinilado, 50 µg/ml, 1:125 em PBS/1% BSA + 2% soro de cabra (do inglês: *goat serum*), R&D Systems;
- MICB: DuoSet ELISA kit, 72 µg/ml, 1:180 em PBS/1% BSA + 2% soro de cabra, R&D Systems;
- ULBP-2: biotinilado, 72 µg/ml, 1:300 em PBS/1% BSA + 2% soro de cabra; R&D Systems.

A etapa de incubação com o anticorpo primário foi seguida pela etapa de detecção com o uso de streptavidina conjugada com HRP (R&D Systems) diluída 1:200 em PBS/1% BSA e uma incubação pelo período de 30 minutos a temperatura ambiente. O substrato cromogênico de ligação 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB Super Slow, Sigma-Aldrich, USA) foi empregado nas amostras. Após essa etapa, a reação enzimática foi interrompida pelo uso de 1M H₂SO₄ e a densidade óptica foi medida a 450nm através do equipamento BioTek® PowerWave XS (Biotek Instruments, Winooski, USA). A determinação dos níveis de HLA-G, HLA-E, MICA/B e ULBP-2 foi realizada através de uma curva padrão de 6

parâmetros para HLA-G/E e 7 parâmetros para MICA/B e ULBP-2. A quantificação inespecífica de moléculas presentes nas suspensões de vesículas extracelulares pôde ser descartada devido à presença de amostras contendo níveis nulos de moléculas HLA-G, HLA-E, MICA/B e ULBP-2 em frações de vesículas extracelulares, apesar de altos níveis presentes no sangue periférico. A etapa de quantificação dos níveis de HLA-G, HLA-E, MICA/B e ULBP-2 por ELISA foi realizada no University Hospital Essen, Institute for Transfusion Medicine (Transplantation Diagnostics R&D), Essen, Alemanha.

1.12. Estudos funcionais

1.12.1. Captação de vesículas extracelulares por células de sangue periférico

Inicialmente, 2 ml de plasma de uma representante de cada grupo de estudo (IF, FW e PW) foram centrifugados (19.000xg, 5 minutos) com o intuito de sedimentar células e restos celulares. Após essa etapa, os sobrenadantes foram ultracentrifugados (Beckman-Coulter Inc., CA, USA) a 139.000xg durante 2h10min a 4°C, seguida de descarte de sobrenadante e ressuspensão do *pellet* de vesículas extracelulares em 200µl de NaCl 0,9%.

Para testar a capacidade das vesículas extracelulares de serem captadas ou entrarem em contato com células de sangue periférico, as suspensões de vesículas extracelulares em NaCl 0,9% foram marcadas com PKH26 (Red Fluorescent Cell Linker Mini Kit, Sigma-Aldrich, USA) conforme recomendações do fabricante. Brevemente, as suspensões de vesículas extracelulares em NaCl 0,9% foram ultracentrifugadas a 139.000xg durante 1h10min a 4°C e marcadas com PKH26 diluído (1:250) em Diluent C (Sigma kit) e incubadas pelo período de 10 minutos a 37°C. A reação foi suspensa com a adição de meio de cultura RPMI 1640 (Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Deutschland) contendo 1% de penicilina, 1% de estreptomicina, 1% de L-glutamina e 10% de soro bovino fetal inativado (56°C, 30 minutos) e depletado de vesículas extracelulares por diferentes passos de ultracentrifugação. Para lavagem e remoção de corante excedente, dois passos de lavagem com PBS foram realizados a 139.000xg durante 1h10min a 4°C cada e o precipitado resultante foi ressuspensão em 200µl de RPMI completo.

