

FERNANDA RIBAS ZACARIAS

**POLIMORFISMO DO GENE *MICA* E SEU DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO
COM *HLA-B***

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

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

CURITIBA
2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**POLIMORFISMO DO GENE *MICA* E SEU DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO
COM *HLA-B***

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

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

Aluna: Fernanda Ribas Zacarias.

CURITIBA
2006

À todos aqueles que de fato fazem ou
fizeram diferença em minha vida, dedico...

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal do Paraná e ao Curso de Pós-Graduação em Genética por permitirem a realização deste curso.

Ao Convênio FUNPAR-LIGH pelo auxílio financeiro.

À Profa. Dra. Maria da Graça Bicalho, pela confiança, incentivo, orientação e por todas as oportunidades que a mim concedeu propiciando sempre o meu aperfeiçoamento profissional e acadêmico.

As professoras Maria Luiza Petzl-Erler e Valéria Sperandio Roxo pelas valiosas sugestões e auxílio durante o acompanhamento deste trabalho.

À toda equipe do Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade: Sonia, Fabiana, Savana, Sibelle, Marina, Eni, Izolde, Paola, Rafael, Clineu, Alessandro, José Luiz, Márcio, Gorete, Claudia, Renate, Téó, Pablo, Paulo e Waldir. Em especial ao pessoal da rotina por compreenderem minhas necessidades, sendo generosos e amigos, de modo que contribuíram de forma importante para a concretização deste trabalho.

À Sonia por todos os ensinamentos práticos de laboratório, e pela amizade que amadureceu durante os nossos oito anos de convivência.

À colega Liana Alves de Oliveira que colaborou na parte prática deste trabalho, enriquecendo os dados obtidos.

A todos os amigos, professores, servidores ou alunos, do departamento de Genética, dentre os quais gostaria de citar o Prof. Juarez, a Karin, a Lupe, o Ricardo, a Savana e a Loraine.

À pessoa que sem dúvida tenho um amor e uma ligação muito especial, minha irmã Renata, por tudo que compartilhamos e vivenciamos juntas, por nossas afinidades e diferenças, pela amizade, compreensão e apoio sempre. Muito obrigada por estar sempre comigo.

À minha sobrinha Isadora por todas as alegrias que me proporciona.

À minha mãe, Sônia de Quadros Ribas, e as minhas irmãs, Fabíola e Larissa, pelo amor e por terem me apoiado durante esta e outras etapas de minha vida.

À minha querida vó Tita, por ser uma pessoa maravilhosa e por todos os ensinamentos, carinho, dedicação e grande apoio sempre prestado à minha família.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS, QUADROS e GRÁFICOS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
RESUMO	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 O COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE.....	3
2.1.1 GENES DE CLASSE I E SEUS PRODUTOS MOLECULARES.....	6
2.2 O GENE <i>MICA</i> : ESTRUTURA, PRODUTO E FUNÇÃO	8
2.2.1 POLIMORFISMO DO GENE <i>MICA</i> E ESTUDOS POPULACIONAIS.....	14
2.3 O GENE <i>HLA-B</i> : ESTRUTURA, PRODUTO E FUNÇÃO.....	22
2.4 HAPLÓTIPOS <i>MICA_HLA-B</i> E DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO.....	25
2.5 ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO COM DOENÇAS.....	28
2.6 RELEVÂNCIA DE <i>MICA</i> NA REJEIÇÃO DE TRANSPLANTES.....	31
3. OBJETIVOS	33
4. JUSTIFICATIVA	34
5. MATERIAIS E MÉTODOS	36
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA POPULACIONAL.....	36
5.2 TÉCNICA DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO.....	36
5.2.1 CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DO DNA.....	36
5.3 TÉCNICA DE TIPAGEM PCR-SSP E PCR-SSOP-LUMINEX.....	37
5.3.1 TIPAGEM DO GENE <i>MICA</i> PELA TÉCNICA DE PCR-SSP.....	38
5.3.2 TIPAGEM DO GENE <i>MICA</i> PELA TÉCNICA DE PCR-SSOP.....	45
5.3.3 CARACTERIZAÇÃO DO MICROSSATÉLITE DO GENE <i>MICA</i>	46
5.3.4 TIPAGEM DO GENE <i>HLA-B</i> PELA TÉCNICA DE PCR-SSP.....	47
5.4 ELETROFORESE.....	48
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
6. RESULTADOS	53
6.1 GENE <i>MICA</i>	53
6.1.1 TIPIFICAÇÃO DO GENE <i>MICA</i>	53
6.1.2 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE <i>MICA</i>	55

6.2 GENE <i>HLA-B</i>	57
6.2.1 TIPIFICAÇÃO DO GENE <i>HLA-B</i>	57
6.2.2 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE <i>HLA-B</i>	59
6.3 EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG E HETEROZIGOSIDADE.....	63
6.4 TESTE DE NEUTRALIDADE.....	63
6.5 FREQUÊNCIA DOS HAPLÓTIPOS <i>MICA_HLA-B</i> E DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO.....	64
6.5.1 DESCRIÇÃO DOS HAPLÓTIPOS <i>MICA_HLA-B</i>	66
7. DISCUSSÃO	68
8. CONCLUSÕES	86
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
APÊNDICE 1.....	106
ANEXO 1.....	110
ANEXO 2.....	112
ANEXO 3.....	123

LISTA DE TABELAS, QUADROS E GRÁFICOS

TABELA 2.1 – ALELOS DO GENE <i>MICA</i>	15
TABELA 2.2 – MICROSSATÉLITE DO EXON 5 E SUA ASSOCIAÇÃO COM OS ALELOS <i>MICA</i>	17
TABELA 2.3 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS (%) DO GENE <i>MICA</i> EM ALGUMAS POPULAÇÕES.....	21
QUADRO 5.1 – OLIGONUCLEOTÍDEOS <i>SENSE</i> EMPREGADOS NA TIPAGEM DO GENE <i>MICA</i> ...	39
QUADRO 5.2 - OLIGONUCLEOTÍDEOS <i>ANTI-SENSE</i> EMPREGADOS NA TIPAGEM DO GENE <i>MICA</i>	41
QUADRO 5.3 – MIXES DE AMPLIFICAÇÃO PARA IDENTIFICAR OS ALELOS <i>MICA</i>	43
TABELA 5.1 – CONCENTRAÇÃO DE REAGENTES NA PCR.....	47
TABELA 5.2 – KITS DE TIPAGEM PARA O GENE <i>HLA-B</i>	48
QUADRO 6.1 – DISPARIDADES NA DEFINIÇÃO DOS ALELOS DO GENE <i>MICA</i>	55
TABELA 6.1 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE <i>MICA</i>	56
GRÁFICO 6.1 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE <i>MICA</i>	57
TABELA 6.2 – FREQUÊNCIAS DOS ALELOS DO MICROSSATÉLITE DO GENE <i>MICA</i>	57
TABELA 6.3 - FREQUÊNCIAS DOS GRUPOS ALÉLICOS DO GENE <i>HLA-B</i>	60
GRÁFICO 6.2 – FREQUÊNCIAS DOS GRUPOS ALÉLICOS DO GENE <i>HLA-B</i>	61
TABELA 6.4 – FREQUÊNCIAS DOS GRUPOS, CONJUNTOS E/OU ALELOS DE <i>HLA-B</i>	62
TABELA 6.5 – TESTE DE NEUTRALIDADE SELETIVA (EWENS-WATTERSON).....	64
TABELA 6.6 - HAPLÓTIPOS <i>MICA_HLA-B</i> COM FREQUÊNCIA SUPERIOR A 1% E RESPECTIVOS VALORES DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO RELATIVO.....	65
TABELA 7.1 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE <i>MICA</i> EM ALGUMAS POPULAÇÕES.....	72

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – MAPA DO COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE HUMANO.....	5
FIGURA 2A – MOLÉCULA HLA-A2.....	7
FIGURA 2B – DIAGRAMA EM FITAS DA ESTRUTURA DE UMA MOLÉCULA DE CLASSE I.....	7
FIGURA 3 – ESTRUTURA DO GENE <i>MICA</i>	9
FIGURA 4 – ESTRUTURA DA MOLÉCULA <i>MICA</i>	13
FIGURA 5 – DIAGRAMA EM FITAS DO COMPLEXO <i>MICA-NKG2D</i>	14
FIGURA 6 – INTERPRETAÇÃO DO GEL PARA OS KITS LSSP.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cDNA	- DNA complementar
CMV	- Citomegalovírus
CPH	- COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE
HGH	- Hormônio do Crescimento Humano
HIV	- <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HLA	- <i>Human Leukocyte Antigen</i>
HSP70	- <i>Heat Shock Protein</i>
LINE	- <i>Long Interspersed Nuclear Element</i>
MHC	- <i>MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX</i>
MIC	- <i>MHC CLASS I CHAIN-RELATED GENE</i>
MICA	- <i>MHC class I chain-related gene A</i>
NK	- <i>Natural Killer Cell</i>
NKG2D	- <i>C-Type lectin-like activating immunoreceptor</i>
NMDP	- <i>National Marrow Donor Program</i>
PCR	- <i>Polymerase Chain Reaction</i>
SAPE	- Estreptoavidina-Phycoeritrina
SBT	- <i>Sequencing-based Typing</i>
SSCP	- <i>Single-Strand Conformation Polymorphism</i>
SSOP	- <i>Sequence-Specific Oligonucleotide Probing</i>
SSP	- <i>Sequence-Specific Primer</i>
T CD4+	- Linfócito T CD4+
T CD8+	- Linfócito T CD8+
T $\gamma\delta$	- Linfócitos T gama –delta

RESUMO

O gene *MICA* (*Major histocompatibility complex class I chain-related gene A*) codifica para moléculas que apresentam similaridades estruturais com os antígenos HLA de classe I. No entanto, estas moléculas não se ligam à β_2 -microglobulina, nem apresentam peptídeos aos linfócitos T. A transcrição destas moléculas é induzida em condições de estresse celular que ocorrem predominantemente na superfície celular de fibroblastos, células endoteliais, epitélio intestinal e em células de epitélio tumoral. São moléculas que interagem com o receptor NKG2D presente em células NK e em linfócitos $T\gamma\delta$ e $T\alpha\beta$ CD8+. O gene *MICA* está localizado próximo ao gene *HLA-B*, com o qual um forte desequilíbrio de ligação é esperado. Seu polialelismo e polimorfismo é bastante elevado, tendo sido descritos 61 alelos até o momento. Neste estudo uma amostra de 204 indivíduos euro-brasileiros do Paraná, oriundos em sua grande maioria da cidade de Curitiba, foi investigada quanto à distribuição alélica do gene *MICA* e seu desequilíbrio de ligação com o gene *HLA-B*. Na tipagem de ambos os genes foram empregados os métodos de PCR-SSOP e de PCR-SSP, ambas as metodologias utilizam sondas ou oligonucleotídeos iniciadores com seqüências dirigidas para os pontos polimórficos dos genes. Observou-se uma alta diversidade do gene *MICA* em nossa amostra, sendo os alelos mais freqüentes: *MICA*00801*, *MICA*00201*, *MICA*00901* e *MICA*004*. O haplótipo mais comum foi *MICA*00901_B*51*, além de *MICA*00201_B*35* e *MICA*00801_B*07*. Entretanto, os haplótipos *MICA*011_B*14* e *MICA*00201_B*39* são os únicos entre os dez mais freqüentes que apresentam um valor de $\Delta' = 1,0$ e $p = 0,000$. Este é o primeiro estudo a respeito da distribuição alélica do gene *MICA* no estado do Paraná e o segundo no Brasil. Os resultados obtidos, além de gerarem dados para estudos na área de genética de populações, poderão contribuir para os estudos funcionais e para a imunogenética das doenças auto-imunes e dos transplantes.

1 INTRODUÇÃO

Os genes de classe I do Complexo Principal de Histocompatibilidade – CPH (ou MHC do inglês – *Major Histocompatibility Complex*) são responsáveis por codificar glicoproteínas de superfície celular, que exercem a função de apresentadoras de peptídeos antigênicos às células T (BJORKMAN; PARHAM, 1990). Os genes *MIC* (*MHC class I chain-related genes*) constituem uma segunda linhagem de genes não clássicos do CPH de classe I descoberta em 1994 por dois grupos de pesquisa independentes, um deles adotando a determinação PERB11 que posteriormente caiu em desuso (BAHRAM *et al.*, 1994 e LEELAYUWAT *et al.*, 1994). Deste modo, a superfamília *HLA* de classe I passou a ser composta pelos genes de classe I clássicos, genes de classe I não clássicos (*HLA-E*, *-F*, *-G*, além de 12 pseudogenes) e pelos genes *MIC* (*MICA*, *MICB* e 5 pseudogenes) (HORTON *et al.*, 2004).

A família *MIC* é composta por sete membros, *MICA* – *MICG*, dos quais apenas *MICA* (*MHC class I chain-related genes A*) e *MICB* são funcionais, sendo os demais pseudogenes (BAHRAM, 2000; citado por HORTON *et al.*, 2004). Pelo isolamento de clones de cDNA foi constatado que o gene *MICA* localiza-se a cerca de 46,4 kb distantes de *HLA-B* em direção ao centrômero, tendo um comprimento equivalente a 11,7 kb (BAHRAM *et al.*, 1994 e MIZUKI, *et al.*, 1997a). Assim como as moléculas *HLA* (*Human Leukocyte Antigen*) de classe I e II, as moléculas *MICA* são expressas de forma codominante e são glicoproteínas de superfície celular de 383 aminoácidos. (BAHRAM *et al.*, 1994 e MOLINERO *et al.*, 2002). Entretanto, diferem dos antígenos *HLA* de classe I por não estarem associadas a uma cadeia de β_2 -microglobulina, nem apresentarem peptídeos ligados em sua fenda (GROH *et al.*, 1996 e ZWIRNER; FERNÁNDEZ-VIÑA; STASTNY; 1998).

Estruturalmente a proteína apresenta três domínios extracelulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$), um segmento transmembrana e uma cauda citoplasmática com um terminal carboxila. Cada domínio extracelular é codificado por um exon (exon 2, 3 e 4), havendo um grande intron separando o exon 1 do exon 2, e as seqüências da cauda citoplasmática e 3' não traduzida são partes de um único exon 6 (Figura 3) (BAHRAM *et al.*, 1994 e BAHRAM *et al.*, 1996). Muitos alelos diferem entre si por um

único nucleotídeo, sendo a variabilidade do gene *MICA* baseada em mutações de ponto (PÉREZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2002). Além disso, foi verificado que a taxa de substituições nucleotídicas não sinônimas é superior a taxa de substituições sinônimas no exon 3, mas não nos exons 2 e 4. Esta observação sugere que a seleção esteja agindo a favor da manutenção do polimorfismo no exon 3, as quais resultam em alterações de aminoácidos no domínio $\alpha 2$ da molécula MICA (ELSNER; SCHROEDER; BLASCZYK, 2001).

A molécula MICA, cuja expressão é induzida em condições de estresse celular, são alvo de células $T\gamma\delta V\delta 1$, as quais são abundantes no epitélio intestinal (GROH *et al.*, 1998). Seu receptor NKG2D está associado à proteína adaptadora de membrana DAP10, e este complexo MICA-NKG2D pode potencializar a atividade anti-tumoral inata das células NK (BAUER *et al.*, 1999 e WU *et al.*, 1999). O polimorfismo observado e sua expressão na superfície de células endoteliais sugerem um envolvimento desta molécula em rejeições crônicas e agudas de aloenxertos (ZWIRNER; DOLE; STASTNY, 1999).

Devido à pequena distância (46 kb) que separa os genes *MICA* e *HLA-B*, é esperado que haja um forte grau de desequilíbrio de ligação entre alelos destes locos. Este fato, somado ao polimorfismo observado para estes genes, tem motivado estudos, cujo objetivo é investigar sua diversidade populacional, e as implicações deste polimorfismo em doenças autoimunes e rejeição de órgãos transplantados. A tipagem dos genes *MICA* e *HLA-B* em uma amostra de doadores voluntários de medula óssea de Curitiba cadastrados no Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade da Universidade Federal do Paraná fornece resultados que esperamos possam contribuir para um melhor conhecimento da distribuição da diversidade alélica e haplotípica destes genes em nossa população. Estas informações poderão ser de grande relevância em futuras investigações a respeito da função das moléculas MICA.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE

As primeiras descobertas que levariam mais tarde ao conhecimento sobre o que viria a ser em humanos o Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH ou MHC, do inglês: *Major Histocompatibility Complex*), aconteceram na década de 30 do século XX, quando Peter Gorer e George Snell descreveram no genoma de murinos um loco que determinava a rejeição ou não de tecidos transplantados entre linhagens diferentes. Este loco foi mapeado no cromossomo 17 do camundongo e denominado H-2 (HANSEN *et al.*, 1993).

Cerca de duas décadas mais tarde, Jean Dausset, observou que soros de indivíduos politransfundidos eram capazes de aglutinar leucócitos de outros indivíduos, concluindo que as transfusões provocavam nessas pessoas a produção de anticorpos contra leucócitos dos seus doadores de sangue. De modo similar, em 1958, as equipes de Rose Payne e de Jon van Rood observaram, independentemente, que mulheres múltíparas produziam anticorpos contra antígenos paternos herdados pelo embrião (AMOS, 1992).

Ainda em 1958, foi descrito por Dausset o primeiro antígeno do CPH humano, este antígeno foi denominado “Mac”, e corresponde aos atuais antígenos HLA-A2 e HLA-A28 (AMOS, 1991).

A partir da década de 60, vários grupos de pesquisa se interessaram pela investigação do CPH, e agindo de forma cooperativa, com o objetivo de comparar resultados de ensaios e de estabelecer padrões de testes e de nomenclatura para fatores do sistema HLA (do inglês: *Human Leukocyte Antigens*) organizaram em 1964 o primeiro Encontro Internacional de Histocompatibilidade – *workshops*.

Estes encontros foram marcados por grandes descobertas e avanços no campo da Imunogenética e da Histocompatibilidade, como a descoberta da existência de vários locos e da diversidade presente nestes locos. Completando em 2006 sua décima quinta edição, ainda hoje trazem avanços nas técnicas de tipagem e apresentam a descoberta de novos alelos.

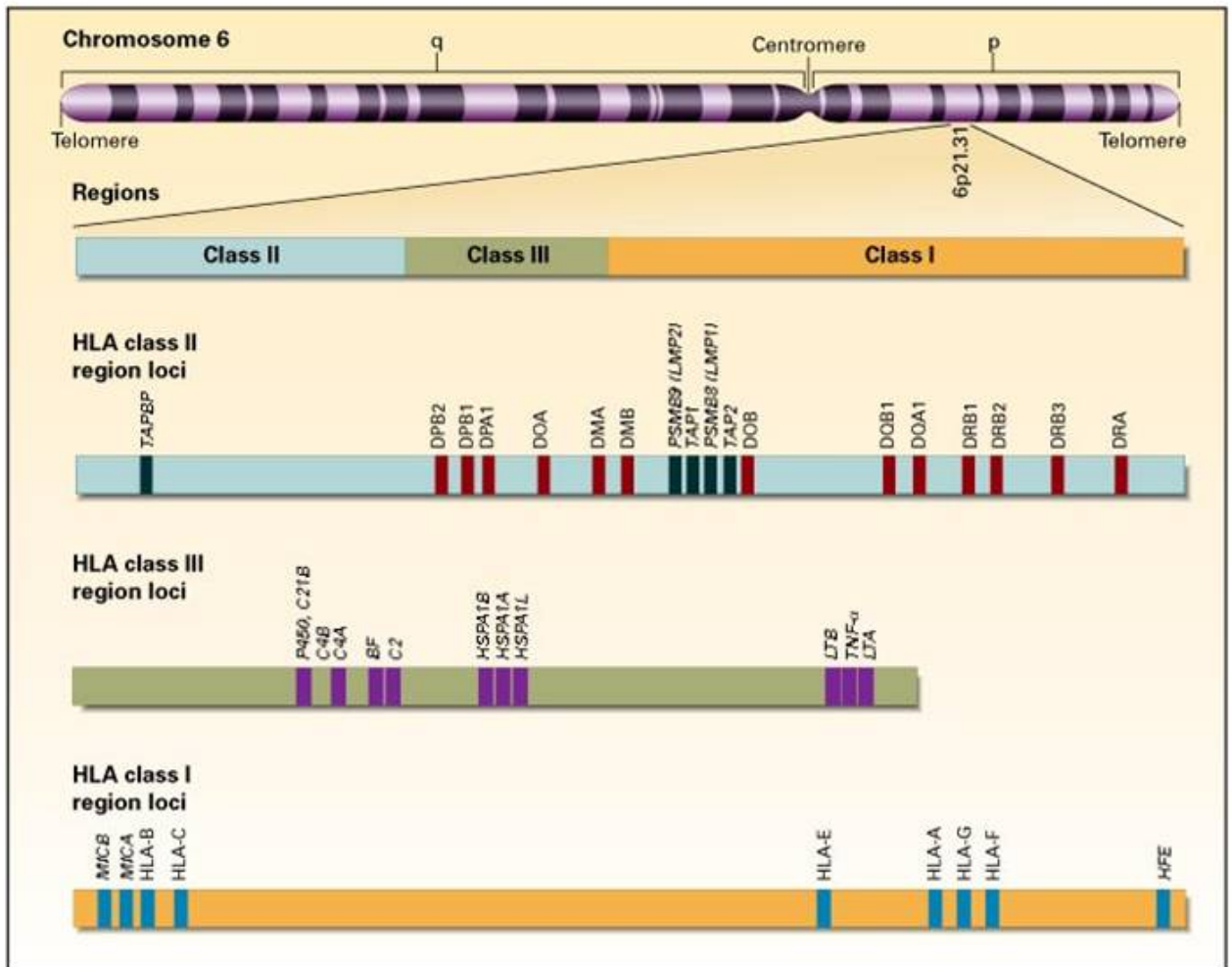
O CPH está organizado em 3 regiões: região de classe II, de classe III e de classe I, as quais se situam nesta ordem no braço curto do cromossomo 6 do

centrômero para o telômero. Diversos genes situados nestas regiões do CPH codificam moléculas que participam da resposta imune. As mais amplamente estudadas são aquelas codificadas pelo sistema gênico HLA, cuja função de apresentar peptídeos para serem reconhecidos pelas células T, faz com que se constituam em elementos centrais da nossa imunidade adaptativa. Existem dois tipos principais de moléculas HLA, as moléculas HLA de classe I e as de classe II, que apresentam peptídeos aos linfócitos T citotóxicos CD8⁺ e aos linfócitos T auxiliares CD4⁺, respectivamente. Localizado entre os grupos de genes de classe I (região de classe I) e de classe II (região de classe II), situa-se um terceiro grupo de genes denominados de classe III, que entre outras proteínas, codificam vários componentes do sistema complemento, como C2 e C4 (Figura 1) (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Os genes *HLA* em sua grande maioria são polialélicos e polimórficos, apresentando freqüências alélicas características em diferentes populações ou grupos étnicos, o que os tornam alvo de interesse em estudos na área de genética de populações e em pesquisas antropológicas.

Além disso, as implicações desta diversidade na defesa do organismo contra patógenos, na aceitação *versus* rejeição de transplantes e na associação com diversas alterações autoimunes, levaram a um grande interesse pelo seqüenciamento completo da região do genoma onde está situado o CPH. A seqüência completa e o mapa genético deste complexo foram concluídos em 1999 pelo Consórcio Internacional de Seqüenciamento do CPH, compreendendo uma região de 3,6 Mb situada no braço curto do cromossomo 6, banda 6p21.3. Com 224 locos gênicos identificados, o CPH é a região com maior densidade gênica já seqüenciada. Destes genes, 128 (57,1%) parecem ser expressos, sendo que o produto protéico de cerca de 40% exerce funções diretamente relacionadas com o sistema imunológico (The MHC sequencing consortium, 1999).

Figura 1 – Mapa do Complexo Principal de Histocompatibilidade Humano



FONTE: http://nejm.org/teaching_tools/jpegs_large/klei.fig1.jpg

Recentemente uma compilação de diversas pesquisas em larga escala divulgou a seqüência completa, finalizada em 2003, de uma região referida como CPH estendido, que compreende um segmento de 7,6 Mb, incluindo o original de 3,6 Mb. A nova região, que se estende telomericamente em relação à região de classe I e centromericamente em relação à região de classe II, foi definida por apresentar principalmente na porção telomérica sintenia em relação ao CPH de camundongo. Além disso, esta região apresenta genes similares aos genes do original CPH e que estão em desequilíbrio de ligação com os genes já conhecidos do CPH. Estes estudos detectaram cerca de 420 locos. Dentre os genes expressos, 22% apresentam um número de substituições nucleotídicas não sinônimas maior que a

média , 28% estão associados com funções imunológicas e 10% são causadores ou estão associados com doenças (HORTON *et al.*, 2004).

2.1.1 Genes de Classe I e seus Produtos Moleculares

A região de classe I do CPH ocupa um segmento de aproximadamente 2Mb da porção mais telomérica do braço curto do cromossomo 6. Neste segmento foram identificados até 1999 mais de 60 pseudogenes e 40 genes, dentre os quais temos os genes *HLA* de classe I clássicos e não clássicos e os genes e pseudogenes da família MIC (The MHC Sequencing Consortium, 1999)

As proteínas codificadas pelos genes *HLA* de classe I clássicos (*HLA-A*, *HLA-B*, *HL-C*) têm como principal função o transporte e apresentação de peptídeos específicos às células T CD8⁺, e se caracterizam pelo seu extraordinário polimorfismo (BJORKMAN; PARHAM, 1990 e MASON; PARHAM, 1998). Por outro lado, a função dos genes *HLA* de classe I não clássicos (*HLA-E*, *HLA-F*, *HLA-G*) não está ainda totalmente esclarecida; são poucos os alelos descritos e seus produtos possuem expressão tecidual mais restrita, se comparados aos clássicos (GERAGHTY *et al.*, 1990). A estrutura de uma molécula *HLA* de classe I consiste em duas cadeias polipeptídicas ligadas de forma não covalente, a cadeia α ou pesada, codificada por genes de classe I do CPH, associada a uma cadeia leve não polimórfica de β_2 -microglobulina (β_2m), que é codificada em um loco situado no cromossomo 15. A cadeia pesada apresenta 3 domínios, α_1 , α_2 , α_3 , sendo que o polimorfismo se concentra nos domínios α_1 e α_2 , codificados pelos exons 2 e 3, que formam a fenda de ligação de peptídeos (Figura 2a e 2b) (BJORKMAN *et al.*, 1987).

Em meados da década de 90, o uso de técnicas como *Blot Hybridizations*, clones de DNA complementar (cDNA) e seqüenciamento, permitiu a identificação de uma segunda linhagem de genes não clássicos do CPH de classe I evolutivamente conservada, a qual foi nomeada genes *MIC* (*MHC class I chain-related genes*) (BAHRAM *et al.*, 1994). Na mesma época outro grupo de pesquisadores identificou independentemente esta mesma família gênica, a qual descreveu pelo nome de *PERB11* (LEELAYUWAT *et al.*, 1994).

Entretanto, a terminologia que prevalece e é comumente utilizada, foi a proposta pelo grupo de Thomas Spies - termo *MIC*. Deste modo, a superfamília *HLA* de classe I passou a ser composta pelos genes de classe I clássicos (*HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*), genes de classe I não clássicos (*HLA-E*, *-F*, *-G*, além de 12 pseudogenes) e pelos genes e pseudogenes *MIC* (HORTON *et al.*, 2004).

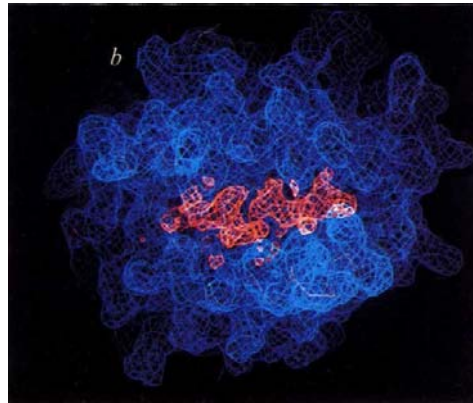


Figura 2a - Molécula HLA-A2 (azul) vista de cima, com um peptídeo (vermelho) ligado em sua fenda
FONTE: Bjorkman *et al.*, 1987

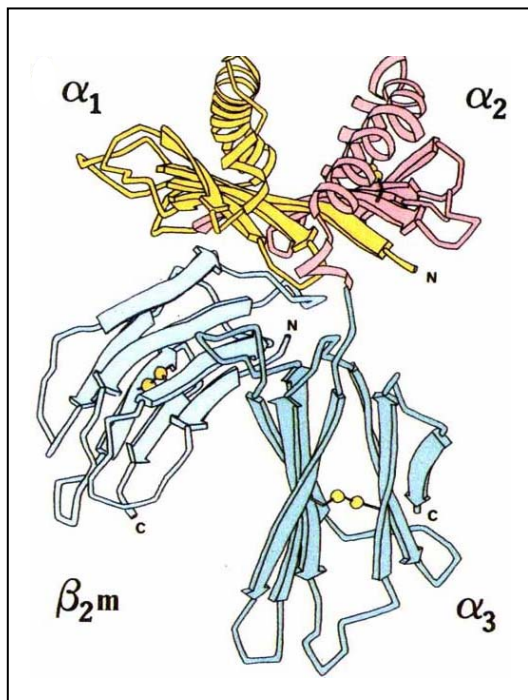


Figura 2b - Diagrama em fitas da estrutura de uma molécula de classe I - HLA-A2
FONTE: Bjorkman *et al.*, 1987

2.2 O GENE *MICA*: ESTRUTURA, PRODUTO e FUNÇÃO

A procura por novas seqüências codificadoras situadas próximas ao gene *HLA-B* foi motivada pelo fato da associação de *HLA-B27* com doenças inflamatórias, como por exemplo, espondilite anquilosante, não ter uma explicação fisiológica plausível. Esta investigação levou à descoberta de uma nova família de genes de classe I do CPH, a família *MIC*. Inicialmente foi observado que a família gênica *MIC* continha pelo menos 5 membros, dentre eles *MICA* e *MICB*, posicionados na região de classe I do CPH, fazendo parte de uma super família juntamente com outros genes, dentre eles os genes *HLA* de classe I (BAHRAM *et al.*, 1994 e LEELAYUWAT *et al.*, 1994). Mais tarde, através de estudos de mapeamento, concluiu-se que na verdade existem sete membros, *MICA* – *MICG*, e destes apenas *MICA* e *MICB* são expressos, sendo os demais pseudogenes (BAHRAM, 2000; citado por HORTON *et al.*, 2004).

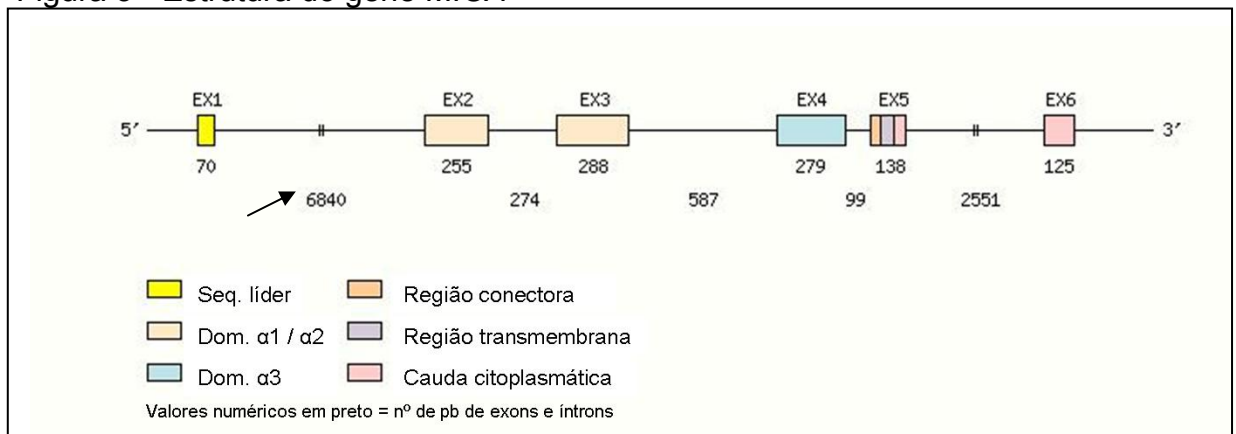
Estudo a respeito da origem evolutiva dos genes *MICA* e *MICB* em humanos e chimpanzés revelou que enquanto em humanos estes genes estão intactos, em chimpanzés eles estão fundidos. Uma deleção que se estende da porção mais centromérica do gene *MICA* até a porção mais telomérica do gene *MICB* resultou na junção dos segmentos restantes de cada um dos genes, constituindo o gene denominado *MICA/B* em chimpanzés (FUKAMI-KOBAYASHI *et al.*, 2005). Neste mesmo trabalho foi feita a previsão de quanto tempo antes dos humanos e chimpanzés divergirem houve a duplicação destes genes. A análise da distância evolutiva entre seqüências LINE (Long Interspersed Nuclear Element) ortólogas das duas espécies sugerem que a duplicação destes genes tenha ocorrido a cerca de 14 milhões de anos atrás. Em macaco rhesus não foi identificado um par de genes ortólogos aos genes *MICA* e *MICB* humano (SEO, WALTER e GÜNTHER, 2001). Em bonobos, mas não em gorilas e orangotangos, também foi verificada a deleção identificada em chimpanzés formando um gene único *MICA/B* (Groot *et al.*, 2005).

Pelo isolamento de clones de cDNA foi constatado que o gene *MICA* localiza-se a cerca de 46,4 kb de distância de *HLA-B* em direção ao centrômero e a 70 kb de distância de *MICB* em direção ao telômero, ocupando um segmento de 11 722 pb. O grau de identidade de seqüência entre *MICA* e *MICB* é de: 80, 91, 90, 98, 73 e 82%

para os exons 1 a 6, respectivamente; e de: 52, 86, 87, 97 e 83% para os íntrons 1 a 5, respectivamente (BAHRAM *et al.*, 1996ab e MIZUKI, *et al.*, 1997a).

Estruturalmente a molécula MICA apresenta três domínios extracelulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$), um segmento transmembrana e uma cauda citoplasmática com um terminal carboxila, sendo cada um destes domínios codificado por um exon assim como ocorre para as moléculas HLA de classe I. Entretanto, a similaridade de seqüência dos exons 1, 2 e 3, que codificam os domínios extracelulares, é de apenas 18, 25 e 30% em relação à seqüência dos genes HLA de classe I. Outro aspecto particular de *MICA* é a presença de um grande íntron separando os exons 1 e 2, além da seqüência que codifica para a cauda citoplasmática e a extremidade 3' não traduzida serem partes de um único exon (Figura 3) (BAHRAM *et al.*, 1996a e BAHRAM e SPIES, 1996). Em contraste os antígenos HLA de classe I, as moléculas *MICA* não estão associadas a uma cadeia de β_2 -microglobulina, nem parecem apresentar peptídeos ligados em sua fenda, fator necessário para a estabilidade das moléculas de classe I (GROH *et al.*, 1996 e ZWIRNER; FERNÁNDEZ-VIÑA; STASTNY; 1998).

Figura 3 - Estrutura do gene *MICA*



FONTE: Immunogenetics Information System, <http://imgt.cines.fr> (acesso em 24/08/06)

O processamento alternativo de RNA mensageiro, como já observado para produtos de genes do sistema HLA, parece também ocorrer com produtos do gene *MICA* e *MICB*. Formas solúveis de HLA-A e HLA-B são resultantes do processamento alternativo do exon 5 (KRANGEL, 1986). Além destes HLA-G exibe pelo menos sete isoformas, algumas solúveis, outras que se ancoram na membrana celular (ISHITANI e GERAGHTY, 1992). Objetivando verificar se este tipo de

processo ocorreria com produtos do gene *MICA* e *MICB*, foram conduzidas análises de cDNA obtidos a partir de RNA de células de carcinoma de cólon. Esta análise revelou a existência de dois fragmentos de tamanhos distintos, um deles correspondendo ao tamanho esperado do exon 1 ao 6 e o outro menor, em decorrência da ausência do exon 3, o que sugeriu que esta isoforma seja decorrente do processamento alternativo do RNA (ZOU e STASTNY, 2002). À semelhança do que ocorre no sistema gênico HLA, as moléculas MICA são expressas de forma codominante (MOLINERO *et al.*, 2002).

As primeiras investigações quanto à expressão de MICA constataram que sua localização na superfície de células do epitélio intestinal coincidia com a presença abundante de células T $\gamma\delta$ V δ 1 neste sítio, e que estas interagem com as moléculas MICA através do reconhecimento dos domínios α 1 e α 2 da molécula. Além disso, de forma similar ao que é conhecido para o gene *HSP70* (*Heat Shock Protein 70*), a região que flanqueia a extremidade 5' do gene *MICA* apresenta um elemento de resposta *heat shock*, que associado aos fatores transcricionais poderá resultar no aumento da transcrição do RNA mensageiro MICA em células epiteliais que estejam sob condições de estresse. A expressão de MICA na superfície de células danificadas, infectadas ou neoplásicas e seu reconhecimento pelas células T $\gamma\delta$ V δ 1, pode servir como um mecanismo de vigilância imunológica e de manutenção da homeostasia do epitélio intestinal (GROH *et al.*, 1996 e GROH *et al.*, 1998).

O reconhecimento das moléculas MICA por células T $\gamma\delta$ V δ 1 através da interação com os domínios α 1 e α 2 foi confirmado mais tarde em outro estudo. Neste foram utilizadas moléculas recombinantes, que mesmo não apresentando o domínio α 3, foram capazes de estimular a proliferação e a atividade citotóxica das células T $\gamma\delta$ V δ 1 (ZHAO *et al.*, 2006).

Além de terem sido reconhecidas no epitélio intestinal, sua expressão também foi observada em células epiteliais de diversos tipos de tumor como cardíaco, pulmonar, renal, ovariano e em carcinomas de cólon e próstata. Culturas celulares de epitélios tumorais expressam quantidades grandes e intermediárias de MICA, que podem estar relacionadas com as condições de homeostasia e crescimento do tumor. Tais evidências sugerem uma função de imunidade inata contra tumores (GROH *et al.*, 1999).

