

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLOGICAS
FACULDADE DE BIOMEDICINA

ANA CAROLINE DE MATOS BARBOSA

SELEÇÃO BALANCEADORA SOBRE O GENE HLA-G: EVIDÊNCIA
BASEADA EM ANÁLISE DE GENEALOGIAS.

BELÉM
2009

ANA CAROLINE DE MATOS BARBOSA

SELEÇÃO BALANCEADORA SOBRE O GENE HLA-G: EVIDÊNCIA
BASEADA EM ANÁLISE DE GENEALOGIAS.

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Biomedicina da
Universidade Federal do Pará, como
requisito parcial para a obtenção do grau de
Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo José Melo dos Santos

BELÉM
2009

ANA CAROLINE DE MATOS BARBOSA

SELEÇÃO BALANCEADORA SOBRE O GENE HLA-G: EVIDÊNCIA
BASEADA EM ANÁLISE DE GENEALOGIAS.

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Biomedicina da
Universidade Federal do Pará, como
requisito parcial para a obtenção do grau de
Bacharel em Biomedicina.

Belém (PA), 17 de Dezembro de 2009.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Eduardo José Melo dos Santos
ICB-UFPA
(Orientador)

Prof. Dr. Sidney Emanuel Batista dos Santos
(ICB-UFPA)

Prof. MSc. Mauro de Meira Leite
(ESAMAZ)

Prof. Dr. Leonardo dos Santos Sena - Suplente
(UEPA)

BELÉM
2009

*Dedico este trabalho aos meus pais, ANA
LUCIA E JOÃO CASTRO. Amo vocês.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter colocado todas as pessoas certas no meu caminho e ter guiado meus passos. Sem ele eu nem ao menos estaria aqui.

Aos meus pais. Sem todo o esforço e a infinita fé que sempre depositaram em mim, nada do que já realizei e ainda vou realizar seriam possíveis. Talvez, durante a vida, eu siga por caminhos que me levem para longe de vocês, mas não tenham dúvidas, seja através de tudo que me ensinaram, ou por todo amor e dedicação com que me criaram, vocês sempre estarão comigo. De todo coração, aos meus pais, Ana Lucia e João Castro, eu ofereço meus maiores e mais sinceros agradecimentos.

Claro, meus irmãos não estão fora dessa. Sem todos os bons momentos, e os maus também, que passamos juntos, eu não seria quem sou hoje. Então, muito obrigada André e Victor por serem meus irmãos. Apesar de nem sempre demonstrar, amo muito vocês dois. Agradeço de todo coração também à minha prima Ariane Nayara. Nem meus pais poderiam me dar uma irmã melhor.

A todos os tios, tias, primos, primas, avós e avô que me sempre me deram e sempre desejaram o melhor para mim.

E é com muito amor que eu ofereço meus agradecimentos ao Hugo Jorge, que, no momento que surgiu na minha vida, mudou tudo para melhor. Não é segredo para ninguém que eu nunca fui mais feliz na minha vida. Muito obrigado por ser meu namorado e encher a minha vida de tanto amor. Te amo demais!

A todos os amigos e amigas que conheci durante a graduação, sem os quais esse trabalho não seria possível, e os anos de faculdade seriam muito chatos.

Aos meus amigos de turma, agradeço todos os bons momentos que passamos juntos. Agradeço especialmente a Layanna e a Priscila. Amigas que eu amo muito e que contribuíram não apenas no meu crescimento científico, mas também, e principalmente, no meu crescimento como pessoa, não estou me referindo ao tamanho, claro.

Não tenho palavras para agradecer a inestimável ajuda de todos do laboratório de Genética Humana e Médica. Mas não posso deixar de agradecer especialmente o Leonardo, o Mauro, o Clayton, a Maria Helena, a Janaína, a Danuta, a Yukari, a Larysse, a Layanna, a Bruna, a Ana Paula, o Jean e a Andreza. Eu me considero muito sortuda por fazer parte desse laboratório e um dos principais

motivos é por poder trabalhar ao lado de vocês. Vocês não tem noção de quanto sou grata a todos vocês.

Ao meu orientador. Tenho certeza que falo por todos seus alunos quando digo que ele não é apenas um ótimo orientador, é um verdadeiro pai científico. Não tenho como agradecer por tudo que fez por mim, desde a oportunidade de me juntar à equipe e desenvolver um trabalho que eu adoro, até os momentos que demonstrou que era mais que meu orientador, era também um amigo com quem eu podia sempre contar. Por isso, e outras coisas que não cabem aqui, que eu agradeço ao Prof. Dr. Eduardo Santos o dia que me escolheu para ser sua aluna.

Ao Prof. Dr. Sidney Santos e sua equipe pelas amostras concedidas para realização desse trabalho.

A universidade Federal do Pará pela infra-estrutura e ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica que muito colaborou para o meu desenvolvimento científico.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. HLA-G.....	1
1.1.1. Estrutura e função.....	1
1.1.2. Associação do polimorfismo de 14 pb com doenças e seus papel na reprodução.....	3
1.1.3. Evidências de seleção sobre o HLA-G.....	4
1.2. JUSTIFICATIVA.....	6
1.3. OBJETIVOS.....	7
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
2.1. DELINEAMENTO AMOSTRAL.....	8
2.2. GENOTIPAGEM.....	8
2.3. ANÁLISE DE DADOS.....	8
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	9
4. CONCLUSÃO.....	13
5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	14

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1 - Estrutura proteica das isorformas HLA-G1, HLA-G2, HLa-G5 e HLA-G6.	2
FIGURA 2 - Frequências observadas (HO) e esperadas (HS) de heterozigotos descritos por 11 populações.	12
TABELA 1 - Frequência alélica do polimorfismo de 14pb in/del do HLA em várias populações.	5
TABELA 2 - Frequência alélica e genotípica em indivíduos não aparentados da população de Belém e nas genealogias.	9
TABELA 3 - Transmissão dos alelos HLA-G*I e D nas genealogias informativas.	11