O próximo passo foi o isolamento de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs, do inglês: *peripheral blood mononuclear cells*) por gradiente de densidade. PBMCs provenientes de 3 mulheres saudáveis e não gestantes foram isoladas utilizando tubos Vacutainer (BD Vacutainer® CPTTM, Becton Dickinson Co., USA) e diversos passos de centrifugação com o objetivo de separar células, extrair plaquetas e deduzir contaminação com granulócitos. Depois de isoladas, as células foram estimuladas com interleucina-2 (IL-2, 200 U/ml, PeproTech, USA) e incubadas pelo período de 12h a 37°C e 5% de CO₂. Após a etapa de incubação, PBMCs foram colocadas em cultura pelo período de 2h a 37°C e 5% de CO₂ juntamente com as suspensões de vesículas extracelulares (200 – 450 µg/ml, Pierce™

BCA Protein Assay kit, Thermo Scientific, USA) marcadas com PKH26. O passo seguinte foi a coloração das células com os fluorocromos DAPI (marcador de ácido nucleico, Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Deutschland), anti-CD19 FITC (linfócitos B, eBioscience Inc., USA), anti-CD8 FITC (linfócitos T citotóxicos, Becton Dickinson Co., USA), anti-CD3 ECD (linfócitos T, Beckman Coulter, Co., France), anti-CD56 ECD (células NK, Beckman Coulter, Co., France), anti-CD14 APC (monócitos; eBioscience, Inc., USA) e anti-CD4 APC (linfócitos Th1 e Th2, monócitos e macrófagos, Becton Dickinson Co., USA). A compensação foi realizada através do uso de PBMCs marcadas com um único fluorocromo.

A aquisição das amostras e imagens foi realizada através do equipamento ImageStreamX Imaging Flow Cytometer (AMNIS® Corporation, USA) e do programa INSPIRE®, o qual acompanha o equipamento. O equipamento ImageStreamX combina a velocidade, a sensibilidade e as habilidades de fenotipagem da citometria de fluxo com as imagens detalhadas de microscopia. No total, 10.000 eventos (células) foram analisados por amostra com um aumento de 60x. Os sinais dos fluorocromos FITC, PKH26 e ECD foram coletados nos canais 2 (480 – 560 nm), 3 (560 – 595 nm) e 4 (595 – 642 nm), respectivamente e excitados por um laser de 488 nm com 100 mW. O sinal do fluorocromo DAPI foi coletado no canal 7 (430 – 505 nm) e excitado por um laser de 375 nm com 7 mW e o sinal do fluorocromo APC foi coletado no canal 11 (642 – 745 nm) e excitado por um laser de 642 nm com 120 mW.

A análise dos dados foi realizada através do programa IDEAS® Application versão 6.1. A ferramenta de internalização do programa IDEAS® foi utilizada para calcular a proporção de populações celulares específicas que mostram co-localização positiva entre os marcadores de superfície celular e as vesículas extracelulares marcadas com PKH26. A proporção de populações celulares positivas para co-localização com vesículas extracelulares foram calculadas de acordo com as populações de células vivas, as quais são negativas para coloração com DAPI. A etapa da análise de captação de vesículas extracelulares por PBMCs foi realizada no University Hospital Essen, Institute for Transfusion Medicine (Transplantation Diagnostics R&D), Essen, Alemanha.

1.12.2. Detecção da atividade de caspase-3, da expressão de IFN- γ e da degranulação em PBMCs na presença e na ausência de vesículas extracelulares

O primeiro passo para esse experimento foi o isolamento de PBMCs por gradiente de densidade. PBMCs provenientes de 1 mulher saudável e não gestante foram isoladas utilizando tubos Vacutainer (BD Vacutainer® CPTTM, Becton Dickinson Co., USA) e diversos passos de centrifugação com o objetivo de separar células, extrair plaquetas e deduzir contaminação com granulócitos. Depois de isoladas, as células foram incubadas pelo período de 48h a 37°C e 5% de CO₂ na presença e ausência de 20x10⁶ partículas/ml de

suspensão de vesículas extracelulares (concentração média das mulheres participantes do estudo), precipitadas utilizando ExoQuick™, provenientes de amostras de soro de três mulheres com falha de implantação embrionária (IF) e de três mulheres gestantes (PW). Após a incubação de 48h, PBMCs na presença e ausência de vesículas extracelulares foram colocadas em cultura com a linhagem celular LCL-RSV (linhagem imortalizada de células B) na razão de 10 para 1 em um volume final de 200µl de meio RPMI completo. Nesse momento, as suspensões celulares foram marcadas com o fluorocromo CD107a PE (proteína 1 de membrana associada ao lisossomo, BD Bioscience, USA), o qual funciona como um marcador de degranulação celular, seguindo uma etapa de incubação de 1h a 37°C e 5% de CO₂.