Estudo empregando a técnica de *Western blot* para investigar a expressão de *MICA* em diversos tipos celulares detectou a presença da proteína em monócitos, queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais de cordão umbilical, e ausência destas moléculas em células T CD4⁺, CD8⁺ e CD19⁺ de sangue periférico (ZWIRNER *et al.*, 1998). Considerando a hipótese de que diferentes linhagens celulares poderiam ter níveis de expressão diferenciados, foram conduzidas análises por citometria de fluxo. Foi constatado um alto nível de moléculas *MICA* em células endoteliais e fibroblastos, comparado ao baixo nível em queratinócitos e monócitos, havendo possibilidade de nestas últimas as moléculas ficarem retidas no retículo endoplasmático. Várias hipóteses foram formuladas na tentativa de explicar esta expressão diferencial, e é provável que esteja relacionada diretamente com a função biológica de *MICA*. Sua diversidade genética e sua expressão na superfície de células endoteliais sugerem a participação desta molécula na rejeição crônica e aguda de aloenxertos (ZWIRNER; DOLE; STASTNY, 1999).

Foi verificada a expressão de *MICA* em níveis residuais em células T CD4⁺ ativadas. Talvez a manutenção das moléculas *MICA* no interior das células T seja um mecanismo de proteção destas contra o ataque de células NK em situações de processos inflamatórios, infecções virais ou processos tumorais, em que ambas estas células são recrutadas (MOLINERO, *et al.*, 2006)

Através do uso de moléculas *MICA* solúveis, anticorpos e citometria de fluxo, foi verificada a presença de um receptor de superfície ligante de *MICA* em células T $\gamma\delta$, células T CD8⁺ e em células NK (*Natural Killer*). Este receptor foi identificado como sendo NKG2D (*C-Type lectin-like activating immunoreceptor*) associado à proteína adaptadora de membrana DAP10, e sua interação com *MICA* parece poder potencializar a atividade anti-tumoral inata das células NK, mesmo na presença de moléculas HLA de classe I, além de promover respostas antígeno específicas de células T (BAUER *et al.*, 1999 e WU *et al.*, 1999).

A análise da estrutura da molécula *MICA* (figura 4) revelou algumas diferenças e singularidades destas quando comparadas às demais moléculas do CPH de classe I. Apesar da aparente similaridade no que se refere aos domínios extracelulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$), domínio transmembrana e cauda citoplasmática, as moléculas *MICA* apresentam uma haste extremamente flexível conectando a plataforma formada pelos domínios $\alpha 1/\alpha 2$ e o domínio $\alpha 3$. Enquanto a fenda de

ligação ao peptídeo nas moléculas HLA de classe I é formada por duas α -hélices paralelamente colocadas e assentadas em um assoalho de oito fitas em estrutura β pregueada, nas moléculas MICA são quatro α -hélices arranjadas também sob oito fitas β pregueadas, sendo a fenda formada tão reduzida que não seria possível a ligação de um peptídeo composto por mais de três ou quatro resíduos de aminoácidos (LI *et al.*, 1999).

Análises empregando métodos de cristalização e cristalografia, revelaram que o complexo receptor-ligante é formado por uma molécula MICA monomérica e um homodímero de NKG2D, em uma interação muito semelhante à observada entre receptores de células $T_{\alpha\beta}$ e moléculas HLA (Figura 5). Superfícies similares de cada monômero de NKG2D interagem com diferentes superfícies dos domínios $\alpha 1$ ou $\alpha 2$ de MICA. Esta interação envolve uma grande área da superfície das moléculas envolvidas e se caracteriza por uma alta complementaridade (LI *et al.*, 2001).

A expressão de moléculas MICA pode ser induzida em cultura de fibroblastos infectados com citomegalovírus (CMV), e sua ligação com o receptor NKG2D aumenta significativamente a resposta de células T $CD8^+$ e de células NK anti-CMV. Estas observações, juntamente com o aparente papel desempenhado na atividade anti-tumoral ao estimular células T $CD8^+$ específicas contra antígenos tumorais, suportam o modelo que o sistema MICA-NKG2D exerce uma função biológica na defesa contra agentes infecciosos e em condições de estresse celular (GROH *et al.*, 2001 e SKOV *et al.*, 2005). A presença de moléculas MICA nas células de tumor poderá contribuir futuramente para o desenvolvimento de vacinas anti-tumorais no campo da imunoterapia do câncer (GROH *et al.*, 2005).

Por outro lado foi observado que células T $CD8^+$ e células NK presentes em tumores possuem baixa expressão do receptor NKG2D e comprometimento funcional. Este comprometimento da função efetora destas células pode ser decorrente da ação inibitória de moléculas MICA e MICB solúveis derivadas de tumores (GROH *et al.*, 2002). A baixa expressão de NKG2D na superfície de células com atividade citotóxica foi correlacionada com a incidência e progressão de carcinogênese cutânea, enfatizando a importância deste receptor e conseqüentemente de seus ligantes como marcadores da resistência de tumores (OPPENHEIM *et al.*, 2005).

O aumento da expressão de MICA na superfície celular de fibroblastos isolados e infectados com CMV também foi verificada por Zou e colaboradores, 2005. Este mesmo autor um ano mais tarde observou que havia uma diminuição tanto na produção de RNA mensageiro quanto das proteínas MICA em culturas de fibroblastos, propondo que este efeito poderia ser decorrente da inibição provocada pelo contato celular (ZOU; FARIBA; STASTNY, 2006a).

Figura 4 – Estrutura da molécula MICA

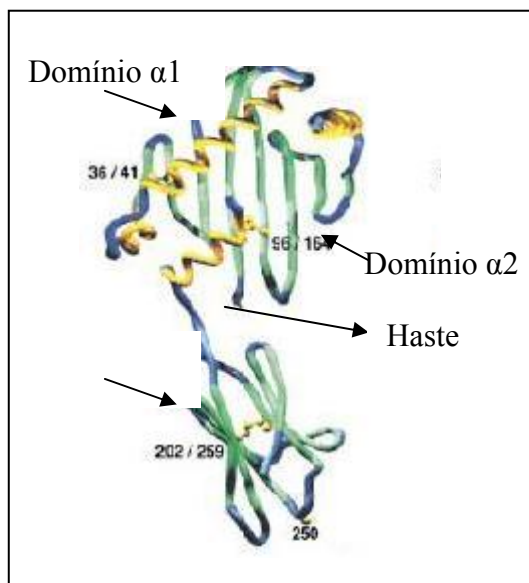
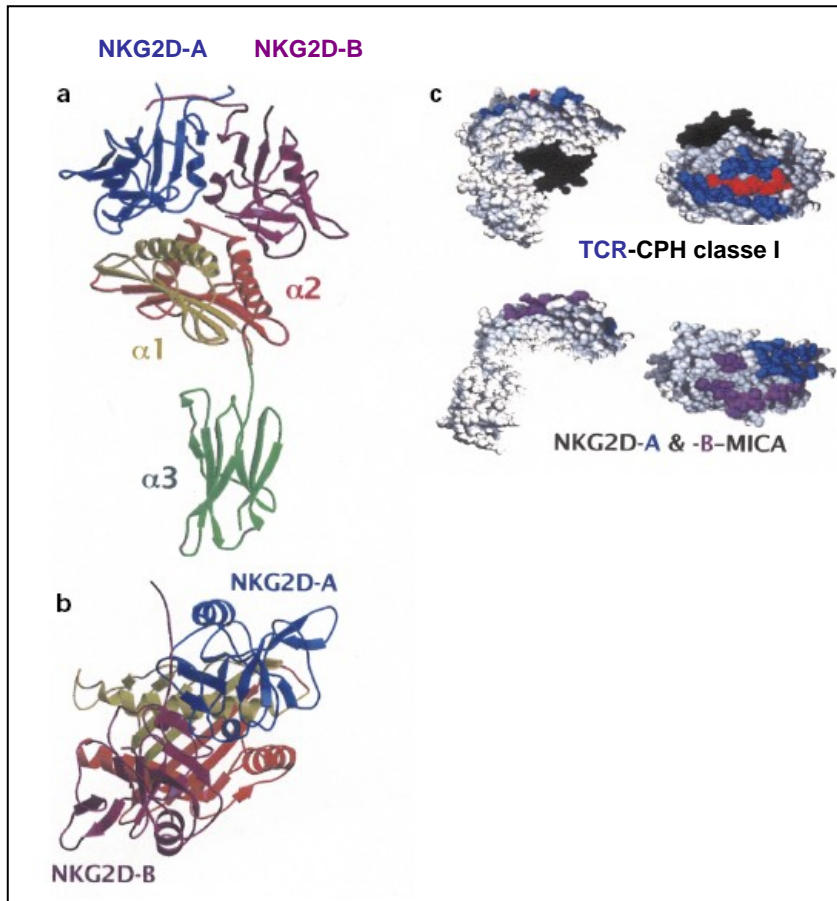


Diagrama em fitas: em amarelo as quatro α -hélices, em verde as oito fitas β pregueadas e em azul as dobraduras em anéis concêntricos.

FONTE: LI, P. *et al.* Crystal Structure of the MHC Class I Homolog MIC-A, a $\gamma\delta$ T Cell Ligand. **Immunity**, v. 10, p. 577-584, 1999.

Em cultura de células obtidas a partir de camundongos pré-imunizados foi possível verificar a proliferação de células T quando estas eram estimuladas novamente com antígenos MICA. O padrão de resposta das células T $CD4^+$ constatado foi do tipo Th-2 (*T helper 2*), devido ao aumento na produção de IL-4 (Interleucina 4) por estas células. A proliferação de células T $CD8^+$ foi menos intensa, mas de qualquer forma, foi detectada a atividade citotóxica destas células contra monócitos. Neste mesmo estudo verificou-se que a resposta das células T expostas aos antígenos MICA era inibida na presença de anticorpos anti-HLA de classe I e de classe II, sugerindo os antígenos MICA como antígenos secundários do CPH, os quais poderiam ativar um mecanismo de reconhecimento indireto de peptídeos derivados de MICA apresentados por moléculas do CPH (ZHANG; STASTNY, 2006).

Figura 5 - a) Diagrama em fitas do complexo MICA-NKG2D (vista lateral), b) Diagrama em fitas do complexo MICA-NKG2D (vista de cima), c) Interação do complexo TCR-CPH de classe I e do complexo MICA-NKG2D (direita: vista de cima e esquerda: vista lateral)



FONTE: LI, P. *et al.* Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. **Nature Immunology**, v. 2, n. 5, p. 443-451, 2001.

2.2.1 Polimorfismo do gene *MICA* e Estudos Populacionais

Caracterizado pelo seu alto grau de polimorfismo, diferente do que normalmente ocorre para os genes do CPH de classe I não clássicos, 61 alelos já foram descritos para o gene *MICA*, muitos destes alelos diferem entre si em uma única posição (Tabela 2.1) (ROBINSON *et al.*, 2001 e MARSH *et al.*, 2002, atualizado por Anthony Nolan Institute – acesso em 09/12/06).

Tabela 2.1 – Alelos do gene *MICA*

continua

<i>MICA</i>	Referência	<i>MICA</i>	Referência
*001	Bahram <i>et al.</i> , 1994; Fodil <i>et al.</i> , 1996; Gaudiere <i>et al.</i> , 1997; Visser <i>et al.</i> , 1999	*025	Visser <i>et al.</i> , 1999; Yao <i>et al.</i> , 1999
*00201 *00202	Bahram <i>et al.</i> , 1994; Fodil <i>et al.</i> , 1996; Visser <i>et al.</i> , 1999	*026	Visser <i>et al.</i> , 1999
*004	Bahram <i>et al.</i> , 1994; Fodil <i>et al.</i> , 1996; Visser <i>et al.</i> , 1999	*027	Perez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2001; Visser <i>et al.</i> , 1999
*005	Bahram <i>et al.</i> , 1994; Fodil <i>et al.</i> , 1996	*028	Visser <i>et al.</i> , 1999 ; Yao <i>et al.</i> , 1999
*006	Fodil <i>et al.</i> , 1996; Visser <i>et al.</i> , 1999	*029	Perez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2001; Yao <i>et al.</i> , 1999
*00701 *00702	Fodil <i>et al.</i> , 1996; Visser <i>et al.</i> , 1999 ; Yao <i>et al.</i> , 1999 ;	*030	Petersdorf <i>et al.</i> , 1999
*00703	Quiroga <i>et al.</i> , 2006	*031	Visser <i>et al.</i> , 1999
*00801 *00802	Fodil <i>et al.</i> , 1996; Gaudiere <i>et al.</i> , 1997; Visser <i>et al.</i> , 1999	*032	Visser <i>et al.</i> , 1999
*00803	Y. Mitsubishi	*033	Perez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2001; Visser <i>et al.</i> , 1999
*00804	Stewart <i>et al.</i> , 2004	*034	Visser <i>et al.</i> , 1999
*00901	Fodil <i>et al.</i> , 1996; Gaudiere <i>et al.</i> , 1997; Visser <i>et al.</i> , 1999	*035	Visser <i>et al.</i> , 1999
*00902	Fodil <i>et al.</i> , 1999; Petersdorf <i>et al.</i> , 1999; Visser <i>et al.</i> , 1999; Yao <i>et al.</i> , 1999	*036	Visser <i>et al.</i> , 1999
*010	Fodil <i>et al.</i> , 1996; Gaudiere <i>et al.</i> , 1997; Visser <i>et al.</i> , 1999; Yao <i>et al.</i> , 1999	*037	Visser <i>et al.</i> , 1999
*011	Fodil <i>et al.</i> , 1996; Gaudiere <i>et al.</i> , 1997; Visser <i>et al.</i> , 1999	*038	Visser <i>et al.</i> , 1999
*01201	Fodil <i>et al.</i> , 1996;	*039	Visser <i>et al.</i> , 1999 (conclusão)
*01202	Y. Mitsubishi	*040	Visser <i>et al.</i> , 1999
*013	Fodil <i>et al.</i> , 1996	*041	Perez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2001 / Y. Mitsubishi
*014 <i>MICA</i>	Fodil <i>et al.</i> , 1996 Referência	*042 <i>MICA</i>	Y. Mitsubishi Referência
*015	Fodil <i>et al.</i> , 1996 / A. Kimura	*043	Perez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2001 / Y. Mitsubishi
*016	Fodil <i>et al.</i> , 1996; Gaudiere <i>et al.</i> , 1997; Visser <i>et al.</i> , 1999; Yao <i>et al.</i> , 1999	*044	Y. Mitsubishi

Tabela 2.1 – Alelos do gene *MICA*

		conclusão	
*017	Fodil <i>et al.</i> , 1999; Perez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2001; Petersdof <i>et al.</i> , 1999; Yao <i>et al.</i> , 1999	*045	Perez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2001 / Y. Mitsuishi
*01801	Fodil <i>et al.</i> , 1999; Perez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2001; Petersdof <i>et al.</i> , 1999; Visser <i>et al.</i> , 1999; Yao <i>et al.</i> , 1999	*046	Perez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2001
*01802	Quiroga <i>et al.</i> , 2006	*047	Perez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002; Zhang <i>et al.</i> , 2002
*019	Fodil <i>et al.</i> , 1999; Komatsu-Wakui <i>et al.</i> , 1999 ; Perez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2001; Petersdof <i>et al.</i> , 1999; Visser <i>et al.</i> , 1999	*048	Obuchi <i>et al.</i> , 2001
*020	Perez –Rodriuez <i>et al.</i> , 2000	*049	Obuchi <i>et al.</i> , 2001
*021	Yao <i>et al.</i> , 1999	*050	Rueda <i>et al.</i> , 2002
*022	Visser <i>et al.</i> , 1999; Yao <i>et al.</i> , 1999	*051	Quiroga <i>et al.</i> , 2004
*023	Visser <i>et al.</i> , 1999	*052	-----
*024	Visser <i>et al.</i> , 1999; Yao <i>et al.</i> , 1999	*053	Quiroga <i>et al.</i> , 2006

FONTE: Robinson, J. *et al.* *MICA* Sequences 2000. **Immunogenetics**, v. 53, p. 150-169, 2001. Atualizada por Anthony Nolan Institute, disponível em: www.anthonynolan.com (acesso em 09/12/06).

As primeiras análises da seqüência nucleotídica do gene *MICA*, mesmo em uma amostra restrita em número de cromossomos, já revelavam a existência de 16 alelos, definidos por 27 posições polimórficas, das quais 22 são não-sinônimas (BAHRAM *et al.*, 1994 e FODIL *et al.*, 1996). Atualmente as seqüências disponíveis dos alelos do gene *MICA* somam um total de 53 substituições nucleotídicas(/^{*}), 39 delas são não sinônimas(* /): 5/8 no exon 2, 15/16 no exon 3, 10/16 no exon 4, 4/5 no exon 5 e 7/8 no exon 6 (EUROPEAN BIOINFORMATIC INSTITUTE, www.ebi.ac.uk/imgt/hla/ - acesso em 09/12/06). A diversidade observada no exon 4 é uma característica peculiar do sistema MIC, uma vez que no sistema HLA o polimorfismo concentrado nos exons 2 e 3 não se compara ao encontrado no exon 4 (KATSUYAMA *et al.*, 1999).

A taxa de substituições não sinônimas no exon 3 é mais elevada do que a taxa de substituições sinônimas, mas o mesmo não foi verificado para os exons 2 e 4. Este fato sugere que o polimorfismo existente no exon 3 não seja decorrente da fixação de mutações ocorrendo aleatoriamente. Tem sido proposto que mecanismos semelhantes aos que ocorrem para os genes HLA a manutenção deste polimorfismo

seja decorrente, dentre outros fatores, da ação de seleção balanceadora (PÉREZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2002 e ELSNER; SCHROEDER; BLASCZYK, 2001).

Comparações entre diversos alelos de *MICA* revelaram diferenças na capacidade de se ligar ao receptor NKG2D. Seqüências cujo códon 129 codifica para metionina expressam proteínas com capacidade de 10 a 50 vezes maior de formar o complexo com NKG2D, do que seqüências que codificam para valina nesta mesma posição (STEINLE *et al.*, 2001).

Variantes para o domínio transmembrana da molécula *MICA*, codificado pelo exon 5, apresentam diferentes números de repetições de GCTs a partir do códon 293, o que resulta em uma seqüência de polialaninas de tamanhos variáveis. *A4*, *A5*, *A5.1*, *A6*, *A7*, *A9* e *A10* são as designações atribuídas as variantes de acordo com o número de códons GCTs repetidos (Tabela 2.2) (ROBINSON *et al.*, 2001 e COLLINS, 2004). No caso da variante *A5.1*, além das 5 repetições, ocorre a inserção de uma guanina após a segunda repetição GCT, esta inserção resulta em um códon de parada na posição 304 e conseqüentemente em uma forma solúvel da proteína (MIZUKI *et al.*, 1997b).

Tabela 2.2 – Microsatélite do exon 5 e sua associação com os alelos *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 2ª 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, R. W. M. Human MHC class I chain related (MIC) genes: their biological function and relevance to disease and transplantation. **European Journal of Immunogenetics**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 105-114, 2004. Atualizada pelo [site www.ebi.ac.uk/imgt/hla/](http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/) (acesso em 09/12/06)

Existem variantes que apresentam seqüências idênticas nos exons 2, 3 e 4, que codificam para os domínios extracelulares da glicoproteína, sendo distintos apenas pelo número de repetições GCT no exon 5, como por exemplo: *MICA**00701(*A4*) de *MICA**026(*A6*), *MICA**00201(*A9*) de *MICA**020(*A10*) e *MICA**00801(*A5.1*) de *MICA**027(*A5*).

A seqüência de *MICA*050*, comumente associada à variante *A7*, é muito semelhante à do alelo *MICA*002*, exceto pelo número de repetições GCT, uma vez que *MICA*002* apresenta nove repetições e pela substituição de uma citosina por uma timina na primeira base do códon 337 do exon 3 (RUEDA *et al.*, 2002). *MICA*002* apresenta também grande semelhança entre os exons 2 e 3 com *MICA*017*, diferindo apenas na segunda base do códon 341 do exon 3 (G → A). Esta similaridade de seqüência provocou discordâncias na tipificação destes alelos em linhagens celulares (FODIL *et al.*, 1999; VISSER *et al.*, 1999; KATSUYAMA *et al.*, 1999 e OBUCHI *et al.*, 2001).

Os alelos *MICA*015* e *MICA*017* apresentam uma deleção na extremidade 3' do exon 4, que causa uma mudança na região transmembrana das proteínas codificadas e um encurtamento da cauda citoplasmática. Como muitos indivíduos analisados são homozigotos para estes alelos, esta mutação não deve ser deletéria (OBUCHI *et al.*, 2001 e PÉREZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2002). Esta mesma deleção já foi relatada como uma deleção no início do exon 5, resultando na tradução de uma seqüência de polilisina, seguida por um códon de parada, características da variante *A9* (ROBINSON *et al.*, 2001).

Estudo realizado com uma amostra da população da República Tcheca para verificar o polimorfismo do microssatélite localizado no exon 5 mostrou que a variante mais freqüente é *A5.1* (59,3%), seguida por *A6* e *A9* (30,7% e 29,3%, respectivamente). Nesta amostra não foi observado nenhum indivíduo *A7*, *A8* ou *A10*, e o alelo menos freqüente foi *A5* (20,0%) (NOVOTA *et al.*, 2004).

Investigação do polimorfismo em 199 indivíduos, representativos da população coreana, relatou *MICA*008* (24,4%), *MICA*010* (18,3%) e *MICA*002* (17,8%) como sendo os alelos mais freqüentes, em contraste com *MICA*007* (3,3%) que apresentou a freqüência mais baixa. No mesmo estudo a análise do microssatélite presente no exon 5 mostrou que a variante *A5* é a mais comum na população seguida por *A6*. Foi verificada também a associação entre os alelos encontrados, referentes à tipagem dos exons 2, 3 e 4 pela técnica de PCR-SSP (*polymerase chain reaction - specific sequence primer*) e as variantes obtidas para o exon 5. Esta associação foi completa: *MICA*002/A9*, *MICA*004/A6*, *MICA*007/A4*, *MICA*008/A5* OU *A5.1*, *MICA*009/A6*, *MICA*010/A5*, *MICA*012/A4* (PYO *et al.*, 2003). Os alelos *MICA*010* e *MICA*002* são os mais comuns em tailandeses e

possuem freqüência equivalente à observada posteriormente em coreanos. Ainda na população tailandesa foi observada a freqüência de 8,2% para o alelo *MICA*052*, o qual não é comum em nenhuma outra população estudada (ROMPHRUK *et al.*, 2001)

Em amostra de 201 indivíduos afro-americanos os alelos mais freqüentes foram *MICA*00201* (27%) e *MICA*00801* (27%), seguidos por *MICA*004* (18%) (ZHANG *et al.*, 2003). Estes mesmos alelos também são os mais comuns na população euro-americana, porém *MICA*00801* é notavelmente mais freqüente que os demais (ZHANG *et al.*, 2000) Freqüências muito similares as descritas anteriormente foram obtidas em outro estudo realizado com 1 245 indivíduos euro-americanos e 605 afro-americanos (GAO *et al.*, 2006).

Através da análise do polimorfismo em indígenas provenientes de três tribos da América do Sul (Toba e Wichi – Argentina e Terena – Brasil), foi constatado um total de 9 alelos em Toba e 5 em Wichi e Terena, sendo que os alelos mais freqüentes foram os mesmos nos três grupos estudados (*MICA*00201*, *MICA*027*, *MICA*010*). *MICA*027* difere do alelo mais freqüente (*MICA*00801*) em populações de caucasianos e japoneses apenas pelo número de repetições no microsatélite do exon 5. A construção de um dendrograma demonstrou uma pequena distância genética entre as três tribos, além de uma maior proximidade destas com populações orientais do que com euro-americanos (ZHANG *et al.*, 2002).

Estudo baseado apenas no polimorfismo dos domínios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$, e $\alpha 3$, a partir de uma amostra de 200 indivíduos cadastrados como doadores voluntários de medula óssea em São Paulo/Brasil, detectou, através da técnica de PCR-SSP, *MICA*008* (47%) como o alelo mais freqüente, seguido por *MICA*002* (28,5%). Como neste estudo não foi feita a análise do microsatélite, o alelo *MICA*008* se refere na verdade à *MICA*008* ou *MICA*027* e o alelo *MICA*002* à *MICA*002* ou *MICA*020* (MARIN *et al.*, 2004).

É interessante notar que a alta freqüência da combinação *MICA*008/A5.1* parece ocorrer em várias populações. Considerando que a variante *A5.1* codifica um segmento transmembrana curto, sem cauda citoplasmática, estudos bioquímicos e biológicos deste alelo serão de fundamental importância (FODIL *et al.*, 1999).

Comparando as freqüências das variantes para o microsatélite localizado no exon 5 entre amostras de 127 indonésios e 250 japoneses pode-se constatar que as

variantes A9 e A6 apresentam respectivamente, freqüências significativamente maiores e menores nos indonésios comparadas às freqüências encontradas nos japoneses (NISHIYAMA *et al.*, 2004).

Entre os marroquinos os alelos mais comuns são *MICA*00801*, *MICA*004*, *MICA*009* e *MICA*002*, os quais comumente ocorrem em alta freqüência em outras populações já estudadas (PIANCATELLI *et al.*, 2005).

A Tabela 2.3 apresenta o polimorfismo do gene *MICA* em algumas populações. Estes trabalhos apresentam resultados obtidos por diferentes metodologias de tipagem molecular.

A diversidade genética observada para o gene *MICA* torna difícil a caracterização de todos os seus alelos. Alguns métodos de genotipagem já foram propostos: PCR-SSP, SSOP (*sequence-specific oligonucleotide probing*), SSCP (*single-strand conformation polymorphism*), e SBT (*sequencing-based typing*) (KATSUYAMA *et al.*, 1999; MENDOZA-RINCON *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 2001; COLLINS *et al.*, 2002; PEREZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2002; REES *et al.*, 2005 e ZOU *et al.*, 2006). Freqüentemente são observadas disparidades na caracterização alélica de linhagens celulares por diferentes grupos. Algumas destas discordâncias podem ser decorrentes de variações existentes dentro dos introns ainda não conhecidas, e que possivelmente interferem na complementaridade de certos oligonucleotídeos iniciadores (SHAO *et al.*, 2004).

Tabela 2.3 - Frequências alélicas (%) do gene *MICA* em algumas populações

Alelo <i>MICA</i> *	(1) Brasileiros [#] n=200	(2) Indígenas Sul-Americanos			(3) Afro- Americanos [#] n=605	(3) Euro- Americanos [#] n=1.245	(4) Japoneses n=130	(5) Coreanos n=199
		Toba n=94	Wichi n=42	Terena n=60				
001	1,8	0,5	0	0	1,4	1,1	0	0
002	15,4	34,6	47,6	44,5	25,4	14,26	14,6	17,8
00201	15,4	NT	NT	NT	25,4	14,1	NT	NT
00202	0	NT	NT	NT	0	0,16	NT	NT
004	14,6	1,1	0	0	19,1	7,5	9,2	12,3
006	0,8	0	0	0	0,08	0,32	0	0
007	1,3	0	1,2	0	1,24	5,08	1,2	3,3
00701	NT	NT	NT	NT	0,66	4,6	NT	NT
00702	NT	NT	NT	NT	0,58	0,48	NT	NT
008	27,2	1,0	0	0,8	31,7	43,33	30,8	10,8
00801	NT	NT	NT	NT	26,6	43,05	NT	NT
00802	NT	NT	NT	NT	5,1	0,28	NT	NT
009	12,5	3,2	1,2	2,3	3,8	8,5	16,5	10,6
00901	12,5	1,6	1,2	2,3	1,7	7,1	NT	NT
00902	0	1,6	0	0	2,1	1,4	NT	NT
010	5,7	27,7	19,0	17,2	1,2	5,8	10,8	18,3
011	3,3	0,5	0	0	2,6	2,9	0	0
012	1,3	0	0	0	1,2	1,9	12,3	11,1
01201	NT	0	0	0	1,2	1,9	NT	NT
015	2,0	0	0	0	5,6	0,2	0	0
016	2,3	0	0	0	0,17	2,3	0	0
017	0,8	0	0	0	0,6	1,1	0	NT
018	2,5	0	0	0	3,0	3,9	0	NT
019	2,3	0	0	0	0,83	1,2	3,5	NT
021	0	0	0	0	0,17	0,28	NT	NT
024	0	0	0	0	0,08	0,12	NT	NT
027	NT	30,9	31,0	35,2	NT	NT	NT	13,6
029	0,3	0	0	0	0	0	NT	NT
030	0	0	0	0	0,33	0,16	NT	NT
035	0	0	0	0	0	0,04	NT	NT
041	0,3	0	0	0	0,5	0	NT	NT
043	0,3	0	0	0	0,33	0	NT	NT
044	0	0	0	0	0,08	0	NT	NT
045	0	0	0	0	0,33	0,04	NT	NT
046	0	0	0	0	0,25	0	NT	NT
047	0	0	0	0	0	0,04	NT	NT
del	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	2,3
blank	5,7	0	0	0	NI	NI	1,2	0

NT não tipado, NI não informado

[#] Microsatélite (GCT_n) não caracterizado: *MICA**002 inclui *MICA**020 e *023, *MICA**007 inclui *MICA**026 e *MICA**008 inclui *MICA**027 e *048.(1) MARIN *et al.*, 2004; (2) ZHANG *et al.*, 2002; (3) GAO *et al.*, 2006; (4) KATSUYAMA *et al.*, 1999; (5) PYO *et al.*, 2003.

2.3 O GENE *HLA-B*: ESTRUTURA, PRODUTO E FUNÇÃO

Os genes que codificam a cadeia pesada das moléculas HLA de classe I apresentam uma estrutura característica, na qual exons separados são responsáveis por codificar cada um dos domínios do polipeptídeo. O peptídeo líder é codificado pelo exon 1, os domínios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$, são codificados pelos exons 2 (343 pb), 3 (274 pb) e 4 (276), respectivamente; o segmento transmembrana pelo exon 5 e a cauda citoplasmática pelos exons 6 e 7. A região 3' não traduzida faz parte do exon 8. A seqüência total dos exons 1 a 8 consiste em 1089-1101 nucleotídeos, e codificam para um polipeptídeo de 362-366 aminoácidos (MARSH; PARHAM; BARBER, 2000).

A estrutura das moléculas do sistema HLA de classe I consiste em duas cadeias polipeptídicas ligadas de forma não covalente, a cadeia α (ou cadeia pesada) de 44 a 47 kD e a cadeia β_2 -microglobulina, uma subunidade de 12 kD não codificada pelo CPH. Cada cadeia α está orientada de tal forma que três quartos de todo o polipeptídeo se estendem para o meio extracelular, um pequeno segmento hidrofóbico atravessa a membrana celular e os resíduos da região carboxiterminal estão localizados no citoplasma. Os segmentos aminoterminais $\alpha 1$ e $\alpha 2$ interagem para formar uma plataforma de oito fitas em estrutura β -pregueada na quais se apóiam duas α -hélices paralelas. Esta estrutura forma a fenda de ligação de peptídeos nas moléculas de classe I, sendo a região onde se concentra o polimorfismo da molécula devido à substituições nucleotídicas nos exons 2 e 3 (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Juntamente com HLA-A, o produto codificado pelo gene *HLA-B* é o antígeno de superfície celular mais investigado em testes sorológicos pré-transplante de órgão e tecidos, sendo expresso na superfície celular de todas as células nucleadas. Caracterizado pelo seu alto grau de polimorfismo, até o momento é considerado o gene mais polimórfico do genoma humano, uma vez que mais de 800 alelos já foram identificados (<http://www.anthonynolan.org.uk/HIG/>, acesso em 26/11/06).

Os critérios e normas para identificação e nomenclatura dos alelos do sistema HLA são definidos pelo Comitê de Nomenclatura do Sistema HLA, da Organização Mundial de Saúde (*WHO Nomenclature Comitee for Factors of the HLA System*). Até

o final da década de 80, a técnica sorológica da microlinfotoxicidade de Terasaki era o padrão para a identificação de novas especificidades do HLA. Essas técnicas sorológicas baseiam-se na reação antígeno-anticorpo, e possibilitam identificar epítomos de proteínas HLA que se expressam nas membranas de leucócitos. Assim, o Comitê estabeleceu que os *loci* da região de classe I seriam designados por uma letra, precedida pela sigla *HLA* (por exemplo: *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-G*), e as especificidades antigênicas determinadas pela sorologia seriam indicadas por números arábicos, que se seguem à designação do *locus* (por exemplo: *HLA-A1*, -*A2*, -*B5*) (WHO Terminology Comitee, 1984 e 1987).

Com o advento das técnicas moleculares de tipagem HLA, tornou-se possível determinar as seqüências nucleotídicas codificadoras das moléculas HLA que cada indivíduo apresenta, e identificar assim alelos do sistema HLA. A nomenclatura do sistema HLA foi então estabelecida de forma a contemplar as duas técnicas de tipagem. Nos casos onde a seqüência é conhecida, deve-se assinalar a letra correspondente ao *locus* do HLA com um asterisco (por exemplo: *HLA-B**), ao qual deve seguir um número de 4 dígitos, sendo que os dois primeiros referem-se à especificidade sorológica ou grupo alélico, e os dois últimos ao número da variante alélica (MARSH *et al.*, 2001).

Quando após a seqüência numérica que caracteriza o alelo houver a notação “N”, “L” ou “S”, refere-se às seqüências que codificam um produto com expressão ou funcionamento nulo (“N”), proteínas de baixa expressão (“L”: *Low*) ou proteína secretada (“S”: *Secreted*). Alelos que diferem somente por substituições nucleotídicas sinônimas são diferenciados na nomenclatura através da adição de outros 2 dígitos após os 4 já comentados. Estas diferenças não têm, normalmente, nenhum significado fisiológico, mas elas podem ser ferramentas úteis para estudos de evolução e de genética de populações (MAGOR *et al.*, 1997).

Assim como outros genes do Sistema *HLA*, o gene *HLA-B* exerce sua principal função no sistema imune, como apresentador de peptídeos antigênicos as células T CD8⁺, tendo também grande influência na sobrevida de órgãos transplantados, na progressão de doenças infecciosas e na susceptibilidade a certas doenças autoimunes (ROBINSON *et al.*, 2003).

Embora a maioria dos locos HLA de classe I do CPH sejam relativamente estável no que se refere aos mecanismos de recombinação genética, o loco *HLA-B*

parece sofrer mais eventos genéticos que resultam na geração de novos alelos. Para investigar o mecanismo evolutivo deste loco genético, seqüências de 19 *HLA-B* homólogos de chimpanzés e bonobos foram comparadas com outras 65 seqüências humanas. Apesar das similaridades existentes entre chimpanzés e humanos no exon 2, o exon 3 é pouco conservado (McADAM *et al.*, 1994).

O polimorfismo *HLA-B* em grupos de ameríndios é bastante limitado, provavelmente isto seja reflexo da pequena população fundadora, que colonizou a América vindo da Ásia a 11.000 – 40.000 anos atrás (CAVALLI-SFORZA, 1988). As seqüências nucleotídicas investigada em 2 tribos indígenas brasileiras culturalmente distintas, Caingangue e Guarani, diferem das seqüências encontradas em caucasóides, orientais e outras populações (BELICH *et al.*, 1992). Estes resultados, juntamente com estudos realizados na tribo equatoriana Waorani (WATKINS *et al.*, 1992), são sugestivos de que a evolução do gene *HLA-B* após a chegada dos primeiros habitantes na América do Sul tenha provocado o aparecimento de novos alelos através de recombinação entre alelos pré-existentes. Estes alelos novos substituíram alguns alelos presentes na população fundadora. Estas observações revelam que este loco pode evoluir rapidamente em populações isoladas (BELICH *et al.*, 1992 e WATKINS *et al.*, 1992).

Um estudo caso-controle realizado na África mostrou que a variante *HLA-B53* e o háplotipo *DRB1*1302/DQB1*050*, estão associados de forma independente com a proteção à malária. Estes antígenos são comuns na população estudada, mas raros em outros grupos raciais. Estes achados suportam a hipótese de que o extraordinário polimorfismo dos genes do CPH tenha evoluído primeiramente pela seleção natural através da ação de patógenos (HILL *et al.*, 1992). A sobrevivida prolongada de caucasianos portadores do vírus da AIDS (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*) pode ser atribuída a heterozigose completa para os locos do sistema *HLA* de classe I, e/ou pela baixa freqüência de alelos associados à doença, como *B*35* e *Cw4*, observada nestes indivíduos (CARRINGTON *et al.*, 1999).

Entretanto, em outro estudo foi proposto que a associação previamente encontrada com *Cw4* seja conseqüente do desequilíbrio de ligação entre este alelo e o alelo *HLA-B*35*. O fato da associação com *B*35* ter sido observada tanto em europeus quanto em africanos fortalece a evidência de que este alelo seja o

responsável por exercer um efeito na resposta imune à infecção por HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) (GAO *et al.*, 2001). Em estudo realizado com 375 indivíduos sul-africanos infectados pelo vírus da AIDS, um número significativamente maior de respostas de células T CD8⁺ foi restrita ao HLA-B se comparado às moléculas HLA-A. Além deste fato, foi verificada uma maior pressão de seleção imposta ao vírus HIV-1 por certos alelos *HLA-B* do que por alelos *HLA-A*, indicando que o principal foco de atividade viral seja o HLA-B (KIEPIELA *et al.*, 2004).

Avaliando as freqüências alélicas e haplotípicas em uma amostra de 3.500 doadores voluntários de medula óssea de Curitiba/Pr, Brasil, foi detectado como haplótipo predominante *HLA-A*01_ B*08_DR*03*. Considerando apenas o loco *HLA-B*, o grupo alélico mais freqüente na amostra total e em caucasianos foi *HLA-B*35*, seguido de *HLA-B*44* e *B*51*. Entre os indivíduos de origem negróide o grupo alélico mais freqüente foi *HLA-B*15*, concordando com dados de um estudo realizado com população da região nordeste, onde há predominância de negróides. Entre os orientais avaliados no estudo o haplótipo mais encontrado foi *HLA-A*33/ B*44/ DR*13* (RUIZ *et al.*, 2005).