RESUMO

O HLA-G é o ligante para um dos receptores imunoglobulina-símiles de células *natural killer* (KIR) e tem sido associado com um importante papel na tolerância imunológica durante a gravidez. Em particular, o polimorfismo de 14pb ins/del do HLA-G está associado com menores níveis de RNAm e, conseqüentemente, com a expressão de HLA-G. Além disso, esse polimorfismo está associado a complicações durante a gravidez, como pré-eclampsia e abortos recorrentes. Alguns estudos reportaram desvio do equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (H-W) em algumas populações, aumentando a possibilidade de diferenças de adaptação reprodutiva para ambos os alelos. O presente estudo teve como objetivo avaliar as diferenças de segregação para o polimorfismo de 14pb ins/del em genealogias bem estabilizadas com o intuito de detectar um modelo de seleção agindo sobre a transmissão alélica desse polimorfismo. As amostras utilizadas consistiram de 228 indivíduos não aparentados e 112 genealogias compostos por pai, mãe e um filho. Todas as genealogias tiveram a paternidade e maternidade confirmada por genotipagem adicional de 11 *locis* de microssatélites (CSF1PO, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, TH01, and TPOX). O polimorfismo 14pb ins/del do gene HLA-G foi investigado através de PCR e eletroforese em gel de poliacrilamida. A frequência do alelo de inserção de 14pb [*HLA-G*I*] foi de 38,4% entre indivíduos não aparentados, 45,5% entre os casais e 48,7% entre os filhos. A diferença da frequência do HLA-G*I entre as amostras de filhos e de indivíduos não aparentados foi estatisticamente significativa ($\chi^2=6,531$; $p=0,0134$), sugerindo que o alelo HLA-G*I pode estar associado com sucesso reprodutivo, uma vez que os indivíduos nas genealogias obtiveram sucesso reprodutivo e que a amostra de indivíduos não aparentados deve conter alguns com distúrbios reprodutivos. Além disso, nenhuma das amostras apresentou desvios do equilíbrio de H-W. A análise da segregação dos alelos nas genealogias informativas mostrou que o alelo HLA-G*I é preferencialmente transmitido (Teste-T pareado; $T=3,77$; $p=0,0198$). Em concordância com nossos resultados, observou-se na literatura uma tendência ao excesso de heterozigotos com relação ao esperado no equilíbrio de H-W. A partir de onze populações estudadas, onde foram obtidas as frequências genotípicas, todas indicaram excesso de heterozigoto (Teste t pareado, $t=-4,04$; $p=0,0019$). O presente estudo é o primeiro a descrever a transmissão alélica do polimorfismo 14 pb ins/del em genealogias sob condições não patológicas, sugerindo que esse tendência pode ser reflexo de pressão de seleção e ainda ser responsável pelos desvios do equilíbrio de H-W descritos na literatura.

ABSTRACT

The HLA-G has been reported to be important in the immunological tolerance during the pregnancy. In particular the 14pb in/del polymorphism is involved with the stability of mRNA and levels of soluble HLA-G. Moreover, this polymorphism seems to be associated with pre-eclampsia and recurrent abortions. A number of studies reported deviation of Hardy-Weinberg equilibrium among populations, raising the possibility of differential reproductive fitness for both alleles. The present study aimed to evaluate the segregation differences of both alleles in well established genealogies in order to detect selective patterns acting on parent/offspring allelic transmission. The samples were constituted by 228 unrelated individuals from Belém, PA, and 112 genealogies composed by parents and one off-spring. All genealogies had the fathership and mothership confirmed by additional genotyping of 11 microsatellites. The 14pb in/del polymorphism of HLA-G was investigated by PCR and polyacrylamide gel electrophoresis. The frequency of the 14 pb insertion allele [HLA-G*I] was 38,4% in the unrelated sample, 45.5% among the parents and 48.7% in the offspring sample. The difference between the offspring and unrelated samples was statistically significant ($\chi^2=6,531$; $p=0,0134$), suggesting that the allele HLA-G*I may be associated with reproductive success, since the genealogy samples are reproductively well succeeded and the unrelated sample may contain individuals with reproductive disturbances. Additionally, all samples did not presented deviation from Hardy-Weinberg equilibrium. The segregation analysis of genealogies showed that in all five mate configurations where the segregation could be evaluated the transmission parent/offspring of HLA-G*I was higher than expected (paired t-test; $t=3,77$; $p=0,0198$). In agreement to our findings we observed a trend in the literature to a heterozygote excess in relation to the expected by Hardy-Weinberg. From eleven reported population samples, where the genotypic frequencies were available, all displayed heterozygote excess (paired t-test, $t=-4,04$; $p=0,0019$). The present study is the first to describe bias on the parent/offspring allelic transmission under non-pathological conditions, suggesting that this bias may reflect selective pressure and even be responsible for some deviations from Hardy-Weinberg equilibrium reported in the literature.

1. INTRODUÇÃO

1.1. HLA-G

1.1.1. Estrutura e função

HLA-G é uma molécula de HLA de classe I não-clássica, que possui expressão restrita e um importante papel na regulação do sistema imune. As moléculas HLA de classe I estão localizadas na região telomérica do cromossomo 6p21 e são subdivididas em dois grupos: genes HLA de classe Ia ou clássicos (HLA-A,B,C) e genes HLA de classe Ib ou não-clássicos (HLA-E,F,G). Diferente da maioria dos genes HLA, o gene HLA-G possui número restrito de polimorfismos e limitada expressão tecidual em condições não patológicas. O *splicing* alternativo do transcrito primário do HLA-G resulta em sete isoformas diferentes, sendo quatro proteínas de ligação à membrana (HLA-G1-4) e três formas solúveis (HLA-G5-7) (Carosella *et al.*,1999).

A organização do gene HLA-G é similar aos dos genes HLA de classe Ia, possuindo oito exons que codificam um peptídeo sinal (exon 1), o domínio $\alpha 1$ (exon 2), o domínio $\alpha 2$ (exon 3), o domínio $\alpha 3$ (exon 4), o domínio transmembrana (exon 5), a cauda citoplasmática (exons 6 e 7) e uma região não traduzida (exon 8) (Kirisits *et al.*,1991).