Com o objetivo de poder marcar e analisar a proteína caspase-3 e a citocina IFN-γ, um coquetel inibidor de transporte de proteína (do inglês: *Protein Transport-Inhibitor Cocktail*, eBioscience, Inc., USA) contendo brefeldina A (5,3 mM) e monensina (1 mM) foi adicionado às suspensões celulares na concentração final de 2 µl/ml e uma incubação adicional de 5h a 37°C e 5% de CO₂ foi realizada. Após esse período de incubação, as suspensões celulares foram marcadas com os fluorocromos anti-CD56 ECD (Beckman Coulter, Co., France) e anti-CD3 PECy7 (clone: SK7, BioLegend, USA) que detectam especificamente células NK e linfócitos T (CD3⁺), respectivamente. Para coloração intracelular dos eventos positivos para caspase-3 e IFN-γ, as suspensões celulares passaram por fixação e permeabilização (Fixation/Permeabilization Solution Kit, BD Bioscience, USA) de acordo com as recomendações do fabricante e finalmente foram marcadas com anti-caspase-3 ativa FITC (clone: C92-605, BD Bioscience, USA) e anti-IFN-γ APC (clone: 4S.B3, eBioscience, Inc., USA). A compensação foi realizada através do uso de PBMCs marcadas com um único fluorocromo e o controle negativo foi realizado com anticorpos de mesmo isotipo IgG1 (BD Bioscience, USA). A aquisição e análise das amostras foi realizada através do citômetro de fluxo Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, Germany) e a aquisição dos dados foi realizada através do programa CXP (Beckman Coulter, Germany), que acompanha o equipamento. Os dados foram avaliados através do programa Kaluza® Analysis versão 1.3 (Beckman Coulter, Germany). A etapa de detecção da atividade de caspase-3, da expressão de IFN-γ e da degranulação em PBMCs na presença e na ausência de vesículas extracelulares foi realizada no University Hospital Essen, Institute for Transfusion Medicine (Transplantation Diagnostics R&D), Essen, Alemanha.

1.13. Análise estatística

As frequências alélicas e genóticas foram obtidas por contagem direta. A avaliação da condição de equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizada com o uso do programa Genepop versão 4.2 (<http://genepop.curtin.edu.au/>). Uma vez obtidas as frequências alélicas e genóticas dos genes *HLA-G*, *HLA-E* e *MICA*, foram realizadas análises comparativas ou de associação no grupo de casais com falha de implantação e no grupo de casais controle, segundo diversas abordagens (geral e estratificação por sexo), com o intuito de avaliar a existência de associação entre a distribuição dos genes e a condição de falha de implantação embrionária. A inferência de haplótipos do gene *HLA-G* e 14pb ins/del foi realizada com o auxílio do programa Arlequin versão 3.0. Todas as comparações foram realizadas através do uso do Teste Exato de Fisher ou Qui-quadrado (dependendo do tamanho da amostra que foi analisada para cada teste) em tabelas de contingência 2x2. Nos casos em que o valor de alguma das células da tabela de contingência foi 0, foi realizada a correção de Haldane, que consiste de acrescentar o valor de 0,5 a todas as células da tabela com o objetivo de prevenir erro de cálculo quando da divisão de um valor por zero. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas (indicando associação) nos casos em que $p \leq 0,05$. Como fator de correção (correção de Bonferroni) os valores de p foram multiplicados pelo número de alelos, genótipos ou haplótipos testados (p_c). Nos casos em que a diferença entre as frequências gênicas de pacientes e controles apresentaram significância estatística, foi calculado o Odds Ratio ("OR" ou razão de probabilidades), com intervalo de confiança de 95%. O valor de OR, em análises de associação, é tomado como sinônimo do valor de risco relativo (RR), que demonstra quantas vezes a característica é mais frequente entre os portadores de um determinado fator comparando com indivíduos sem o fator. Valores de OR acima de 1 indicam que o fator está associado com uma maior probabilidade de se desenvolver a afecção, enquanto valores de OR abaixo de 1 indicam uma menor probabilidade. Os programas Arlequin versão 3.0, GraphPad Prism versão 6.01 (GraphPad Software, USA) e Genepop versão 4.2 (<http://genepop.curtin.edu.au/>) foram utilizados nas análises.