2.4 HAPLÓTIPOS *MICA_HLA-B* E DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO

Devido à pequena distância (46 kb) que separa os genes *MICA* e *HLA-B*, é esperado que haja um forte grau de desequilíbrio de ligação entre os alelos destes locos. Este fato tem motivado diversos estudos objetivando investigar as associações existentes. É comum o uso de amostras de linhagens de células homozigotas e heterozigotas fornecidas pelo 10th International Histocompatibility Workshop nestas investigações. Em muitos casos um mesmo alelo *MICA* aparece com vários alelos *HLA-B*, e vice-versa: *HLA-B*0702*, **0801*, **4001* e **4402* estão associados com *MICA*008*, por outro lado *HLA-B*5101* foi tipado juntamente com *MICA*006*, *MICA*007* e *MICA*009*. Entretanto para algumas variantes a associação é restrita a um único haplótipo: *HLA-B*1402* com *MICA*011*, e *HLA-B*052* com *MICA*007* (FODIL *et al.*, 1999). Em outro estudo, no qual a tipagem *HLA-B** foi apenas em nível de grupo alélico, o alelo mais freqüente *MICA*002*, teve forte associação com *HLA-B*35*, **53* e **58*, e *MICA*004* com *HLA-B*42*, **49*, **51*, **52* e **07* (ZHANG *et al.*, 2003).

Utilizando linhagens de células do mesmo Workshop citado acima também foram descritos os seguintes haplótipos em forte associação: *MICA*007_HLA-B*27*, *MICA*010_HLA-B*15*, *MICA*002* e *MICA*009* com *HLA-B*35* (ZHANG *et al.*, 2000).

Objetivando estabelecer um método de tipagem alélica para o gene *MICA* através da técnica de seqüenciamento, Katsuyama e colaboradores investigaram 130 indivíduos saudáveis da população japonesa. Esta mesma amostra foi então tipada para *HLA-B** e teve a freqüência de seus haplótipos determinada: *MICA*002_B35* (14/38) e *MICA*002_B39* (12/38); *MICA*004_B44* (24/24); *MICA*008A5_B61* (41/79), *MICA*008A5.1_B60* (14/79) e *MICA*008A5.1_B7* (16/79); *MICA*010_B62* (16/28) e *MICA*010_B46* (9/28); *MICA*012_B54* (17/33) (KATSUYAMA *et al.*, 1999). Associações muito similares foram observadas na população coreana (PYO *et al.*, 2003). Em relato sobre a população do sudeste asiático (Tailândia) os desequilíbrios de ligação mais acentuados foram verificados para os seguintes haplótipos: *MICA*010_HLA-B*4601*; *MICA*002_HLA-B*5801*; *MICA*019_HLA-B*15* e *MICA*052_HLA-B*13*. Nesta população, diferentemente das outras duas citadas acima, o alelo *MICA*008* foi associado com *HLA-B*27* e *B*39* (ROMPHRUK *et al.*, 2001).

Em linhagens de células homozigotas para *HLA-B61* e *HLA-B*5101* foram identificados os alelos *MICA*048* e *MICA*00901*, respectivamente (OBUCHI *et al.*, 2001). Em outro estudo alguns haplótipos citados anteriormente foram confirmados e outros foram identificados, como: *MICA*027_B*40*, *MICA*018_B*18*, *MICA*019_B*1401*, *MICA*017_B*5701*. O alelo *MICA*001* foi encontrado exclusivamente com *HLA-B*1801* (PEREZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2002).

A presença de uma deleção de cerca de 100 kb entre os locos *MICB* e *HLA-B* foi identificada na população japonesa e determina o chamado *MICA-MICB null haplotype* (KOMATSU-WAKUI *et al.*, 1999). Esta deleção foi posteriormente investigada em larga escala na população asiática confirmando os achados prévios de uma freqüência relativamente alta e um forte desequilíbrio de ligação com *HLA-B*4801*. A deleção do gene *MICA*, que acompanha também a falta de expressão *MICB*, não deve ser totalmente deletéria no que se refere ao desempenho imunológico do organismo, mas talvez possa ser seletivamente neutra na defesa imune (OTA *et al.*, 2000 e KOMATSU-WAKUI *et al.*, 2001). A freqüência elevada

desta deleção associada com o grupo alélico B*48 também foi observada em uma comunidade de ameríndios paraguaios.

A partir de dados obtidos no *13th International Histocompatibility Workshop* foi observado que grupos *HLA-B* sorologicamente relacionados, que diferem em seqüência nucleotídica, normalmente estão associados às mesmas variantes de *MICA*, embora existam algumas exceções, como: *B49* com *MICA*004*, enquanto *B50* aparece com *MICA*0902*, e *B45* também associado com *MICA*0902*, enquanto seu similar sorológico, *B44*, aparece com *MICA*008 (B*4402)* ou *MICA*004 (B*4403)*. Isto confirma a idéia de que a similaridade sorológica não é um indicativo confiável de relação evolutiva. Vários alelos *HLA-B*, dentre eles *B*35*, *B*38* e *B*39*, estão associados com *MICA*00201* e todos os alelos *HLA-B*07* e **08* com *MICA*00801*. Este *workshop* também teve a contribuição de dados sobre indígenas brasileiros, para os quais os haplótipos mais comuns são: *MICA*002_HLA-B*3913* e *MICA*027_HLA-B*4004*. Nesta mesma amostra de indígenas, semelhante ao observado em populações asiáticas, foi constatada a presença do alelo *MICA null* nos três casos tipados como *B*4801* ou *B*4802* (ALBERT *et al.*, 2004). Em ameríndios provenientes de duas tribos na Argentina *MICA*027* aparece associado com *B*4002*, e *MICA*002* com *B*3503*, *B*3903* e *B*4035* (ZHANG *et al.*, 2002)

Em estudo representativo da população marroquina, onde todos os indivíduos que compunham a amostra foram tipados em nível alélico, verificou-se a associação exclusiva de *B*4403* e de *B*4402* com *MICA*004* e *MICA*008*, respectivamente (PIANCATELLI *et al.*, 2005).

A partir de uma amostra de indivíduos provenientes de São Paulo, Brasil, foi detectado um alto grau de desequilíbrio de ligação para vários haplótipos, alguns já relatados em outros estudos, mas que muitas vezes não tiveram significância estatística devido à baixa freqüência com que apareceram. Novamente *MICA*001* foi encontrado exclusivamente com *HLA-B*1801* e a maioria dos alelos *HLA-B*62* com *MICA*010*. Os nove casos, onde foram tipados o alelo *MICA*016*, houve associação com *HLA-B*35*. Alguns haplótipos raros também foram descritos, como: *MICA*008_HLA-B*37* e *HLA-B*72*, além de *MICA*010_HLA-B*52*, sendo importante citar que neste caso *MICA*008* se refere a um grupo alélico ao lado de *MICA*027* e **048* (MARIN *et al.*, 2004).

Investigação da diversidade haplotípica em duas amostras de indivíduos afro-americanos (uma proveniente de Boston e a outra do *US National Marrow Donor Program*-NMDP) e em três tribos nigerianas (Yoruba, Efik e Igbo) permitiu a constatação de um alto grau de heterogeneidade entre estas populações. O haplótipo *MICA*00201_HLA-B*5301* foi o mais comum nos grupos de Boston, Yoruba e Igbo, enquanto que nos grupos do NMDP e Efik, predominaram os haplótipos *MICA*004_HLA-B*4201* e *MICA*00801_HLA-B*1503*, respectivamente. De modo geral as frequências haplotípicas nas tribos Efik e Igbo foram significativamente diferentes entre elas, bem como se comparadas aos grupos afro-americanos. Em todas as populações foram observados desequilíbrios de ligação significativos, havendo uma concordância para o haplótipo *MICA*00801_HLA-B*1503*, que foi detectado em todas elas (TIAN *et al.*, 2003).

A caracterização dos haplótipos *MICA_HLA-B* em duas populações norte americanas (euro-americanos e afro-americanos) mostrou que a distribuição destes difere entre os dois grupos, sendo principalmente dependente da distribuição dos alelos de *HLA-B*. O haplótipo *MICA*00801_B*0702* foi comum nos dois grupos, além de ocorrer em diversas populações, no entanto *MICA*00201_B*5301* foi o haplótipo mais frequente em afro-americanos e raro em euro-americanos. Esta diferença se deve ao fato de *B*53* ser encontrado predominantemente em populações de origem africana, embora *MICA*00201* seja comum a todas as populações (GAO *et al.*, 2006)

2.5 ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO COM DOENÇAS

O polimorfismo do gene *MICA* tem sido investigado em uma variedade de doenças com associações previamente descritas para alelos dos genes *HLA* de classe I, principalmente com alelos do *HLA-B*, devido à proximidade entre estes dois locos. Entretanto, muitos destes estudos têm concentrado suas investigações apenas no polimorfismo do microssatélite do exon 5 (número de repetições GCT), o qual codifica para a região transmembrana da molécula. Como cada uma das oito variantes do exon 5 aparece associada a uma série de alelos *MICA*, muitas vezes os resultados podem ser pouco informativos (STEPHENS, 2001 e COLLINS, 2004).

Em vários estudos caso-controle o alelo *MICA*009/A6*, que possui seis repetições GCT na região de microssatélite, tem sido encontrado com maior

freqüência em pacientes da doença de Behcet quando comparados aos controles. *MICA*009/A6* se encontra em desequilíbrio de ligação com o alelo *HLA-B*51*, cuja associação com a doença de Behcet já é bem conhecida. MICA pode estar envolvido com a patogenia da doença através da sua interação com as células NK e T $\gamma\delta$, e HLA-B estaria funcionando como um marcador deste gene (YABUKI *et al.*, 1999a; MIZUKI *et al.*, 2000; SALVARANI *et al.*, 2001; COHEN *et al.*, 2002 e PICCO *et al.*, 2002; HUGHES *et al.*, 2005).

O alelo *MICA-A5.1* tem sido sugerido como fator genético de predisposição à doença celíaca independente do desequilíbrio de ligação verificado com outros alelos de locos *HLA*, que predispõem a doença. Foi sugerido o envolvimento de *MICA-A5.1* na suscetibilidade à doença, ou às diferentes formas de desenvolvimento da mesma (RUEDA *et al.*, 2003 e LOPEZ-VAZQUEZ *et al.*, 2004). Investigando se a ingestão de glúten por pacientes da doença celíaca era um fator ativador da expressão de *MICA* na mucosa intestinal, foi verificado que este pode estar provocando uma super expressão de *MICA* nos estágios iniciais da doença. A ativação do sistema imune através das moléculas MICA poderia levar a um processo de autoimunidade do organismo (MARTIN-PAGOLA *et al.*, 2004).

Na população chinesa foi verificada a associação de *MICA-A5.1* com a susceptibilidade à colite ulcerativa, que assim como a doença celíaca e a doença de Crohn é um tipo de inflamação crônica do trato gastrointestinal. Esta associação foi mais forte entre as pacientes do sexo feminino (DING *et al.*, 2005). Em estudos realizados anteriormente com amostras populacionais constituídas por japoneses e alemães a associação encontrada foi com o alelo *MICA-A6* (GLAS *et al.*, 2001 e SUGIMURA *et al.*, 2001). No entanto, nenhuma associação foi encontrada em estudo com pacientes caucasianos portadores da doença de Crohn ou de colite ulcerativa, em análise que incluiu o polimorfismo dos exons 2, 3, 4 e 5 (AHMAD *et al.*, 2002).

Existem relatos também de que a abundância de moléculas MICA solúveis derivadas de tecido sinovial provoca uma alteração na quantidade de complexos NKG2D-MICA. Esta alteração poderia estimular células T autoreativas e promover a patogênese da artrite reumatóide, e de outras doenças autoimunes (GROH *et al.*, 2003).

Estudos em população oriental e italiana encontraram algumas variantes do gene *MICA*-exon 5 com frequência aumentada em pacientes de diabetes mellitus tipo I (insulina dependente), como por exemplo: *MICA-A4*, *A5* e *A5.1* (acompanhadas de *HLA-DR3* ou *DR4*) e *MICA-A9* (GAMBELUNGHE *et al.*, 2000; KAWABATA *et al.*, 2000 e LEE *et al.*, 2000). Embora a variante *A9* também já tenha sido descrita em associação negativa para a doença, como se estivesse fornecendo uma função protetora (BILBAO *et al.*, 2003 e NIKITINA-ZAKE *et al.*, 2004). Achados similares foram encontrados para a doença autoimune lupus eritematoso em italianos. Neste caso *MICA-A5* e *A5.1* estavam associados positivamente com a doença e *A9* negativamente. Considerando os genes do sistema *HLA*, foi encontrada associação da patologia com *HLA-DR3-DQ2* e *B8*. A associação das variantes para o exon 5 de *MICA* foi independente da verificada para o loco *HLA* (GAMBELUNGHE *et al.*, 2005).

Estudo caso/controle realizado na população tailandesa constatou uma frequência aumentada do haplótipo *MICA*008/HLA-B*13/Cw*0602* e do *MICA*010/HLA-B*4601/Cw*01* nos tipos I e II da doença psoríase, que juntamente com a espondilite anquilosante e outras compõem um grupo de espondiloartropatias. Os haplótipos *MICA*008/HLA-B*13/Cw*0602* e *MICA*010/HLA-B*4601/Cw*01* estiveram aumentados apenas no tipo I. Entretanto a associação com a doença não foi mantida ao se analisar *MICA*010* em indivíduos que não portavam *Cw*01*. Estes dados sugerem que os haplótipos *MICA*/HLA-Cw* podem estar funcionando como um marcador de um outro gene crítico para a doença (ROMPHRUK *et al.*, 2004). Por outro lado, estudo realizado com população caucasiana demonstrou uma frequência significativamente aumentada de *MICA*006* entre os pacientes se comparados ao grupo controle. Neste último estudo também foi confirmada a expressão de moléculas *MICA* na camada basal da epiderme (TAY *et al.*, 2000).

Na população japonesa e européia, a variante transmembrana *A4* e os alelos *MICA*007* e **010* foram encontrados em desequilíbrio de ligação positivo com *HLA-B*27* em pacientes com espondilite anquilosante (TSUCHIYA *et al.*, 1998 e YABUKI *et al.*, 1999b). Em outro estudo com população algeriana foi constatada a associação do genótipo homocigoto que codifica metionina na posição 129 com um tipo de espondilite anquilosante juvenil (AMROUN *et al.*, 2005). A referida posição,

que parece afetar a ligação com o receptor NKG2D, apresenta um dimorfismo, que determina um códon para valina ou para metionina (STEINLE *et al.*, 2001).

O gene *MICA* também já foi sugerido como gene candidato para susceptibilidade à alopecia aerata, fenótipo caracterizado pela perda de cabelo ou até mesmo pêlos do corpo. A genotipagem de oito microssatélites na região do CPH revelou uma associação significativa de *MICA-A6* e de *MICA-A5.1* com vários subtipos de alopecia (BARAHMANI, 2006).

2.6 RELEVÂNCIA DE MICA NA REJEIÇÃO DE TRANSPLANTES

A rejeição crônica e aguda dos aloenxertos constitui a principal causa de perda de órgãos transplantados. O envolvimento de anticorpos pré-formados dirigidos contra antígenos HLA no processo de rejeição hiperaguda já é conhecido desde a década de 60 (KISSMEYER-NIELSEN *et al.*, 1966). De forma semelhante sabe-se que estes anticorpos podem contribuir para o desenvolvimento de respostas humorais mesmo em períodos mais tardios do pós-transplante, e que juntamente com respostas celulares levam a rejeição do tipo aguda e podem preceder a perda crônica do enxerto.

Mais recentemente o papel e relevância das proteínas MICA no contexto dos transplantes também têm sido investigados. A primeira descrição de anticorpos induzidos por peptídeos derivados tanto de MICA quanto de MICB aconteceu em 1996, a partir de experimentos realizados com coelhos imunizados e também pela análise com marcação fluorescente de diversos tipos de tecidos (LEELAYUWAT *et al.*, 1996).

A presença de anticorpos anti-MICA no soro de pacientes transplantados renais com episódios de rejeição aguda foi detectada. No entanto não pôde ser confirmado se tais anticorpos eram específicos contra os doadores (ZWIRNER *et al.*, 2000). Em outro estudo a grande maioria dos receptores renais com rejeição aguda ou crônica apresentou positividade para a presença de moléculas MICA no aloenxerto (HANKEY *et al.*, 2002). Além disso, foi encontrada uma correlação significativa entre anticorpos anti-MICA presentes no período pré e pós transplante e incidência da perda do enxerto (SUMITRAN-HOLGERSSON *et al.*, 2002).

A comparação de soros coletados durante 10 anos pós-transplante renal em grupos de pacientes com e sem rejeição crônica do enxerto, sendo ambos os grupos negativos para anticorpos anti-HLA pré-formados, demonstrou uma incidência maior tanto de anticorpos anti-HLA quanto anti-MICA no grupo com manifestação de rejeição (MIZUTANI *et al.*, 2005). Cerca de um ano mais tarde o mesmo grupo de pesquisa conduziu outro estudo semelhante, no qual foi analisada uma única amostra de soro de cada paciente coletada até um ano após a realização do transplante. Novamente os resultados sugeriram MICA como um aloantígeno capaz de induzir a produção de alo-anticorpos em pacientes transplantados (MIZUTANI *et al.*, 2006).

Anticorpos específicos contra MICA também foram detectados, juntamente com anticorpos anti-HLA, em pacientes sensibilizados aguardando um transplante renal, em pacientes já transplantados e em amostras obtidas a partir de enxertos rejeitados. Estes dados sugerem fortemente a participação de MICA na patogênese da rejeição de órgãos (ZOU *et al.*, 2006b).

Com o intuito de constatar se a compatibilidade de marcadores microsatélites na região do CPH é relevante na incidência e severidade da doença do enxerto *versus* hospedeiro decorrente do transplante de células tronco hematopoéticas, treze microsatélites foram investigados, dentre eles o presente no exon 5 do gene *MICA*. Apesar de nenhum microsatélite incluído no estudo ter sido informativo para o prognóstico pós-transplante, futuras investigações poderão determinar a existência de outros marcadores que auxiliem na identificação de antígenos de histocompatibilidade secundários (LI *et al.*, 2004).

3 OBJETIVOS

- Caracterizar os alelos do gene *MICA* e os grupos alélicos e/ou alelos do gene *HLA-B* em uma amostra populacional de caucasianos (auto-denominados) do estado do Paraná.
- Determinar as freqüências alélicas e genotípicas destes genes na referida população, verificando se estas últimas estão em conformidade com o equilíbrio de Hardy-Weinberg.
- Verificar a concordância dos resultados de tipagem do gene *MICA* obtidos pela técnica de PCR-SSP e de PCR-SSOP.
- Descrever os haplótipos *MICA_HLA-B* e suas freqüências.
- Analisar o desequilíbrio de ligação entre os alelos dos genes investigados.
- Comparar os resultados obtidos na nossa população com dados disponíveis na literatura a respeito de outras populações.

4 JUSTIFICATIVA

A diversidade dos genes *HLA* em diversas populações humanas, das mais diversas etnias ou localizações geográficas, vem sendo caracterizada há mais de três décadas. Estudos foram e ainda são conduzidos tanto com genes de classe I quanto de classe II, pois o extraordinário polimorfismo destes genes os torna bastante informativos no campo da genética de populações.

A descoberta da família gênica MIC aconteceu 34 anos após a descrição do primeiro antígeno HLA por Dausset em 1958. A caracterização desta família foi resultado da motivação pela procura de novos genes na região do complexo principal de histocompatibilidade (BAHRAM *et al.*, 1994 e LEELAYUWAT *et al.*, 1994).

Logo se notou que o gene *MICA*, assim como os genes clássicos do sistema HLA, apresentava um alto grau de polimorfismo, caracterizado pelos vários pontos de substituições nucleotídicas resultando em sítios principalmente bialélicos. Além disso, foi verificada a semelhança de estrutura, no que se refere aos domínios protéicos desta glicoproteína, em relação às moléculas HLA de classe I. Estes fatores atraíram o interesse pela caracterização da sua diversidade alélica em populações.

Na última década, a variabilidade de *MICA* tem sido investigada em populações de norte americanos caucasianos e afro-americanos, em orientais e em alguns isolados de ameríndios e tribos africanas. Paralelamente a estas pesquisas, novos alelos foram descritos, os quais podem não ter sido detectados em estudos prévios, dependendo da metodologia utilizada no estudo.

No Brasil foi realizado um único estudo relacionado a variabilidade populacional do gene *MICA* na população de São Paulo/SP (MARIN *et al.*, 2004), sendo assim, a distribuição da diversidade alélica do gene *MICA* na população brasileira é praticamente desconhecida. Por este fato o presente estudo enriquece este conhecimento com dados referentes à população de Curitiba, utilizando uma amostra de caucasianos, uma vez que esta é a etnia predominante na região. Além disso, juntamente com futuras análises em outros segmentos étnicos da nossa população, permitirá uma caracterização da diversidade intra-populacional e da miscigenação existente.

Compreender e explorar a variabilidade do gene *MICA*, bem como o seu desequilíbrio de ligação com o gene *HLA-B* são de grande relevância nas diversas abordagens para estudar suas possíveis funções e implicações na suscetibilidade a doenças, nos transplantes de órgãos e crescimento de tumores.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA POPULACIONAL

A amostra é constituída de 204 doadores voluntários de medula óssea oriundos do estado do Paraná, em sua grande maioria da cidade de Curitiba, cadastrados no Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná. A escolha dos doadores foi realizada randomicamente, através da função `random()` do banco de dados PostgreSQL versão 8.1 (POSTGRESQL, 2005). Todos os doadores se auto-classificaram como caucasianos (euro-brasileiros) diante das opções que constam na ficha de cadastro (Anexo 1).

5.2 TÉCNICA DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

O DNA genômico foi extraído a partir de sangue periférico, coletado em tubo tipo *Vacutainer* de 5 mL contendo EDTA, pelo método de *Salting Out* (JOHN *et al.*, 1990, modificado por LAHIRI; NURNBERGER Jr., 1991). Este método desenvolve-se essencialmente em quatro etapas:

- Obtenção da camada de leucócitos por centrifugação a 5000 rpm por 20 minutos do sangue total coletado com anticoagulante EDTA.
- Lise de eritrócitos através do uso de tampão de lise de células vermelhas (Tris + MgCl₂ + NaCl) pH 7,6.
- Precipitação de proteínas com NaCl 6Mol.
- Precipitação do DNA com etanol absoluto e hidratação com H₂O Mili-Q

5.2.1 Cálculo da concentração do DNA

A concentração de DNA das amostras foi determinada através da leitura de densidade ótica, utilizando-se o espectrofotômetro GeneQuant Pro - PHARMACIA e a concentração de uso foi padronizada em 20ng/μl para tipagem do gene *MICA* e do gene *HLA-B*.

5.3 TÉCNICA DE TIPAGEM PCR-SSP E PCR-SSOP-LUMINEX

A metodologia de reação em cadeia da polimerase utilizando oligonucleotídeos iniciadores seqüência específicos, do inglês: *Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primers* (PCR-SSP) é baseada no princípio de que oligonucleotídeos iniciadores complementares são utilizados de forma mais eficaz, pela Taq polimerase recombinante, para amplificar uma seqüência alvo do que um iniciador sem complementaridade perfeita. Os pares de iniciadores são delineados para apresentar apenas correspondências perfeitas com um único alelo ou grupo de alelos. Sob condições de PCR estritamente controladas, os pares de iniciadores com perfeita complementaridade traduzem-se na amplificação de seqüências alvo (ou seja, um resultado positivo), enquanto que pares de iniciadores sem correspondência não se traduzem em amplificação (ou seja, um resultado negativo) (TERASAKI *et al.*, 1980).

A metodologia de tipagem através da reação em cadeia da polimerase utilizando oligonucleotídeos-sonda seqüência-específicos, do inglês: *Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotide Probes* (PCR-SSOP) utilizada neste estudo emprega a tecnologia Luminex. Esta tecnologia consiste em um sistema de multi-análise que trabalha com um conjunto de microesferas codificadas por cores que representam diferentes comprimentos de onda, as quais são analisadas num avançado Citometro de Fluxo. Microesferas codificadas por uma determinada cor contêm em sua superfície apenas oligonucleotídeos-sonda de mesma seqüência, sendo assim, diferentes microesferas podem ser trabalhadas em um único tubo, substituindo o formato multi-poços convencional. A metodologia assemelha-se à técnica SSOP padrão, onde primeiramente a região alvo do DNA é amplificada e desnaturada, seguindo-se a hibridização com sondas marcadas e de seqüência conhecida. No entanto, na tecnologia Luminex a região alvo do DNA é amplificada com o uso de oligonucleotídeos iniciadores biotinilados, então, os produtos marcados são desnaturados e hibridizados em um único tubo com as sondas acopladas às microesferas. Por último faz-se a marcação com estreptoavidina conjugada com ficoeritrina e a leitura da reação. Este método também é chamado de SSOP reverso devido ao fato das sondas estarem imobilizadas em uma superfície.

5.3.1 Tipagem do Gene *MICA* pela Técnica de PCR-SSP

A tipagem do gene *MICA* foi baseada no protocolo proposto por Collins e colaboradores (COLLINS *et al.*, 2002) e Rees e colaboradores (REES; DOWNING, DARKE, 2005), com algumas modificações nas condições da PCR que possibilitassem uma melhor sensibilidade e especificidade de algumas reações. Segundo os autores os oligonucleotídeos iniciadores listados nos Quadros 5.1 e 5.2 foram desenhados com base na análise das seqüências nucleotídicas dos alelos disponíveis na página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>. Estes quadros também trazem informações dos alelos alvo de cada oligonucleotídeo, cuja posição referenciada é contada a partir do códon de início ATG.

A reação de PCR foi adaptada para 10 μ l de volume final, sendo que para cada reação foram utilizadas: 50ng de DNA, tampão 1x (Invitrogen), 1,5mM de MgCl₂ (Invitrogen), 0,2 μ M de cada dNTP (Invitrogen), 0,5U/ μ l de *Platinum Taq* polimerase (Invitrogen), 0,5 μ M dos oligonucleotídeos específicos de cada reação e 0,08 μ M dos oligonucleotídeos 5' (5' CAGTGCCTTCCCAACCATTCCTTA 3') e 3' (5' ATCCACTCACGGATTTCTGTTGTGT 3') para o controle interno da reação, que reconhecem seqüências conservadas do gene do hormônio de crescimento humano (HGH). Os ciclos da PCR foram efetuados no termociclador TECHNE TC-512. As temperaturas e tempos de ciclagem foram: a) 94°C por 5 minutos, b) 94°C por 20 segundos, c) 63°C por 50 segundos, d) 72°C por 30 segundos e e) 4°C até a retirada dos tubos de PCR da maquina para posterior corrida eletroforética. Os passos b, c, d foram repetidos 30 vezes. Um total de 73 reações de amplificação foram realizadas para cada amostra, as quais foram denominadas mix 1 ao 69, incluindo os mixes 12A, 12B, 15A e 19A. Algumas destas reações apresentaram temperatura de anelamento ou concentração dos oligonucleotídeos específicos distinta do descrito anteriormente. Os detalhes referentes a cada mix de reação podem ser observados na Quadro 5.3.

Um total de 17 amostras de DNA genômico tipadas em outros laboratórios foram utilizadas como controle positivo para validação das nossas reações de amplificação. A Dra. Jennifer Pepperall do instituto *Welsh Blood Service* cedeu amostras genotipadas como *MICA*010/MICA*017*, *MICA*009/MICA*017* e

*MICA*017/MICA*029*; a Dra. Maria Lúcia Carnevalli Marin do Laboratório de Imunologia do InCor-HC-FMUSP cedeu amostras das linhagens WS03 (*MICA*017*), WS70 (*MICA*015*), M28 (*MICA*009/MICA*015*), M91 (*MICA*011/MICA*029*) e M115 (*MICA*002, MICA*041*); o Dr. Peter Stastny do Departamento de Medicina Interna da Universidade do Texas forneceu amostras genotipadas como *MICA*015/MICA*015* e *MICA*00201/MICA*017* e o Dr. Frans Claas do Departamento de Transfusão de Sangue e Imunologia dos Transplantes da Universidade de Leiden forneceu amostras das linhagens DBB (*MICA*017*), DEU (*MICA*017*), WDV (*MICA*023*), DKB (*MICA*028*), EHM (*MICA*036*), LS40 (*MICA*037*) e LUY (*MICA*049*).

Quadro 5.1 - Oligonucleotídeos *sense* utilizados na tipagem do gene *MICA*

continua

Código do Oligonucleotídeo	Localização		Seqüência (5'---- 3')	Alelos alvo <i>MICA*</i>
	Exon	Posição 3'		
86Gb	2	86	CAGAgCCCCACAgTCTTCg	001-009, 011-024, 026-053
86C	2	86	CAGAgCCCCACAgTCTTCC	010, 025
109T	2	109	TAACCTCACggTgCTgTCCT	001, 004-010, 012, 016, 018, 019, 021, 024-029, 031-033, 037-040, 042, 043, 045, 048, 049, 051
109G	2	109	CCTCACggTgCTgTCCg	002,011,013-015,017,020,022,023,030, 034-036,04,044,046,047,050,052,053
139TG	2	39	TgTgCAgTCAgggTTTCTTg	004-006, 008-010, 016, 019, 024, 025, 027, 028, 031-033, 042, 048, 049, 051
139CA	2	139	gTgCAgTCAgggTTTCTCA	001, 012, 018, 021
139CG	2	139	TgTgCAgTCAgggTTTCTCg	002, 007, 011, 013, 014, 015, 017, 020, 022, 023, 026, 029, 030, 034-041, 043-047, 050, 052, 053
146G	2	146	CAGggTTTCTCgCTgAggg	041, 047
146T	2	146	CAGggTTTCTCgCTgAggT	001-040, 042-046, 048-053
176 ^a	2	176	TCAgCCCTTCTgCgCTA	004-006, 008-010, 016, 019, 024, 025, 027, 028, 031-033, 042, 044, 048, 049, 051
176G	2	176	TCAgCCCTTCTgCgCTg	001, 002, 007, 011-015, 017, 018, 020-023, 026, 029, 030, 034-041, 043, 045-047, 050, 052, 053
237T	2	237	CAGAAgATgTCCTgggAAAT	001-020, 022-053
261 ^a	2	261	CATgggACAgAgAgACCAgA	001, 012, 018, 021
341A	3	341	AAggCTTgCATTCCCTCCA	001-016, 018-053
405T	3	405	AgCTCCCAgCATTCTACTAT	00703, 00902
409 ^a	3	409	CCAgCATTCTACTACgATA	014, 015
433G	3	433	gCTTCTCTCTCCAAAACg	004, 006, 009, 044, 049
439 ^a	3	439	CTCTCCAAAACCTggAgA	001, 002, 005, 007, 008, 010-032, 034-043, 045-048, 050-053. Com mm na posição 433: 004, 006, 009, 044, 049

454 ^a	3	454	ggAgACTgAggAATggACAA	002, 007, 011, 012, 014, 015, 017, 018, 020, 021, 023, 025, 026, 029, 030, 032, 034-043, 045-047, 050-052. Com mm na posição 442:001, 031
520 ^a	3	520	ATTTCTTgAAggAAgATgCCA	001-010, 012-033, 035-053
520G	3	520	TCTTgAAggAAgATgCCg	011, 034
586 ^a	3	586	AggAACTACggCgATATCTAA	001, 002, 005, 007, 011, 012, 015, 017, 018, 020, 021, 023, 025, 026, 029-032, 034, 035, 037-043, 045-047, 050-052
586G	3	586	ggAACTACggCgATATCTAg	004, 006, 008, 009, 010, 013, 014, 016, 019, 022, 024, 027, 028, 033, 036, 044, 048, 049, 053
592 ^a	3	592	ACggCgATATCTAgAATCCA	004, 006, 009, 010, 016, 019, 022, 032, 033, 036, 044, 049
592G	3	592	ACggCgATATCTAgAATCCg	008, 013, 014, 024, 027, 028, 048, 053. Com mm na posição 586: 001, 002, 005, 007, 011, 012, 015, 017, 018, 020, 021, 023, 025, 026, 029-031, 034, 035, 037-043, 045-047, 050-052
611G	3	611	gCgTAgTCCTgAggAgAAg	004, 014, 032, 044
611C	3	611	gCgTAgTCCTgAggAgAAC	001, 002, 005, 007-013, 015-031, 033-043, 045-053. Com mm na posição 592 e 595: 006
642T	4	642	gTgAATgTCACCCgCAgT	00202, 00701, 00703, 1802, 026, 045, 051
648 ^a	4	648	gTCACCCgCAgCgAggCA	00803
663C	4	663	gCCTCgAgggCAACATC	004, 006, 008-010, 016, 019, 022, 024, 027, 033-035, 037-039, 042, 044, 048, 049, 053
692 ^a	4	692	gCAgggCTTCTggCTTCTA	001, 002, 007, 011-015, 017, 018, 020, 021, 023, 025, 026, 028-032, 036, 040, 041, 043, 045, 047, 050-052. Com mm nas posições: 684 e 685: 004-006, 008-010, 016, 019, 022, 024, 027, 033-035, 037-039, 042, 044, 048, 049, 053
697T	4	697	ggCTTCTggCTTCTATCCCT	001, 002, 007, 011-015, 017, 018, 020, 021, 023, 025, 026, 028-032, 036, 040, 041, 043, 045-047, 050-052
707C	4	707	CTTCTATCCCCggAATATCAC	004-006, 009, 024, 034, 038, 044, 049. Com mm na posição 697: 001, 002, 007, 011-015, 017, 018, 020, 021, 023, 025, 026, 028-032, 036, 040, 041, 043-047, 050-052
10820 ^{a#}	Intron 5	10820	gAgggTCAggAgAggCCA	
delF	1577*		ggCTAgTgggACATgCACAC	<i>MICA deletion</i>

mm= mismatch. # alelos alvo não disponíveis pois a seqüência do intron 5 foi descrita para o gene *MICA*, mas não para os alelos individualmente.

Quadro 5.2 - Oligonucleotídeos *anti-sense* utilizados na tipagem do gene *MICA*

continua

Código do Oligonucleotídeo	Localização		Seqüência (5'---- 3')	Alelos alvo <i>MICA</i> *
	Exon	Posição 3'		
237G'	2	237	TCTCTCTgTCCCATgTCTTg	021
337A'	3	337	CAGACCCTAATCTCCTggAA	050
341C'	3	341	CTCACAgACCCTAATCTCCC	017
383T'	3	383	gTAgAAATgCTgggAgCTCT	036
409C'	3	409	ggAgAggAAgAgCTCCCC	001-013, 016-053
433C'	3	433	TCCATTCTCAgTCTCCAC	004, 006, 009, 044, 049
439A'	3	439	ggCACTgTCCATTCTCAgA	033
442T'	3	442	TggggCATTgTCCATTCTTT	001, 031, 040
442C'	3	442	ggggCATTgTCCATTCTTC	002-030, 032-039, 041-053
454C'	3	454	TCTggAggACTggggCAC	004-006, 008-010, 013, 016, 019, 022, 024, 027, 028, 033, 044, 048, 049, 053
454T'	3	454	CTCTggAggACTggggCAT	001, 002, 007, 011, 012, 014, 015, 017, 018, 020, 021, 023, 025, 026, 029-032, 034-043, 045-047, 050-052
493T'	3	493	CTTCCTTCAAgAAATTCCTgAT	029
536A'	3	536	CTgCATgCATAgCgTgATAgA	012, 021, 032
536T'b	3	536	CTgCATgCATAgCgTgATAgT	001-042, 044-053
536C'	3	536	gCATgCATAgCgTgATAgC	043
586T'	3	586	CTCAggACTACgCCggATTT	001, 002, 005, 007, 011, 012, 015, 017, 018, 020, 021, 023, 025, 026, 029-031, 034, 035, 037-043, 045-047, 050-052. Com mm na posição 592 : 032
586C'	3	586	TCAggACTACgCCggATTC	008, 013, 014, 024, 027, 028, 048, 053. Com mm na posição 592: 004, 006, 009, 010, 016, 019, 022, 033, 036, 044, 049
592T'	3	592	TTCTCCTCAggACTACgCT	004, 009, 010, 016, 019, 022, 032, 033, 036, 044, 049. Com mm na posição 595: 006
595T'	3	595	CCTgTTCTCCTCAggACTAT	006
595C'	3	595	CCTgTTCTCCTCAggACTAC	001, 002, 005, 007-013, 015-031, 033-043, 045-053. Com mm na posição 611: 004, 014, 032, 044
611G'	3	611	ggCCAgCgTCCgTACCTg	001, 002, 005-013, 015-031, 033-043, 045-053
Mm642A'	4	642	gTTgCCCTCAAaggCCTCA	Com mm nas posições 650 e 651: 00202, 00701, 00703, 01802, 026, 045, 051
663A'	4	663	AgCCCTgCATgTCACggTA	001, 002, 005, 007, 011-015, 017, 018, 020, 021, 023, 025, 026, 028-032, 036, 040, 041, 043, 045-047, 050-052
663G'	4	663	AgCCCTgCATgTCACggTg	004, 006, 008-010, 016, 019, 022, 024, 027, 033-035, 037-039, 042, 044, 048, 049, 053
692C'	4	692	gTgTgTgATATTCCAgggAC	046

			conclusão	
707A'	4	707	CCTgACgCCAggTCAgTA	008, 010, 016, 019, 022, 027, 033, 035, 037, 039, 042, 048, 053
713G'	4	713	CCCATCCTgACgCCAgg	004-006, 008-010, 016, 019, 022, 024, 027, 033-035, 037-039, 042, 044, 048, 049, 053
713C'	4	713	CCCCATCCTgACgCCAgC	001, 002, 007, 011-015, 017, 018, 020, 021, 023, 025, 026, 028-032, 036, 040, 041, 043, 045-047, 050-052
730G'	4	730	gTgTCgTggCTCAAATAg	016, 039
730C'	4	730	gTgTCgTggCTCAAATAC	001-015, 017-038, 040-053
810A'	4	810	CTCTCCTCggCAAATCCTA	00802, 042
820C'	4	820	AACCTCTgCTCCTCTCCTTC	045
820G'	4	820	CCTCTgCTCCTCTCCTTg	001-004, 006, 007, 009, 011, 012, 014, 015, 017, 018, 020, 021, 023-026, 028-032, 034, 036, 038, 040, 041, 043, 044, 046, 047, 049-052. Com mm na posição 821: 005, 008, 010, 013, 016, 019, 022, 027, 033, 035, 037, 039, 042, 048, 053
821C'	4	821	AACCTCTgCTCCTCTCCTC	005, 008, 010, 013, 016, 019, 022, 027, 033, 035, 037, 039, 042, 048, 053
821T'	4	821	AACCTCTgCTCCTCTCCTT	001-004, 006, 007, 009, 011, 01201, 014, 015, 017, 018, 020, 021, 023-026, 028-032, 034, 036, 038, 040, 041, 043-047, 049-052
834T'	4	834	CCATgTAgCAggTgAACCTT	01202
880C'	4	880	CTCACCAgAgggCACAgC	011, 030, 047
952C'	5	952	ATAACAAAATAgCAgCAgCC	00801, 00802, 023, 028, 053
1002G'	5	1002	TTCTTCTTACAACAACAgACg	00201, 015, 017, 020, 041, 046, 050
1038 ^{a1}	5	1038	gCTTTTCTCACCTggACCA	048
1088 ^{a1}	6	1088	gCATCCCTgTggTCACTCA	049
delR'	2236*		TgACCCACATTTggTCg	<i>MICA deletion</i>

mm= mismatch

A posição de hibridização dos oligonucleotídeos iniciadores nas seqüências nucleotídicas dos exons 2, 3 e 4 dos alelos do gene *MICA* estão disponíveis nos anexos 2 e 3. O oligonucleotídeo com código 10820 está localizado no intron 5, e portanto sua posição não está demonstrada no Anexo 2. Segundo Collins *et al.*, 2002, este oligonucleotídeo foi desenhado e numerado de acordo com o estudo de Bahram *et al.*, 1996. Outros oligonucleotídeos não apresentados nos anexos são delF e delR' os quais definem a presença de uma deleção que inclui todo o gene *MICA*.