A proteína HLA-G5 possui três domínios extracelulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$) e pode estar associado com microglobulina $\beta 2$ de cadeia leve, assim como HLA-G1(Figura 1). A proteína HLA-G6 não possui o domínio $\alpha 2$, assim como HLA-G2, e pode ser expresso como homodímeros de cadeias pesadas. Pouco é conhecido sobre o padrão de expressão ou função das proteínas HLA-G3, HLA-G4 e HLA-G7 (Carosella *et al.*,1999).

O HLA-G interage com dois receptores inibitórios de leucócitos (leukocyte inhibitory receptors-LILRs), antes conhecidos como *immunoglobulin-like transcripts* (ILT), que se ligam ao domínio $\alpha 3$ das molécula HLA de classe I, que são LILRB1 e LILRB2 (Shirioishi *et al.*,2003) e o receptor imunoglobulina símiles de células NK (KIR)2DL4 (Ponte *et al.*,1999; Rajagopalan & Long,1999) expresso na superfície de células NK. O receptor LILRB1 (antes chamado de ILT2) é expresso por células NK, linfócitos T, B e por fagócitos mononucleares e sua ação consiste na interferência de

sinais ativatórios (Hunt & Langat, 2009). A expressão do receptor LILRB2 (antes chamado de ILT4) é limitada a linhagem mielóide, que incluem monócitos, macrófagos e células dendríticas (Borges *et al.*,1997). Até o momento, pouco é conhecido a respeito das vias de sinalização via LILR ou 2DS4.

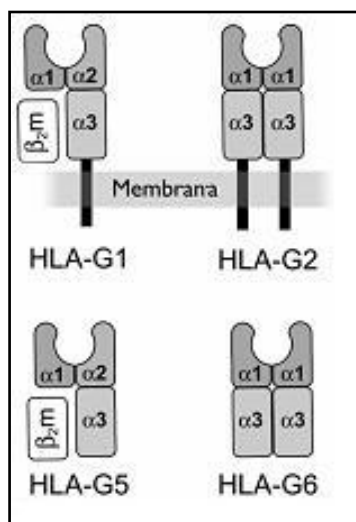


Figura 1: Estrutura proteica das Isorformas HLA-G1, HLA-G2, HLa-G5 e HLA-G6. (Fonte: McIntire *et al*, 2005)

A tolerância induzida pelas proteínas derivadas do gene HLA-G é a função melhor documentada desse gene em células do sistema imune. Nessa função, incluem efeitos como diminuição da atividade citotóxica, migração, viabilidade celular, proliferação e produção de IFN γ das células NK; regulação da produção de citocinas por célula mononucleares e linfócitos T citotóxicos (CTL); supressão da citotoxicidade e viabilidade dos CTL; inibição da proliferação e indução de fenótipo supressivo in linfócitos T auxiliares (T_H); alteração da maturação e da capacidade estimulatória de células dendríticas (Hunt, 2006; Le Bouteiller *et al.*,2007; Pistoia *et al.*,2007; Carosella *et al.*,2008a,2008b; Baricordi *et al.*,2008). Uma função incomum do HLA-G em ativar células NK via estimulação NF κ B, que é a principal via de ativação de receptores do sistema imune inato, foi descrito recentemente por Guillard *et al*(2008).

Em condições normais, o HLA-G é expresso principalmente por células fetais, trofoblastos, sendo o único gene HLA, com exceção do HLA-C e HLA-E, que é expresso por essas células na zona de contato entre a mãe e o feto, e está envolvido no complexo mecanismo de aceitação imunológica do embrião semi-alogênico pelo organismo materno (Rouas-Freiss *et al.*, 1997). A expressão de HLA-

G por tecidos periféricos é observada em condições patológicas, como infecções virais (Tripathi & Agrawal, 2007), doenças autoimunes (Veit *et al.*, 2009) e tumores (Paul *et al.*, 1998), e transplante de órgãos (Lila *et al.*, 2000).

Como dito anteriormente, o gene HLA-G é caracterizado por limitados polimorfismos, apresentando somente 36 alelos descritos até o momento (Harrison *et al.*, 2003) com oito polimorfismos simples de aminoácidos descritos. Além disso, dois polimorfismos de significância funcional foram detectados no gene HLA-G. Um polimorfismo consiste em uma deleção ou inserção de uma sequência de 14 pb (5'-ATTTGTTTCATGCCT- 3') na região 3' não traduzida (3'UTR) na posição 3741 do exon 8 do gene e o outro é uma substituição simples de nucleotídeo na região promotora. Alelos que possuem a inserção de 14 pb vem sendo associados com uma menor produção de RNAm para a maioria das isoformas ligadas à membrana e solúveis em amostra de trofoblastos (Hviid *et al.*, 2003).

1.1.2. Associação do polimorfismo de 14 pb com doenças e seus papel na reprodução

Por causa de seu papel imunossupressor, a atuação do HLA-G tem sido investigada em vários contextos. Um estudo clínico recente demonstrou que altos níveis de HLA-G em pacientes submetidos a transplante de coração está associado com baixa incidência de episódios de rejeição aguda (Luque *et al.*, 2006a, 2006b). Lila *et al.* (2007) também encontrou associação entre a expressão de HLA-G e rejeição crônica e aguda em paciente submetidos a transplantes cardíacos. A expressão de HLA-G já foi associada também à redução da incidência de rejeição em transplantes renais (Crispim *et al.*, 2008).

Vários estudos reportaram a importante influência que o polimorfismo de 14 pb ins/del exerce nos níveis de expressão do HLA-G encontrados em pacientes transplantados (La Nasa *et al.*, 2007; La Rond *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2009). No estudo de Torres *et al.* (2009) foi demonstrado que o genótipo homozigoto para a deleção dos 14 pb (HLA-G*D/D) induzia altos níveis de expressão do HLA-G e determinavam graus menores de rejeição do enxerto. Neste caso, altos níveis de HLA-G poderiam induzir imunotolerância inibindo a proliferação de células CD4 alo-reativas, inibindo a atividade citotóxica de linfócitos T CD8 e/ou bloqueando a ação de células NK (Torres *et al.*, 2009).