Todas as variáveis quantitativas contínuas passaram por teste de normalidade ou distribuição Gaussiana (D'Agostino & Pearson normality test e Shapiro-Wilk normality test) anteriormente as análises estatísticas. As análises comparativas referentes à tamanho de vesículas extracelulares foram realizadas através de Unpaired T test devido à distribuição normal da variável. As análises comparativas referentes ao número de vesículas extracelulares foram realizadas através de Unpaired T test e Mann-Whitney Test dependendo da distribuição da variável em diferentes situações de comparação. Para as análises comparativas referentes a diferenças na expressão de proteínas típicas de vesículas extracelulares avaliadas densitometricamente, Mann-Whitney Test foi empregado

por se tratar de variáveis quantitativas contínuas sem distribuição normal. As análises comparativas entre os níveis de moléculas HLA-G, HLA-E, MICA/B e ULBP-2 e os níveis de citocinas IFN- γ , IL-10 e TGF- β 1 no soro e nos precipitados de vesículas extracelulares derivadas de soro de mulheres pertencentes aos grupos de estudo foram realizadas através de Mann-Whitney Test por se tratar de variáveis quantitativas contínuas sem distribuição normal. Além disso, Mann-Whitney Test foi empregado para avaliar a associação entre os diferentes alelos e haplótipos dos genes *HLA-G*, *HLA-E* e *MICA* e seus respectivos níveis no soro e nos precipitados de vesículas extracelulares derivadas de soro de mulheres pertencentes aos grupos IF e FW. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas nos casos em que $p \leq 0,05$. Os dados foram apresentados como média \pm DP e mediana + variação ou mediana + amplitude inter-quartil, dependendo da distribuição da variável avaliada. Os programas GraphPad Prism versão 6.01 (GraphPad Software, USA) e SPSS versão 21.0 (SPSS Inc., USA) foram utilizados nas análises.

Nas análises referentes aos níveis da molécula HLA-G no soro e nos precipitados de vesículas extracelulares derivadas de soro de mulheres pertencentes aos grupos IF e FW, uma curva ROC (do inglês: *Receiver Operating Characteristic*) foi executada adicionalmente com o objetivo de discriminar os grupos de estudo em relação a um valor de *cut-off* gerado pelos níveis solúveis de HLA-G. A curva ROC é uma representação direta da habilidade de uma variável contínua em classificar indivíduos em grupos, onde a sensibilidade representa os verdadeiros positivos e $1 -$ especificidade representa os falsos positivos. A área abaixo da curva representa a medida de desempenho do teste, na qual valores acima de 0,70 são considerados satisfatórios. O programa SPSS versão 21.0 (SPSS Inc., USA) foi utilizado para essa análise.

As análises estatísticas referentes aos estudos funcionais foram realizadas com o auxílio dos programas GraphPad Prism versão 6.01 (GraphPad Software, USA) e SPSS versão 21.0 (SPSS Inc., USA). Os testes estatísticos executados para avaliar a captação de vesículas extracelulares por células de sangue periférico foram One-way ANOVA e Unpaired T test para as variáveis quantitativa contínuas. Além disso, Holm-Sidak's test foi executado para comparações múltiplas. Para as análises estatísticas referentes à detecção da atividade de caspase-3, da expressão de IFN- γ e da degranulação em PBMCs na presença e na ausência de vesículas extracelulares, os testes estatísticos Kruskal-Wallis e Wilcoxon foram empregados para as comparações, sendo que o teste de Dunn's foi executado para comparações múltiplas.

2. QUESTIONÁRIOS CLÍNICOS E DEMOGRÁFICOS

Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH)

Departamento de Genética – UFPR

PROJETO: Estudos genéticos sobre HLA e Fertilidade

CASAL PACIENTE - IF

1 – Identificação do Casal

1 - Nome da mulher:

2 - Data de Nasc.: Idade: G. Étnico:

3 – Profissão: G. Sanguíneo:

4 – Fumante () Sim Sim Há quanto tempo? (____Anos) (____Meses)
() Não

5 – Nome do Marido:

6 – Data de Nasc.: Idade: G. Étnico:

7 – Profissão: G. Sanguíneo:

8 – Fumante () Sim Há quanto tempo? (____Anos) (____Meses)
() Não

9 – Endereço: N°:

Apartamento Bairro Cidade Estado

CEP Tel. Res. Tel. Com.