Quadro 5.3 - Mixes de amplificação para identificar os alelos *MICA* continua

Mix	Alelos <i>MICA</i> alvo	Tamanho fragmento (pb)	Código do Oligonucleotídeo Sense	Código do Oligonucleotídeo anti-sense	°C para anelamento
1	001	616	139CA	442T'	63
2	00201/020,015,017,041,050	449	692 ^a	1002G'	63
3	002/020,015,017,046	1854	146T	1002G'	63
4	002/020,015,041,046	1317	341 ^a	1002G'	63
5	004,044	724	611G	713G'	63
6	004,006,009,049	637	109T	433C'	63
7	005,013	154	707C	821C'	63
8	005,025,028,031,032,051	1384	176 ^a	663A'	63
9	006	731	176 ^a	595T'	63
10	00701/026,00703,01802,045,051	1432	109T	mm642A'	61
11 ^c	00701/026,00703,00202,01802,051	215	642T	820G'	63
12	008, 053 (00803 ñ seqüenciado)	428	663C	952C'	63
12 A	00802	265	586G	810A'	63
12 B	00803	215	648 ^a	821C'	63
13	004,006,009,044,049	568	176 ^a	433C'	63
14	006,009,049	216	433G	611G'	63
15 ^e	004,009,044,049	202	433G	595C'	63
15 A	00703,00902	230	405T	592T'	63
16	010	679	86C	454C'	63
17 ^d	011	983	520G	880C'	60
18	012,021	711	139CA	536A'	63
19	012,032	545	237T	536A'	63
19 A	01202	180	697T	834T'	63
20 ^d	013,022,035,053	1608	109G	821C'	60
21 ^e	014	216	409 ^a	586C'	60
22 ^e	015	217	409 ^a	586T'	63
23	016	770	586G	730G'	63
24	017	516	139CG	341C'	68
25	001,018	590	261 ^a	536T'	63
26	012,018,021	615	139CA	442C'	63
27	010,016,019,022,033	854	592 ^a	821C'	63
28	004,006,009,016,019,022,032,033,036,044,049	818	86G	592T'	63
29	004,006,009,010,019,022,032,033,036,044,049	764	592 ^a	730C'	63
30 ^e	010,016,019,022,032,036,044,049	191	439 ^a	592T'	63
31	004,006,009,010,016,019,032,033,049	1423	139TG	592T'	63
32 ^e	021	168	109T	237G'	63
33	022,036,044	793	109G	592T'	63
34	023	1094	586 ^a	952C'	63
35	004,006,009,014,024,028,036,044,049	860	586G	821T'	63
36	005,008,024,027,034,035,037,038,039,042,048,053	744	592G	713G'	63
37	025	813	86C	586T'	63
38	008,010,016,019,027,033,042,048	1466	139TG	707A'	63
39	008,010,016,019,022,027,033,048,053	745	586G	707A'	63
40	013,014,028,036	751	586G	713C'	63
41	029	700	109T	493T'	63
42 ^d	011,030	985	146T	880C'	63

conclusão

43	031	578	176 ^a	442T'	63
44	032	673	176 ^a	536A'	63
45	033	575	176 ^a	439A'	63
46	034	814	520G	713G'	60
47	035,037,039,042	746	586 ^a	707A'	63
48	002,011,013,017,020,022,023,030 034-036,041,044,046,047,050,052,053	609	109G	409C'	63
49	036	586	109G	383T'	63
50	035,037,039,042	993	454 ^a	821C'	63
51	001,004-010,012,018,019,021,024- 029,031-033,037,038,040,042,043,045, 048,049,051	1521	109T	730C'	63
52 ^e	002,007,011,015,017,020,023,026,029,0 30 034,035,037-041,043,045,046,047, 050,052	761	139CG	586T'	63
53	034,035,037,038,039,042	834	454 ^a	663G'	63
54	001,002,006,007,009,011,012,015,017 018,020,021,023-026,028-032,034,036, 038,040,041,043,045,046,047,049-052	1012	611C	821T'	63
55	039	771	586 ^a	730G'	63
56	040	617	139CG	442T'	63
57	041,047	753	146G	586T'	63
58	042	850	586 ^a	810A'	63
59	043	762	86G	536C'	63
60	044	607	139CG	433C'	63
61	045	861	586 ^a	820C'	63
62	046	868	520 ^a	692C'	63
63 ^d	030,047	985	520 ^a	880C'	63
64	048	1137	586G	1038A'	63
65 ^c	049	680	10820 ^a	1088A'	63
66	Deletion	696	delF	delR'	63
67	004-006, 008-010,013,016,019,022,024 027,028,033,044,048,049,053	529	237T	454C'	63
68	001,002,007,011,012,014,015,017,018,0 20 021,023,026,029-032,034-043,045- 047,050-052	680	86G	454T'	63
69	050	475	176G	337A'	63

Concentração final de oligonucleotídeos iniciadores: ^a0,25 μ M, ^d0,5 μ M e ^e2 μ M. As demais reações tiveram concentração final de 1,0 μ M.

As 73 reações de amplificação descritas na tabela acima não permitem identificar o alelo *MICA*00702*, que apesar de reagir com os mixes 51, 52, 54 e 68, não possui uma reação exclusiva. Os mixes 10 e 11 identificam os alelos *MICA*00701* e *00703*, mas não detectam o alelo 00702 devido à substituição de uma timina por uma citosina na posição 642 deste.

É importante ressaltar que reações envolvendo oligonucleotídeos que anelam em seqüências do exon 5 e 6 podem produzir bandas resultantes da amplificação de outros alelos além dos descritos, uma vez que vários alelos ainda não possuem estes exons seqüenciados.

A determinação do genótipo de cada indivíduo, precedida pela eletroforese descrita no item 5.4, depende de uma análise conjunta dos resultados obtidos nas 73 reações de amplificação, sendo verificada a presença ou ausência da banda específica da reação. O conjunto das reações positivas e negativas foi interpretado utilizando dois modelos de ficha de análise (Apêndice 1).

5.3.2 Tipagem do Gene *MICA* pela Técnica de PCR-SSOP

Além do método SSP descrito anteriormente, a caracterização dos alelos do gene *MICA* também foi feita pelo método de PCR-SSOP, empregando-se o *Kit LABType MICA*, fabricado por One Lambda Inc. Optou-se por mais de um método de tipagem devido ao número reduzido de amostras controle positivo (n= 17, representativas de apenas 8 alelos) obtido para a tipagem deste gene. Este motivo também levou à escolha de um *kit* comercial, desenvolvido por uma empresa com tradição em *kits* diagnóstico para tipagem de alelos de genes do complexo principal de histocompatibilidade.

Todos os procedimentos para o uso do *Kit LABTypeMICA* foram realizados de acordo com as instruções do fabricante, e consistem primeiramente em uma amplificação da região do gene de interesse, sendo o produto desta amplificação biotinizado. Este produto de PCR marcado é então desnaturado e mantido na forma de simples fita através do uso de tampões. O produto de PCR em simples fita é reibridizado com oligonucleotídeos-sonda seqüência-específicos. Estas sondas estão conjugadas na superfície de microesferas codificadas por cores. Após a reibridização é feita a marcação com Estreptoavidina conjugada com Phycoeritrina (SAPE). As reações são lidas no citômetro de fluxo LABScanTM, o qual emprega a tecnologia conhecida como Luminex, onde um laser de cor vermelha com comprimento de onda de 633nm reconhece a cor da microesfera e outro laser verde com comprimento de onda de 532nm reconhece se esta microesfera está ou não marcada com SAPE, o que determina sua positividade. As análises das tipagens são realizadas com o auxílio do software *HLA Visual* versão 2.0 que faz a coleta de dados e a determinação dos alelos.

5.3.3 Caracterização do Microssatélite do Gene MICA

Todos os procedimentos de tipagem do microssatélite foram realizados pela mestranda Liana Alves de Oliveira do mesmo Programa de Pós-Graduação em Genética sob orientação da Profa. Dra. Maria Luiza Petzl-Erler. Portanto foi um trabalho colaborativo com o Laboratório de Genética Molecular Humana do Depto. de Genética da UFPR, que teve como objetivo possibilitar a distinção dos alelos que se diferenciam apenas na região do microssatélite.

A tipagem foi realizada com base em um método semi-automatizado, no qual é amplificada a região do microssatélite por PCR com oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) marcados com fluorescência. Os segmentos amplificados, depois de desnaturados, são submetidos à corrida eletroforética, juntamente com um marcador de peso molecular, no aparelho seqüenciador MegaBACE 1000, na qual são separados por tamanho. Os alelos são designados com o uso do programa *Fragment Profiler version 1.2* (GE Healthcare).

A seqüência do oligonucleotídeo iniciador *sense* é: ccttttttcagggaaagtgc e do *anti-sense*: ccttaccatctccagaaactgc, cuja reação de amplificação gera um fragmento de 180 a 200 pb. A cor de marcação utilizada no oligonucleotídeo *sense* foi VIC - verde. As condições de PCR estão descritas na Tabela 5.1. O ciclo consiste de 3 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 54,5°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e finalizando com 72°C por 40 minutos.

Após a amplificação, o produto de PCR foi diluído em água miliQ. As condições de diluição foram as seguintes: 2ul de produto de PCR em 8ul de água miliQ. Após a diluição, o produto de PCR foi preparado para injeção no MegaBACE. Uma solução de TWEEN 20 e marcador de peso molecular ET-400 foi empregada (GE Healthcare). Para cada amostra se adicionou 0,3ul do marcador, 6,7ul de TWEEN 0,02X e 2ul do produto de PCR diluído. As amostras (contendo os reagentes citados) são então desnaturadas por 3 minutos a 94°C e colocadas diretamente no gelo para manter a desnaturação. A injeção no MegaBACE foi feita a 3KV por 80 segundos e a corrida se com 8KV por 80 minutos.

Tabela 5.1 - Concentração dos reagentes na PCR.

Reagente (concentração inicial)	Concentração final / Quantidade
Oligonucleotídeo iniciador	0,2µM
dNTP (2mM)	0,25mM
MgCl ₂ (50mM)	1,5mM
Taq Pol. (5U/ul)	0,25U
Tampão (10X)*	1X
DNA (20ug/ml)	5ug/ml

O volume final da reação é de 10ul.

Taq Pol. – Taq DNA Polimerase *Platinum* (Invitrogen)

*Tampão da Invitrogen (20mM Tris HCl pH=8, 40mM NaCl, 2mM Sulfato de Sódio, 0,1mM DTT, glicerol 50%).

5.3.4 Tipagem do Gene *HLA-B* pela Técnica de PCR-SSP

A tipagem do gene *HLA-B* foi realizada através do uso dos *Kits Micro SSP™ Allele Specific HLA Class I*, fabricado por One Lambda Inc. O emprego destes *kits* é adequado para amostras que já possuam seu grupo alélico *HLA-B* definido, como ocorre no nosso caso. Todos os indivíduos que compõem este estudo foram tipados previamente através dos *kits* LABType SSO1B (One Lambda Inc.).

Os procedimentos de tipagem foram realizados de acordo com as normas do fabricante. Os kits SSP utilizados são elaborados em placas para PCR de 96 poços, sendo que cada placa tipa de duas a seis amostras, dependendo do grupo alélico. Esta variabilidade ocorre pelo fato de alguns grupos possuírem mais alelos do que outros. Como os oligonucleotídeos iniciadores são aliquotados nos poços da placa, existe a necessidade de um número maior ou menor de poços para a tipagem de cada grupo. Cada *kit* acompanha além da placa de tipagem um D-Mix ao qual deve ser acrescentada uma amostra de DNA na faixa de concentração de 20ng/µl (utilizada neste estudo) a 200 ng/µl e a enzima Taq polimerase (5U/µl). Finalmente são distribuídos 10µl desta mistura em cada poço da placa.

Os kits empregados neste estudo estão descritos na Tabela 5.2. Optamos por não empregar *kits* específicos para os alelos *HLA-B*13*, *-B*37*, *B*41*, *-B*42*, *-B45*, *-B*48*, *-B*49*, *-B*50*, *-B*53*, *-B*55*, pelo fato destes grupos aparecem uma ou poucas vezes na nossa amostra. Além disso, em alguns casos os alelos destes grupos já haviam sido caracterizados no momento que o doador se cadastrou em nosso laboratório, pois apesar do *kit* SSOP ser destinado a uma tipagem de baixa resolução (grupo alélico), algumas vezes é possível definir o alelo através dela.

Tabela 5.2 - Kits de tipagem para o gene *HLA-B*

Nome do <i>Kit</i>	Grupo de alelos alvo	Volume de D-Mix [#]	Volume de DNA [#]	Volume de Taq polimerase [#]
LSSP105	B*51, 52, 78	540	59	3,0
LSSP107	B*07	360	39	2,0
LSSP108	B*08	270	29	1,5
LSSP115	B*15	540	59	3,0
LSSP116	B*38, 39	360	39	2,0
LSSP117	B*57, 58	270	29	1,5
LSSP118	B*18	270	29	1,5
LSSP127	B*27	360	39	2,0
LSSP135	B*35	540	59	3,0
LSSP140	B*40	360	39	2,0
LSSP144	B*44	270	29	1,5

[#]Volumes em μ l

A análise das tipagens, precedida pela eletroforese descrita no item 5.4, foi realizada manualmente com o auxílio de uma folha de análise fornecida juntamente com o *kit* e também através do *software HLA Visual* versão 2.0, que permite uma análise combinada dos dados de tipagem obtidos pela técnica de SSOP e de SSP. Desta forma pudemos combinar a tipagem prévia de cada doador com as tipagens realizadas durante este estudo, o que auxiliou na determinação dos alelos ou conjunto destes.

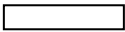
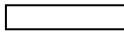
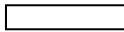






5.4 ELETROFORESE

Depois do processo de PCR, os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose e tampão TBE 1X (Trizma base 45mM, ácido bórico 45mM, EDTA 0,01M em pH8,0), corados com brometo de etídeo e fotografados durante exposição à luz ultravioleta.

O volume total de 10 μ l dos produtos do gene *MICA* amplificados por PCR-SSP foram misturados a 1 μ l de azul de bromofenol e separados em gel 1,2% a 100V, com tempo de corrida variando de 15 minutos a 30 minutos. Apenas os produtos dos mixes 11, 14, 15, 21 e 22 foram separados em gel 2,5% a 150V por 5 minutos. Este último procedimento também foi utilizado na eletroforese de todos os produtos de tipagem de *HLA-B*, por ser o recomendado pelo fabricante. Não foi

adicionado azul de bromofenol aos produtos de amplificação de *HLA-B* pelo D-Mix de reação já conter um corante de cor rosada. A interpretação dos resultados de PCR-SSP foi baseada na presença ou ausência de um fragmento de DNA amplificado visualizado no gel (Figura 6).

Figura 6 - Interpretação do Gel para os *Kits* LSSP

	Reação positiva	Reação negativa	Sem Amplificação
Poço			
Banda do Controle Interno*			
Banda de Tipagem Positiva			
Banda de Iniciadores			

* Existe um par de iniciadores de controle interno incluído em todas as reações da PCR. Este par amplifica uma região conservada do gene da β -globina humana, presente em todas as amostras de DNA. O resultado de sua amplificação é a banda do controle interno, a qual é usada para confirmar a integridade da reação de PCR. A banda de controle interno e a não incorporada ampla banda de iniciadores atuam como marcadores de tamanho, qualquer banda visível entre elas deverá ser considerada como banda de tipagem positiva. Na presença de uma banda de tipagem positiva (amplificação específica de um alelo de *HLA-B*), a banda do controle interno pode ser fraca ou ausente.

A posição da banda de controle interno (485pb) para a tipagem do gene *MICA* pelo método de PCR-SSP varia de acordo com o tamanho do fragmento específico amplificado, podendo estar acima ou abaixo da banda de tipagem específica.

No método de tipagem do gene *MICA* por PCR-SSOP a corrida eletroforética foi realizada em gel 2,5% a 150V por 8 minutos utilizando 1,3 μ l do produto amplificado. Este procedimento foi adotado a fim de constatar a qualidade da amplificação das amostras, mas não com fins de caracterização dos alelos.

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As freqüências alélicas foram obtidas por contagem direta através do pacote de programas ARLEQUIN versão 3 (EXCOFFIER *et al.*, 2005), o qual realiza este cálculo pela fórmula:

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

onde

- f_{al} : freqüência alélica (ou freqüência de determinado grupo alélico)
- n : freqüência absoluta de um alelo ou grupo alélico na amostra
- N : número de indivíduos na amostra. O N é multiplicado por 2 pois cada indivíduo é portador de duas cópias alélicas de cada gene

Para verificar se as freqüências genótípicas estavam em equilíbrio segundo o Teorema de Hardy-Weinberg também utilizou-se ferramentas do programa ARLEQUIN v.3, o qual aplica o método de Guo e Thompson (1992). Como a fase gamética neste estudo não é conhecida o teste foi realizado para cada loco separadamente.

A diversidade gênica, medida que indica a heterozigosidade esperada para um dado loco sob equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi estimada pela fórmula de Nei

(1987):
$$\hat{H} = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right)$$

onde

- n : número de cópias de cada gene na amostra
- k : número de alelos
- p_i^2 : freqüência observada dos i_s genótipos homozigotos na amostra

O teste de neutralidade seletiva para cada loco foi realizado de acordo com o teste de homozigosidade de Ewens-Watterson (WATTERSON, 1978; HARTL e CLARK, 1997) disponível no pacote de programas ARLEQUIN v.3. Este teste é baseado na comparação da homozigosidade observada na amostra com a esperada numa população neutra e em equilíbrio. Um algoritmo computacional (STEWART, 1977) é utilizado para simular amostras com populações obedecendo ao modelo de

alelos-infinitos, com o mesmo número de alelos e indivíduos existentes na amostra estudada. Quando a homozigiosidade observada na amostra é inferior a esperada sob condições de neutralidade, rejeitando esta hipótese, as freqüências alélicas podem estar apresentando uma distribuição consistente com a esperada pela seleção balanceadora (distribuição mais eqüitativa).

As freqüências haplotípicas puderam ser estimadas por um método estatístico que utiliza o algoritmo da maximização da expectativa (método da máxima verossimilhança), como descrito por Excoffier e Slatkin (1995). Este método é empregado pelo programa ARLEQUIN para se estimar as freqüências haplotípicas tomando-se como base as freqüências alélicas de uma amostra.

A partir destes dados estimaram-se os valores de desequilíbrio de ligação para os locos estudados. A verificação da ocorrência não aleatória de certas combinações alélicas foi realizada como proposto por Lewontin (1964), pela fórmula:

$$\Delta_{ab} = p_{ab} - p_a p_b$$

onde

- Δ_{ab} : valor do desequilíbrio de ligação
- p_{ab} : freqüência observada de um haplótipo
- p_a : freqüência observada do alelo (a) de um dado *locus*
- p_b : freqüência observada do alelo (b) de um outro *locus*
- $p_a p_b$: freqüência esperada de um haplótipo (ab)

No entanto, um valor relativo do desequilíbrio de ligação (Δ'_{ab}) é mais informativo do que o obtido pela fórmula descrita acima, pois o Δ'_{ab} traz informação a respeito da magnitude do desequilíbrio de ligação em relação ao maior valor que ele poderia assumir, dadas as freqüências dos alelos em questão (LEWONTIN, 1964). Este valor relativo foi calculado pelo programa ARLEQUIN através da fórmula

$$\Delta'_{ab} = \Delta_{ab} / \Delta_{ab, \text{máx}}$$

onde o valor de $\Delta_{ab, \text{máx}}$ pode ter um dos dois valores:

- o maior de $(p_a p_b, (1 - p_a)(1 - p_b))$, se $\Delta_{ab} < 0$
- ou
- o menor de $((1 - p_a)p_b, p_a(1 - p_b))$, se $\Delta_{ab} \geq 0$

O Δ'_{ab} pode assim assumir valores no intervalo de -1,0 a +1,0, sendo que os valores negativos indicam repulsão entre os alelos em questão e os positivos indicam acoplamento. O valor zero indica ausência de desequilíbrio de ligação, ou a situação denominada por alguns autores como “equilíbrio de ligação”. O grau de significância do desequilíbrio de ligação foi avaliado através do teste exato de Fisher, em tabelas de contingência 2x2.

A determinação das diferenças e similaridades entre as freqüências alélicas observadas na nossa população e em outros grupos populacionais foi efetuada pela análise de tabelas de contingência empregando-se o programa R X C (MILLER, 1997), assumindo como significantes valores de p menores ou iguais a 0,05.

6 RESULTADOS

6.1 GENE *MICA*

6.1.1 Tipificação do Gene *MICA*

A definição dos alelos para o gene *MICA* dos 204 indivíduos que compõem a amostra deste estudo baseou-se em uma análise conjunta dos dados obtidos a partir do método de PCR-SSP e de PCR-SSOP. Essa estratégia se fez necessária para esclarecimento de tipagens ambíguas ou não conclusivas, que resultam na atribuição de mais de dois alelos para um genótipo. O padrão de sondas ou oligonucleotídeos positivos na hibridização ou amplificação podem caracterizar mais de um genótipo para uma mesma amostra quando alelos diferentes de *MICA* compartilham a seqüência alvo dos “oligos positivos”, considerando-se que os dois alelos de um indivíduo são analisados simultaneamente.

Através do método de PCR-SSOP 37 (18%) tipagens tiveram um alelo definido, sendo que para o outro os resultados sugeriram mais de uma possibilidade alélica. Em todos estes casos foi possível uma tipagem conclusiva através da análise conjunta com os dados obtidos por SSP. Os casos mais comuns foram: 1) um alelo definido como *MICA**010 e o segundo podendo ser *MICA**010/016/019/033; 2) um alelo definido como *MICA**00201 ou *MICA**00801 ou *MICA**011 e o outro podendo ser *MICA**016/019/033; 3) um alelo definido como *MICA**004 podendo o indivíduo ser homocigoto ou heterocigoto com *MICA**00901 e 4) um alelo definido como *MICA**00201 podendo o indivíduo ser homocigoto ou heterocigoto com *MICA**030.

Além dos 37 casos não definidos pela análise isolada dos resultados da técnica de SSOP, foram constatadas quatro ambigüidades nos resultados obtidos por SSP e seis discordâncias entre os resultados obtidos pelos dois métodos empregados. Esses resultados discordantes estão dispostos no Quadro 6.1. Dos 408 alelos que representam os 204 indivíduos investigados neste estudo, 361 (88,5%) apresentaram tipagens concordantes entre as técnicas. Dos 47 (11,5%) alelos restantes 37 (9%) tiveram resultado ambíguo em SSOP, quatro (1%) tiveram resultado ambíguo em SSP e seis (1,5%) apresentaram resultados alélicos

diferentes considerando-se os métodos utilizados. Nestes seis últimos casos a tipificação por SSOP foi repetida e optamos pelo resultado obtido por esta técnica, já que os controles positivos e negativos estavam ótimos (dentro dos valores de *cut-off* definidos pelo fabricante) assegurando que o resultado estivesse correto.

O alelo mais freqüente em nossa amostra *MICA*00801* não pode ser diferenciado de *MICA*00802* pelo método de SSP. Isto só foi possível pelo método de SSOP, onde dos 108 alelos tipados como *MICA*00801/802* cinco foram definidos como *MICA*00802* por SSOP.

Apesar do método SSP utilizado não permitir a identificação do alelo *MICA*00702*, se este estivesse presente em nossa amostra teria sido detectado por SSOP. No entanto todas as amostras identificadas como *MICA*00701/702* por SSP foram definidas como *MICA*00701* por SSOP.

Os alelos *MICA*00901* e *MICA*049* são diferenciados apenas pelo método de SSP e não pelo método de SSOP. Devido ao fato de *MICA*049* ser um alelo raro dentre as populações já estudadas e nenhuma amostra deste estudo ter apresentado um padrão de amplificação positivo para o mix 65 que define exclusivamente este alelo, consideramos que nenhum indivíduo fosse portador deste alelo.

O método de SSOP não permite a identificação da ausência do gene *MICA* em heterozigose, a qual pode ocorrer devido a deleção de cerca de 100 kb na porção mais centromérica da região de classe I do CPH. Nos dois casos em que se constatou a presença da deleção em heterozigose com *MICA*00201* pelo método de SSP, a tipagem obtida por SSOP foi homozigosidade para *MICA*00201*, mas os indivíduos foram considerados heterozigotos.

As diferenças observadas entre as técnicas utilizadas para a tipificação dos alelos *MICA*007*, *MICA*008* e *MICA*009* (ou **049*) e para a deleção do gene *MICA* não foram consideradas como discordâncias entre os dois métodos empregados, uma vez que para cada caso claramente um dos métodos empregados não permite a detecção de um alelo.

Quadro 6.1 – Disparidades na definição dos alelos do gene *MICA*

Método PCR-SSP		Método PCR-SSOP		Genótipo considerado	
Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
<i>MICA*004</i>	<i>MICA*041</i>	<i>MICA*00201</i>	<i>MICA*004</i>	<i>MICA*00201</i>	<i>MICA*004</i>
<i>MICA*017</i>	<i>MICA*041</i>	<i>MICA*00201</i>	<i>MICA*017</i>	<i>MICA*00201</i>	<i>MICA*017</i>
<i>MICA*00901</i>	<i>MICA*00901</i>	<i>MICA*00201</i>	<i>MICA*004</i>	<i>MICA*00201</i>	<i>MICA*004</i>
<i>MICA*01801</i>	<i>MICA*01801</i>	<i>MICA*001</i>	<i>MICA*01801</i>	<i>MICA*001</i>	<i>MICA*01801</i>
<i>MICA*00201</i>	<i>MICA*00201</i>	<i>MICA*00201</i>	<i>MICA*011</i>	<i>MICA*00201</i>	<i>MICA*011</i>
<i>MICA*00201</i>	<i>MICA*040</i>	<i>MICA*00201</i>	<i>MICA*00201</i>	<i>MICA*00201</i>	<i>MICA*00201</i>

A tipagem do microssatélite do gene *MICA* permitiu diferenciar aqueles alelos que são idênticos em suas seqüências nucleotídicas ao longo dos exons 2 a 6, exceto no que se refere ao número de repetições GCT no exon 5. Dos 115 indivíduos tipados como *MICA*008* ou *MICA*027* por SSP e/ou SSOP, sete foram posteriormente definidos como *MICA*027*, pois apresentam o alelo A5 para o microssatélite e 108 foram definidos como *MICA*008*, pois apresentam o alelo A5.1. Dentre os indivíduos tipados como *MICA*00201* ou *MICA*020* e como *MICA*00701* ou *MICA*026*, todos foram definidos como *MICA*00201* e *MICA*00701* após a análise do microssatélite que revelou os alelos A9 e A4, respectivamente, em todos os casos. Para haver correspondência com as seqüências que caracterizam *MICA*020* e *MICA*026*, os alelos do microssatélite deveriam ser A10 e A6, respectivamente.

6.1.2 Freqüências Alélicas do Gene *MICA*

A Tabela 6.1 e o Gráfico 6.1 apresentam os 18 alelos encontrados na amostra de 204 indivíduos, auto-classificados como caucasianos, oriundos do estado do Paraná, em sua grande maioria da cidade de Curitiba. Nesta mesma tabela estão disponíveis os dados de freqüência absoluta e relativa para cada um dos alelos, bem como para a deleção do gene *MICA*.

Dentre os alelos encontrados na amostra populacional analisada, o mais freqüente é *MICA*00801* com freqüência de 25,3% seguido por *MICA*00201*, *MICA*00901* e *MICA*004*, cujas freqüências são 17,7, 13,7 e 11,5%, respectivamente. Alguns alelos não atingiram freqüência de 1%: *MICA*006*, *MICA*015* e *MICA*021*, bem como a deleção que caracteriza a ausência do gene *MICA*.

Os dados referentes às freqüências das variantes do microssatélite do gene *MICA* estão descritos na Tabela 6.2. A nomenclatura do microssatélite consiste da letra *A* seguida por um número que corresponde à quantidade de vezes que a repetição GCT aparece. As variantes mais freqüentes são *A6* (30,6%) e *A5.1* (26,5%), sendo que a primeira acompanha dentre outros, o terceiro e o quarto alelo, *MICA*009* e *MICA*004*, mais freqüentes em nossa amostra e a segunda acompanha somente o alelo mais freqüente *MICA*00801*, além de *MICA*00802*. Nenhuma amostra foi caracterizada como *A7* e como *A10*, os quais estão associados com os alelos *MICA*050* e *MICA*020*, respectivamente.

Para um indivíduo tipado como *MICA*00201* e *MICA*010* por ambos os métodos (SSP e SSOP), a caracterização do microssatélite definiu-o como *A6* e *A9*, enquanto que o esperado seria uma tipagem *A5* e *A9*, pois o alelo *MICA*010* possui um microssatélite com cinco repetições GCT. Existe a possibilidade deste indivíduo ser portador de um alelo ainda não descrito na literatura. Entretanto, a metodologia utilizada no presente estudo não permite afirmar se este é ou não um alelo novo. Para tanto, seria interessante realizar uma análise familiar e empregar um método de seqüenciamento das amostras. Este indivíduo não está sendo computado na amostra de 204 componentes, na qual a análise e interpretação dos dados deste estudo estão sendo baseadas.

Tabela 6.1 – Freqüências alélicas do gene *MICA* (n=204) continua

<i>MICA*</i>	Freqüência		
	n	%	σ
001	4	1,0	0,0051
00201	72	17,7	0,0188
004	47	11,5	0,0159
006	3	0,7	0,0042
00701	13	3,2	0,0087
00801	103	25,3	0,0215
00802	5	1,2	0,0053
00901	56	13,7	0,0175
010	29	7,1	0,0126
011	19	4,7	0,0101
01201	4	1,0	0,0050
015	3	0,7	0,0042
016	7	1,7	0,0065
017	7	1,7	0,0066
01801	16	3,9	0,0095
019	10	2,5	0,0074
021	1	0,2	0,0024

Tabela 6.1 – Frequências alélicas do gene <i>MICA</i> (n=204)			conclusão
027	7	1,7	0,0064
Deleção	2	0,5	0,0034

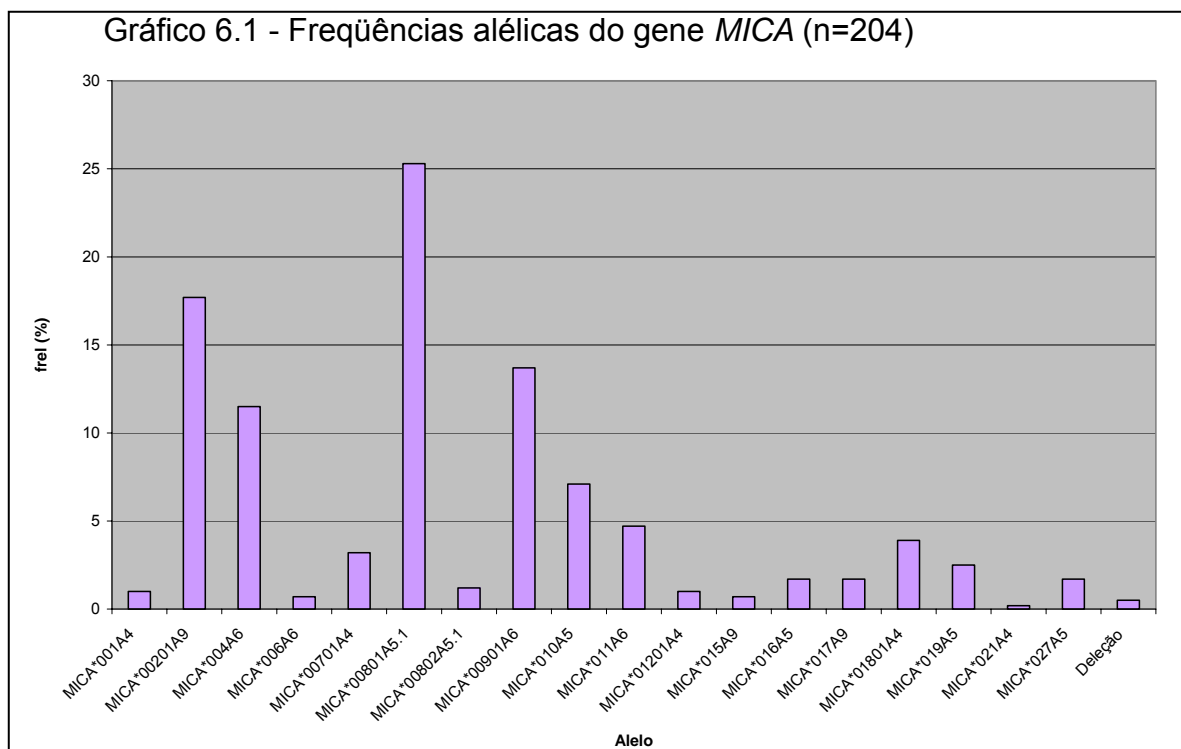


Tabela 6.2 – Frequências dos alelos do microssatélite do gene *MICA* (n=204)

Microssatélite GCT _n	N	%
A4	38	9,3
A5.1	108	26,5
A5	53	13,0
A6	125	30,6
A9	82	20,1
Ausência*	2	0,5

* casos em que foi constatado a deleção do gene *MICA*

6.2 GENE *HLA-B*

6.2.1 Tipificação do Gene *HLA-B*

A tipagem do gene *HLA-B* foi realizada através do uso dos *Kits Micro SSP™ Allele Specific HLA Class I*, fabricado por One Lambda Inc. Estes *kits* fornecem uma tipagem de média-alta resolução, desde que o grupo alélico da amostra investigada

tenha sido determinado previamente. Sempre que possível determinamos o alelo (nomenclatura com 4 dígitos – alta resolução), e nos casos em que isto não foi possível, um conjunto de possíveis alelos era determinado (média resolução). Todos os indivíduos selecionados para compor a amostra deste estudo já possuíam o grupo alélico de *HLA-B* caracterizado através do *Kit LABType SSO1B* (One Lambda Inc.) que emprega o método de PCR-SSOP e a tecnologia Luminex.

Os grupos alélicos estavam bem definidos, não havendo ambigüidade neste nível de resolução. Para algumas amostras os resultados da tipagem por SSOP já traziam informações sobre um conjunto de alelos possíveis ou até mesmo definição do alelo. Além disso, conforme descrito no tópico 5.3.4 não foram utilizados *kits* SSP para alguns grupos alélicos devido a sua baixa freqüência em nossa amostra.

O extenso polimorfismo do gene *HLA-B* resulta muitas vezes numa tipagem operacionalmente definida como ambígua, pelas diferentes possibilidades de atribuição alélica, dentro de um mesmo grupo alélico, para uma dada amostra tipada. Os *kits* que empregam o método de SSP utilizados forneceram de modo geral uma tipagem com nível de resolução inferior ao que esperávamos. Em muitos casos foi realizada uma análise conjunta dos resultados obtidos pelo método de SSP com os dados prévios da tipagem por SSOP para se chegar ao mais alto nível de resolução possível para cada amostra.

A Tabela 6.4 descreve a freqüência dos alelos de *HLA-B*. Alguns destes estão acompanhados da letra *c*, a qual se refere a um conjunto de alelos além do citado. Em todos os casos o conjunto foi nomeado pelo alelo tido como mais comum ou mais freqüente daquele conjunto. O conjunto *B*0702c* inclui os alelos *B*0702/35/36/39/41/44* entretanto, através da análise conjunta com os resultados de baixa-média resolução obtidos por SSOP, notamos que na maioria dos casos, do conjunto de alelos sugerido, apenas o alelo *B*0735* é possível além do *B*0702*. Os alelos *B*0801/22/24* fazem parte do conjunto *B*0801c*. Os indivíduos caracterizados como *B*3501c* podem ser *B*3501* ou *B*3550/52/54/57*. O mesmo tipo de ocorrência deve ser considerado em *B*3801c*, para o qual existe a possibilidade de ser *B*3809/11*, e para *B*3901c*, que pode ser *B*3926/31/32/35/38*. O conjunto *B*4001c* compreende aos alelos *B*4001/46/48/54/55/62*, o conjunto *B*4402c* aos alelos *B*4402/34/41/44* e o *B*4403c* aos alelos *B*4403/36/38/39/40*.

Assim como ocorre em *B*0702c*, a análise conjunta dos resultados obtidos por SSP e por SSOP permite que algumas opções de alelos dentro dos conjuntos sejam descartadas em determinadas amostras, mas não descreveremos estes resultados individuais. Salientamos que em todos os casos o alelo mais provável é aquele que nomeia o conjunto, e que os demais, devido à baixa ocorrência não só em populações caucasóides como na maioria das populações, são conhecidos como alelos raros e têm menor probabilidade de aparecerem na amostra selecionada para este estudo. Para facilitar a compreensão dos resultados não será mais feita citação referente aos alelos raros de cada conjunto. Quando existem apenas duas opções de alelos de um determinado grupo as duas são citadas como, por exemplo, *B*0705/06* (mesmo que *B*0705* ou *B*0706*).