Além disso, a importância do polimorfismo de 14pb ins/del vem sendo confirmado em vários estudos que descrevem a associação desse polimorfismo em complicações na gravidez, infecções virais e doenças autoimunes (Yan *et al.*, 2006; Hviid *et al.*, 2005).

Em infecções virais, a indução da expressão de HLA-G por células infectadas foi proposta como mecanismo que ajuda o vírus a escapar as defesas do hospedeiro (Tripathi & Agrawal, 2007). No trabalho desenvolvido por Zheng *et al.* (2009), a frequência do alelo HLA*D, assim como do genótipo HLA-G*D/D, estava acentuadamente aumentada no grupo de pessoas infectadas pelo citomegalovírus humano (HCMV) quando comparado com a população controle saudável.

O HLA-G foi primeiro identificado como uma molécula expressa exclusivamente por citotrofoblastos e foi primeiro estudo no contexto da gravidez. Vários estudos associam o polimorfismo de 14 pb ins/del com algumas complicações da gravidez, como pré-eclampsia (Hylenius *et al.*, 2004), abortos recorrentes (Hviid *et al.*, 2004) e um maior risco de fracasso em fertilizações *in vitro* (FIV). Em especial observou-se que o genótipo heterozigoto para este polimorfismo está associado com abortos recorrentes (Tripathi *et al.*, 2004), configurando um curioso tipo de seleção balanceadora.

1.1.3. Evidências de seleção sobre o HLA-G

Devido ao papel do HLA-G na reprodução e em diversas doenças, esperar-se-ia que ele estivesse sobre algum tipo de pressão seletiva. De fato, Tan *et al.* (2005) reportaram evidências de seleção balanceadora na região promotora do gene HLA-G. Adicionalmente, Mendes-Junior *et al.* (2007) também sugeriram que a seleção balanceadora pode ter sido importante na distribuição do dimorfismo inserção/deleção de 14 pb da região 3' não traduzida do HLA-G em populações ameríndias. Evidências de seleção ocorrendo em regiões próximas ao do gene HLA-G já foram documentadas (McEvoy *et al.*, 2009).

Nesse contexto é importante classificar os tipos de pressão seletiva. Seleção balanceadora é aquela que mantém a variabilidade de um gene na população (Nei, 1987; Ridley, 2004). Geralmente ela beneficia heterozigotos e é o único fator evolutivo capaz de gerar desequilíbrio de Hardy-Weinberg com excesso

de heterozigotos (Nei, 1987). Contrapondo-se a ela temos a seleção purificadora, que desfavorece certos alelos e tende a eliminá-los da população, diminuindo a variabilidade do gene sob seleção (Nei, 1987).

Se houver pressão seletiva balanceadora e ela for constante e atuar em todas as populações seria esperado que polimorfismos deste gene mostrassem elevada variabilidade em todas as populações, como pode ser observado para os genes HLA clássicos. Uma revisão da literatura para o polimorfismo de 14 pb in/del do gene HLA-G mostrou que entre diversos grupos étnicos (ameríndios, europeus, asiáticos e hindus) nenhum dos dois alelos foi fixado e nem mesmo atingiu frequências inferiores a 22%, conforme pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1: Frequência alélica do polimorfismo de 14pb in/del do HLA-G em várias populações.

População	N	HLA-G*I	HLA-G*D
China Etnia Han ¹	640	40,3	59,7
Alemanha ²	739	38,8	61,2
Dinamarca ³	93	38,7	61,3
Itália ⁴	451	38,9	61,1
Polônia ⁵	93	38,7	61,3
Índia ⁶	120	47,9	52,1
Brasil			
Belém*	228	38,4	61,6
Porto Alegre ⁷	104	33,7	66,3
São Paulo ⁸	97	42,0	58,0
Recife ⁹	168	41,0	59,0

¹Yan et al.,2008; ²Glass et al.,2007; ³Hviid et al.,2004; ⁴Rizzo et al.,2008; ⁵Sipak-Szmigiel et al.,2007; ⁶Tripaphi et al.,2004; ⁷Veit et al.,2009; ⁸ Crispim et al.,2007; ⁹ Segat et al.,2009.; *Presente estudo.

1.2. JUSTIFICATIVA

Vários estudos reportaram um desvio na proporção genotípica esperada com relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW). Esses estudos obtiveram um excesso de heterozigoto, porém apenas em apenas quatro desses estudos essa diferença foi estatisticamente significativa. (Veit *et al.*, 2009; Moreau *et al.*, 2008; Mendes-Junior *et al.*, 2007; Hviid *et al.*, 2002).

Desequilíbrio de HW pode ser causado por quebra de panmixia – como endogamia - e efeito Wahlund, além de erros de genotipagem. Entretanto, estes fatores levam a um excesso de homozigotos. Como o desvio ocorreu no sentido de excesso de heterozigotos, seleção balanceadora torna-se praticamente a única explicação plausível, excluindo-se um erro sistemático de genotipagem.

Motivado por essas observações na literatura e pelo papel do HLA-G na reprodução e em diversas patologias, o presente estudo teve como objetivos identificar evidências de pressão seletiva que possa estar agindo sobre o polimorfismo de 14pb ins/del do gene HLA-G, de modo a explicar as causas para o desequilíbrio de HW, com excesso de heterozigoto, descritos na literatura. Para isso, foi analisada a segregação desse polimorfismo em genealogias e foram comparadas as frequências desse polimorfismo entre as genealogias e a população de Belém, Pará.

1.3. OBJETIVOS

Descrever a variabilidade genética do polimorfismo inserção/deleção (HLA-G*I/D) de 14 pb da região 3' não traduzida do exon 8 do gene HLA-G na população de Belém;

Descrever a variabilidade deste polimorfismo em genealogias formadas por pai, mãe e filho;

Caracterizar a transmissão dos alelos I e D nas genealogias informativas, testando se ela ocorre de acordo com o esperado;

Identificar erros de genotipagem usando-se as genealogias;

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. DELINEAMENTO AMOSTRAL

As amostras foram compostas por 228 indivíduos não aparentados, representativos da população de Belém e 112 genealogias compostos por pai, mãe e um filho (Belém, Pará, Brasil). Todas as genealogias tiveram confirmação de paternidade e maternidade por genotipagem adicional de 11 microssatélites: CSF1PO, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, TH01 e TPOX. As genotipagens foram realizadas de acordo com o descrito em Santos *et al.* (2009). Todas as genealogias já haviam sido previamente genotipadas para os microssatélites antes da execução do presente trabalho.