2 – Dados do Casal Atual

1 – Data de união _____ Idade da mulher ao se casar _____

2 – Consangüinidade: () S () N Grau de parentesco: _____

3 – Relato de casos de infertilidade ou dificuldade de engravidar na família

() Sim () Não

Se sim: () família da mulher () família do homem

4 – N° total de tratamentos de reprodução anteriores: _____ Abortos _____

5 – Causa da infertilidade _____

6 – Medicação para indução da ovulação _____

7 – Número de óvulos obtidos _____

8 – Número de embriões transferidos _____ Qualidade do embrião _____

9 – Número de embriões vivos _____

10 – Avaliação no 3º dia após a estimulação

Volume ovariano _____

Nº de folículo antral _____

Nível de FSH (Folículo estimulante) _____

Nível de Estradiol _____

3 – Antecedentes Maternos

1 – Concebe facilmente () Sim () Não

2 – Usa método anticoncepcional? () Sim () Não

Há quanto tempo? _____

Qual? _____

3 – Idade da primeira menstruação: _____

4 – Enfermidade aguda? () Sim () Não

Especifique: _____

5 – Enfermidade crônica? () Sim () Não

Qual? _____

6 – Doença auto-imune? () Sim () Não

Qual? _____

7 – Recebeu transfusão sanguínea? () Sim () Não

Quando? _____

5 – Outros fatores

1 – Fatores femininos

a) Problemas ovulatórios com Clamídias () Sim () Não

b) Cervix incompetente () Sim () Não

c) Síndrome de Asherman () Sim () Não

d) Efeito da fase luteal () Sim () Não

e) Problemas anatômicos () Sim () Não

Quais? _____

2 – Fatores masculinos

a) Prostatite () Sim () Não

3 – Fatores do Casal

a) Infecção por Micoplasma () Sim () Não

Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH)

Departamento de Genética – UFPR

CONTROLES: Estudos genéticos sobre HLA e Fertilidade

CASAL CONTROLE - FW

1 – Identificação do Casal

1 - Nome da mulher:

2-Fumante () Sim Há quanto tempo? (____Anos) (____Meses)
() Não

3 - Data de Nasc: Idade: G. Étnico:

4 – Profissão: G. Sanguíneo:

5 – Nome do cônjuge:

6- Fumante () Sim Há quanto tempo? (____Anos) (____Meses)
() Não

7 – Data de Nasc.: Idade: G. Étnico:

8 – Profissão: G. Sanguíneo:

7 – Endereço: Nº: Compl:

Bairro: Cidade: Estado:

CEP: Tel. Res.: Tel. Com.:

2 – Dados do Casal Atual

1 – Data de união: Consangüinidade: ()S ()N

2 – Idade da mulher ao se casar : Grau de parentesco:

3 – Nº total de concepções: Abortos: Natimortos: N. vivos:

4 – Concepções: 1ª 2ª 3ª 4ª 5ª 6ª

5 – Outras uniões ou casamentos: Consangüinidade: ()S ()N

6 – Data da união: Nº de concepções:

7 – Idade da mulher ao se casar:

8 – Outras uniões ou casamentos: Consangüinidade: ()S ()N

9 – Data da união: Nº de concepções:

10 – Idade da mulher ao se casar:

3 – Antecedentes Maternos

1 – Idade ou data da última gravidez:

2 – Concede facilmente? () Sim () Não

3 – Usa método anticoncepcional? Há quanto tempo? Qual?

4 – Idade da primeira menstruação:

5 – Enfermidade aguda? () Sim () Não

Especifique: _____

6 – Enfermidade crônica? () Sim () Não

Especifique: _____

7 – Doença auto-imune? () Sim () Não

Especifique: _____

8 – Recebeu transfusão sanguínea? () Sim () Não

Quando? _____

9 – Data da última gestação: _____

Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH)

Departamento de Genética – UFPR

CONTROLES: Estudos genéticos sobre HLA e Fertilidade

CONTROLE GESTANTE - PW

1 – Identificação

1 - Nome:

2 - Fumante () Sim Há quanto tempo? (____Anos) (____Meses)
() Não

3 - Data de Nasc: Idade: G. Étnico:

4 – Profissão: G. Sanguíneo:

5 – Endereço: N°: Compl:

Bairro: Cidade: Estado:

CEP: Tel. Res.: Email.:

2 – Gestação Atual

1 – Tempo de gestação: Meses: Semanas:

2 – Teve algum problema para engravidar? () Sim () Não

Qual: _____

3 – Teve algum problema nas primeiras semanas de gravidez? () Sim () Não

Especifique: _____

4 – Diabetes gestacional? () Sim () Não

5 – Pré-eclampsia ou Eclampsia? () Sim () Não

3 – Antecedentes Maternos

1 – Estado civil:

2 – Idade ao se casar:

3 – Filhos anteriores: () Sim () Não

4 – N° total de gestações: N. vivos: Abortos: Natimortos:

5 – Anos dos Nascimentos: 1^a 2^a 3^a 4^a 5^a 6^a

6 – Outras uniões ou casamentos:

7 – N° de gestações desta união:

8 – Idade ou data da última gravidez:

9 – Engravidada facilmente? () Sim () Não

10 – Idade da primeira menstruação:

11 – Está com alguma inflamação, infecção ou doença no momento (Enfermidade aguda)? () Sim () Não

Qual: _____

12 – Possui alguma doença crônica (Enfermidade crônica)? () Sim () Não

Qual: _____

13 – Doença auto-imune? () Sim () Não

Qual: _____

14 – Recebeu sangue alguma vez (transfusão sanguínea)? () Sim () Não

Quando: _____

3. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

- a) Você está sendo convidado a participar como: () PACIENTE () CONTROLE de um estudo intitulado “DETECÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES NO PROGNÓSTICO E ACEITAÇÃO DO ALOENXERTO E ENXERTO SEMI-ALOGÊNICO”. É através das pesquisas, inclusive básicas, que ocorrem os avanços na medicina, e sua participação é de fundamental importância;
- b) O objetivo desta pesquisa é buscar subsídios que possam ajudar a esclarecer fenômenos relacionados ao sucesso da implantação do embrião no útero materno. Essas informações serão também importantes para o entendimento de alterações que ocorrem no período gestacional tais como, abortos recorrentes de causas desconhecidas, pré eclampsia e inclusive auxiliar no entendimento dos mecanismos que contribuem para aceitação/rejeição de órgãos transplantados. A participação de controles neste caso é de fundamental importância, pois é através das comparações entre dados clínicos entre amostras caracterizadas como Paciente e Controle é que se pode concluir sobre a influência do componente genético na condição clínica sob estudo.
- c) Caso você participe da pesquisa, será necessário que você forneça uma amostra de sangue (10ml);
- d) O único inconveniente que você poderá experimentar é a dor pela picada na hora da coleta de sangue, bem como pequenos hematomas que possam vir a ocorrer, e que não causam danos a pacientes ou controles;
- e) Não há riscos para você;
- f) Para tanto você deverá coletar sangue na clínica onde realiza o tratamento;
- g) A pesquisadora responsável pelo projeto, Profa. Maria da Graça Bicalho – fone: 3361-1729 poderá ser contatada no LIGH;
- h) Está garantido que você terá todas as informações que você queira, antes, durante e depois da pesquisa;
- i) A sua participação neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de recusar participar da pesquisa;
- j) As informações relacionadas à pesquisa poderão ser inspecionadas pelos pesquisadores que executam a pesquisa e pelas autoridades legais, no entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório, publicação ou por qualquer meio, isto será feito de forma codificada, para que a confidencialidade seja mantida;
- l) Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames) não são de responsabilidade dos pacientes ou controles;
- m) Pela sua participação na pesquisa você não receberá qualquer valor em dinheiro;
- n) Quando os resultados forem divulgados, não aparecerá seu nome e sim um código;

Eu, li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo da pesquisa para a qual fui convocado a participar. A explicação que recebi menciona o fato relacionado a coleta de sangue e seus inconvenientes. Eu entendi que sou livre para interromper ou não participar da pesquisa. Eu concordo, voluntariamente, em participar desta pesquisa.

Ass. Paciente/Controle _____

Ass. Pesquisador _____

Data ___/___/_____