Atualmente existe mais de 100 alelos descritos para a especificidade B15, o que torna difícil a caracterização alélica dentro deste grupo. Pertencem ao conjunto nomeado como *B*1501c* os alelos *B*1501/71/75/79N/81/82/ 92/94N/96/97* e *B*9502/04/05*. Alguns dos possíveis alelos de *B*1501c* podem ser descartados através da análise conjunta com os resultados obtidos por SSOP, mas estes resultados variam para cada indivíduo analisado e, portanto não serão apresentados.

6.2.2 Frequências Alélicas do Gene *HLA-B*

Os valores de frequência relativa e absoluta dos grupos e dos conjuntos ou alelos do gene *HLA-B* estão disponíveis nas Tabelas 6.3 e 6.4. As frequências dos alelos e conjuntos mostradas na Tabela 6.4 são relativas à amostra total (n=204) e não à porcentagem em relação ao grupo que pertencem. No Gráfico 6.2 está descrita apenas a frequência dos grupos *HLA-B*.

Atualmente existem mais de 800 alelos *HLA-B* descritos. Na amostra estudada foram detectados cerca de 60 alelos pertencentes a 27 grupos alélicos ou especificidades de *HLA-B*.

Os grupos *B*15* e *B*44* são os mais frequentes na amostra populacional representando juntos 22% (11% cada) dos alelos do loco HLA-B. Para o grupo *B*15* dentre os 45 alelos encontrados 41 foram definidos, sendo que destes 12 foram caracterizados como pertencentes ao conjunto *B*1501c*, e oito foram definidos como

*B*1517*, representando 2,9% e 2% da freqüência de 11% do grupo. O conjunto *B*4403c* é o mais freqüente do grupo *B*44* seguido pelo conjunto *B*4402c*.

O grupo de alelos *B*51* e *B35** são o terceiro e quarto grupos mais comuns da amostra, respectivamente. Dentro do grupo *B*35* foram encontrados quatro alelos, *B*3502*, *B*3503*, *B*3504* e *B*3508*; além do conjunto *B*3501c*, que é o mais comum.

Considerando apenas o nível de resolução alélica, o alelo mais comum é *B*5101*, que totaliza 36 dos 42 alelos pertencentes ao grupo *B*51*. Este número pode ser ainda maior, uma vez que os 6 alelos restantes do grupo não foram definidos.

Outros grupos bastante comuns na amostra estudada são *B*07*, *B*08* e *B*14*, com a maior parte de seus alelos pertencendo aos conjuntos *B*0702c* e *B*0801c*, os quais são os mais freqüentes da amostra, além de *B*4403c*. Para o grupo *B*14* o alelo mais comum é *B*1402*, que considerando a amostra total com definição alélica é o segundo mais freqüente, ficando atrás apenas de *B*5101*.

Nos casos em que foi possível a caracterização alélica dentro do grupo *B*18* os indivíduos foram tipados como *B*1801* e para *B*27* todas as 11 amostras tiveram o alelo definido, sendo a grande maioria *B*2705*. Os alelos do grupo *B*53* e *B*57* foram tipados como *B*5301* e *B*5701*, e dos nove alelos definidos dentro do grupo *B*58* oito foram tipados como *B*5801* e apenas um como *B*5802*.

Foram identificados cinco alelos dentro do grupo *B*39*: *B*3903*, *B*3905*, *B*3906*, *B*3909*, *B*3913*, além do conjunto *B*3901c*. Na amostra analisada, *B*39* segue-se ao grupo *B*15*, apresentando a maior diversidade de alelos observada dentro de um grupo alélico. No grupo *B*35* foram identificados quatro alelos, além de *B*3501c*, mas como oito alelos deste grupo não foram definidos, talvez este apresente maior diversidade que *B*39*.

Tabela 6.3 – Freqüências dos grupos alélicos do gene *HLA-B* (n=204)
continua

<i>HLA-B*</i>	Freqüência		
	n	%	σ
07	28	6,9	0,0121
08	27	6,6	0,0124
13	9	2,2	0,0073
14	26	6,4	0,0125
15	45	11,0	0,0152
18	21	5,1	0,0108
27	11	2,7	0,0079

Tabela 6.3 – Frequências dos grupos alélicos do gene *HLA-B* (n=204)
conclusão

<i>HLA-B*</i>	Frequência		
	n	%	σ
35	40	9,8	0,0146
37	4	1,0	0,0049
38	10	2,5	0,0075
39	18	4,4	0,0100
40	13	3,2	0,0089
41	6	1,5	0,0060
42	5	1,2	0,0054
44	45	11,0	0,0157
45	6	1,5	0,0061
47	1	0,2	0,0024
48	3	0,7	0,0042
49	9	2,2	0,0070
50	6	1,5	0,0060
51	42	10,3	0,0157
52	8	2,0	0,0067
53	4	1,0	0,0048
55	3	0,7	0,0042
56	2	0,5	0,0035
57	7	1,7	0,0064
58	9	2,2	0,0074

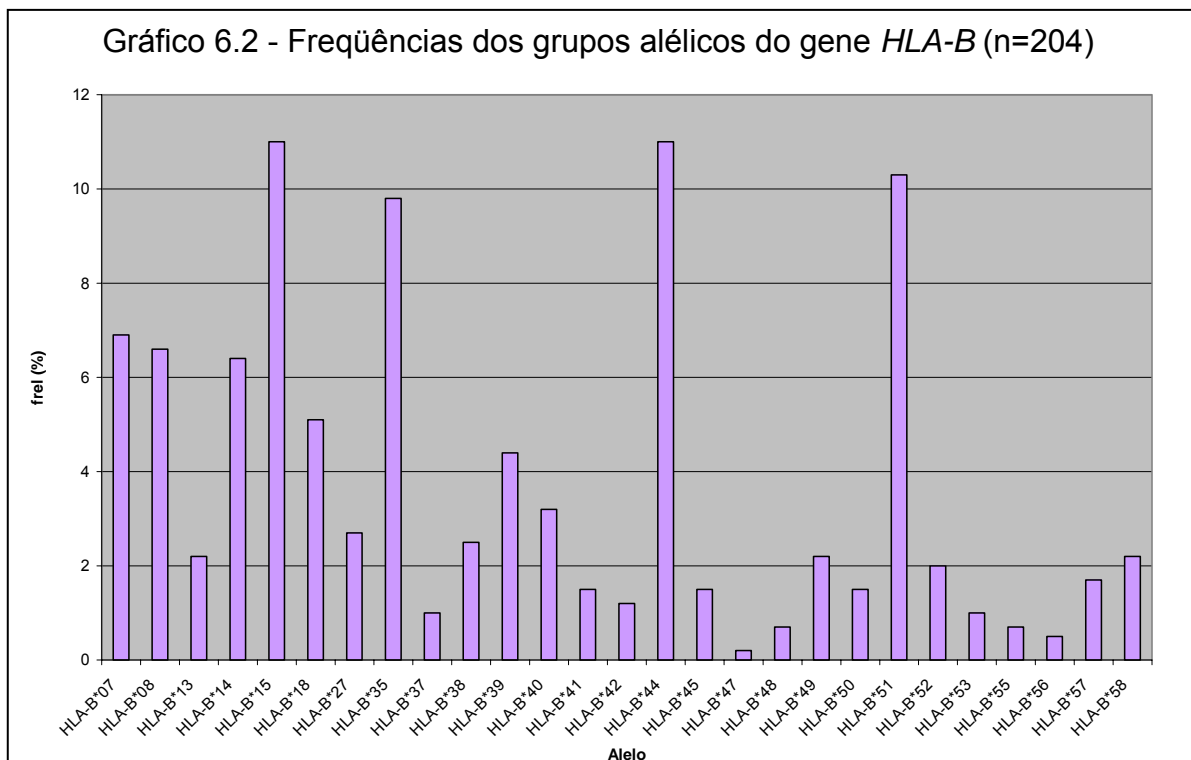


Tabela 6.4 – Freqüências dos grupos, conjuntos e/ou alelos de *HLA-B* (n=204)

<i>HLA-B</i> *	Freqüência		<i>HLA-B</i> *	Freqüência	
	n	%		n	%
07	28	6,9	40	13	3,2
0702c	24	5,4	4001c	7	1,7
0705	1	0,2	4002	4	1,0
0705/06	3	0,7	4004	1	0,2
08	27	6,6	41	6	1,5
0801c	25	6,1	4101	2	0,5
13	9	2,2	4101/05/06/07	4	1,0
1302	2	0,5	42	5	1,2
1302/08	5	1,2	4201	2	0,5
14	26	6,4	4202	1	0,2
1401	6	1,5	4201/02	2	0,5
1402	20	5	44	45	11,0
15	45	11,0	4402c	19	4,2
1501c	12	2,9	4403c	24	5,9
1503	4	1,0	4405	2	0,5
1504	6	1,5	45	6	1,5
1508	1	0,2	47	1	0,2
1510	4	1,0	4701	1	0,2
1516/67	2	0,5	48	3	0,7
1517	8	2	4802	2	0,5
1518	3	0,7	49	9	2,2
1561	1	0,2	4901	6	1,5
18	21	5,1	50	6	1,5
1801	17	4,0	5001	3	0,5
27	11	2,7	5002	3	0,7
2702	2	0,5	51	42	10,3
2705	9	2,2	5101	36	8,8
35	40	9,8	52	8	2,0
3501c	14	3,4	5201	2	0,5
3502	6	1,5	5201/05	4	0,7
3503	9	2,2	5201/07	2	0,5
3504	1	0,2	53	4	1,0
3508	2	0,5	5301	4	1,0
37	4	1,0	55	3	0,7
3701/03/06	3	0,7	56	2	0,5
38	10	2,5	5601	1	0,2
3801c	6	1,5	57	7	1,7
3801/09	4	1,0	5701	7	1,7
39	18	4,4	58	9	2,2
3901c	5	1,2	5801	8	2,0
3903	1	0,2	5802	1	0,2
3905	5	1,2			
3906	4	1,0			
3909	1	0,2			
3913	1	0,2			

Linhas em cinza correspondem aos grupos *HLA-B*.

*B**0702c = *B**0702/35/36/39/41/44, *B**0801c = *B**0801/22/24, *B**3501c = *B**3501/50/52/54/57, *B**1501c = *B**1501/71/75/79N/81/82/ 92/94N/96/97 e *B**9502/04/05, *B**3801c = *B**3801/09/11, *B**3901c = *B**3901/26/31/32/35/38, *B**4001c = *B**4001/46/48/54/55/62, *B**4402c = *B**4402/34/41/44, *B**4403c = *B**4403/36/38/39/40

6.3 EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG E HETEROZIGOSIDADE

O cálculo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg para o gene *HLA-B* foi realizado com base nos dados obtidos em baixa resolução (grupo alélico – 2 dígitos). O fato de nem todas as amostras de cada grupo terem o mesmo nível de informação, ou seja, algumas foram definidas como alelos, mas para outras apenas o grupo alélico foi definido, provocaria desvios da real freqüências dos alelos e dos genótipos em nossa amostra. Todas as amostras foram tipadas a nível alélico para o gene *MICA*, sendo assim o teste da hipótese nula do equilíbrio reflete a distribuição de seus genótipos em nível alélico.

A amostra populacional de caucasianos do Paraná está em equilíbrio segundo o Teorema de Hardy-Weinberg para os dois locos analisados, *MICA* e *HLA-B*, sendo os valores de p encontrados igual a 0,1970 e 0,2067, respectivamente.

A heterozigosidade observada para ambos os locos (*MICA*=81,0% e *HLA-B*=88,7%) é um pouco inferior à esperada (*MICA*=86,4% e *HLA-B*=93,5%), mas os desvios não são significativos considerando-se o limite de 5%. Provavelmente este desvio se torne ainda menor se, futuramente, novas análises forem realizadas com um tamanho amostral maior.

6.4 TESTE DE NEUTRALIDADE

Conforme descrito na Tabela 6.5 foi verificado um desvio significativo para o loco *HLA-B* entre os valores esperado e observado de homozigosidade de acordo com o teste de Ewens-Watterson. Neste caso foi verificado um excesso de heterozigosidade.

Apesar da homozigosidade observada no loco *MICA* ser inferior à esperada está não apresenta um desvio significativo do esperado através do teste de neutralidade seletiva de Ewens-Watterson.

Tabela 6.5 – Teste de Neutralidade Seletiva (Ewens-Watterson)

Loco	F _{obs} (%)	F _{esp} (%)	p
MICA	13,9	19,4	0,214
HLA-B	6,8	13,4	0,001

F_{obs} = índice de F observado, F_{esp} = índice de F esperado

6.5 FREQUÊNCIA DOS HAPLÓTIPOS *MICA_HLA-B* E DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO

A descrição dos haplótipos *MICA_HLA-B* inferidos neste estudo, bem como suas frequências, valores de desequilíbrio de ligação e respectivos valores de p estão na Tabela 6.6. Nesta tabela constam os haplótipos mais comuns (>1%) dentre os 63 observados em nossa amostra considerando o mais baixo nível de resolução para o gene *HLA-B*, ou seja, os seus grupos alélicos. Os haplótipos menos comuns ou raros não estão descritos, pois nestes casos o desvio padrão é muito elevado levando a estimativa pouco confiável da frequência dos mesmos na população que esta amostra representa.

A nomenclatura dos alelos do gene *MICA* adotada na tabela e no texto não acompanha a designação do microssatélite de cada alelo, com o intuito de tornar a leitura dos dados mais clara e simplificada.

O haplótipo mais freqüente na amostra estudada é *MICA*00901_B*51*, seguido por *MICA*00201_B*35* e *MICA*00801_B*07*. Outros haplótipos comuns são *MICA*004_B*44*, *MICA*00801_B*08* e *MICA*010_B*15*. Os valores de desequilíbrio entre os alelos destes haplótipos e respectivo valor de p indicam associação entre seus alelos, mas esta associação não é absoluta.

Outras associações comuns neste estudo são: *MICA*011_B*14*, *MICA*00201_B*39*, *MICA*00701_B*27*, *MICA*00201_B*38*, *MICA*00201_B*58* e *MICA*004_B*49*, as quais apresentam um $\Delta' = 1,0$ com valor de $p = 0,0000$, indicando uma associação absoluta entre os alelos de cada haplótipo.

Os haplótipos *MICA*016_B*35*, *MICA*017_B*57*, *MICA*004_B*41* e *MICA*004_B*42* não apresentam frequências elevadas (<2%), mas constatou-se um forte desequilíbrio de ligação para estas associações.

Tabela 6.6 – Haplótipos *MICA_HLA-B* com freqüência superior a 1% e respectivos valores de desequilíbrio de ligação relativo (n = 204)

Haplótipo	Freqüência		Δ'	<i>p</i>
	n	%		
<i>MICA*00901_B*51</i>	36	8,7	0,8344	0,0000
<i>MICA*00201_B*35</i>	25	6,1	0,5446	0,0000
<i>MICA*00801_B*07</i>	25	6,1	0,8567	0,0000
<i>MICA*004_B*44</i>	24	5,9	0,4726	0,0000
<i>MICA*00801_B*08</i>	24	5,9	0,8514	0,0000
<i>MICA*010_B*15</i>	24	5,9	0,8062	0,0000
<i>MICA*00801_B*44</i>	20	4,9	0,2568	0,0017
<i>MICA*011_B*14</i>	19	4,6	1,0000	0,0000
<i>MICA*00201_B*39</i>	18	4,4	1,0000	0,0000
<i>MICA*01801_B*18</i>	15	3,7	0,9341	0,0000
<i>MICA*00701_B*27</i>	11	2,7	1,0000	0,0000
<i>MICA*00201_B*38</i>	10	2,5	1,0000	0,0000
<i>MICA*00201_B*58</i>	9	2,2	1,0000	0,0000
<i>MICA*004_B*49</i>	9	2,2	1,0000	0,0000
<i>MICA*00801_B*15</i>	9	2,2	-0,1197	0,6207
<i>MICA*00801_B*13</i>	8	2,0	0,8514	0,0000
<i>MICA*00801_B*40</i>	7	1,7	0,3826	0,0158
<i>MICA*016_B*35</i>	7	1,7	1,0000	0,0000
<i>MICA*017_B*57</i>	7	1,7	1,0000	0,0000
<i>MICA*004_B*41</i>	6	1,5	1,0000	0,0000
<i>MICA*00901_B*35</i>	6	1,5	0,0148	0,8052
<i>MICA*019_B*14</i>	6	1,5	0,5728	0,0000
<i>MICA*004_B*42</i>	5	1,2	1,0000	0,0000
<i>MICA*00901_B*50</i>	5	1,2	0,8068	0,0000
<i>MICA*010_B*52</i>	5	1,2	0,5963	0,0000
Outros haplótipos*	25	16,8		

* 25 haplótipos diferentes com freqüência inferior a 1% na amostra total.

6.5.1 Descrição dos haplótipos *MICA_HLA-B*

Nesta sessão descrevemos mais detalhadamente os dados obtidos no presente trabalho, revelando, sempre que possível, informações relativas ao número de cada combinação alélica entre os genes *MICA* e *HLA-B*. Quando pertinente também são informados os valores de desequilíbrio de ligação e valores de p .

A maioria dos alelos *B*0702c* (92%) está associada com *MICA*00801* ($\Delta' = 0,8729$; $p = 0,0000$), sendo que a combinação *B*0702c* e *MICA*027* foi observada em apenas dois indivíduos. De forma similar, *B*0801c* está associado quase sempre com *MICA*00801* ($\Delta' = 0,8932$; $p = 0,0000$) e em apenas dois casos ele aparece com *MICA*00901* e *MICA*019*. *MICA*00801* também foi observado com os alelos de *B*13* e com *B*37*.

*MICA*010* está associado com diversos alelos de *B*15*, como *B*1501c*, *B*1504*, *B*1508* e *B*1517*. Os cinco alelos *MICA*010* que não aparecem com algum alelo do grupo *B*15* estão associados com *B*5201* ou *B*5201/05*. Por outro lado alelos do grupo *B*15* também estão associados com *MICA*00801* e *MICA*00802*. O único alelo identificado como *B*1561* parece formar haplótipo com *MICA*00201*.

Dos 16 alelos caracterizados como *MICA*01801*, 15 estão em haplótipos com *B*18* ou *B*1801*, e um foi observado em associação com *B*4402c*. Todos os quatro alelos *MICA*001* mostram associação com *B*1801*, neste caso o valor de desequilíbrio é $\Delta' = 1,0$ e $p = 0,0000$.

Dois alelos do grupo *B*27* foram encontrados em nossa amostra, *B*2702* ($n=2$) e *B*2705* ($n=9$), ambos estão associados com o alelo *MICA*00701* ($\Delta' = 1,0$; $p = 0,0000$).

O alelo *MICA*016* apareceu em associação com os alelos *B*3502* e *B*3508*. Entretanto, o conjunto *B*3501c*, o mais freqüente do grupo *B*35*, apresentou um forte desequilíbrio de ligação com *MICA*00201* ($\Delta' = 0,9132$; $p = 0,0000$).

Apesar de terem sido identificados neste trabalho cinco alelos distintos de *B*39* ($n=18$) além do conjunto *B*3901c*, todos parecem estar em associação com o alelo *MICA*00201*. Para o grupo *B*38*, podendo os alelos ser *B*3801c* ou *B*3801/09*, a associação observada também é com *MICA*00201*, assim como para *B*5301* ($n=4$), *B*5801* ($n=8$) e *B*5802* ($n=1$).

Todos os alelos dos grupos *B*41* (n=6), *B*42* (n=5) e *B*49* (n=9) estão em associação com *MICA*004*, este último por sua vez aparece associado com diversos alelos de *HLA-B*, dentre eles outra associação forte é com *B*4403c* ($\Delta' = 1,0$; $p = 0,0000$). Outro haplótipo comum na amostra considerando o grupo *B*44* é *MICA*00801_B*4402c* (n=18).

O alelo *MICA*015*, que apresenta uma frequência inferior a 1%, está ligado ao grupo *B*45* ($\Delta' = 1,0$; $p = 0,0000$). Tanto *MICA*017* quanto *B*5701* aparecem sete vezes na amostra estudada e para estes foi observado um desequilíbrio de ligação absoluto. Este mesmo tipo de correlação ocorre entre *MICA*01201* e *B*55* (n=3), apesar de neste caso *MICA*01201* aparecer uma quarta vez na amostragem e provavelmente acompanhando o alelo *B*1801*.

O grupo alélico *B*51* parece estar em associação com diversos alelos de *MICA*, mas a grande maioria (n=32) de seus alelos caracterizados como *B*5101* está associada com *MICA*00901*. Este, por sua vez, também está associado com os dois alelos de *B*50* (n=6). Detectaram-se apenas três alelos *MICA*006* na amostra, todos associados com *B*5101*.

7 DISCUSSÃO

O Complexo Principal de Histocompatibilidade desde sua descoberta por Peter Gorer em camundongos em 1936 tem sido uma das regiões mais estudadas no genoma de vertebrados. No genoma humano esta região apresenta um elevado número de genes, densamente distribuídos ao longo de 3,6 Mb, ou de 7,6 Mb, se considerarmos a região conhecida atualmente como CPH estendido (HORTON *et al.*, 2004).

Em humanos, muitas vezes o CPH é referido como Sistema HLA, o qual dentre outros compreende os genes *HLA* de classe I clássicos, *A*, *B* e *C*. A variabilidade dos antígenos HLA resultante de diferenças nucleotídicas entre os alelos são decorrentes de mutações de ponto, eventos de conversão intragênica e de recombinação (PARHAM *et al.*, 1997). Estes mecanismos geram um extraordinário polialelismo e polimorfismo característico dos genes *HLA*, ampliando a capacidade de resposta imunológica, em nível individual e populacional, aos inúmeros agentes patogênicos do meio ambiente.

Os genes e pseudogenes da família MIC, descobertos a pouco mais de uma década (BAHRAM *et al.*, 1994 e LEELAYUWAT *et al.*, 1994), juntamente com os genes de classe I clássicos e não clássicos constituem a Super-família HLA de classe I. As semelhanças estruturais das moléculas MICA com os antígenos HLA de classe I, bem como o seu polimorfismo foram determinantes para que pesquisadores iniciassem estudos sobre sua função e diversidade em populações.

Quando comparamos o gene *MICA* com os genes *HLA* classe I clássicos observamos que estes últimos exibem uma frequência maior de polimorfismo nos exons 2 e 3 enquanto que o gene *MICA* apresenta um polimorfismo ao longo dos exons 2, 3 e 4. Em *HLA-A*, *-B* e *-C*, mas não em *MICA*, as substituições nucleotídicas tendem a ocorrer em posições que transcrevem para resíduos envolvidos na interação com os peptídeos (resíduos da fenda de ligação). Provavelmente as seqüências do exon 4 são conservadas em decorrência das funções do domínio $\alpha 3$, que consistem da associação à $\beta 2$ -microglobulina e a interação com o co-receptor CD8 presente nas células T. Esta associação com a $\beta 2$ -microglobulina não é observada nas moléculas MICA.

O presente trabalho é o primeiro a investigar o polimorfismo do gene *MICA* e seu desequilíbrio de ligação com alelos de *HLA-B* em uma população caucasiana do estado do Paraná. Através dos dados e informações obtidas esperamos enriquecer o conhecimento sobre a distribuição da diversidade alélica e haplotípica destes genes.

Até o momento não há investigações sobre a distribuição alélica de *MICA*, bem como de seu desequilíbrio de ligação com alelos do gene *HLA-B*, nas populações européias que tiveram maior contribuição na colonização do estado do Paraná em meados do século 19, como, italianos, alemães, poloneses e ucranianos. Também não há estudos com amostras representativas das populações portuguesa e espanhola, que iniciaram a colonização da região a partir do século 17, ou com ameríndios pertencentes às tribos Guarani e Caingangue, as quais predominam no sul do Brasil e que ocupavam a região até a chegada dos primeiros imigrantes conforme descrito no trabalho de PROBST *et al.*, 2000.

Por este motivo não será possível neste momento comparar a distribuição alélica de *MICA* em nossa população com a distribuição nas suas principais populações fundadoras. Entretanto, comparamos a diversidade de *MICA* observada em nosso estudo com os dados disponíveis na literatura, incluindo nestes um estudo realizado com amostra representativa da população de São Paulo (MARIN *et al.*, 2004), o único, além deste, que analisou uma população brasileira.

Inicialmente o método empregado na tipagem do gene *MICA* seria apenas de PCR-SSP baseado no protocolo proposto por Collins *et al.*, 2002, além da utilização de alguns oligonucleotídeos iniciadores propostos no trabalho de Rees *et al.*, 2005, que complementaríamos o primeiro detectando os alelos *MICA**00703, *MICA**00803, *MICA**00902, *MICA**01202 e *MICA**050. Entretanto, com o intuito de aumentar a confiabilidade dos resultados optamos por reproduzir todas as tipagens pelo método de SSOP, através do recém lançado *kit LABTypeMICA* do fabricante One Lambda Inc.

Para diversas reações (mix) tínhamos dúvidas da confiabilidade dos dados no que se refere à presença ou ausência de bandas, pois a falta de amostras de referência que nos servissem como controle positivo impedia a otimização das condições de PCR para cada reação. Conforme descrito na sessão 6.1.1, os resultados revelaram uma alta concordância dos resultados, mas mais do que isto,

que o ideal seria uma análise conjunta dos padrões de positividade obtidos em ambos os métodos, o que permitiu a resolução de diversas ambigüidades.

Nenhum dos métodos empregados neste trabalho permite a identificação do alelo *MICA*00804*. Optamos por não considerar este alelo nas análises dos resultados obtidos, já que o mesmo foi descrito em apenas um indivíduo caucasóide oriundo da Inglaterra (STEWART *et al.*, 2004). Este alelo se diferencia de *MICA*00801* apenas pela substituição de uma citosina por timina no nucleotídeo 21 do exon 1. Outros alelos podem apresentar esta mesma substituição, pois até o momento apenas os alelos *MICA*004*, *MICA*00801* e *MICA*00804* possuem o exon 1 seqüenciado (EUROPEAN BIOINFORMATIC INSTITUTE, www.ebi.ac.uk/imgt/hla/ - acesso em 05/12/06).

A metodologia de PCR-SSP utilizada neste estudo apresenta a vantagem de ser uma das únicas propostas na literatura que permite a detecção da deleção do gene *MICA*.

A tipagem do gene *HLA-B* também foi realizada pelo método de PCR-SSP (*kits* comerciais da One Lambda Inc.), sendo que todas as amostras já tinham seu(s) grupo(s) alélico definido pelo método de SSOP (*kits* comerciais da One Lambda Inc.). Novamente o ideal foi uma análise conjunta dos dados de ambas as técnicas, mas mesmo assim só foi possível definir os alelos até a nomenclatura de quatro dígitos, de forma que a nomenclatura com seis ou oito dígitos, que se referem às mutações sinônimas e fora da região codificadora, não foi usada neste trabalho.

Em muitos casos a tipificação do gene *HLA-B* sugere mais de um alelo de um mesmo grupo alélico *HLA-B* para uma dada amostra. Este fato reflete a dificuldade de tipificação dos alelos deste loco com extraordinário polimorfismo, o maior conhecido no genoma humano. Devido ao desconhecimento da configuração *cis* e *trans* das substituições nucleotídicas presentes em um genótipo e pelo fato dos dois alelos serem tipados simultaneamente, é relativamente freqüente a não resolução a nível alélico do genótipo de um indivíduo.

A distribuição dos genótipos de *MICA* na amostra populacional investigada, embora apresente um valor de heterozigosidade um pouco inferior ao esperado, está de acordo com os princípios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg. O mesmo fato foi observado para o loco *HLA-B*.

Neste estudo foram encontrados 18 alelos *MICA* dos 61 descritos na literatura, além da deleção deste gene, número semelhantes ao observado em afro-americanos, euro-americanos e marroquinos. Em estudos realizados com tribos nigerianas, populações ameríndias, japoneses e coreanos o número de alelos detectados foi inferior, variando entre cinco e oito alelos. Deve-se considerar que, diferentes estudos utilizam diferentes metodologias na identificação dos alelos, e que nem sempre é possível o mesmo grau de detecção destes. Portanto em algumas populações o número de alelos pode estar subestimado. Além disso, alguns estudos foram realizados anteriormente a descoberta de certos alelos, o que, dependendo do método de tipagem empregado, pode ter impedido a identificação dos mesmos.

A Tabela 7.1 traz dados de freqüência alélica do gene *MICA* em algumas populações e informações a respeito das diferenças e semelhanças destas freqüências quando comparadas com os dados obtidos no presente estudo. De qualquer forma estas informações também são discutidas ao longo do texto.

Os alelos *MICA*00801A5.1*, *MICA*00201A9* e *MICA*00901A6*, assim como observado em outras populações de norte americanos caucasianos e japoneses (KATSUYAMA *et al.*, 1999; GAO *et al.*, 2006; KOMATSU-WAKUI *et al.*, 1999 e ZHANG *et al.*, 2000) são, nesta ordem, os mais freqüentes e juntos correspondem a mais de 50% da freqüência alélica total da amostra. Nas populações coreanas e tailandesas (PYO *et al.*, 2003 e ROMPHRUK *et al.*, 2001) estes alelos também são comuns. No entanto, nestas, o alelo *MICA*010* é o mais freqüente, ocorrendo de forma significativamente mais elevada do que em nossa amostra populacional.

Resultados interessantes e similares de três estudos independentes foram obtidos a partir da análise de três populações caucasóides, duas inglesas e uma norte-americana, nos quais a freqüência de *MICA*008* atingiu valores entre 50 e 55% do total de alelos em cada amostra, sendo ligeiramente mais comum do que em outros estudos (PETERSDORF *et al.*, 1999; AHMAD *et al.*, 2002 e REES, DOWNING e DARKE, 2005).

Tabela 7.1 – Frequências alélicas do gene *MICA* em algumas populações

Alelo <i>MICA</i> *	Euro- Brasileiros n=204	(1) Brasileiros# n=200	(2) Indígenas Sul-Americanos			(3) Afro- Americanos# n=605	(3) Euro- Americanos# n=1.245	(4) Nigerianos - tribos			(5) Tailandeses n=255	(6)# Japoneses n=130	(7) Coreanos n=199
			Toba n=94	Wichi n=42	Terena n=60			Yoruba n=74	Efik n=32	Igbo n=46			
001	1,0	1,8	0,5	0	0	1,4	1,1	NI	NI	NI	0	0	0
002	17,7	15,4	34,6	47,6	44,5	25,4	14,26	33,1	17,2	42,4	17,6	14,6	17,8
00201	17,7	15,4	34,6	47,6	44,5	25,4	14,1	33,1	17,2	42,4	17,6	NT	NT
00202	0	0	0	0	0	0	0,16	0	0	0	0	NT	NT
004	11,5	14,6	1,1	0	0	19,1	7,5	27,0	21,9	13,0	3,5	9,2	12,3
006	0,7	0,8	0	0	0	0,08	0,32	0	0	0	0	0	0
007	3,2	1,3	0	1,2	0	1,24	5,08	NI	NI	NI	0	1,2	3,3
00701	3,2	NT	0	1,2	0	0,66	4,6	NI	NI	NI	0	NT	NT
00702	0	NT	0	0	0	0,58	0,48	0	0	0	0	NT	NT
008	26,5	27,2	1,0	0	0,8	31,7	43,33	14,2	32,8	25,0	21,4	30,8	10,8
00801	25,3	NT	1,0	0	0,8	26,6	43,05	14,2	32,8	25,0	21,4	NT	NT
00802	1,2	NT	0	0	0	5,1	0,28	6,8	3,1	1,1	0	NT	NT
009	13,7	12,5	3,2	1,2	2,3	3,8	8,5	NI	NI	NI	2,4	16,5	10,6
00901	13,7	12,5	1,6	1,2	2,3	1,7	7,1	NI	NI	NI	2,4	NT	NT
00902	0	0	1,6	0	0	2,1	1,4	0,7	7,8	0	0	NT	NT
010	7,1	5,7	27,7	19,0	17,2	1,2	5,8	NI	NI	NI	18,2	10,8	18,3
011	4,7	3,3	0,5	0	0	2,6	2,9	NI	NI	NI	0	0	0
012	1,0	1,3	0	0	0	1,2	1,9	NI	NI	NI	3,1	12,3	11,1
015	0,7	2,0	0	0	0	5,6	0,2	NI	NI	NI	0	0	0
016	1,7	2,3	0	0	0	0,17	2,3	NI	NI	NI	0,2	0	0
017	1,7	0,8	0	0	0	0,6	1,1	NI	NI	NI	2,2	0	NT
018	3,9	2,5	0	0	0	3,0	3,9	NI	NI	NI	6,1	0	NT
019	2,5	2,3	0	0	0	0,83	1,2	NI	NI	NI	15,3	3,5	NT
020	0	NT	0	0	0	NT	NT	0	0	0	0,4	NT	NT
021	0,2	0	0	0	0	0,17	0,28	NI	NI	NI	0	NT	NT
024	0	0	0	0	0	0,08	0,12	0	0	0	0	NT	NT
026	0	NT	0	0	0	NT	NT	0	0	0	1,4	NT	NT
027	1,7	NT	30,9	31,0	35,2	NT	NT	0	0	0	NT	NT	13,6
029	0	0,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NT	NT
030	0	0	0	0	0	0,33	0,16	NI	NI	NI	0	NT	NT
035	0	0	0	0	0	0	0,04	0	0	0	0	NT	NT
041	0	0,3	0	0	0	0,5	0	2,0	3,1	9,8	0	NT	NT
043	0	0,3	0	0	0	0,33	0	0	0	0	0	NT	NT
044	0	0	0	0	0	0,08	0	0	0	0	0	NT	NT
045	0	0	0	0	0	0,33	0,04	NI	NI	NI	0	NT	NT
046	0	0	0	0	0	0,25	0	NI	NI	NI	0	NT	NT
047	0	0	0	0	0	0	0,04	0	0	0	0	NT	NT
052	0	NT	NT	NT	NT	0	0	0	0	0	8,2	NT	NT
Del	0,5	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0	0	0	NT	NT	2,3
Blank	0	5,7	0	0	0	NI	NI	0	0	0	NI	1,2	0

NT não tipado, NI não informado. Em vermelho: frequências alélicas que diferem significativamente da encontrada em nossa amostra ($p \leq 0,05$).

Microsatélite (GCT_n) não caracterizado: *MICA**002 inclui *MICA**020 e *023, *MICA**007 inclui *MICA**026, *MICA**008 inclui *MICA**027 e *048.

(1) MARIN *et al.*, 2004; (2) ZHANG *et al.*, 2002; (3) GAO *et al.*, 2006; (4) TIAN *et al.*, 2003; (5) ROMPHRUK *et al.*, 2001; (6) KATSUYAMA *et al.*, 1999; (7) PYO *et al.*, 2003.

Em vários estudos foi detectado o alelo *MICA*019* em baixa frequência, inclusive no presente estudo. Entretanto, em tailandeses este é o quarto alelo mais freqüente, representando 15% dos alelos presentes nesta população (ROMPHRUK *et al.*, 2001). Outro alelo característico nessa população é *MICA*052*, o qual não foi descrito em nenhuma outra e nem neste trabalho.

O alelo *MICA*00901*, comum em nossa amostra, ocorre em baixa frequência em afro-americanos e nigerianos, sendo nestas *MICA*004* um dos alelos mais freqüentes. Este alelo mesmo sendo relativamente comum na amostra investigada neste trabalho, apresenta frequência significativamente mais baixa do que em populações negróides (TIAN *et al.*, 2003 e GAO *et al.*, 2006). O alelo *MICA*00902*, não detectado em nossa amostra, foi encontrado em alta frequência apenas em marroquinos de origem caucasiana, onde juntamente com *MICA*00801* e *MICA*004* é o mais comum (PIANCATELLI *et al.*, 2005).

O alelo *MICA*01201* é significativamente mais comum em orientais do que na nossa população e *MICA*011*, que possui uma frequência de quase 5% na nossa amostra, não foi identificado até o momento em populações asiáticas.

A diversidade encontrada no presente estudo se assemelha a do estudo de Marin *et al.*, 2004, também conduzido em amostra brasileira, no entanto representativa da população de São Paulo. Não foi observada nenhuma diferença significativa na frequência dos alelos entre os dois estudos. Os alelos *MICA*029*, *MICA*041* e *MICA*043* detectados apenas uma vez na população de São Paulo, não estão presentes na nossa amostra, por outro lado, os alelos *MICA*021* e *MICA*027* identificados na nossa amostra, não foram encontrados na amostra de São Paulo. O alelo *MICA*027* pode estar ocorrendo no estudo de Marin, mas como a análise do microssatélite não foi realizada neste estudo, não é possível distinguir este alelo de *MICA*00801*.

Os alelos de *MICA* que não foram detectados no presente trabalho podem apresentar uma baixa representatividade ou mesmo serem ausentes na população que nossa amostra representa.

Devido à proximidade física entre os genes *MICA* e *HLA-B* seus alelos tendem a estarem associados, embora esta associação em muitos casos não seja absoluta. Nota-se que mais comumente um mesmo alelo *MICA* está associado com vários alelos ou grupos alélicos de *HLA-B* do que o contrário, pois de forma geral um

alelo *HLA-B* está associado com um ou poucos alelos *MICA*. Isto se torna mais evidente se não considerarmos os haplótipos com baixa frequência. Se pensarmos que o número de alelos *HLA-B* é muito mais elevado em comparação com o número de alelos *MICA* fica fácil entender esta distribuição.

Os dois alelos de *MICA* predominantes em nossa amostra aparecem associados com múltiplos alelos de *HLA-B*. As associações observadas com *MICA*00801* são: *B*0702c*, *B*0801c*, *B*1302/08*, *B*1517*, *B*4001c* e *B*4402c*, dentre outros que atingiram frequência inferior ou igual a 1%. Estas associações também foram constatadas em populações asiáticas, em euro-americanos, ingleses e marroquinos (OBUCHI *et al.*, 2001; PYO *et al.*, 2003; KATSUYAMA *et al.*, 1999; KOMATSU-WAKUI *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 2000 e AHMAD *et al.*, 2002). No entanto, em asiáticos, os haplótipos mais comuns são *MICA*00801_B*07* e *MICA*00801_B*40*. Em negróides o alelo que comumente aparece associado com *MICA*00801* é *B*1503* (TIAN *et al.*, 2003 e GAO *et al.*, 2006), sendo este último comum em populações de negros africanos e americanos (GEER, TERASAKI e GJERTSON, 1998 e BARNARDO *et al.*, 1998). Em nossa amostra dos quatro alelos *B*1503*, três podem estar associados com *MICA*00801*.