2.2. GENOTIPAGEM

O polimorfismo 14pb in/de do gene HLA-G foi investigado através de PCR e eletroforese em gel de poliacrilamida. Para as seqüências dos primers e as condições de PCR foi utilizado protocolo previamente descrito (Hviid *et al.*, 2002). O produto de PCR foi visualizado em gel de poliacrilamida a 4,8% corada com nitrato de prata.

2.3. ANÁLISE DOS DADOS

A genotipagem combinada de cada casal formado por pai e mãe é útil para a detecção de erros de tipagem, já que de casais homozigotos para a inserção de 14 pb (I) ou para a deleção (D), ou casais formados por homozigotos para I e D pode-se esperar apenas um genótipo para o filho (II,DD ou ID, respectivamente). Combinações II x ID, ID x II, ID x DD, DD x DI e ID x ID são úteis para a determinação da segregação dos alelos I e D e para comparação da segregação obtida com a esperada. Cada combinação genotípica foi considerada independentemente e a segregação dos alelos I e D analisado por teste T pareado utilizando o programa BioEstat 5.0 (Ayres,2007). Um ponto importante é que estamos considerando principalmente casais que obtiveram sucesso reprodutivo. Nesse caso, combinações genotípicas desvantajosas para o sucesso reprodutivo podem estar sub-representada nesses casais em comparação com a população em geral.

3. RESULTADO E DISCUSSÃO

A frequência da deleção de 14 pb (*HLA-G*I*) foi de 38,4% entre indivíduos não aparentados representativos da população de Belém (Tabela 2). A amostra mostrou-se em equilíbrio de HW, com um excesso de heterozigotos observado não estatisticamente significativo.

A frequência do alelo I foi 45,5% entre os casais e 48,7% entre os filhos. Não houve diferença estatisticamente significativa nas frequências alélicas e genotípicas entre as amostras de mães e pais. Ambos os grupos amostrais se encontravam em equilíbrio e HW (Tabela 2).

Observou-se, apesar de não significativo, excesso de heterozigotos tanto na amostra de indivíduos não aparentados quanto nas genealogias.

Tabela 2: Frequência alélica e genotípica do polimorfismo de 14 pb do gene *HLA-G* em indivíduos não aparentados da população de Belém e nas genealogias.

	Indivíduos não aparentados (%)	Casais (%)	Filhos (%)
Genótipo	n=228	N=224	n=112
<i>HLA-G*I/I</i>	30(13,2)	48(21,4)	27(24,1)
<i>HLA-G*I/D</i>	115(50,4)	108(48,2)	55(49,1)
<i>HLA-G*D/D</i>	83(36,4)	68(30,4)	30(26,8)
Alelos			
<i>HLA-G*I</i>	175(38,4)	204(45,5)	109(48,7)
<i>HLA-G*D</i>	281(61,6)	244(54,5)	115(53,3)
Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2=3,84$)	$\chi^2=0,2069$ $p=0,6492$	$\chi^2=0,1752$ $P=0,6755$	$\chi^2=0,0329$ $P=0,8560$

A diferença da frequência do *HLA-G*I* entre a população geral de Belém e a amostras de filhos foi estatisticamente significativa ($\chi^2=6,531$; $p=0,0134$). Como a amostragem composta pelas genealogias pressupõe a inclusão de apenas casais que obtiveram sucesso reprodutivo, a maior frequência do alelo *HLA-G*I* entre os filhos desses casais do que na população geral sugere que este alelo está

associado com maior sucesso reprodutivo. Uma possível causa dessa associação é o fato desse polimorfismo está associado com níveis menores de expressão do HLA-G, apesar de a maioria dos estudos associarem a presença das isoformas do HLA-G com uma boa evolução da gestação e associarem o alelo HLA-G*1 com complicações gestacionais. Como uma das funções mais importante do HLA-G é, provavelmente, proteger células trofoblásticas fetais da lise mediada por células NK maternas (Ponte *et al.*,1999) e que Guillard *et al.*(2008) descreveu um novo papel do HLA-G na ativação de células NK, níveis menores de expressão desse gene poderia diminuir o sinal ativatório em células NK, aumento assim as chances de sobrevivência do feto.

A análise das genealogias mostrou transmissão mendeliana para ambos os alelos, sugerindo que não há erros de tipagem nas amostras. Adicionalmente, o método usado (sequência de primers e condições de PCR) é o mesmo descrito por diversos grupos de pesquisa, que não referiram possíveis erros de tipagem. Adicionalmente, foi realizada uma busca no *GeneBank* para possíveis outras regiões homólogas que poderiam co-amplificar, gerando padrões falso heterozigotos, e não foram encontradas. Isso exclui a possibilidade de erros sistemáticos de genotipagem.

A análise da segregação nas genealogias mostrou que nas combinações onde pode ser avaliado a transmissão dos alelos HLA-G*1 e HLA-G*, o alelo HLA-G*1 estaria sendo preferencialmente transmitido (Teste-t pareado; $t=3,77$; $p=0,0198$)(Tabela 3). Além disso, a mesma análise sugere que o heterozigoto é favorecido em algumas combinações e desfavorecido em outras. Algumas combinações genótípicas dão vantagem a heterozigotos, outras desvantagens, que no geral configura um quadro de seleção balanceadora. Nessa situação, a seleção balanceadora agiria mantendo a variabilidade para este polimorfismo elevada, que no caso de ser uma seleção à nível de reprodução esperar-se-ia elevada variabilidade para todas as populações humanas, o que é relatado em vários estudos.

Tabela 3: Transmissão dos alelos HLA-G*I e D nas genealogias informativas. O genótipo dos filhos onde cada alelo transmitido pode ser detectado encontra-se entre parêntesis.