O alelo *B*0705/06* aparece duas vezes com *MICA*00801* e uma vez com *MICA*00802*, já um alelo definido exclusivamente como *B*0705* aparece com *MICA*00801*. Este fato é sugestivo de que o alelo associado com *MICA*00802* seja *B*0706* e os demais, associados com *MICA*00801* sejam *B*0705*.

Para *MICA*00201* as associações mais comuns foram observadas com: *B*3501c*, *B*3801c* e *B*3801/09*, todos os alelos identificados de *B*39*, *B*5301* e *B*5801*. Em japoneses ocorre a combinação do alelo *MICA*00201* com *B*35* e *B*39* (KOMATSU-WAKUI *et al.*, 1999; KATSUYAMA *et al.*, 1999 e OBUCHI *et al.*, 2001); em coreanos e em amostra populacional do nordeste da Tailândia, além destes haplótipos, a combinação mais comum ocorre com o grupo *B*58* (PYO *et al.*, 2003). A associação com *B*5301* é mais comum em afro-americanos e em populações de diferentes tribos nigerianas (TIAN *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2003 e GAO *et al.*, 2006) do que em outras populações. Esta observação concorda com a presença relativamente alta do alelo *B*5301* em populações negróides (africanas e afro-descendentes) (FERNANDEZ-VIÑA *et al.*, 1995 e CAO *et al.*, 2004).

O grupo *B*35* apresenta um grande número de alelos e está amplamente distribuído em diversas populações. Na nossa amostra o haplótipo *MICA*00201_B*35* é o segundo mais comum, sendo que dentre eles ocorre em maior frequência *MICA*00201_B*3501c*. Em ameríndios o grupo *B*35* aparece como um dos mais freqüentes do loco HLA-B (PETZL-ERLER *et al.*, 1993; BELICH *et al.*, 1992 e PARHAM *et al.*, 1997), entretanto informações a cerca de seu desequilíbrio de ligação com alelos de *MICA* ainda são escassas. Na tribo argentina Toba foi verificada a associação de *B*3505* com *MICA*00201* (ZHANG *et al.*, 2002).

O haplótipo *MICA*00901_B*5101* é o que apresenta frequência mais elevada em nossa amostra, sendo também comum em populações asiáticas (tailandeses, japoneses e coreanos) e em euro-americanos. Em orientais (japoneses e coreanos) o haplótipo *MICA*00201_B*52* é igualmente freqüente (KOMATSU-WAKUI *et al.*, 1999; KATSUYAMA *et al.*, 1999; ROMPHRUK *et al.*, 2001; OBUCHI *et al.*, 2001 e PYO *et al.*, 2003). *MICA*00901* também aparece associado com *B*3503*, e com todos os alelos *B*5001* e *B*5002* da nossa amostra. Em euro e afro-americanos e em caucasianos do Marrocos foi verificada a associação de *B*5001* e *B*5002* com *MICA*00902*, o qual difere de *MICA*00901* apenas por uma substituição no exon 3 (GAO *et al.*, 2006 e PIANCATELLI *et al.*, 2005).

Em diversos estudos, assim como neste, foi constatada a associação de *MICA*004* com *B*4403* em frequência relativamente elevada. A forte associação verificada com *B*4901*, porém em baixa frequência, foi observada também em euro e afro-americanos. Em nossa amostra é possível que *MICA*004* também esteja em haplótipo com *B*5101* e com *B*5201* (aparecem uma vez cada na nossa amostra), esta associação foi evidente até o momento somente em afro-americanos (ZHANG *et al.*, 2003 e GAO *et al.*, 2006). Em nosso estudo o alelo *B*4403* na verdade representa o conjunto *B*4403c*, que inclui os alelos *B*4403/36/38/39/40*. Entretanto, diante dos dados de associação verificados em outros trabalhos, acredita-se que realmente se trate do alelo *B*4403*.

O grupo alélico *B*15* é o grupo que possui maior diversidade no loco HLA-B. Este grupo tem uma distribuição geográfica ampla e vários de seus alelos apresentam frequências diferenciadas entre as populações. Em grande parte os alelos deste grupo identificados na nossa amostra estão associados com *MICA*010*, principalmente *B*1501c* e *B*1504*, os quais pertencem ao grupo sorológico B62. A

associação entre *MICA*010* e *B*15* foi relatada em praticamente todos os trabalhos disponíveis até o momento, porém poucos trazem informações em nível alélico, mas muitos deles fazem referência ao equivalente sorológico B62.

Os haplótipos *MICA*00801_B*44*, *MICA*00801_B*15* e *MICA*00901_B*35* ocorrem em frequências próximas às esperadas sob a hipótese de equilíbrio de ligação. Todos estes alelos são comuns na nossa amostra, portanto se a associação entre eles estivesse de alguma forma favorecida, um número mais elevado destes haplótipos teria sido detectado.

Em nossa amostra o alelo *B*1510*, mais freqüente em negros do que caucasianos (BARNARDO *et al.*, 1998), parece estar associado com *MICA*00802*. Este haplótipo já foi observado em populações de origem ou ancestralidade negróide (TIAN *et al.*, 2003 e GAO *et al.*, 2006). Por outro lado o alelo *B*1518*, que é mais comum em caucasóides, está associado com *MICA*019* em nossa amostra. Em tailandeses o alelo *MICA*019*, que tem uma freqüência elevada não vista em outras populações, está associado com vários alelos do grupo *B*15* (ROMPHRUK *et al.*, 2001). Outra associação verificada com *MICA*019* é de *B*1401*. O outro alelo do grupo *B*14* detectado em nossa amostra, *B*1402*, está em desequilíbrio de ligação absoluto com *MICA*011*.

O alelo *MICA*027*, assim como *MICA*010*, aparece em alta freqüência em japoneses, coreanos e ameríndios (OTA *et al.*, 1997; PYO *et al.*, 2003 e ZHANG *et al.*, 2002), tendo sido encontrado em baixa freqüência em nossa amostra. Não podemos afirmar se este alelo realmente caracteriza tais populações, pois muitos estudos não investigaram o microssatélite presente no exon 5 do gene *MICA*, o qual diferencia *MICA*027* de *MICA*00801*. Estes achados podem significar que estes alelos tenham sido trazidos para a América pelas populações fundadoras oriundas do leste asiático e que sua freqüência esteja sendo mantida em ameríndios. Estes alelos também foram detectados em células de indígenas brasileiros tipadas no 13º *Workshop* de histocompatibilidade (ALBERT *et al.*, 2004).

Em coreanos e em tribos indígenas da Argentina (Toba e Wichi) o haplótipo *MICA*027_B*4002* está dentre os mais freqüentes (PYO *et al.*, 2003 e ZHANG *et al.*, 2002). Em nossa amostra verificamos a presença desta associação em baixa freqüência. O haplótipo *MICA*010_B*52* foi somente encontrado na tribo Toba e também no presente trabalho, sendo um indivíduo homocigoto para ambos os locos.

O haplótipo *MICA*01201_B*55*, que ocorre em baixa frequência em nossa amostra, é mais comum em orientais (japoneses e coreanos) do que nas demais populações estudadas.

O alelo *MICA*00701* está associado com os dois alelos identificados do grupo *B*27* (*B*2702* e *B*2705*). Este haplótipo já foi observado em coreanos, ingleses e em norte-americanos caucasianos (PYO *et al.*, 2003; AHMAD *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2000 e GAO *et al.*, 2006). Em populações negróides ainda não foi descrito, o que já era esperado pelo fato de *B*27* ser mais comum em caucasianos (GONZALEZ-ROCES *et al.*, 1997 e MULLER, EHNINGER e GOLDMANN, 2003).

Os haplótipos *MICA*017_B*5701* e *MICA*015_B*45*, apesar de pouco frequentes na amostra deste estudo, confirmam os achados de Obuchi *et al.*, 2001, no qual ele identificou estes alelos de *MICA* relatando que ambos apresentavam a deleção de uma guanina na extremidade 3' do exon 4. Esta deleção resulta em uma mudança no quadro de leitura e conseqüente encurtamento da cauda citoplasmática. Neste mesmo trabalho Obuchi *et al.* (2001) verificaram o desequilíbrio de ligação com os grupos alélicos *B*45* e *B*57*.

O alelo *MICA*016* está em associação absoluta com o grupo *B*35*, mesma associação encontrada no estudo de Marin *et al.*, 2004 em uma amostra proveniente de São Paulo. Em nossa amostra pudemos identificar que cinco dos alelos deste haplótipo são *B*3502* e dois *B*3508*, este último encontrado mais em caucasóides.

Constatamos um forte desequilíbrio de ligação entre os alelos *MICA*01801* e *MICA*001* com o alelo *B*1801*. Apesar destes dois alelos de *MICA* terem sido observados em outras populações, a maioria dos trabalhos não apresentam os dados referentes aos seus haplótipos, pelo fato de ocorrerem em baixa frequência. Em dois trabalhos, um com amostra representativa de tailandeses e o outro de ingleses, foi verificado um forte desequilíbrio entre os alelos *MICA*01801* e *B*18* (ROMPHRUK *et al.*, 2001 e REES *et al.*, 2005). Como ambos os alelos se diferenciam apenas por uma substituição no códon 125, talvez *MICA*001* tenha se originado a partir de *MICA*01801*.

O alelo *MICA*006* não foi observado em praticamente nenhuma população estudada até o momento. Verificamos uma baixa ocorrência deste alelo em nossa amostra (apenas três indivíduos) ocorrendo em associação com *B*51*. O mesmo

achado foi relatado por outro estudo conduzido com amostra de brasileiros de São Paulo (MARIN *et al.*, 2004).

O alelo *MICA*021*, identificado em apenas um indivíduo em nossa amostra, só foi identificado em outros dois estudos até o presente, nos quais a frequência deste alelo também é baixa. Em euro e afro-americanos (GAO *et al.*, 2006) e em africanos (TIAN *et al.*, 2003). O banco de dados de seqüências do gene *MICA* disponível na página eletrônica www.ebi.ac.uk/imgt/hla (acesso em 07/12/2006) ainda não traz informações a respeito do número de repetições GCT presentes no exon 5 desse alelo. Através da nossa tipagem concluímos que se trata de 4 repetições, assim como relatado no estudo de Tian *et al* (2003). Os genótipos do indivíduo positivo para *MICA*021* sugerem que este esteja ocorrendo em haplótipo com *B*5601*.

O desequilíbrio de ligação entre alelos dos genes *MICA* e *HLA-B* pode refletir alguns aspectos da origem de certos alelos de *HLA-B*. Por exemplo, os alelos *B*35*, *B*53* e *B*58* compartilham um alto grau de identidade de seqüência e acredita-se terem um mesmo ancestral. A associação desses três alelos de *HLA-B* com um mesmo alelo de *MICA* (*MICA*00201*) reforça a hipótese de que tenham uma origem comum (GAO *et al.*, 2006).

A deleção de aproximadamente 100 Kb, incluindo o gene *MICA* e *MICB*, foi descrita em associação com *HLA-B48* (*B*4801*) em indivíduos japoneses (KOMATSU-WAKUI *et al.*, 1999). Em nosso estudo duas amostras apresentam o alelo *B*48* sendo que uma delas possui o seguinte genótipo: *MICA*00201/MICA*deletion* e *B*5801/B*48*, e a outra o mesmo genótipo para *MICA* e *B*35/B*4802*. Este achado sugere a associação de *B*48* com a deleção do gene *MICA* em nossa amostra. Esta associação já foi verificada ou sugerida em diversas populações asiáticas (KATSUYAMA *et al.*, 1999; OTA *et al.*, 2000; PYO *et al.*, 2003) e também aparece em alta frequência em uma comunidade ameríndia do Paraguai, onde além da já conhecida associação com *B*48* foi identificada uma nova associação com *B*15*, provavelmente resultante de recombinação (AIDA *et al.*, 2002).

A deleção dos genes *MICA* e *MICB* e sua associação com *B*48* parece ter sido conservada na região do leste asiático, tendo até mesmo sido considerada decorrente de seleção favorável para este haplótipo. Estudos já constataram a

presença da deleção em homozigose em indivíduos saudáveis. Portanto, a ausência do gene *MICA* parece não interferir no desempenho imunológico do indivíduo, nem ser essencial para a sobrevivência (KOMATSU-WAKUI *et al.*, 2001).

Os alelos *MICA*00801*, *MICA*00201*, *MICA*004* e *MICA*00901* são comuns em diversas populações e juntos somam mais de 60% da freqüência alélica em muitas delas (COLLINS, 2004). Algumas exceções têm sido observadas, como por exemplo, a alta freqüência de *MICA*027* em coreanos, japoneses e ameríndios (PYO *et al.*, 2003; OTA *et al.*, 1997 e ZHANG *et al.*, 2002) e de *MICA*019* e *MICA*052* em tailandeses da região nordeste (ROMPHRUK *et al.*, 2001). Outras diferenças marcantes são a freqüência mais elevada do alelo *MICA*010* e *MICA*027* em asiáticos e ameríndios, e do alelo *MICA*012* em coreanos e japoneses.

Provavelmente o número de alelos descritos aumente à medida que novas populações ou etnias forem estudadas, mas de qualquer forma espera-se que a distribuição alélica nas populações tenda a se manter semelhante à já observada até o momento.

O polimorfismo do gene *MICA* ao longo dos exons 2, 3 e 4 exibe uma grande quantidade de substituições não sinônimas, das quais muitas resultam em mudanças de aminoácidos não conservativas. Acredita-se que as diferenças nas seqüências dos alelos *MICA* possam influenciar a interação destas moléculas com o receptor NKG2D. Investigação a cerca do polimorfismo no códon 129 (exon 3) indicou que os alelos codificando para metionina nesta posição possuem uma capacidade consideravelmente maior de se ligar ao receptor NKG2D do que alelos que codificam para valina nesta mesma posição (STEINLE *et al.*, 2001).

No presente trabalho avaliou-se que 34,3% dos alelos da amostra possuem o códon ATG, que traduz para metionina, e 65,7% o códon GTG, que traduz para valina. A avaliação desta proporção em outros estudos poderá trazer algum indicativo da existência ou não de favorecimento para a prevalência de algum dos dois polimorfismos. Outra substituição que parece afetar a afinidade com o receptor NKG2D ocorre no códon 156 (exon 3), onde as diferenças na segunda base desta trinca resultam na tradução para histidina, leucina ou arginina (HOLMES *et al.*, 2002). A grande maioria dos alelos codifica para histidina nesta posição, incluindo aqueles que normalmente aparecem com freqüência mais elevada nas populações.

A elevada freqüência em diversas populações de uma molécula truncada, *MICA*008*, cuja inserção de uma guanina após o códon 294 resulta em um códon de parada na posição 304 é muito intrigante (ROBINSON *et al.*, 2001). Foi demonstrado em modelo *in vitro* que o transporte desta molécula para a superfície celular, assim como das moléculas *MICA*023* e *MICA*028*, que também apresentam a variante transmembrana *A5.1*, parece ocorrer de forma aberrante. A ancoragem incorreta desta molécula parece alterar a ligação com seu receptor NKG2D, e/ou a transdução de sinais intracelulares (SUEMIZU *et al.*, 2002). Inicialmente pensou-se na possibilidade desta proteína não ser ancorada na membrana e ser secretada, porém sabe-se que ela eventualmente alcança a superfície (BAHRAM, 2000). O que não se sabe ainda é se essa molécula pode ser secretada em diferentes quantidades em situações de estresse celular.

A ampla distribuição de *MICA*00801* e sua presença em diversos haplótipos podem indicar que este seja um alelo ancestral que após subseqüentes recombinações e mutações de ponto gerou a diversidade alélica atual (PETERSDORF *et al.*, 1999).

A alta freqüência do alelo *MICA*00801*, o fato deste transcrever para uma molécula truncada, e ainda exibir o códon 129 para valina (menor afinidade com o receptor), nos faz argumentar a respeito de quais funções esta molécula exerceu ou está exercendo. Talvez alguma função inibitória na forma de molécula solúvel, bloqueando o sítio ativo do receptor NKG2D. Pode-se considerar também que apesar da alta freqüência de *MICA*00801* a seleção esteja atuando a favor da geração e manutenção de alelos, cujos produtos ativam o receptor NKG2D, uma vez que a vigilância imunológica ficaria favorecida nestas condições. Desta forma a heterozigose de *MICA*00801* com outros alelos *MICA* promoveria a regulação da ativação e inibição da atividade citotóxica das células que expressam o receptor NKG2D.

A seqüência de aminoácidos das moléculas *MICA*015* e *MICA*017* também resulta em uma estrutura protéica completamente diferente das demais. Nestes casos a região transmembrana apresenta uma cadeia hidrofóbica longa e a terminação ocorre logo no início da cauda citoplasmática. Esta estrutura diferenciada deve ter alguma relevância na função imunológica do gene *MICA*. É interessante notar que apesar de nenhum destes alelos ter sido associado com alguma desordem

imunológica, o alelo *HLA-B*57*, em associação com *MICA*017*, foi frequentemente encontrado em indivíduos infectados por HIV-1 que demoram em manifestar a imunodeficiência (OBUCHI *et al.*, 2001).

Esses dados sugerem que variantes alélicas de *MICA* podem estar diretamente relacionadas com a ligação ao NKG2D, afetando significativamente os efeitos de ativação celular. Dessa forma o conhecimento da extensão do polimorfismo de seus alelos “refletido” tanto nos domínios extracelulares quanto na região transmembrana ou cauda citoplasmática da molécula, pode trazer conhecimentos complementares aos estudos funcionais, para que se consiga um melhor entendimento da relevância biológica desta molécula para o sistema imune.

As localizações das substituições ao longo da seqüência dos exons 2-4 do gene *MICA* levantam a questão de como o polimorfismo está relacionado com a função biológica e imune das moléculas MICA e quais forças seletivas poderiam atuar na geração da diversidade destas moléculas (PETERSDORF *et al.*, 1999).

Os principais mecanismos de geração de diversidade alélica nos genes do CPH são mutações de ponto, conversão gênica e recombinações não recíprocas. As conversões gênicas entre alelos de um mesmo loco parecem ocorrer em maior frequência que as recombinações intergênicas. Para *HLA-B*, diferentemente do observado para *HLA-A*, ocorre grande similaridade inter-específica (chimpanzés e humanos) no domínio $\alpha 1$, mas não nos demais domínios da molécula. Este fato reforça a hipótese de que a recombinação intraloco no exon 3 dos alelos de *HLA-B* serve como fonte de motivos polimórficos na geração de novos alelos, e a maior conservação no exon 2 pode estar relacionada com funções estruturais do domínio $\alpha 1$ (McADAM *et al.*, 1994).

Acredita-se que um dos mecanismos responsáveis pela manutenção do polimorfismo e diversidade dos genes HLA seja a seleção sobredominante, na qual o heterozigoto tem maior adaptabilidade que os homozigotos (HUGHES e NEI, 1989; TAKAHATA, SATTA e KLEIN, 1992 e MEYER e THOMSON, 2001). Este mesmo processo seletivo de favorecimento do heterozigoto, tem sido proposto como responsável pela manutenção da variação alélica e diversidade observada no loco MICA (ELSNER, SCHROEDER e BLASCZYK, 2001). Esta pressão seletiva atuando em genes *HLA* fica clara se considerarmos a função destas moléculas como

apresentadoras de antígenos, permitindo que um maior número de peptídeos antigênicos distintos seja reconhecido e assim apresentado às células T.

Até o momento nenhum estudo esclarece qual a relevância do polimorfismo observado para o gene *MICA* em relação à função do seu produto proteico. Elsner *et al* (2001) propõe que as moléculas MICA interajam com ligantes não peptídicos de forma não covalente através de uma fenda rasa formada entre os domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$. Esta hipótese é reforçada pelo fato das células $T\gamma\delta$, que expressam o receptor NKG2D, serem capazes de reconhecer antígenos não peptídicos. Neste mesmo trabalho Elsner *et al* sugere que a heterozigiosidade observada para o gene *MICA* seja decorrente de seleção sobredominante e que seja vantajosa para a interação com os ligantes não peptídicos.

Em nossa amostra a distribuição das freqüências alélicas de *MICA* está em conformidade com o esperado pela hipótese de neutralidade seletiva, onde as variações dentro de uma população são decorrentes de mutações neutras e deriva genética. Achados similares foram relatados por GAO *et al.*, 2006, que empregou o método de seqüenciamento na tipagem de *MICA*. Em nosso estudo a metodologia de tipagem empregada não permite a detecção de alelos novos que podem estar ocorrendo em baixa freqüência em nossa amostra. Entretanto, se alelos raros estiverem presentes em nossa amostra, a distribuição das freqüências alélicas apresentará um desvio ainda maior do esperado sob efeito de seleção balanceadora (alelos com freqüências intermediárias e similares), reforçando a hipótese de neutralidade.

Entretanto, mesmo para genes *HLA* nem sempre é possível demonstrar estatisticamente um desvio da neutralidade. Em muitas amostras populacionais a significância estatística depende do número de alelos considerado, em outras uma possível explicação para a aceitação da hipótese nula é que a deriva genética ou algum fator não seletivo estaria contrabalançando os efeitos da seleção balanceadora (RENQUIN *et al.*, 2001).

A taxa de substituições não sinônimas nos genes *HLA*, principalmente no sítio de ligação dos peptídeos antigênicos, supera a taxa de substituições sinônimas, o que é uma forte evidência da atuação de seleção balanceadora (TAKAHATA, SATTA e KLEIN, 1992 e MEYER E THOMSON, 2001). Achados similares foram relatados para o gene *MICA*, no qual foi constatado um excesso de substituições

não sinônimas no exon 3, as quais provavelmente resultam em um aumento da variabilidade funcionalmente relevante (ELSNER, SCHROEDER, e BLASCZYK, 2001).

O papel biológico das moléculas MICA ainda não nos permite compreender qual o significado do polimorfismo observado neste loco. Enquanto os genes *HLA* de classe I acumulam mais substituições nucleotídicas nos exons 2 e 3 (em sítios que transcrevem para resíduos envolvidos na ligação de peptídeos) os resíduos polimórficos de MICA estão posicionados na margem exterior do que seria uma fenda de ligação, distribuídos tanto em pontos que parecem interagir com o receptor quanto em sítios que parecem distantes desta interação (HOLMES et al., 2002).

A possibilidade de neutralidade seletiva ou de seleção balanceadora ainda deixa em aberto as razões que explicariam o polimorfismo do gene *MICA*. Seria este mantido por deriva genética e pela influência de ondas migratórias, ou existem alelos sendo favorecidos, enquanto outros apresentam o mesmo valor adaptativo?

O fato de a molécula MICA ser expressa na superfície de células endoteliais e reconhecida por anticorpos específicos sugere, que ela possa ser alvo no processo de rejeição, funcionando como um aloantígeno secundário. No contexto dos transplantes alguns estudos têm investigado a relevância do polimorfismo do gene *MICA* como aloantígenos de histocompatibilidade, os quais desencadeariam um processo de resposta imune ao aloenxerto.

A presença de anticorpos anti-MICA foi verificada no soro de pacientes transplantados renais, principalmente após episódios de rejeição aguda (ZWIRNER et al., 2000 e SUMITRAN-HOLGERSSON et al., 2002). Em outro trabalho foi verificado que as moléculas MICA são alvo para a citotoxicidade mediada por complemento, sugerindo um alto potencial imunogênico para esta molécula (ZOU et al., 2006b). Outros ensaios verificaram a presença de moléculas MICA e MICB em biópsias de enxertos renais diagnosticados com rejeição aguda ou com necrose tubular (HANKEY et al., 2002). A maior incidência de anticorpos anti-HLA e anti-MICA em pacientes que apresentaram rejeição crônica do aloenxerto se comparados com pacientes sem rejeição também sugere o envolvimento desta molécula na perda dos aloenxertos (MIZUTANI et al., 2005).

De forma semelhante, o polimorfismo de *MICA* poderia ser relevante no transplante de medula óssea, pois, apesar da forte presença de desequilíbrio de

ligação entre *MICA* e *HLA-B*, observamos que uma mesma especificidade *HLA-B* pode estar associada a diferentes moléculas *MICA*. Além disso, a tipagem *HLA* de classe I pré-transplante é realizada apenas em baixa resolução o que acentua a possibilidade de em transplantes entre indivíduos não aparentados diferentes alelos de um mesmo grupo *HLA-B* estarem sendo “utilizados” e conseqüentemente diferentes alelos de *MICA*. Um exemplo bem evidente em nossa amostra são os alelos *B*4402c* e *B*4403c*, ambos comuns, onde o primeiro aparece associado com *MICA*008* e o segundo com *MICA*004*.

A presença dessas moléculas no epitélio intestinal, um dos principais sítios acometidos na doença do enxerto *versus* hospedeiro, reforça a idéia de um possível envolvimento de *MICA* no desenvolvimento desta doença.

Ainda no contexto do transplante de células tronco hematopoéticas, foi demonstrado que células NK do doador podem exercer um efeito citotóxico anti-leucemia decorrente da disparidade entre moléculas *HLA* do receptor e receptores *KIR* do doador (GIEBEL *et al.*, 2003). Este mesmo efeito benéfico anti-células tumorais mediado por células NK já havia sido verificado em pacientes de leucemia mielóide crônica que receberam transplante *HLA* idêntico, mas neste caso o mecanismo de ativação das células NK não foi esclarecido (JIANG *et al.*, 1997).

Mais tarde foi proposto que a presença de moléculas *MICA* solúveis no soro de pacientes transplantados poderia bloquear o receptor *NKG2D* na superfície das células NK inibindo sua atividade citotóxica contra as células leucêmicas (SCONOCCHIA *et al.*, 2005).

Moléculas *MICA* expressas na superfície celular parecem ativar células NK e promover a atividade citotóxica das mesmas, por outro lado estas moléculas na forma solúvel podem bloquear a ativação do receptor *NKG2D* inibindo a citotoxicidade inerente das células NK. Esta última situação pode ser deletéria nos processos anti-tumorais ou até mesmo em situações de infecção viral. Mesmo as moléculas ancoradas na superfície celular exibem variabilidade em sua estrutura e/ou posicionamento na membrana, como comentado anteriormente, e desta forma provavelmente não interagem com a mesma intensidade com o receptor, ou seja, o polimorfismo funcional parece trazer conseqüências para o sistema de defesa imunológico do organismo.

É possível que um balanço entre a ativação e inibição das células NK através da interação de MICA-NKG2D seja importante na manutenção da homeostasia do organismo. Alterações na expressão das moléculas MICA solúveis e/ou de superfície celular talvez resultem em uma ativação ou inibição exacerbada das células NK levando à progressão de tumores e infecções ou até mesmo ao desenvolvimento de doenças auto-imunes.

8 CONCLUSÕES

- A definição alélica de genes com alto grau de polimorfismo como *MICA* e *HLA-B*, exige muitas vezes a aplicação de mais de um método de tipagem para a resolução das ambigüidades. A concordância entre os métodos SSOP e SSP empregados não foi absoluta, mas foi elevada (88,5%).
- Os alelos mais freqüentes na amostra de euro-brasileiros paranaenses são: *MICA*00801*, *MICA*00201*, *MICA*00901* e *MICA*004*, que juntos somam mais de 68% dos alelos da amostra.
- De modo geral as populações mundiais, assim como aquela representada neste estudo, exibem não mais do que 20 alelos *MICA*, dos quais poucos já representam mais de 50% dos alelos nas amostragens populacionais.
- Ambos os genes, *MICA* e *HLA-B*, estão em conformidade com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg e apresentam uma alta diversidade.
- Conforme esperado pelo efeito de seleção balanceadora sobre o gene *HLA-B*, este não está em conformidade com a hipótese de neutralidade seletiva. Por outro lado, os dados obtidos a partir da amostra investigada indicam que a distribuição alélica do gene *MICA* está de acordo com o esperado pelo modelo de alelos infinitos. É necessária a realização de outros estudos para confirmar este achado e entender a sua causa.
- Cerca de 50 haplótipos distintos foram inferidos neste estudo, muitos reforçando a idéia do forte desequilíbrio de ligação entre os genes *MICA* e *HLA-B*. Mais comumente ocorrem diferentes alelos de *HLA-B* com um mesmo alelo de *MICA*, do que a relação inversa.

O estudo populacional do gene *MICA* e seu desequilíbrio de ligação com o gene *HLA-B* fornece informações relevantes para a compreensão da sua diversidade e distribuição. Com a obtenção destes resultados esperamos que este trabalho seja informativo para outros estudos populacionais e também para grupos de pesquisa que objetivam investigar o significado funcional do polimorfismo do gene *MICA*.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. O Complexo Principal de Histocompatibilidade. In: _____. **Imunologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p.65-81.

AHMAD, T.; MARSHALL, S. E.; MULCAHY-HAWES, K.; ORCHARD, T.; CRAWSHAW, J.; ARMUZZI, A.; NEVILLE, M.; HEEL, D. van.; BARNARDO, M.; WELSH, K. I.; JEWELL, D. P.; BUNCE, M. High resolution MIC genotyping: Design and application to the investigation of inflammatory bowel disease susceptibility. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 60, p. 164-179, 2002.

AIDA, K.; RUSSOMANDO, G.; KIKUCHI, M.; CANDIA, N.; FRANCO, L.; ALMIRON, M.; UBALÉE, R.; HIRAYAMA, K. High frequency of MIC null haplotype (HLA-B48-MICA-del-MICB*0107 N) in the Angaité Amerindian community in Paraguay. **Immunogenetics**, New York, v. 54, p. 439-441, 2002.

ALBERT, E. *et al.* MICA Report. In: International Histocompatibility Workshop, 13th, 2004, local. **Immunobiology of the Human MHC. Proceedings of the 13th International Histocompatibility Workshop and Congress**. Seattle/WA: IHWG Press, 2004. p. JR352:1-11.

AMOS, D. B. Fundamental Antigens of HLA. **Human Immunology**, New York, v. 30, p. 236-246, 1991.

AMOS, D. B. The 1991 Nomenclature Report. **Human Immunology**, New York, v. 34, p. 1, 1992.

AMROUN, H.; DJOUDI, H.; BUSSON, M.; ALLAT, R.; EL SHERBINI, S. M. ; SLOMA, I. ; RAMASAWMY, R. ; BRUN, M.; DULPHY, N.; KRISHNAMOORTHY, R.; TOUBERT, A.; CHARRON, D.; ABBADI, M.C.; TAMOUZA, R. Early-Onset Ankylosing Spondylitis Is Associated With a Functional MICA Polymorphism. **Human Immunology**, New York, v. 66, p. 1057-1061, 2005.

ANTHONY NOLAN RESEARCH INSTITUTE, Disponível em: <<http://www.anthonynolan.org.uk/HIG/index.html>> (Acesso em 26/08/06).

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

BAHRAM, S.; MIZUKY, N.; INOKO, H.; SPIES, T. Nucleotide sequence of the human MHC class I MICA gene. **Immunogenetics**, New York, v. 44, n. 1, p. 80-81, 1996.

BAHRAM, S. MIC genes: from genetics to biology. **Advances in immunology**, New York, v. 76, p.1-60, 2000.

BAHRAM, S. "MIC genes: From genetics to biology". **Advances in Immunology**, New York, v. 76, p. 1-60, 2001.

BARAHMANI, N.; de ANDRADE, M. ; SLUSSER, J. P. ; ZHANG, Q. ; DUVIC, M. Major histocompatibility complex class I chain-related gene polymorphisms and extended haplotypes are associated with familial alopecia areata. *The Journal of investigative dermatology*, New York, v. 126, n. 1, p. 74-78, 2006.

BARNARDO, M. C. N. M.; WELSH, K. I.; VILCHES, C.; MAITLAND, K.; BUNCE, M. Allele-specific HLA-B*15 typing by PCR-SSP and its application to four distinct ethnic populations. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 51, p. 293-300, 1998.

BAUER, S.; GROH, V.; WU, J.; STEINLE, A.; PHILLIPS, J. H.; LANIER, L. L.; SPIES, T. Activation of NK Cells and T Cells by NKG2D, a Receptor for Stress-Inducible MICA. **Science**, Washington, n. v. 285, n. 5428, p. 727-729, 1999.

BELICH, M. P.; MADRIGAL, J. A.; HILDEBRAND, W. H.; ZEMMOUR, J.; WILLIAMS, R. C.; LUZ, R.; PETZL-ERLER, M. L.; PARHAM, P. Unusual *HLA-B* alleles in two tribes of Brazilian Indians. **Nature**, London, v. 357, n. 6376, p. 326-329, 1992.

BILBAO, J. R. ; MARTIN-PAGOLA, A. ; PEREZ DE NANCLARES, G. ; CALVO, B. ; VITORIA, J. C. ; VAZQUEZ, F. ; CASTANO, L. HLA-DRB1 AND MICA IN AUTOIMMUNE: COMMON ASSOCIATED ALLELES IN AUTOIMMUNE DISORDERS. **ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCE**, NEW YORK, v. 1005, p. 314-318, 2003.

BJORKMAN, P. J.; SAPER, M. A. ; SAMRAOUI, B. ; BENNETT, W. S. ; STROMINGER, J. L.; WILEY, D. C. Structure of the human class I histocompatibility antigen HLA-A2. **Nature**, London, v. 329, p. 506-512, 1987.

BJORKMAN, P.; PARHAM, P. STRUCTURE, FUNCTION AND DIVERSITY OF CLASS I MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX MOLECULES. **ANNUAL REVIEW OF BIOCHEMISTRY**, PALO ALTO, v. 59, p. 253-268, 1990.

CAO, K.; MOORMANN, A. M.; LYKE, K. E. ; MASABERG, C. ; SUMBA, O. P.; DOUMBO, O. K.; KOECH, D.; LANCASTER, A.; NELSON, M.; MEYER, D.; SINGLE,

R.; HARTZMAN, R. J.; PLOWE, C. V.; KAZURA, J.; MANN, D. L.; SZTEIN, M. B.; THOMSON, G.; FERNANDEZ-VINA, M.A.. Differentiation between African populations is evidenced by the diversity of alleles and haplotypes of HLA class I loci. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 63, p. 293-325, 2004.

CARRINGTON, M.; NELSON, G. W.; MARTIN, M. P.; KISSNER, T.; VLAHOV, D.; GOEDERT, J. J.; KASLOW, R.; BUCHBINDER, S.; HOOTS, K.; O'BRIEN, S. J. HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage. **Science**, Washington, v. 283, n. 5408, p. 1748-1752, 1999.

CAVALLI-SFORZA, L. L.; PIAZZA, A.; MENOZZI, P.; MOUNTAIN, J. Reconstruction of human evolution: bringing together genetic, archaeological, and linguistic data. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 85, n. 16, p. 6002-6006, 1988.

CHARRON, D. Immunogenetics today: HLA, MHC and much more. **Current Opinion in Immunology**, v. 17, p. 1-5, 2005.

COHEN, R.; METZGER, S.; NAHIR, M.; CHAJEK-SHAUL, T. ASSOCIATION OF THE MICA GENE AND HLA-B51 WITH BEHCET'S DISEASE IN ARABS AND NON-ASHKENAZI JEWS IN ISRAEL. **ANNALS OF RHEUMATIC DISEASE**, LONDON, v. 61, p. 157-160, 2002.

COLLINS, R. W.; STEPHENS, H. A.; CLARE, M. A.; VAUGHAN, R. W. HIGH RESOLUTION MOLECULAR PHOTOTYPING OF MICA AND MICB ALLELES USING SEQUENCE SPECIFIC PRIMERS. **HUMAN IMMUNOLOGY**, NEW YORK, v. 63, n. 9, p. 783-794, 2002.

COLLINS, R. W. Human MHC class I chain related (MIC) genes: their biological function and relevance to disease and transplantation. **European Journal of Immunogenetics**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 105-114, 2004.

DING, Y.; XIA, B.; LU, M.; ZHANG, Y.; LI, J.; YE, M.; LUO, H.; YU, J.; ZHANG, X.; TAN, J. MHC class I chain-related gene A-A5.1 allele is associated with ulcerative colitis in Chinese population. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 142, p. 193-198, 2005.

ELSNER, H. A.; SCHROEDER, M.; BLASCZYK, R. The nucleotide diversity of MICAS and MICB suggests the effect of overdominant selection. **Tissue Antigens**, Copelhagen, v. 58, p. 419-421, 2001.

EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE, Disponível em:
<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/> (Acesso em 05/12/06).

EXCOFFIER, L.; SLATKIN, M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 12, n. 5, p. 921-927, 1995.

EXCOFFIER, L. G. L.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 1, p. 47-50, 2005.

FERNANDEZ-VIÑA, M.; LAZARO, A. M.; SUN, Y.; MILLER, S.; FORERO, L.; STASTNY, P. Population diversity of B-locus alleles observed by high-resolution DNA typing. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 45, p. 153-168, 1995.

FODIL, N.; LALOUX, L.; WANNER, V.; PELLET, P.; HAUPTMANN, G.; MIZUKI, N.; INOKO, H.; SPIES, T.; THEODOROU, I.; BAHRAM, S. ALLELIC REPERTOIRE OF THE HUMAN MHC CLASS I MICA GENE. **IMMUNOGENETICS**, NEW YORK, v. 44, n. 5, p. 351-357, 1996.

FODIL, N.; PELLET, P.; LALOUX, L.; HAUPTMANN, G.; THEODOROU, I.; BAHRAM, S. MICA HAPLOTYPIC DIVERSITY. **IMMUNOGENETICS**, NEW YORK, v. 49, n. 6, p. 557-560, 1999.

FUKAMI-KOBAYASHI, K.; SHIINA, T.; ANZAI, T.; SANO, K.; YAMAZAKI, M.; INOKO, H.; TATENO, Y. GENOMIC EVOLUTION OF MHC CLASS I REGION IN PRIMATES. **PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA**, WASHINGTON, v. 102, n. 26, p. 9230-9234, 2005.

GAMBELUNGHE, G.; GHADERI, M.; COSENTINO, A.; FALORNI, A.; BRUNETTI, P.; SANJEEVI, C. B. ASSOCIATION OF MHC CLASS I CHAIN-RELATED (MICA) GENE POLYMORPHISM WITH TYPE I DIABETES. **DIABETOLOGIA**, BERLIN, v. 43, p. 507-514, 2000.

GAMBELUNGHE, G.; GERLI, R.; BOCCI, E. B.; DEL SINDACO, P.; GHADERI, M.; SANJEEVI, C. B.; BISTONI, O.; BINI, V.; FALORNI, A. Contribution of MHC class I chain-related A (MICA) gene polymorphism to genetic susceptibility for systemic lupus erythematosus. **Rheumatology**, Oxford, v. 44, n. 3, p. 287-292, 2005.

GAO, X.; NELSON, G. W.; KARACKI, P.; MARTIN, M. P.; PHAIR, J.; KASLOW, R.; GOEDERT, J. J.; BUCHBINDER, S.; HOOTS, K.; VLAHOV, D.; O'BRIEN, S. J.; CARRINGTON, M. Effect of a single amino acid change in MHC class I molecules on the rate of progression to AIDS. **The New England journal of medicine**, Boston, v. 344, n. 22, p. 1668-1675, 2001.

GAO, X.; SINGLE, R. M.; KARACKI, P.; MARTI, D.; O'BRIEN, S. J.; CARRINGTON, M. Diversity of MICA and Linkage Disequilibrium with HLA-B in Two North American Populations. **Human Immunology**, New York, v. 67, p. 152-158, 2006.

GEER, L.; TERASAKI, P. I.; GJERTSON, D. W. In: GJERTSON, B. W.; TERASAKI, P. I. HLA 1998. Lexena: American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 1998. p. 327-363.

GERAGHTY, D. E.; WEI, X. H.; ORR, H. T.; KOLLER, B. H. HUMAN LEUKOCYTE ANTIGEN F (HLA-F). AN EXPRESSED HLA GENE COMPOSED OF A CLASS I CODING SEQUENCE LINKED TO A NOVEL TRANSCRIBED REPETITIVE ELEMENT. **THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE**, NEW YORK, v. 171, n. 1, p. 1-18, 1990.

GIEBEL, S.; LOCATELLI, F.; LAMPARELLI, T.; VELARDI, A.; DAVIES, S.; FRUMENTO, G.; MACCARIO, R.; BONETTI, F.; WOJNAR, J.; MARTINETTI, M.; FRASSONI, F.; GIORGIANI, G.; BACIGALUPO, A.; HOLOWIECKI, J. Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. **Blood**, Washington, v. 102, p. 814-819, 2003.

GLAS, J.; MARTIN, K. ; BRUNNLER, G. ; KOPP, R. ; FOLWACZNY, C. ; WEISS, E. H. ; ALBERT, E. D. MICA, MICB AND C1_4_1 POLYMORPHISM IN CROHN'S DISEASE AND ULCERATIVE COLITIS. **TISSUE ANTIGENS**, COPENHAGEN, v. 56, p. 243-249, 2001.

GONZALEZ-ROCES, S.; ALVAREZ, M. V.; GONZÁLES, S.; DIEYE, A.; MAKNI, H.; WOODFIELD, D. G.; HOUSAN, L.; KONENKOV, V.; ABBADI, M. C.; GRUNNET, N.; COTO, E.; LÓPEZ-LARREA, C. HLA-B27 polymorphism and worldwide susceptibility to ankylosing spondylitis. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 49, p. 116-123, 1997.

GROH, V.; BAHRAM, S.; BAUER, S.; HERMAN, A.; BEAUCHAMP, M.; SPIES, T. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 22, p. 12445-12450, 1996.

GROH, V.; STEINLE, A.; BAUER, S.; SPIES, T. Recognition of Stress-Induced MHC Molecules by Intestinal Epithelial $\gamma\delta$ T Cells. **Science**, Washington, v. 279, n. 5357, p. 1737-1740, 1998.

GROH, V.; RHINEHART, R.; SECRIST, H.; BAUER, S.; GRABSTEIN, K. H.; SPIES, T. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived $\gamma\delta$ T cells of MICA and MICB. **Immunology**, Oxford, v. 96, n. 12, p. 6879-6884, 1999.

GROH, V.; RHINEHART, R.; RANDOLPH-HABECKER, J.; TOPP, M. S.; RIDDELL, S. R.; SPIES, T. Costimulation of CD8 $\alpha\beta$ T cells by NKG2D *via* engagement by MIC induced on virus-infected cells. **Nature Immunology**, New York, v. 2, n. 3, p. 255-260, 2001.

GROH, V.; WU, J.; YEE, C.; SPIES, T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. **Nature**, Londres, v. 419, p. 734-738, 2002.

GROH, V.; BRUHL, A.; EL-GABALAWY, H.; NELSON, J. L.; SPIES, T. STIMULATION OF T CELL AUTOREACTIVITY BY ANOMALOUS EXPRESSION OF NKG2D AND ITS MIC LIGANDS IN RHEUMATOID ARTHRITIS. **PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA**, WASHINGTON, v. 100, n. 16, p. 9452-9457, 2003.

GROH, V.; LI, Y. Q.; CIOCA, D.; HUNTER, N. N.; WANG, W.; RIDDELL, S. R.; YEE, C.; SPIES, T. EFFICIENT CROSS-PRIMING OF TUMOR ANTIGEN-SPECIFIC T CELLS BY DENDRITIC CELLS SENSITIZED WITH DIVERSE ANTI-MICA OPSONIZED TUMOR CELLS. **PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA**, WASHINGTON, v. 102, n. 18, p. 6461-6466, 2005.

GROOT, N. G. de; GARCIA, C. A.; VERSCHOOR, E. J.; DOXIADIS, G. G. M.; MARSH, S. G. E.; OTTING, N.; BONTROP, R. E. Reduced MIC Gene Repertoire Variation in West African as Compared to Humans. **Molecular Biology and Evolution**, New York, v. 22, n. 6, p. 1375-1385, 2005.

HANKEY, K. G.; DRACHENBERG, C. B.; PAPADIMITRIOU, J. C.; KLASSEN, D. K.; PHILOSOPHE, B.; BARLETT, S. T.; GROH, V.; SPIES, T.; MANN, D. L. MIC expression in renal and pancreatic allografts. **Transplantation**, Baltimore, v. 73, n. 2, p. 304-306, 2002.

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

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Principles of population genetics**. 3. ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 1997.

HILL, A. V.; ELVIN, J.; WILLIS, A. C.; AIDOO, M.; ALLSOPP, C. E.; GOTCH, F. M.; GAO, X. M.; TAKIGUCHI, M.; GREENWOOD, B. M.; TOWNSEND, A. R.; MICHAEL, A. J.; WHITTLE, H. C. Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria. **Nature**, London, v. 360, n. 6403, p. 434-439, 1992.

HOLMES, M. A.; LI, P.; PETERSDORF, E. W.; STRONG, R. K. Structural Studies of Allelic Diversity of the MHC Class I Homolog MIC-B, a Stress-Inducible Ligand for the Activating Immunoreceptor NKG2D. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 169, n. 3, p. 1395-1400, 2002.

HORTON, R.; WILMING, L.; RAND, V.; LOVERING, R. C.; BRUFORD, E. A.; KHODIYAR, V. K.; LUSH, M. J.; POVEY, S.; TALBOT, C. C. JR.; WRIGHT, M. W.; WAIN, H. M.; TROWSDALE, J.; ZIEGLER, A.; BECK, S. GENE MAP OF THE EXTENDED HUMAN MHC. **NATURE REVIEWS GENETICS**, LONDON, v. 5, p. 889-899, 2004.

HUGHES, A. L.; NEI, M. Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection. **Nature**, London, v. 335, p. 167-170, 1989.

HUGHES, E. H. ; COLLINS, R. W.; KONDEATIS, E.; WALLACE, G. R.; GRAHAM, E. M.; VAUGHAN, R. W.; STANFORD, M. R. Association of major histocompatibility complex class I chain-related molecule polymorphisms with Behcet's disease in Caucasian patients. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 66, p. 195-199, 2005.

Imunogenetics Information System. Disponível em <http://imgt.cines.fr> (acesso em 24/08/06).

ISHITANI, A.; GERAGHTY, D. E. Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 89, p. 3947-3951, 1992.

JIANG, Y. Z.; BARRETT, A. J.; GOLDMAN, J. M.; MAVROUDIS, D. Association of Natural Killer cell and immune recovery with a graft-versus-leukemia effect independent of graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation. **Annals of Hematology**, Berlim, v. 74, p. 1-6, 1997.

JOHN, S. W. N. M.; WEITZNER, G.; ROZEN, R.; SCRIVER, C. R. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocyte, **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 19, n. 2, p. 408, 1990.

KATSUYAMA, Y. ; OTA, M. ; ANDO, H. ; SAITO, S. ; MIZUKI, N. ; KERA, J. ; BAHRAM, S. ; NOSE, Y. ; INOKO, H. SEQUENCING BASED TYPING FOR GENETIC POLYMORPHISMS IN EXONS 2, 3 AND 4 OF THE MICA GENE. **TISSUE ANTIGENS**, COPENHAGEN, v. 54, N. 2, P. 178-184, 1999.

KAWABATA, Y. ; IKEGAMI, H. ; KAWAGUCHI, Y. ; FUJISAWA, T. ; HOTTA, M. ; UEDA, H. ; SHINTANI, M. ; NOJIMA, K. ; ONO, M. ; NISHINO, M. ; TANIGUCHI, H. ; NOSO, S. ; YAMADA, K. ; BABAYA, N. ; OGIHARA, T. AGE-RELATED ASSOCIATION OF MHC CLASS I CHAIN-RELATED GENE A (MICA) WITH TYPE 1 (INSULIN-DEPENDENT) DIABETES MELLITUS. **HUMAN IMMUNOLOGY**, NEW YORK, v. 61, n. 6, P. 624-629, 2000.

KIEPIELA, P.; LESLIE, A. J.; HONEYBORNE, I.; RAMDUTH, D.; THOBAKGALE, C.; CHETTY, S.; RATHNAVALU, P.; MOORE, C.; PFAFFEROTT, K. J.; HILTON, L.; ZIMBWA, P.; MOORE, S.; ALLEN, T.; BRANDER, C.; ADDO, M. M.; ALTFELD, M.; JAMES, I.; MALLAL, S.; BUNCE, M.; BARBER, L. D.; SZINGER, J.; DAY, C.; KLENERMAN, P.; MULLINS, J.; KORBER, B.; COOVADIA, H. M.; WALKER, B.; D.; GOULDER, P. J. Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA. **Nature**, London, v. 432, n. 7018, p. 769-774, 2004.

KISSMEYER-NIELSEN, F. ; OLSEN, S. ; PETERSEN, V. P. ; FJELDBORG, O. HYPERACUTE REJECTION OF KIDNEY ALLOGRAFTS, ASSOCIATED WITH PRE-EXISTING HUMORAL ANTIBODIES AGAINST DONOR CELLS. **LANCET**, LONDRES, v. 2, n. 7465 P. 662-665, 1966.

KOMATSU-WAKUI, M.; TOKUNAGA, K. ; ISHIKAWA, Y. ; KASHIWASE, K.; MORIYAMA, S.; TSUCHIYA, N.; ANDO, H.; SHIINA, T.; GERAGHTY, D. E.; INOKO, H.; JUJI, T. MIC-A POLYMORPHISM IN JAPANESE AND A MICA-MICB *NULL* HAPLOTYPE. **IMMUNOGENETICS**, NEW YORK, v. 49, n. 7-8, P. 620-628, 1999.

KOMATSU-WAKUI, M. ; TOKUNAGA, K. ; ISHIKAWA, Y. ; LEELAYUWAT, C. ; KASHIWASE, K. ; TANAKA, H. ; MORIYAMA, S. ; NAKAJIMA, F. ; PARK, M. H. ; JIA, G. J. ; CHIMGE, N. O. ; SIDELTSEVA, E. W. ; JUJI, T. WIDE DISTRIBUTION OF THE MICA-MICB *NULL* HAPLOTYPE IN EAST ASIANS. **TISSUE ANTIGENS**, COPENHAGEN, v. 57, n. 1, P. 1-8, 2001.

KRANGEL, M. S. SECRETION OF HLA-A AND -B ANTIGENS VIA AN ALTERNATIVE RNA SPLICING PATHWAY. **THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE**, NEW YORK, v. 163, P. 1173-1190, 1986.

LAHIRI, D. K. ; NURNBERGER, J. I. A RAPID NON-ENZYMATIC METHOD FOR THE PREPARATION OF DNA FROM BLOOD FOR RFLP STUDIES. **NUCLEIC ACIDS RESEARCH**, OXFORD, v. 19, n. 19, P.5444, 1991.

LEE, Y. J. ; HUANG, F. Y. ; WANG, C. H. ; LO, F. S. ; TSAN, K. W. ; HSU, C. H. ; HUANG, C. Y. ; CHANG, S. C. ; CHANG, J. G. POLYMORPHISM IN THE TRANSMEMBRANE REGION OF THE MICA GENE AND TYPE 1 DIABETES. **JOURNAL OF PEDIATRIC ENDOCRINOLOGY & METABOLISM**, LONDON, v. 13, n. 5, P. 489-496, 2000.

LEELAYUWAT, C.; TOWNEND, D. C.; DEGLI-ESPOSTI, M. A.; ABRAHAM, L. J.; DAWKINS, R. L. A new polymorphic and multicopy MHC gene family related to nonmammalian class I. **Immunogenetics**, New York, v. 40, n. 5, p. 339-351, 1994.

LEELAYUWAT, C.; HOLLINGSWORTH, P.; PUMMER, S.; LERTMEMONGKOLCHAI, G.; THOM, G.; MULLBERG, J.; WITT, C.; KAUFMAN, J.; DEGLI-ESPOSTI, M. A.; CASMAN, D.; DAWKINS, R. Antibody reactivity profiles following immunization with diverse peptides of the PERB11 (MIC) family. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 106, p. 568-576, 1996.

LEWONTIN, R. C. The interaction of selection and linkage. I. General considerations; heterotic models. **Genetics**, Baltimore, v. 49, p.49-67, 1964.

LI, P.; WILLIE, S. T.; BAUER, S.; MORRIS, D. L.; SPIES, T.; STRONG, R. K. Crystal Structure of the MHC Class I Homolog MIC-A, a $\gamma\delta$ T Cell Ligand. **Immunity**, Cambridge, v. 10, p. 577-584, 1999.

LI, P.; MORRIS, D. L.; WILLCOX, B. E.; STEINLE, A.; SPIES, T.; STRONG, R. K. Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. **Nature Immunology**, New York, v. 2, n. 5, p. 443-451, 2001.

LI, S.; KAWATA, H.; KATSUYAMA, Y.; OTA, M.; MORISHIMA, Y.; MANO, S.; KULSKI, J. K.; NARUSE, T.; INOKO, H. ASSOCIATION OF POLYMORPHIC MHC MICROSATELLITES WITH GVHD, SURVIVAL, AND LEUKEMIA RELAPSE IN UNRELATED HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANT DONOR/RECIPIENT PAIRS MATCHED AT FIVE HLA LOCI. **TISSUE ANTIGENS**, KOPENHAGEN, v. 63, p. 362-368, 2004.

LOPEZ-VAZQUEZ, A.; FUENTES, D.; RODRIGO, L.; GONZALES, S.; MORENO, M.; FERNANDEZ, E.; MARTINEZ-BORRA, J.; LOPEZ-LARREA, C. MHC CLASS I REGION PLAYS A ROLE IN THE DEVELOPMENT OF DIVERSE CLINICAL FORMS OF CELIAC DISEASE IN A SAHARAWI POPULATION. **AMERICAN JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY**, NEW YORK, v. 99, n. 4, p. 662-667, 2004.

MAGOR, K. E.; TAYLOR, E. J.; SHEN, S. Y.; MARTINEZ-NAVES, E.; VALIENTE, N. M.; WELLS, R. S.; GUMPERZ, J. E.; ADAMS, E. J.; LITTLE, A. M.; WILLIAMS, F.; MIDDLETON, D.; GAO, X.; McCLUSKEY, J.; PARHAM, P.; LIENERT-WEIDENBACH, K. Natural inactivation of a common HLA allele (A*2402) has occurred on at least three separate occasions. **Journal of Immunology**. v.158, n. 11, p. 5242-50, 1997.

MARIN, M. L. C.; SAVIOLI, C. R.; YAMAMOTO, J. H.; KALIL, J.; GOLDBERG, A. C. MICA polymorphism in a sample of the São Paulo population, Brazil. **European Journal of Immunogenetics**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 63-71, 2004.

MARSH, S. G. E.; PARHAM, P.; BARBER, L. D. HLA Class I Antigens and Alleles: Workshops and Nomenclature. In: _____. **The HLA Facts Book**. London: Academic Press, 2000. p. 14-25.

MARSH, S. G.; BODMER, J. G.; ALBERT, E. D.; BODMER, W. F.; BONTROP, R. E.; DUPONT, B.; ERLICH, H. A.; HANSEN, J. A.; MACH, B.; MAYR, W. R.; PARHAM, P.; PETERSDORF, E. W.; SASAZUKI, T.; SCHREUDER, G. M.; STROMINGER, J. L.; SVEJGAARD, A.; TERASAKI, P. I. Nomenclature for factors of the HLA System, 2000. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 57, n. 3, p. 236-283, 2001.

MARTIN-PAGOLA, A. PEREZ-NANCLARES, G.; ORTIZ, L.; VITORIA, J. C.; HUALDE, I.; ZABALLA, R.; PRECIADO, E.; CASTANO, L.; BILBAO, J. R. MICA RESPONSE TO GLIADIN IN INTESTINAL MUCOSA FROM CELIAC PATIENTS. **IMMUNOGENETICS**, NEW YORK, v. 56, n. 8, p. 549-554, 2004.

MASON, P. M.; PARHAM, P. HLA class I region sequences. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 51, p. 417-466, 1998.

McADAM, S. N.; BOYSON, J. E.; LIU, X.; GARBER, T. L.; HUGHES, A. L.; BONTROP, R. E.; WATKINS, D. I. A uniquely high level of recombination at the HLA-B locus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, n. 13, p. 5893-5897, 1994.

MENDOZA-RINCON, J.; ARGUELLO, J. R.; PEREZ-RODRIGUES, M.; McWHINNIE, A.; MARSH, S. G.; FISCHER, G.; MADRIGAL, J. A. CHARACTERIZATION OF THE MICA POLYMORPHISM BY SEQUENCE-SPECIFIC OLIGONUCLEOTIDE PROBING. **IMMUNOGENETICS**, NEW YORK, v. 49, n. 6, p. 471-478, 1999.

MEYER, D.; THOMSON, G. How selection shapes variation of the human major histocompatibility complex: a review. **Annals of human genetics**, London, v. 65, p. 1-26, 2001.

MILLER, M. P. RXZ – A program for the analysis of contingency tables via the metropolis algorithm. Disponível em <http://www.marksgeneticsoftware.net/rxc.htm> (Acesso em 05/12/2006).

MIZUKI, N.; ANDO, H.; KIMURA, M.; OHNO, S.; MIYATA, S.; YAMAZAKI, M.; TASHIRO, H.; WATANABE, K.; ONO, A.; TAGUCHI, S.; SUGAWARA, C.; FUKUZUMI, Y.; OKUMURA, K.; GOTO, K.; ISHIHARA, M.; NAKAMURA, S.; YONEMOTO, J.; KIKUTI, Y. Y.; SHIINA, T.; CHEN, L.; ANDO, A.; IKEMURA, T.; INOKO, H. Nucleotide sequence analysis of the HLA class I region spanning the 237 kb segment around the HLA-B and -C genes. **Genomics**, San Diego, v. 42, n. p. 55-66, 1997a.

MIZUKI, N.; OTA, M.; KIMURA, M.; OHNO, S.; ANDO, H.; KATSUYAMA, Y.; YAMAZAKI, M.; WATANABE, K.; GOTO, K.; NAKAMURA, S.; BAHRAM, S.; INOKO, H. TRIPLET REPEAT POLYMORPHISM IN THE TRANSMEMBRANE REGION OF THE MICA GENE: A STRONG ASSOCIATION OF SIX GCT REPETITIONS WITH BEHCET DISEASE. **PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA**, WASHINGTON, v. 94, n. 4, p. 1298-1303, 1997b.

MIZUKI, N.; OTA, M.; YABUKI, K.; KATSUYAMA, Y.; ANDO, H.; PALIMERIS, G. D.; KAKLAMANI, E.; ACCORINTI, M.; PIVETTI-PEZZI, P.; OHNO, S.; INOKO, H. LOCALIZATION OF THE PATHOGENIC GENE OF BEHCET'S DISEASE BY MICROSATELLITE ANALYSIS OF THREE DIFFERENT POPULATIONS. **INVESTIGATIVE OPHTHALMOLOGY & VISUAL SCIENCE**, ST. LOUIS, v. 41, n. 12, p. 3702-3708, 2000.

MIZUTANI, K.; TERASAKI, P.; ROSEN, A.; ESQUENAZI, V.; MILLER, J.; SHIH, R. N.; PEI, R.; OZAWA, M.; LEE, J. Serial Ten-Year Follow-Up of HLA and MICA Antibody Production Prior to Kidney Graft Failure. **American Journal of Transplantation**, Copenhagen, v. 5, p. 2265-2272, 2005.

MIZUTANI, K.; TERASAKI, P. I.; SHIH, R. N.; PEI, R.; OZAWA, M.; LEE, J. Frequency of MIC Antibody in Rejected Renal Transplant Patients without HLA Antibody. **Human Immunology**, New York, v. 67, p. 223-229, 2006.

MOLINERO, L. L.; MARCOS, C. Y.; MIRBAHA, F.; FAINBOIM, L.; STASTNY, P.; ZWIRNER, N. W. Codominant expresión of the polymorphic MICA alloantigens encoded by genes in the HLA region. **European Journal of Immunogenetics**, Oxford, v. 29, p. 315-319, 2002.

MOLINERO, L. L.; DOMAICA, C. I.; FUERTES, M. B.; GIRART, M. V.; ROSSI, L. E.; ZWIRNER, N. W. Intracellular Expresión of MICA in Activated CD4 T Lymphocytes and Protection from NK Cell-Mediated MICA-Dependent Cytotoxicity. **Human Immunology**, New York, v. 67, p. 170-182, 2006.

MULLER, C. R.; EHNINGER, G.; GOLDMANN, S. F. Gene and Haplotype Frequencies for the Loci HLA-A, HLA-B, and HLA-DR Based on Over 13,000 German Blood Donors. **Human Immunology**, New York, v. 64, p. 137-151, 2003.

NCBI – PubMed. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez> (acesso em 08.12.06)

NIKITINA-ZAKE, L. ; GHADERI, M.; PARK, Y.; BABU, S.; EISENBARTH, G.; SANJEEVI C. B. MICA GENE POLYMORPHISM IN HDBI MULTIPLEX FAMILIES. **ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCE**, NEW YORK, v. 1037, p. 150-156, 2004.

NISHIYAMA, M.; TAKAHASHI, M.; MANAKA, K. C.; ROOSIHERMIATIE, B.; KURIYAMA, T.; NAKAE, K. RESEARCH REPORT: FREQUENCIES OF MICA GENE POLYMORPHISM: A COMPARISON BETWEEN INDONESIANS ON BACAN ISLAND AND SUBURBAN JAPANESE. **THE SOUTHEAST ASIAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND PUBLIC HEALTH**, BANGKOK, v. 35, n. 1, p. 195-201, 2004.

NOVOTA, P.; KOLESAR, L.; SLAVCEV, A.; CERNA, M. FLUORESCENCE-BASED AUTOMATED FRAGMENT ANALYSIS OF MICROSATELLITE POLYMORPHISM WITHIN THE TRANSMEMBRANE REGION OF THE MIC-A GENE. **FOLIA BIOLOGICA**, KRAKOW v. 50, p. 21-23, 2004.

OBUCHI, N.; TAKAHASHI, M. ; NOUCHI, T. ; SATOH, M. ; ARIMURA, T. ; UEDA, K. ; AKAI, J.; OTA, M.; NARUSE, T.; INOKO, H.; NUMANO, F.; KIMURA, A. Identification of MICA alleles with a long Leu-repeat in the transmembrane region and no cytoplasmic tail due to a frameshift-deletion in exon 4. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 57, n. 6, p. 520-35, 2001

.

One Lambda Incorporation. Disponível em: <http://www.onelambda.com> (acesso em 11.08.05)

OPPENHEIM, D. E.; ROBERTS, S. J.; CLARKE, S. L.; FILLER, R.; LEWIS, J. M.; TIGELAAR, R. E.; GIRARDI, M.; HAYDAY, A. C. SUSTAINED LOCALIZED EXPRESSION OF LIGAND FOR THE ACTIVATING NKG2D RECEPTOR IMPAIRS NATURAL CYTOTOXICITY IN VIVO AND REDUCES TUMOR IMMUNOSURVEILLANCE. **NATURE IMMUNOLOGY**, NEW YORK, v. 6, n. 9, p. 928-937, 2005.

OTA, M.; KATSUYAMA, Y.; MIZUKI, N.; ANDO, H.; FURIHATA, K.; ONO, S.; PIVETTI-PEZZI, P.; TABBARA, K. F.; PALIMERIS, G. D.; NIKBIN, B.; DAVATCHI, F.; CHAMS, H.; GENG, Z.; BAHRAM, S.; INOKO, H. Trinucleotide repeat polymorphism within exon 5 of the MICA gene (MHC class I chain-related gene A): allele frequency data in the nine population groups Japanese, Northern Han, Hui Uygur, Kazakhstan, Iranian, Saudi Arabian, Greek and Italian. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 49, p. 448-454, 1997.

OTA, M.; BAHRAM, S.; KATSUYAMA, Y.; SAITO, S.; NOSE, Y.; SADA, M.; ANDO, H.; INOKO, H. ON THE MICA DELETED-MICB NULL, HLA-B*4801 HAPLOTYPE. **TISSUE ANTIGENS**, COPENHAGEN, v. 56, n. 3, p. 268-271, 2000.

PARHAM, P.; ARNETT, K. L.; ADAMS, E. J.; LITTLE, A. M.; TEES, K.; BARBER, L. D.; MARSH, S. G. E.; OHTA, T.; MARKOW, T.; PETZL-ERLER, M. L. Episodic evolution and turnover of HLA-B in the indigenous human populations of the Americas. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 50, p. 219-232, 1997.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, M.; ARGUELLO, J. R.; FISCHER, G.; CORELL, A.; COX, S. T.; ROBINSON, J.; HOSSAIN, E.; McWHINNIE, A. ; TRAVERS, P. J. ; MARSH, S. G. ; MADRIGAL, J. A. FURTHER POLYMORPHISM OF THE MICA GENE. **EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOGENETICS**, OXFORD, v. 29, n. 1, p. 35-46, 2002.

PETERSDORF, E. W.; SHULER, K. B.; LONGTON, G. M.; SPIES, T.; HANSEN, J. A. Population study of allelic diversity in the human MHC class I-related MIC-A gene. **Immunogenetics**, New York, v. 49, p. 605-612, 1999.

PETZL-ERLER, M. L.; LUZ, R.; SOTOMAIOR, V. S. The HLA polymorphism of two distinctive South-American Indian tribes: the Kaingang and the Guarani. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 41, p. 227-237, 1993.

PIANCATELLI, D.; DEL BEATO, T.; OUMHANI, K.; EL AOUAD, R.; ADORNO, D. MICA POLYMORPHISM IN A POPULATION FROM NORTH MOROCCO, METALSA BERBERS, USING SEQUENCE-BASED TYPING. **HUMAN IMMUNOLOGY**, NEW YORK, v.66, p. 931-936, 2005.

PICCO, P.; PORFIRIO, B.; GATTORNO, M.; BUONCOMPAGNI, A.; FALCINI, F.; CUSANO, R.; BORDO, D.; PISTOIA, V.; RAVAZZOLO, R.; SERI, M. MICA GENE POLYMORPHISM IN AN ITALIAN PEDIATRIC SERIES OF JUVENILE BEHCET DISEASE. **INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE**, ATHENS, v. 10, n. 5, p. 575-578, 2002.

POSTGRESQL, Global Development Group. Disponível em <<http://www.postgresql.org/>> (Acesso em 19/09/05).

PROBST, C. M.; BOMPEIXE, E. P.; PEREIRA, N. F.; DALALIO, M. M. de O.; VISENTAINER, J. E. L., TSUNETO, L. T.; PETZL-ERLER, M. L. HLA Polymorphism and Evaluation of European, African, and Amerindian Contribution to the White and Mulatto Populations from Paraná, Brazil. **Human Biology**, Detroit, v. 72, n. 4, p. 597-617, 2000.

PYO, C. W.; HUR, S. S.; KIM, Y. K.; CHOI, H. B.; KIM, T. Y.; KIM, T. G. Distribution of MICA Alleles and Haplotypes Associated With HLA in the Korean Population. **Human Immunology**, New York, v. 64, n. 3, p. 378-384, 2003.

QUIROGA, I.; SWEENEY, D.; SUTTON, P. M.; CHAPPLE, S. D.; SOUTO-GRANDO, J. P.; BARNARDO, M. C.; FUGGLE, S. V. Identification of a novel MICA allele: MICA*051. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 63, n. 5, p. 466-9, 2004.

QUIROGA, I.; SWEENEY, D.; SUTTON, P. M.; AHMAD, T.; WALTON, R.; BARNARDO, M. C.; FUGGLE, S. V. Identification of three novel MICA alleles by sequence-based typing. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 67, p. 321-325, 2006.

REES, M.T.; DOWNING, J.; DARKE, C. A Typing System for the Major Histocompatibility Complex Class I Chain Related Genes A and B Using Polymerase Chain Reaction with Sequence-Specific Primers. **Genetic Testing**, v. 9, n. 2, p. 93-110, 2005.

RENQUIN, J.; SANCHEZ-MAZAS, A.; HALLE, L.; RIVALLAND, S.; JAEGER, G.; MBAYO, K.; BIANCHI, F.; KAPLAN, C. HLA class II polymorphism in Aka Pygmies and Bantu Congolese and a reassessment HLA-DRB1 African diversity. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 58, p. 211-222, 2001.

ROBINSON, J.; PEREZ-RODRIGUEZ, M.; WALLER, M. J.; CUILLERIER, B.; BAHRAM, S.; YAO, Z.; ALBERT, E. D.; MADRIGAL, J. A.; MARSH, S. G. MICA SEQUENCES 2000. **IMMUNOGENETICS**, NEW YORK, v. 53, n. 2, p. 150-169, 2001.

ROBINSON, J.; WALLER, M. J.; PARHAM, P.; de GROOT, N.; BONTROP, R.; KENNEDY, L. J.; STOEHR, P.; MARSH, S. G. IMGT/HLA and IMGT/MHC: Sequence databases for the study of the Major Histocompatibility Complex. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 31, n. 1, p. 311-314, 2003.

ROMPHRUK, A. V.; NARUSE, T. K.; ROMPHRUK, A.; KAWATA, H.; PUAPAIROJ, C.; KULSKI, J. K.; LEELAYUWAT, C.; INOKO, H. DIVERSITY OF MICA (PERB11.1) AND HLA HAPLOTYPES IN NORTHEASTERN THAIS. **TISSUE ANTIGENS**, COPENHAGEN, v. 58, n. 2, p. 83-89, 2001.

ROMPHRUK, A. V.; ROMPHRUK, A.; CHOONHAKARN, C.; PAUPAIROJ, C.; INOKO, H.; LEELAYUWAT, C. MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX CLASS I CHAIN-RELATED GENE A IN THAI PSORIASIS PATIENTS: MICA ASSOCIATION AS A PART OF HUMAN LEUKOCYTE ANTIGEN-B-CW HAPLOTYPES. **TISSUE ANTIGENS**, KOPENHAGEN, v. 63, n. 6, p. 547-554, 2004.

RUEDA, B.; PASCUAL, M.; LOPEZ-NEVOT, M. A.; GONZALEZ, E.; MARTIN, J. A new allele within the transmembrane region of the human MICA gene with seven GCT repeats. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 60, n. 6, p. 526-8, 2002.

RUEDA, B.; PASCUAL, M.; LOPEZ-NEVOT, M. A.; KOELEMAN, B. P.; ORTEGA, E.; MALDONADO, J.; LOPEZ, M.; MARTIN, J. ASSOCIATION OF MICA-A5.1 ALLELE WITH SUSCEPTIBILITY TO CELIAC DISEASE IN A FAMILY STUDY. **AMERICAN JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY**, NEW YORK, v. 98, n. 2, p. 359-362, 2003.

RUIZ, T. M.; da COSTA, S. M.; RIBAS, F.; LUZ, P. R.; LIMA, S. S.; da GRAÇA BICALHO, M. Human leukocyte antigen allelic groups and haplotypes in a brazilian sample of volunteer donors for bone marrow transplant in Curitiba, Parana, Brazil. **Transplantation proceedings**, New York, v. 37, n. 5, p. 2293-2296, 2005.

SALVARANI, C.; BOIARDI, L.; MANTOVANI, V.; OLIVIERI, I.; CIANCIO, G.; CANTINI, F.; SALVI, F.; MALATESTA, R.; MOLINOTTI, C.; GOVONI, M.; TROTTA, F.; FILIPPINI, D.; PAOLAZZI, G.; VIGGIANI, M. ASSOCIATION OF MICA ALLELES AND HLA-B51 IN ITALIAN PATIENTS WITH BEHCET'S DISEASE. **THE JOURNAL OF RHEUMATOLOGY**, TORONTO, v. 28, n. 8, p. 1867-1870, 2001.

SCONOCCHIA, G.; LAU, M.; PROVENZANO, M.; REZVANI, K.; WONGSENA, W.; FUJIWARA, H.; HENSEL, N.; MELENHORST, J.; LI, J.; FERRONE, S.; BARRETT, A. J. The antileukemia effect of HLA-matched NK and NK-T cells in chronic myelogenous leukemia involves NKG2D-target-cell interactions. **Blood**, Washington, v. 106, n. 10, p. 3666-3672, 2005.

SEO, J. W.; WALTER, L.; GÜNTHER, E. GENOMIC ANALYSIS OF MIC GENES IN RHESUS MACAQUES. **TISSUE ANTIGENS**, COPENHAGEN, v. 58, p. 159-165, 2001.

SHAO, W.; LOBASHEVSKY, E. S.; KASLOW, R. A.; DORAK, M. T. MICA INTRON 1 SEQUENCES OF CONSERVED EXTENDED HLA HAPLOTYPES: IMPLICATIONS FOR SEQUENCING-BASED TYPING. **GENES AND IMMUNITY**, HOUNDMILLS, v. 5, p. 371-374, 2004.

SKOV, S.; PEDERSEN, M. T.; ANDRESEN, L.; STRATEN, P. T.; WOETMANN, A.; ODUM, N. CANCER CELLS BECOME SUSCEPTIBLE TO NATURAL KILLER CELL KILLING AFTER EXPOSURE TO HISTONE DEACETYLASE INHIBITORS DUE TO GLYCOGEN SYNTHASE KINASE-3-DEPENDENT EXPRESSION OF MHC CLASS I-RELATED CHAIN A AND B. **CANCER RESEARCH**, CHICAGO, v. 65, n. 23, p. 11136-11145, 2005.

STEINLE, A.; LI, P.; MORRIS, D. L.; GROH, V.; LANIER, L. L.; STRONG, R. K.; SPIES, T. INTERACTIONS OF HUMAN NKG2D WITH ITS LIGANDS MICA, MICB, AND

HOMOLOGS OF THE MOUSE RAE-1 PROTEIN FAMILY. **IMMUNOGENETICS**, NEW YORK, v. 53, N. 4, P. 279-287, 2001.

STEPHENS, H. A. F. MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved? **TRENDS in Immunology**, Oxford, v. 22, n. 7, p. 378-385, 2001.

STEWART, C. A.; HORTON, R.; ALLCOCK, R. J.; ASHURST, J. L.; ATRAZHEV, A. M.; COGGILL, P.; DUNHAM, I.; FORBES, S.; HALLS, K.; HOWSON, J. M.; HUMPHRAY, S. J.; HUNT, S.; MUNGALL, A. J.; OSOEGAWA, K.; PALMER, S.; ROBERTS, A. N.; SIMS, S.; WANG, Y.; WILMING, L. G.; ELLIOTT, J. F.; de JONG, P. J.; SAWCER, S.; TODD, J. A.; TROWSDALE, J.; BECK, S. Complete MHC haplotype sequencing for common disease gene mapping. **Genome Research**, New York, v. 14, p. 1176-1187, 2004.

STEWART, F. M. Computer algorithm for obtaining a random set of allele frequencies for a locus in an equilibrium population. **Genetics**, Baltimore, v. 86, p. 482-483, 1977.

SUEMIZU, H.; RADOSAVLJEVIC, M.; KIMURA, M.; SADAHIRO, S.; YOSHIMURA, S.; BAHRAM, S.; INOKO, H. A basolateral sorting motif in the MICA cytoplasmic tail. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 99, n. 5, p. 2971-2976, 2002.

SUGIMURA, K.; OTA, M.; MATSUZAWA, J.; KATSUYAMA, Y.; ISHIZUKA, K.; MOCHIZUKI, T.; MIZUKI, N.; SEKI, S. S.; HONMA, T.; INOKO, H.; ASAKURA, H. A close relationship of triplet repeat polymorphism in MHC class I chain-related gene A (MICA) to the disease susceptibility and behavior in ulcerative colitis. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 57, p. 9-14, 2001.

SUMITRAN-HOLGERSSON, S.; WILCZEK, H. E.; HOLGERSSON, J.; SODERSTROM, K. Identification of the nonclassical HLA molecules, mica, as targets for humoral immunity associated with irreversible rejection of kidney allografts. **Transplantation**, Baltimore, v. 74, n. 2, p. 268-277, 2002.

TAY, G. K.; HUI, J. ; GAUDIERI, S. ; SCHMITT-EGENOLF, M. ; MARTINEZ, O. P. ; LEELAYUWAT, C.; WILLIAMSON, J. F.; EIERMANN, T. H.; DAWKINS, R. L. PERB11 (MIC): A POLYMORPHIC MHC GENE IS EXPRESSED IN SKIN AND SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM ARE ASSOCIATED WITH PSORIASIS. **CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY**, OXFORD, v. 119, N. 3, P. 553-558, 2000.