Genótipos do casal	HLA-G*I	HLA-G*D
II x ID	12 (II)	5(ID)
ID x II	7(II)	4(ID)
ID x ID	6(II)	4(DD)
ID x DD	7(ID)	7(DD)
DD x ID	11(ID)	8(DD)
Total	40	28

Adicionalmente, foram revisados dados de genotipagem de nove estudos, incluindo o presente estudo, onde foram obtidas a frequência do polimorfismo de 14 pb ins/del, cuja amostras consistiam em torno 100 indivíduos genotipados (Glas *et al.*,2007; Zheng *et al.*,2009; Yan *et al.*,2008; Veit *et al.*,2009; Crispim *et al.*,2007; Segat *et al.*,2009; Rizzo *et al.*,2008; Chen *et al.*,2008)(Figura 2). A análise conjunta desses dados indicou uma tendência ao excesso de heterozigotos, que foi estatisticamente significativa (Teste T pareado, $t=-4,04$; $p=0,0019$).

O excesso de heterozigoto observado na análise conjunta de vários trabalhos também apóia a hipótese de ação de seleção balanceadora. Alguns estudos reportaram sinais de seleção balanceadora atuando na região promotora do gene HLA-G (Tan *et al.*, 2005; Mendes-Junior *et al.*, 2006). A associação entre o polimorfismo de 14 pb ins/del no exon 8 (região 3'UTR) do gene HLA-G e os polimorfismos da região promotora são pouco conhecidos, por isso não podemos descartar a possibilidade de associação entre estas duas regiões, o que pode indicar que a seleção não está necessariamente agindo diretamente sobre o polimorfismo estudado, mas sim sobre outras regiões próximas, como a região promotora ou outros genes HLA.

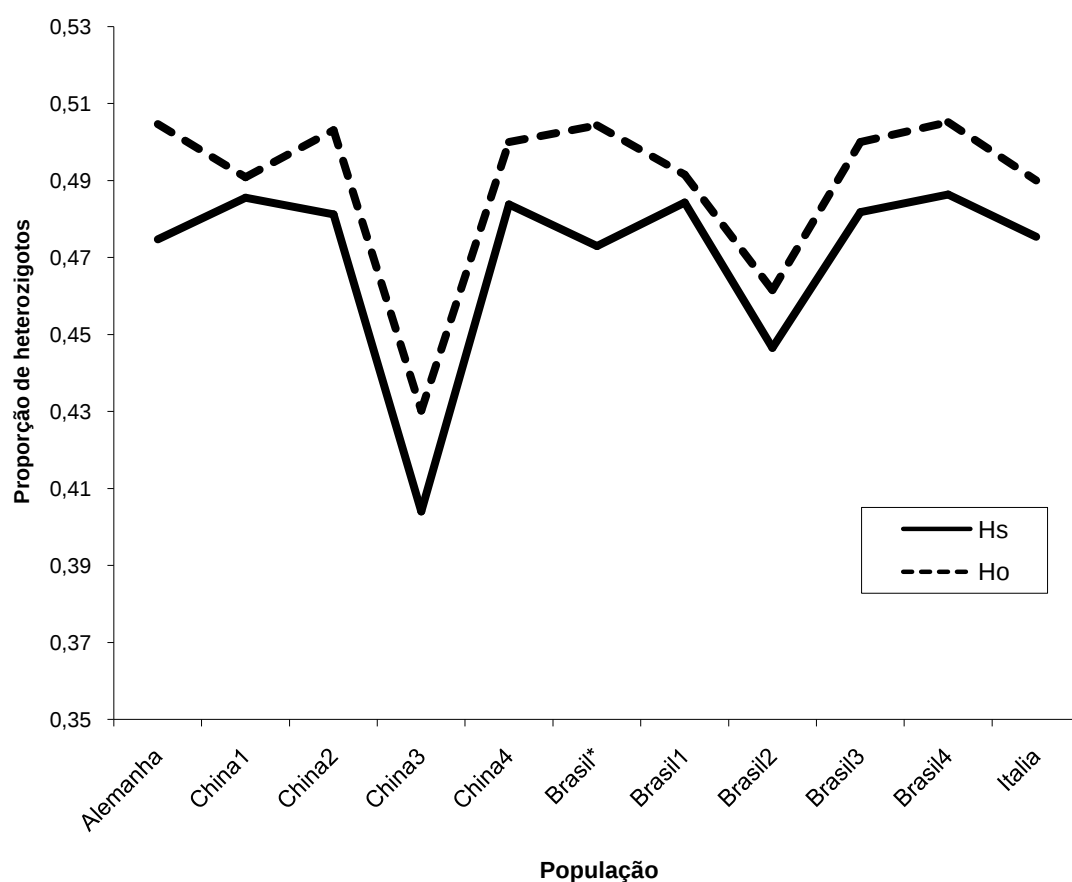


Figura 2: Frequências observadas (HO) e esperadas (HS) de heterozigotos descritos por 11 estudos, incluindo o presente estudo. Alemanha (Glas *et al.*,2007); China1 (Zheng *et al.*,2009); China2 e China3 (Yan *et al.*,2008); China4 (Chen *et al.*,2008); Brasil1 e Brasil2 (Veit *et al.*,2009); Brasil3 (Segat *et al.*,2009); Brasil4 (Crispim *et al.*,2007); Itália (Rizzo *et al.*,2008);Brasil*(presente estudo).

4. CONCLUSÃO

- I. O polimorfismo de 14 pb in/del do HLA-G possui uma grande variabilidade genética na população de Belém, com frequências parecidas com as descritas na maioria das populações até o momento.
- II. A segregação preferencial do alelo de inserção de 14 pb nas genealogias e sua frequência significativamente maior na amostra de filhos do que na população geral de Belém, sugerem que este alelo está envolvido com maior sucesso reprodutivo.
- III. O excesso de heterozigotos observados nesse e na maioria dos trabalhos descritos e o seu continuo favorecimento e desfavorecimento são sugestivos de seleção balanceadora agindo sobre esse polimorfismo de maneira direta ou indireta.
- IV. A análise das genealogias mais a busca no GeneBank por outras regiões que poderiam co-amplificar com os *primers* utilizados nesse estudo descartaram chances de erros de genotipagem.
- V. O presente estudo é o primeiro a descrever a transmissão do polimorfismo 14 pb in/del em genealogias em condições não patológicas.
- VI. O conjunto dos dados gerados no presente trabalho e da análise de dados publicados sugere que a manutenção deste polimorfismo está direta ou indiretamente relacionada com seleção balanceadora

5. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Aldrich C, Wambebe C, Odama L, Di Rienzo A & Ober C. Linkage disequilibrium and age estimates of a deletion polymorphism (1597ΔC) in HLA-G suggest non-neutral evolution. **Human Immunology**, **63**:405–412.2002.
- Ayres, M., Ayres-jr, M., Ayres D.L. BioEstat 5.0 Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. **Sociedade Civil Mamirauá/Imprensa Oficial do Estado do Pará**. Pará, 2007.
- Baricordi, O.R.; Stignani, M.; Melchiori, L. & Rizzo, R. HLA-G and inflammatory diseases. **Inflamm. Allergy Drug Targets**, **7**:67-74.2008.
- Borges, L.; Hsu, M.L.; Fanger, N.; Kubin, M. & Cosman, D. A family of human lymphoid and myeloid Ig-like receptors, some of which bind to MHC class I molecules. **J Immunol**, **159(11)**: 5192e6. 1997.
- Carosella, E.D.; Rouas-Freiss. N.; Pau, P. & Dausset, J. HLA-G: a tolerance molecule from the major histocompatibility complex. **Immunology Today**, **20**: 60-62. 1999.
- Carosella, E.D. & HoWangYin, K.Y. *et al.* HLA-G-dependent suppressor cells: Diverse by nature, function, and significance. **Hum. Immunol.** **69**: 700-07.2008.
- Carosella, E.D.; Moreau, P.; Lemaoult, J. & Rouas-Freiss, N. HLA-G: from biology to clinical beneficts. **Trens. Immunol.**, **9**:125-32.2008.
- Chen, X.Y.; Yan, W.H.; Lin, A.; Xu, H.H.; Zhang, J.H.; Wang, X.X. The 14 bp deletion polymorphisms in HLA-G gene play an important role in the expression of soluble HLA-G in plasma. **Tissue Antigens** .**72**; 335–341.2008.
- Crispim JC, Mendes-Junior CT, Wastowski IJ, Costa R, Castelli EC, Saber LT, Donadi EA. Frequency of insertion/deletion polymorphism in exon 8 of HLA-G and kidney allograft outcome. **Tissue Antigens**. **71(1)**:35-41.2007.
- Crispim JC, Duarte RA, Soares CP, Costa R, Silva JS, Mendes-JÚnior CT, *et al.* Human leukocyte antigen-G expression after kidney transplantation is associated with a reduced incidence of rejection. **Transplant Immunol** .**18**: 361–7.2008.
- Glas J, Török HP, Tonenchi L, Wetzke M, Beynon V, Teshome MY, Cotofana S, Schiemann U, Griga T, Klein W, Epplen JT, Folwaczny C, Folwaczny M, Mussack T, Weiss EH. The 14-bp deletion polymorphism in the HLA-G gene displays significant differences between ulcerative colitis and Crohn's disease

- and is associated with ileocecal resection in Crohn's disease. **Int Immunol**, **19(5)**:621-6.2007.
- Guillard, C.; Zidi, I.; Marcou, C.; Menier, C.; Carosella, E.D. & Moreau, P. Role of HLA-G in innate immunity through direct activation of NK- κ B in natural killer cells. **Mol Immunol.**, **45**:419-427.2008.
- Harrison GA, Humphrey KE, Jakobsen IB, Cooper DW. A 14 bp deletion polymorphism in the HLA-G gene. **Hum Mol Genet** . **2**:2200.1993
- Hunt, J.S. Stranger in a strange land. **Immunol Rev**, **213**: 36–47.2006.
- Hunt, J.S. & Langat, D.L. HLA-G: a human pregnancy-related immunomodulator. **Current Opinion in Pharmacology**, **9**: 462-469. 2009.
- Hviid TV, Hylenius S, Hoegh AM, Kruse C, Christiansen OB. HLA-G polymorphisms in couples with recurrent spontaneous abortions. **Tissue Antigens**, **60**: 122–132.2002.
- Hviid, TV; Hylenius, S; Rorbye, C; Nielsen, LG. HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels. **Immunogenetics**, **55**:63–79.2003.
- Hviid, TV; Hylenius, S; Lindhard. A; Christiansen OB. Association between human leukocyte antigen-G genotype and success of in vitro fertilization and pregnancy outcome. **Tissue Antigens**, **64**: 66–9.2004.
- Hviid, TV & Christiansen OB. Linkage disequilibrium between human leukocyte antigen (HLA) class II and HLA-G—possible implications for human reproduction and autoimmune disease. **Hum Immunol**. **66**:688–99.2005.
- Hviid, TV. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. **Hum Reprod Update**, **12**: 209–32.2006.
- Hylenius S, Andersen AM, Melbye M, Hviid TV. Association between HLA-G genotype and risk of pre-eclampsia: a case-control study using family triads. **Mol Hum Reprod**, **10**: 237–46.2004.
- Kirisits, M.J.; Kunz, H.W. & Gill, T.J. Analysis of the sequence similarities of classical and non-classical class I genes. In **HLA 1991, Vol 1** (Eds) Tsuji, M.; Aizawa, M. & Sasuzuki, T. pp. 1021-1030. Oxford: Oxford University Press. 1992.
- La Nasa G, Littera R, Locatelli F, Lai S, Alba F, Caocci G, et al. The human leucocyte antigen-G 14-basepair polymorphism correlates with graft-versus-host disease in