TERASAKI, P.I. ; BERNOCO, D.; PARK, M. S.; OZTURK, G.; IWAKI, Y. Microdroplet testing for HLA-A, -B, -C and -D antigens. **American Journal of Clinical Pathology**, Chicago, v. 69, n. 2, p. 103-120, 1978.

TERASAKI, P.I. Histocompatibility Testing, 1980. **UCLA Tissue Typing Laboratory**, Los Angeles, California.

The MHC sequencing consortium. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. **Nature**, London, v. 401, p. 921-923, 1999.

The New England Journal of Medicine. Disponível em:
http://content.nejm.org/search_figures.dtl (Acesso em 12.07.05).

TIAN, W.; BOGGS, D. A.; UKO, G.; ESSIET, A.; INYAMA, M.; BANJOKO, B.; ADEWOLE, T.; DING, W. Z.; MOHSENI, M.; FRITZ, R.; CHEN, D. F.; PALMER, L. J.; FRASER, P. A. MICA, HLA-B HAPLOTYPIC VARIATION IN FIVE POPULATION GROUPS OF SUB-SAHARAN AFRICAN ANCESTRY. **GENES AND IMMUNITY**, HOUNDMILLS, v. 4, n. 7, p. 500-505, 2003.

TSUCHIYA, N.; SHIOTA, M.; MORIYAMA, S.; OGAWA, A.; KOMATSU-WAKUI, M.; MITSUI, H.; GERAGHTY, D. E.; TOKUNAGA, K. MICA ALLELE TYPING OF HLA-B27 POSITIVE JAPANESE PATIENTS WITH SERONEGATIVE SPONDYLARTHROPATHIES AND HEALTHY INDIVIDUALS: DIFFERENTIAL LINKAGE DISEQUILIBRIUM WITH HLA-B27 SUBTYPES. **ARTHRITIS RHEUMATOIDIS**, NEW YORK, v. 41, n. 1, p. 68-73, 1998.

VISSER, C. J. ; TILANUS, M. G. ; TATARI, Z. ; VAN DER ZWAN, A. W.; BAKKER, R.; ROZEMULLER, E. H.; SCHAEFFER, V.; TAMOUZA, R.; CHARRON, D. SEQUENCING-BASED TYPING OF MICA REVEALS 33 ALLELES: A STUDY ON LINKAGE WITH CLASSICAL HLA GENES. **IMMUNOGENETICS**, NEW YORK, v. 49, n. 6, p. 561-566, 1999.

WATKINS, D. I. ; McADAM, S. N. ; LIU, X. ; STRANG, C. R. ; MILFORD, E. L.; LEVINE, C. G.; GARBER, T. L.; DOGON, A. L.; LORD, C. I.; GHIM, S. H.; TROUP, G. M.; HUGHES, A. L.; LETVIN, N. L. New recombinant *HLA-B* alleles in a tribe of South American Amerindians indicate rapid evolution of MHC class I loci. **Nature**, London, v. 357, n. 6376, p. 329 – 333, 1992.

WATTERSON, G. The homozygosity test of neutrality. **Genetics**, Baltimore, v. 88, p. 405-417, 1978.

WHO Terminology Comitee. Nomenclature for Factors of the HLA System. 1984. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 24; p. 73-80; 1984.

WHO Terminology Comitee. Nomenclature for Factors of the HLA System. 1987. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 28; p. 391-398; 1987.

WU, J.; SONG, Y.; BAKKER, A. B.; BAUER, S.; SPIES, T.; LANIER, L. L.; PHILLIPS, J. H. An Activating Immunoreceptor Complex Formed by NKG2D and DAP10. **Science**, Washington, n. 5428, v. 285, p. 730-732, 1999.

YABUKI, K.; MIZUKI, N.; OTA, M.; KATSUYAMA, Y.; PALIMERIS, G.; STAVROPOULOS, C.; KOUMANTAKI, Y.; SPYROPOULOU, M.; GIZIAKI, E.; KAKLAMANI, V.; KAKLAMANI, E.; INOKO, H.; OHNO, S. Association of MICA gene and HLAB*5101 with Behcet's disease in Greece. **Investigative ophthalmology & visual science**, St. Louis, v. 40, n. 9, p. 1921-1926, 1999a.

YABUKI, K.; OTA, M.; GOTO, K.; KIMURA, T.; NOMURA, E.; OHNO, S.; MIZUKI, N.; KATSUYAMA, Y.; MAKYSYMOBYCH, W. P.; BAHRAM, S.; KIMURA, M.; INOKO, H. Triplet repeat polymorphism in the MICA gene in HLA-B27 positive and negative Caucasian patients with ankylosing spondylitis. **Human Immunology**, New York, v. 60, n. 1, p. 83-86, 1999b.

ZHANG, Y.; LAZARO, A. M.; LAVINGIA, B.; STASTNY, P. Typing for all Known MICA alleles by group-specific PCR and SSOP. **Human Immunology**, New York, v. 62, n. 6, p. 620-631, 2000.

ZHANG, Y.; LAZARO, A. M.; ZOU, Y.; LAVINGIA, B.; MORAES, E. M.; MORAES, R. J.; STASTNY, P. MICA polymorphism in South American Indians. **Immunogenetics**, New York, v. 53, n. 10-11, p. 900-906, 2002.

ZHANG, Y.; HAN, M.; VORHABEN, R.; GIANG, C.; LAVINGIA, B.; STASTNY, P. Study of MICA Alleles in 201 African Americans by Multiplexed Single Nucleotide Extension (MSNE) Typing. **Human Immunology**, New York, v. 64, n. 1, p. 130-136, 2003.

ZHANG, Y.; STASTNY, P. MICA Antigens Stimulate T Cell Proliferation and Cell-Mediated Cytotoxicity. **Human Immunology**, New York, v. 67, p. 215-222, 2006.

ZHAO, J. et al. V δ 1 T cell receptor binds specifically toMHC I chain related A: Molecular and biochemical evidences. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 339, p. 232-240, 2006.

ZOU, Y.; STASTNY, P. Alternatively spliced forms of MICA and MICB lacking exon 3 in a human cell line and evidence of presence of similar RNA in human peripheral blood mononuclear cells. **Immunogenetics**, New York, v. 54, p. 671-674, 2002.

ZOU, Y. ; BRESNAHAN, W. ; TAYLOR, R. T. ; STASTNY, P. Effect of human cytomegalovirus on expression of MHC class I-related chains A. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 174, p. 3098-3104, 2005.

ZOU, Y. ; HAN, M. ; WANG, Z.; STASTNY, P. MICA Allele-Level Typing by Sequence -based Typing by Sequence-based Typing with Computerized Assignment of Polymorphic Sites and Short Tandem Repeats within the Transmembrane Region. **Human Immunology**, New York, v. 67, p. 145-151, 2006.

ZOU, Y.; FARIBA, M.; STASTNY, P. Contact Inhibition Causes Strong Downregulation of Expression of MICA in Human Fibroblasts and Decreased NK Cell Killing. **Human Immunology**, New York , v. 67, p. 183-187, 2006a.

ZOU, Y. ; HEINEMANN, F. M.; GROSSE-WILDE, H.; SIRECI, G.; WANG, Z.; LAVINGIA, B.; STASTNY, P. Detection of Anti-MICA Antibodies in Patients Awaiting Kidney Transplantation, during the post-Transplant Course, and in Eluates from Rejected Kidney Allografts by Luminex Flow Citometry. **Human Immunology**, New York, v. 67, p. 230-237, 2006b.

ZWIRNER, N. W.; FERNÁNDEZ-VIÑA, M. A.; STASTNY, P. MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endothelial cells and monocytes. **Immunogenetics**, New York, v. 47, n. 2, p. 139-148, 1998.

ZWIRNER, N. W.; DOLE, K.; STASTNY, P. Differential Surface Expression of MICA by Endothelial Cells, Fibroblasts, Keratinocytes, and Monocytes. **Human Immunology**, New York, v. 60, n. 4, p. 323-330, 1999.

ZWIRNER, N. W. ; MARCOS, C. Y. ; MIRBAHA, F. ; ZOU, Y. ; STASTNY, P. Identification of MICA as a new polymorphic alloantigen recognized by antibodies in sera of organ transplant recipients. **Human Immunology**, New York, v. 61, n. 9, p. 917-924, 2000.

APÊNDICE 1: FICHAS DE ANÁLISE PARA TIPAGEM DOS ALELOS DO GENE
MICA

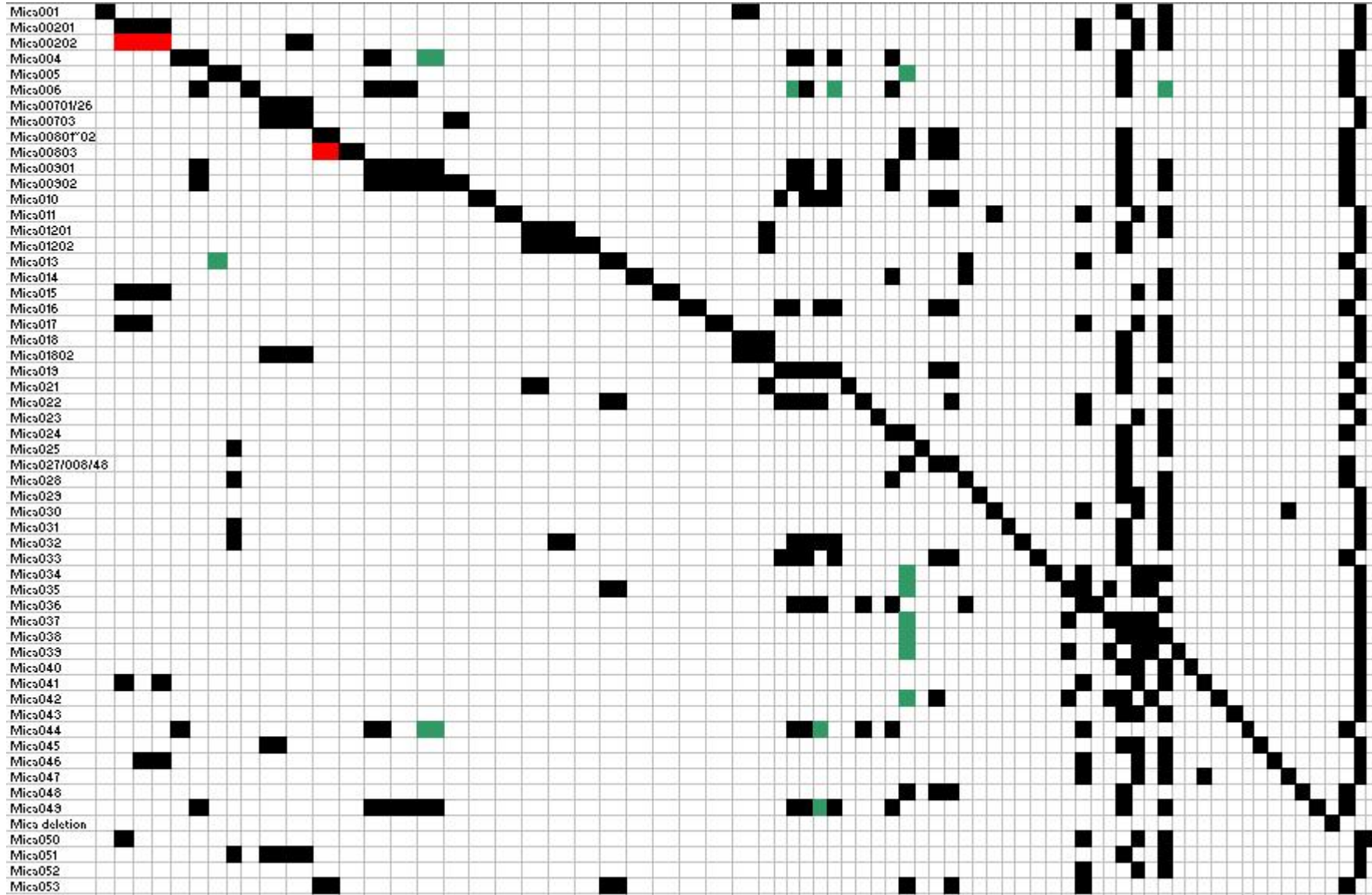
Modelo 1

MIX	MICA*	size
1	001	616
2	00201/020,015,017,041,050,00202	449
3	00201/020,015,017,046,00202	1854
4	00201/020,015,041,046,00202	1317
5	004,044	724
6	004,006,00901~02,049	637
7	005,013	154
8	005,025,028,031,032,051	1384
9	006	731
10	00701/026,00703,01802,045,051	1432
11	00701/026,00703,00202,01802,051	215
12	00801~02, 053, 00803	428
12A	00802	265
12B	00803	215
13	004,006,00901~02,044,049	568
14	006,00901~02,049	216
15	004,00901~02,044,049	202
15A	00703,00902	230
16	010	679
17	011	983
18	012,021	711
19	012,032	545
19A	01202	180
20	013,022,035,053	1608
21	014	216
22	015	217
23	016	770
24	017	516
25	001,018	590
26	012,018,021	615
27	010,016,019,022,033	854
28	004,006,009,016,019,022,032,033,036,044,049	818
29	004,006,009,010,019,022,032,033,036,044,049	764
30	010,016,019,022,032,036,044,049	191
31	004,006,009,010,016,019,032,033,049	1423
32	021	168
33	022,036,044	793
34	023	1094
35	004,006,009,014,024,028,036,044,049	860
36	005,008,024,027,034,035,037,038,039,042,048 053	744
37	025	813
38	008,010,016,019,027,033,042,048	1466
39	008,010,016,019,022,027,033,048,053	745
40	013,014,028,036	751
41	029	700
42	011,030	985
43	031	578
44	032	673
45	033	575

46	034	814
47	035,037,039,042	746
48	002,011,013,017,020,022,023,030,034,035,036, 041,044,046,047,050,052,053	609
49	036	586
50	035,037,039,042	993
51	001,004-010,012,018,019,021,024-029,031- 033,037,038,040,042,043,045, 048,049,051	1521
52	002,007,011,015,017,020,023,026,029,030,034, 035,037-041,043,045,046,047,050,052	761
53	034,035,037,038,039,042	834
54	001,002,006,007,009,011,012,015,017, 018,020,021,023-026,028-032,034,036, 038,040,041,043,045,046,047,049-052	1012
55	039	771
56	040	617
57	041,047	753
58	042	850
59	043	762
60	044	607
61	045	861
62	046	868
63	030,047	985
64	048	1137
65	049	680
66	Deletion	696
67	valine (MICA*008) 004-006,008-010,013,016,019,022,024,027, 028,033,044,048,049,053	529
68	methionine (MICA*002) 001,002,007,011,012,014,015,017,018,020,021 023,026,029-032,034-043,045-047,050-052	680
69	050	475

Alelos mostrados em verde possuem *missmatch* com um dos oligonucleotídeos do mix.


Alelos mostrados em vermelho não possuem a seqüência da região de anelamento de pelo menos um dos oligonucleotídeos disponível em <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla>



Quadrículas marcadas em verde: o alelo correspondente possui mismatch com um dos oligonucleotídeos do mix.

Quadrículas marcadas em vermelho: o alelo correspondente não possui seqüência da região de anelamento de um dos oligonucleotídeos do mix disponível em <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla>

ANEXO 1: FICHA DE CADASTRO DE DOADOR VOLUNTÁRIO DE MEDULA
ÓSSEA

 Estado do Paraná Secretaria de Estado da Saúde Instituto de Saúde do Paraná Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná	AMOSTRA Nº	COLAR ETIQUETA AQUI

REGISTRO BRASILEIRO DE DOADORES VOLUNTÁRIOS DE MEDULA ÓSSEA - REDOME

FAVOR PREENCHER PREFERENCIALMENTE EM LETRAS MAIÚSCULAS EM FORMA, OU LEGÍVEL

IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____
 R.G.: _____ Idade: _____ Data de Nascimento: ____/____/____
 Estado Civil: _____ Sexo: F () M () Peso: _____ Altura: _____ ABO: _____ Rh: _____
 Fumante: SIM () NÃO ()

ENDEREÇO RESIDENCIAL

Rua/Av. : _____ Nº. _____ Ap. : _____
 Bairro: _____ Cidade: _____ UF: _____
 CEP: _____ Fone: _____

ENDEREÇO COMERCIAL

Rua/Av. : _____ Nº. _____ Ap. : _____
 Bairro: _____ Cidade: _____ UF: _____ CEP: _____
 Profissão: _____ Fone: _____

Nome e telefone de duas pessoas para contato, caso haja dificuldades para encontrá-lo:

Nome: _____ Fone: _____
 Nome: _____ Fone: _____

Qual o grupo racial que você se colocaria? (Há tipos de antígenos HLA mais comuns em alguns grupos que outros).

() Caucasiano/Branco () Mulato () Cafuso () Negro () Oriental () Outros _____

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, abaixo assinado(a) e acima qualificado(a), pelo presente instrumento CONSENTO que os meus dados cadastrais, o resultado de minha tipagem HLA e os outros resultados de exames de Histocompatibilidade Imunogenética sejam incluídos no **REGISTRO BRASILEIRO DE DOADORES VOLUNTÁRIOS DE MEDULA ÓSSEA - REDOME**, coordenado pelo Laboratório de Imunogenética do Instituto Nacional de Câncer - INCA, do Ministério da Saúde. A amostra coletada nesta ocasião poderá ser utilizada em possíveis testes genéticos futuros, desde que de maneira sigilosa.

Nesta data, recebi as orientações sobre o que é o transplante de medula óssea e o transplante de células precursoras e estou ciente de que:

O candidato a doador de medula óssea e/ou tecidos hematopoéticos deve encontrar-se em bom estado de saúde.

Na oportunidade de ser selecionado, o doador deverá passar por exames clínicos e laboratoriais que atestem a inexistência de doenças, especialmente as infectocontagiosas.

Na oportunidade de ser selecionado para doação de medula óssea, o doador passará por internação hospitalar (hospital/dia) sendo necessário submeter-se a procedimento sob anestesia geral para retirada de não mais que 10% de sua medula óssea. O procedimento consiste em punção óssea pela região glútea (4 a 8 punções). A medula do doador é espontaneamente restaurada em poucas semanas.

Na oportunidade de ser selecionado para doação de precursores hematopoéticos, após utilizar por via subcutânea uma medicação estimulante de células hematopoéticas. O doador será submetido a procedimento semelhante a doação de sangue sendo este realizado em caráter ambulatorial, não sendo para isso necessários os procedimentos mencionados no segundo item deste Termo.

Os riscos para os doadores de medula óssea e/ou tecidos hematopoéticos é praticamente inexistente. Nos casos de doação de medula óssea, devido ao procedimento de punção é comum haver queixa de dor discreta no local da punção.

Tenho também ciência do propósito a que se destina o referido Registro e meu cadastramento nele.

Proponho-me assim a ser um eventual doador de medula óssea ou de células precursoras, sabendo que me é reservado o direito da decisão final para a doação, mantendo-se a condição de sigilo acima especificada.

CURITIBA, _____ de _____ de _____

Nome legível : _____ Assinatura : _____

TESTEMUNHAS:

Nome legível : _____ Assinatura : _____

Nome legível : _____ Assinatura : _____

ANEXO 2: POSICIONAMENTO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS *SENSE* NAS SEQÜÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DOS EXONS 2, 3 e 4 DOS ALELOS DO GENE *MICA*

Oligonucleotídeos sense (5'--- 3') posicionados no exon 2 do gene *MICA*

	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170
MICA*001	AGCCCCACAG	TCTTCGTTAT	AACCTCACGG	TGCTGTCCTG	GGATGGATCT	GTGCAGTCAG	GGTTTCTCAC	TGAGGTACAT	CTGGATGGTC	AGCCCTTCCT
MICA*00201	-----	-----	-----	-----G-	-----	-----	-----G-	-----	-----	-----
MICA*00202	-----	-----	-----	-----G-	-----	-----	-----G-	-----	-----	-----
MICA*004	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----TG-	-----	-----	-----
MICA*005	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----TG-	-----	-----	-----
MICA*006	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----TG-	-----	-----	-----
MICA*00701	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----G-	-----	-----	-----
MICA*00702	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----G-	-----	-----	-----
MICA*00703	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----G-	-----	-----	-----
MICA*00801	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----TG-	-----	-----	-----
MICA*00802	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----TG-	-----	-----	-----
MICA*00803	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----TG-	-----	-----	-----
MICA*00901	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----TG-	-----	-----	-----
MICA*00902	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----TG-	-----	-----	-----
MICA*010	-----	-----C-	-----	-----	-----	-----	-----TG-	-----	-----	-----
MICA*011	-----	-----	-----	-----G-	-----	-----	-----G-	-----	-----	-----
MICA*01201	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*01202	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*013	-----	-----	-----	-----G-	-----	-----	-----G-	-----	-----	-----
MICA*014	-----	-----	-----	-----G-	-----	-----	-----G-	-----	-----	-----
MICA*015	-----	-----	-----	-----G-	-----	-----	-----G-	-----	-----	-----
MICA*016	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----TG-	-----	-----	-----
MICA*017	-----	-----	-----	-----G-	-----	-----	-----G-	-----	-----	-----
MICA*01801	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*01802	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*019	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----TG-	-----	-----	-----
MICA*020	-----	-----	-----	-----G-	-----	-----	-----G-	-----	-----	-----
MICA*021	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*022	-----	-----	-----	-----G-	-----	-----	-----G-	-----	-----	-----
MICA*023	-----	-----	-----	-----G-	-----	-----	-----G-	-----	-----	-----
MICA*024	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----TG-	-----	-----	-----
MICA*025	-----	-----C-	-----	-----	-----	-----	-----TG-	-----	-----	-----
MICA*026	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----G-	-----	-----	-----
MICA*027	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----TG-	-----	-----	-----
MICA*028	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----TG-	-----	-----	-----
MICA*029	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----G-	-----	-----	-----
MICA*030	-----	-----	-----	-----G-	-----	-----	-----G-	-----	-----	-----
MICA*031	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----TG-	-----	-----	-----
MICA*032	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----TG-	-----	-----	-----
MICA*033	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----TG-	-----	-----	-----
MICA*034	-----	-----	-----	-----G-	-----	-----	-----G-	-----	-----	-----

MICA*021	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----C-----	-----	-----	-----
MICA*022	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*023	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*024	-----A-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*025	-----A-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*026	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*027	-----A-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*028	-----A-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*029	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*030	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*031	-----A-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*032	-----A-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*033	-----A-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*034	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*035	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*036	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*037	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*038	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*039	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*040	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*041	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*042	-----A-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*043	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*044	-----A-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*045	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*046	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*047	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*048	-----A-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*049	-----A-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*050	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*051	-----A-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*052	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*053	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----

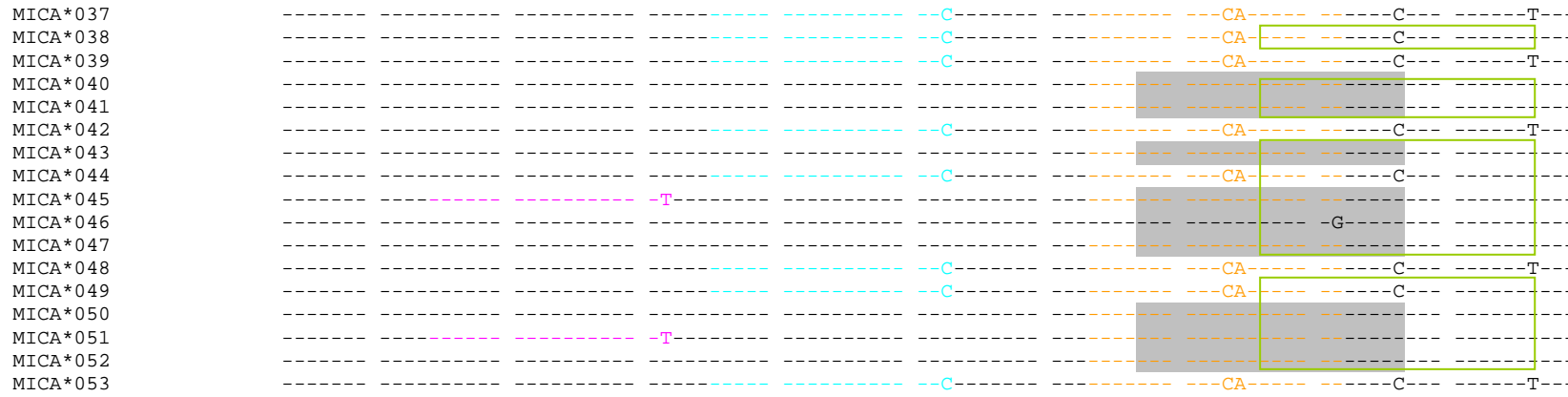
Legenda: código dos oligonucleotídeos

- 86G
- 86C
- 109T
- 109G
- 139CA
- 139TG
- 139CG
- 146T
- 146G
- 176A
- 176G

MICA*022			-G									
MICA*023			-G									
MICA*024			-G									
MICA*025			-G									
MICA*026			-G									
MICA*027			-G									
MICA*028			-G									
MICA*029			-G						A			
MICA*030			-G									
MICA*031			-G									
MICA*032			-G									
MICA*033		T	-G									
MICA*034			-G									G
MICA*035			-G									
MICA*036			-G									
MICA*037			-G									
MICA*038			-G									
MICA*039			-G									
MICA*040			-G									
MICA*041			-G									
MICA*042			-G									
MICA*043			-G									
MICA*044		-G	-G									
MICA*045		-G	-G									
MICA*046		-G	-G									
MICA*047		-G	-G									
MICA*048		-G	-G									
MICA*049		-G	-G									
MICA*050		-G	-G									
MICA*051		-G	-G									
MICA*052		-G	-G									
MICA*053		-G	-G									
MICA*001	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620		
MICA*00201	TGAAGACCAA	GACACACTAT	CACGCTATGC	ATGCAGACTG	CCTGCAGGAA	CTACGGCGAT	ATCTAAAATC	CGGCCGTAGTC	CTGAGGAGAA	CAG		
MICA*00202												
MICA*004							-G	-A		G		
MICA*005												
MICA*006							-G	-A	-A			
MICA*00701												
MICA*00702												
MICA*00703												
MICA*00801							G					
MICA*00802							-G					
MICA*00803							-G					
MICA*00901							-G	-A				
MICA*00902							-G	-A				

Legenda: código dos oligonucleotídeos

341A
405T
409A
433G
439A
454A
520A
520G
586A
586G
592A
592G
611C
611G



Legenda: código dos oligonucleotídeos

- 642T
- 663C
- 692A
- 648A
- 697T
- 707C

ANEXO 3: POSICIONAMENTO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS *ANTI-SENSE* NAS SEQÜÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DOS
EXONS 2, 3, 4, 5 e 6 DOS ALELOS DO GENE *MICA*

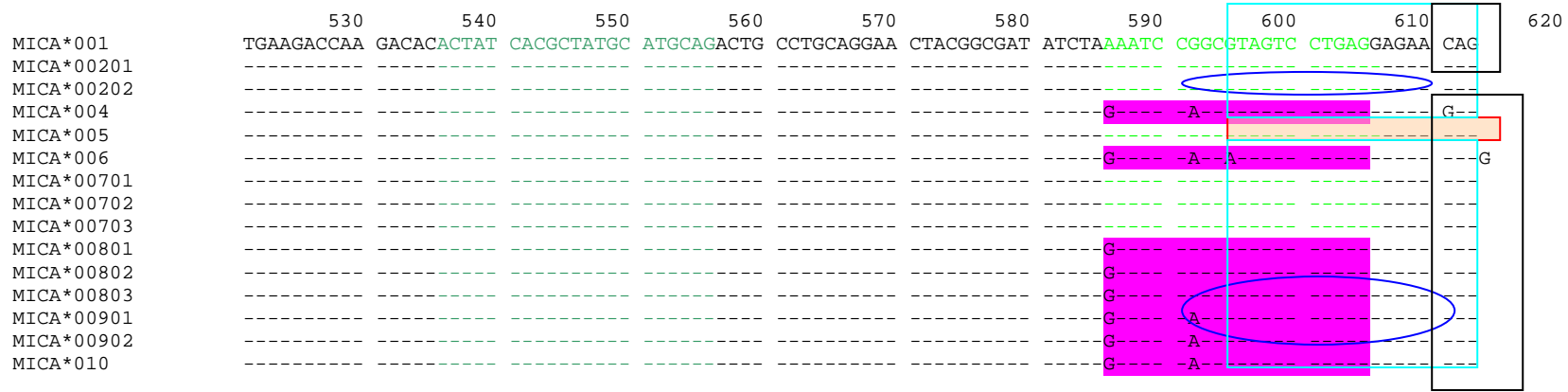
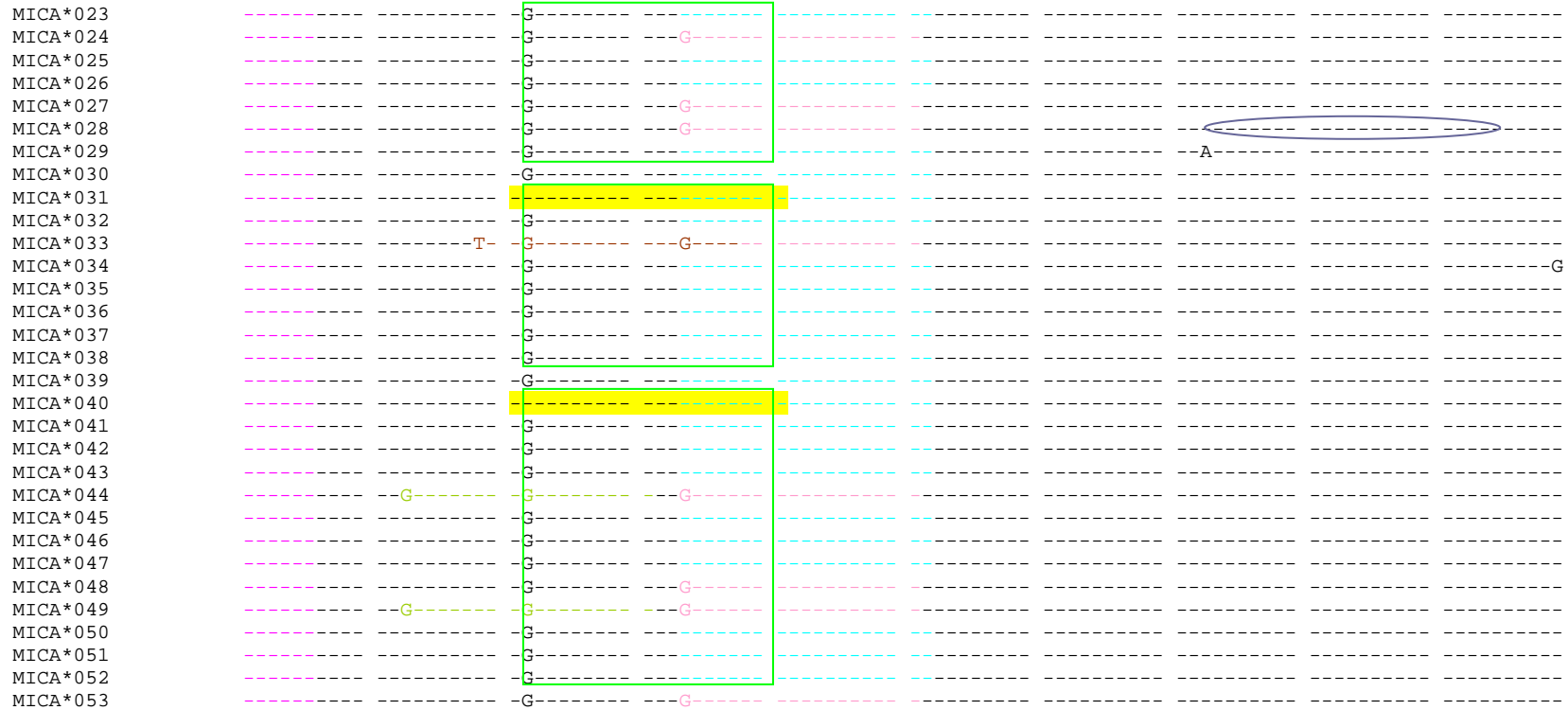
MICA*037	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*038	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*039	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*040	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*041	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*042	-----A-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*043	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*044	-----A-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*045	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*046	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*047	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*048	-----A-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*049	-----A-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*050	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*051	-----A-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*052	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----
MICA*053	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G-----

Legenda: código dos oligonucleotídeos

237G`

Oligonucleotídeos *anti-sense* (5'--- 3') posicionados no exon 3 do gene *MICA*

	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420
MICA*001	GCTTG	CATTCCTCC	AGGAGATTAG	GGTCTGTGAG	ATCCATGAAG	ACAACAGCAC	CAGGAGCTCC	CAGCATTTCT	ACTACGATGG	GGAGCTCTTC
MICA*00201	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*00202	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*004	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*005	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*006	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*00701	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*00702	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*00703	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-T-	-----
MICA*00801	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*00802	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*00803	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*00901	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*00902	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-T-	-----
MICA*010	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*011	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*01201	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*01202	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*013	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*014	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-A-	-----
MICA*015	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-A-	-----
MICA*016	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*017	-----	G-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*01801	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*01802	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*019	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*020	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*021	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*022	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*023	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*024	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*025	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*026	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*027	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*028	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*029	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*030	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*031	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*032	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*033	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*034	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*035	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*036	-----	-----	-----	-----	-----	-----	A-----	-----	-----	-----





Legenda: código dos oligonucleotídeos

337^A

341^C

383^T

409^C

433^C

439^A

442^T

442^C

454^C

454^T

493^T

536^A

536^C

536^T

586^T

586^C

592^T

595^T

595^C

611^G

Legenda: código dos oligonucleotídeos

mm642A`

663A`

663G`

692C`

707A`

713G`

713C`

730G`

730C`

810A`

820C`

820G`

821C`

821T` : não está marcado na sequência. Equivale à região marcada para o oligonucleotídeo 821C` , entretanto somente para os alelos que não estão marcados para o 821C` .

834T`

880C`

Oligonucleotídeos *anti-sense* (5'--- 3') posicionados no exon 5 do gene *MICA*

	900	910	920	930	940	950		960	970	980	990		
MICA*001	GGAAAGTG	CTGGTGCTTC	AGAGTCATTG	GCAGACATTC	CATGTTTCTG	CTGTTGCTGC	T	GCTGCT	ATT	TTTGTTATTA	TTATTTTCTA	TGTCGGTTGT
MICA*00201	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-	-----GCTGCTGCTGCTGCT	-----	-----	-----	-----	C---T-----
MICA*00202	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*	*****	***	*****	*****	*****	*****
MICA*004	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-	-----GCTGCT	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*005	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*	*****	***	*****	*****	*****	*****
MICA*006	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-	-----GCTGCT	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*00701	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*00702	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*	*****	***	*****	*****	*****	*****
MICA*00703	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*00801	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-	-----G	-----GCT	-----	-----	-----	-----
MICA*00802	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-	-----G	-----GCT	-----	-----	-----	-----
MICA*00803	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*	*****	***	*****	*****	*****	*****
MICA*00901	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-	-----GCTGCT	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*00902	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-	-----GCTGCT	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*010	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-	-----GCT	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*011	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-	-----GCTGCT	-----	-----	-----	-----	-----T-----
MICA*01201	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*01202	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*	*****	***	*****	*****	*****	*****
MICA*013	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*	*****	***	*****	*****	*****	*****
MICA*014	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*	*****	***	*****	*****	*****	*****
MICA*015	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-	-----GCTGCTGCTGCTGCT	-----	-----	-----	-----	C---T-----
MICA*016	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-	-----GCT	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*017	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-	-----GCTGCTGCTGCTGCT	-----	-----	-----	-----	C---T-----
MICA*01801	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*01802	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*019	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-	-----GCT	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*020	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-	-----GCTGCTGCTGCTGCTGCT	-----	-----	-----	-----	C---T-----
MICA*021	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*	*****	***	*****	*****	*****	*****
MICA*022	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*	*****	***	*****	*****	*****	*****
MICA*023	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-	-----G	-----GCT	-----	-----	-----	-----
MICA*024	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*	*****	***	*****	*****	*****	*****
MICA*025	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*	*****	***	*****	*****	*****	*****
MICA*026	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-	-----GCTGCT	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*027	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-	-----GCT	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*028	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-	-----G	-----GCT	-----	-----	-----	-----
MICA*029	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*030	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*	*****	***	*****	*****	*****	*****
MICA*031	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*	*****	***	*****	*****	*****	*****
MICA*032	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*	*****	***	*****	*****	*****	*****
MICA*033	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-	-----GCT	-----	-----	-----	-----	-----
MICA*034	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*	*****	***	*****	*****	*****	*****
MICA*035	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*	*****	***	*****	*****	*****	*****
MICA*036	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*	*****	***	*****	*****	*****	*****
MICA*037	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*	*****	***	*****	*****	*****	*****


```

MICA*023  -----***** ***** ***** *****
MICA*024  ***** ***** ***** *****
MICA*025  ***** ***** ***** *****
MICA*026  -----
MICA*027  -----
MICA*028  -----***** ***** ***** *****
MICA*029  -----
MICA*030  ***** ***** ***** *****
MICA*031  ***** ***** ***** *****
MICA*032  ***** ***** ***** *****
MICA*033  -----
MICA*034  ***** ***** ***** *****
MICA*035  ***** ***** ***** *****
MICA*036  ***** ***** ***** *****
MICA*037  ***** ***** ***** *****
MICA*038  ***** ***** ***** *****
MICA*039  ***** ***** ***** *****
MICA*040  ***** ***** ***** *****
MICA*041  -----
MICA*042  ***** ***** ***** *****
MICA*043  -----
MICA*044  ***** ***** ***** *****
MICA*045  -----
MICA*046  -----
MICA*047  -----
MICA*048  -----T-----
MICA*049  -----
MICA*050  -----
MICA*051  -----
MICA*052  -----
MICA*053  -----

```

Legenda: código dos oligonucleotídeos

952c`
1002G`
1038A`


```

MICA*035 *****
MICA*036 *****
MICA*037 *****
MICA*038 *****
MICA*039 *****
MICA*040 *****
MICA*041 *****
MICA*042 *****
MICA*043 *****
MICA*044 *****
MICA*045 *****
MICA*046 *****
MICA*047 *****
MICA*048 -----C--
MICA*049 -----T-----C--
MICA*050 *****
MICA*051 *****
MICA*052 *****
MICA*053 *****

```

Legenda: código dos oligonucleotídeos

1088A`