- unrelated bone marrow transplantation for thalassaemia. **Br J Haematol** .**139**:284–8.2007.
- Le Bouteiller, P.; Tabiasco, J. & Parinaud, J. Soluble HLA-G and embryo implantation: frequently asked questions. **Gynecol Obstet Invest**, **64**:134-137. 2007.
- Le Rond S, Azema C, Krawice-Radanne I, Durrbach A, Guettier C, Carosella ED, Rouas-Freiss N. Evidence to support the role of HLA-G in allograft acceptance though induction of immunosuppressive/regulatory T cells. **J Immunol** .**176**:3266–76.2006.
- Lila N, Amrein C, Guillemain R, Chevalier P, Fabiani JN, Carpentier A. Soluble human leukocyte antigen-G: A new strategy for monitoring acute and chronic rejection after heart transplantation. **J Heart Lung Transplant** . **26**:412–22.2007.
- Lila, N.; Carpentier A; Amrein C, et al. Implication of HLA-G molecule in heart-graft acceptance. **Lancet**; **355**: 2138.2000.
- McEvoy BP, Montgomery GW, McRae AF, Ripatti S, Perola M, Spector TD, Cherkas L, Ahmadi KR, Boomsma D, Willemsen G, Hottenga JJ, Pedersen NL, Magnusson PK, Kyvik KO, Christensen K, Kaprio J, Heikkilä K, Palotie A, Widen E, Muilu J, Syvänen AC, Liljedahl U, Hardiman O, Cronin S, Peltonen L, Martin NG, Visscher PM. Geographical structure and differential natural selection among North European populations. **Genome Res.** **19(5)**:804-14.2009.
- McIntire, R.H. & Hunt, J.S. Antigen presenting cells and HLA-G – A Review. **Placenta**, **26**: Suppl A:S104-9. 2005.
- Mendes-Junior CT, Castelli EC, Simões RT, Simões AL & Donadi EA. HLA-G 14-bp polymorphism at exon 8 in Amerindian populations from the Brazilian Amazon. **Tissue Antigens**, **69**:255–260.2007.
- Moreau P, Contu L, Alba F, Lai S, Simoes R, Orrù S, Carcassi C, Roger M, Rabreau M, Carosella ED. HLA-G gene polymorphism in human placentas: possible association of G*0106 allele with preeclampsia and miscarriage. **Biol Reprod**, **79(3)**:459-67.2008.
- Paul P, Rouas-Freiss N, Khalil-Daher I, Moreau P, Riteau B, Le Gal FA, et al. HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance. **Proc Natl Acad Sci U S A** ;**95**:4510–5.1998.

- Pistoia, V.; Morandi, F.; Wang, X. & Ferrone, S. Soluble HLA-G: Are They Clinically Relevant? **Semin Cancer Biol.**, **17(6)**: 469–479.2007.
- Ponte, M.; Cantoni, C.; Biassoni, R.; Tradori-Cappai, A.; Bentivoglio, G.; Vitale, C.; Bertoni, S.; Moretta, A.; Moretta, L. & Mingari, M.C. Inhibitory receptors sensing HLA-G1 molecules in pregnancy: decidua-associated natural killer cells express LIR-1 and CD94/NKG2A and acquire p49, an HLA-G1 –specific receptor. **Proc Natl Acad Sci USA**, **96**: 5674–9. 1999.
- Rajagopalan, S. & Long, E.O. A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. **J. Exp. Med.**, **189**: 1093-1100. 1999
- Rouas-Freiss, N.; Goncalves, R.M.-B.; Menier, C.; Dausset, J. & Carosella, E.D. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cell cytotoxicity. **Proc Natl Acad Sci USA**, **94**:11520–11525.1997.
- Rizzo, R.; Hviid, T. V. F.; Govoni, M; Padovan, M; M. Rubini, L. Melchiorri, M. Stignani, S. Carturan, M. T. Grappa, M. Fotinidi, S. Ferretti, A. Voss, H. Laustrop, P. Junker, F. Trotta & O. R. Baricordi. HLA-G genotype and HLA-G expression in systemic lupus erythematosus: HLA-G as a putative susceptibility gene in systemic lupus erythematosus. **Tissue Antigens** .**71**; 520–529.2008.
- Santos SE, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-Dos-Santos AK, Hutz MH, Tovo-Rodrigues L, Salzano FM, Callegari-Jacques SM. Autosomal STR analyses in native Amazonian tribes suggest a population structure driven by isolation by distance. **Hum Biol** .**81(1)**:71-88. 2009.
- Segat L; Catamo E; Fabris A; Padovan L; Morgutti M; Crovella S. HLA-G 3' UTR haplotypes and HIV vertical transmission. **AIDS**. **23**:1911–1922.2009.
- Shirioishi, M.;Tsumoto, K. & Amano,K. Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. **Proc Natl Acad Sci USA**, **100**: 8856–61. 2003.
- Tan Z, Shon Am & Ober C. Evidence of balancing selection at the HLAG promoter region. **Human Molecular Genetics**, **14(23)**:3619–3628.2005.
- Tripathi, P. & Agrawal, S. The role of human leukocyte antigen E and G in HIV infection. **AIDS**, **21**:1395–1404.2007.

- Tripathi P, Abbas A, Naik S, Agrawal A. Role of 14-bp deletion in the HLA-G gene in the maintenance of pregnancy. **Tissue Antigens**, **64**: 706-710.2004.
- Veit, TD, Cordeiro EAA, Mucenic T, Monticelo OA, Brenol JCT, Xavier RM , Delgado-Cañedo A and Chies JAB. Association of the HLA-G 14 bp polymorphism with systemic lupus erythematosus. **Lupus**,; **18**; 424.2009.
- Yan WH, Lin A, Li M, Xu HH, Zhang ZP & Wang XX. Analysis of the 14 bp insertion and deletion polymorphism in human leukocyte antigen-G gene in two Chinese ethnic populations. **Tissue Antigens**, **7**:227–233. 2008.
- Yan WH, Lin A, Chen XJ, Dai MZ, Gan LH, Zhou MY, et al. Association of the maternal 14-bp insertion polymorphism in the HLA-G gene in women with recurrent spontaneous abortions. **Tissue Antigens**. **68**:521–3.2006
- Zheng,XQ; Zhu, F.; W.-W. Shi, A. Lin & W.-H. Yan. The HLA-G 14 bp insertion/deletion polymorphism is a putative susceptible factor for active human cytomegalovirus infection in children. **Tissue Antigens**, **74**:317–32.2009.