UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PATRÍCIA PINHO DE FRANÇA

O POLIMORFISMO DOS GENES *MICA* E *MICB* E O ABORTAMENTO RECORRENTE

CURITIBA
2008

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

PATRÍCIA PINHO DE FRANÇA

O POLIMORFISMO DOS GENES *MICA* E *MICB* E O ABORTAMENTO RECORRENTE

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas com Ênfase em Genética, Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas com Ênfase em Genética.
Orientadora: Profa. Dra. Maria da Graça Bicalho

CURITIBA

2008

A todos os casais que sonham com a experiência do nascimento de um filho.

AGRADECIMENTOS

Aos casais que sofrem com abortos espontâneos de repetição e se disponibilizaram em participar do grupo Paciente deste estudo, doando sangue e cedendo as informações necessárias para a concretização do presente trabalho.

Aos casais que participaram do grupo Controle deste estudo, através da doação de sangue e de informações pertinentes a esta pesquisa.

Aos meus queridos pais, Giselle de Pinho Costa e Reinhard Pawelletz, que me concederam todas as formas de apoio possível para o meu ingresso, desenvolvimento e conclusão no mestrado. Desde o incentivo, a confiança em mim, a base psicológica de que precisei nos momentos de desespero e o apoio financeiro sem os quais seria impossível a realização deste trabalho. Além disso, à minha mãe que resolveu tantas dúvidas que tive com a língua portuguesa, cedendo tanto tempo para me atender e ajudar. Ao meu pai biológico, Élcio Eustáquio de Brito França, que me passou o contato de conhecidos que passaram pela situação de abortos ou que conheciam casais com esse perfil, pelas dicas de elaboração de texto e de argumentação.

À minha querida irmã, Paula Pinho de França, que me apoiou incondicionalmente durante os dois anos do meu mestrado, me fazendo companhia pessoalmente ou até pelo MSN durante várias madrugadas que passei estudando para as disciplinas do mestrado, analisando os dados do meu trabalho, escrevendo o projeto e a dissertação, além de me ajudar até mesmo no arranjo de algumas tabelas.

À minha amada avó, Geralda Guimarães, que por mais que faça tanto esforço para que eu volte para minha cidade natal, me deu todo apoio do qual precisei para a concretização do mestrado. A todos da minha família que tiveram grande importância para que eu continuasse em Curitiba e chegasse até o fim do mestrado, em especial meu amado irmão Wagner Wilson Pinho de França e minha querida prima Ana Regina Lima de Pinho.

Ao meu grande e amado companheiro, amigo e namorado, Fábio Carneiro Sterzelecki, ou Gaúcho, que ficou ao meu lado em todos os momentos, fáceis e

difíceis, me fez companhia durante várias noites e finais de semana na Universidade, me deu forças, carinho e incentivo que foram imprescindíveis para que eu conseguisse chegar até o fim. À minha segunda família, meu sogro, Remi José Sterzelecki e minha sogra, Carmensita Carneiro Sterzelecki, meus cunhados Priscila Kaniak, Gustavo Carneiro Sterzelecki, Alessandra Rollwagem e Raul Carneiro Sterzelecki, pelo carinho e incentivo, além da compreensão dos meus vários momentos de isolamento para estudar e resolver assuntos do mestrado durante os churrascos e outros eventos de família.

À minha querida orientadora, Maria da Graça Bicalho, pela oportunidade que me proporcionou em participar da equipe LIGH, pelos ensinamentos, pelos congressos e eventos dos quais participei, pelas tão produtivas reuniões do laboratório, pela confiança em mim, pelas festas, pelo carinho e apoio. Minha conterrânea que tanto admiro por sua postura ética, humana e profissional.

Aos meus queridos colegas de pós-graduação, especialmente, Caroline Bernardi, Carolina Sens, Dellyana Boberg, Márcia Oliveira, Thaís Saad, Renata Rodrigues, Fábio Rigoti, Clineu Julien, Vítor Dantas, Danillo Gardenal, Márcia Holsbach, Danielle Kazue, Hugo Alves, Márcio Moraes, Marcos Maciel, Daniele Matoso, Rafael Vargas e Virgínia Coser que, principalmente, durante o primeiro ano de disciplinas da pós, foram fundamentais no meu crescimento acadêmico e pessoal. Além disso, por tantas ajudas, sejam elas conversa de corredor ou em frente ao computador e pelas festas que nos divertimos juntos.

Às minhas queridas colegas Caroline Bernardi (Carol), Dellyana Boberg (Delly), Márcia Oliveira (Má), Renata Rodrigues (Rê) e Danielle Kazue (Dani) que se tornaram grandes amigas, presentes em todos os momentos durante o mestrado: nas aulas, nos tão rentáveis estudos na casa de uma de nós, nas noites e finais de semana no Departamento de Genética, nos “cafofos” e nas várias festas que participamos e organizamos juntas. Foram amigas de fundamental importância para a realização deste trabalho, com as quais, as vindas e estadias na Universidade foram tão prazerosas e produtivas.

Às professoras Eleidi Chautard-Freire-Maia, Valéria Roxo e Eni Bompeixe, que participaram da minha banca de acompanhamento e/ou banca de avaliação, pelas várias sugestões dadas, correções e auxílio que foram imensamente

importantes neste trabalho.

Aos professores do Departamento de Genética que ministraram disciplinas as quais foram de extrema importância para minha vida acadêmica (professoras Chirlei Glienke, Marina de Almeida, Enilze Ribeiro, Maria Luiza Petzl-Erler, Maria da Graça Bicalho, Lygia Galli e professores Ives Sbalqueiro, Erasto Villa Branco, João Carlos Magalhães, Iglenir João Cavalli e Ricardo Lehtonen).

A todos os professores do Departamento de Genética que organizaram os ótimos seminários e ajudam para que o programa da Pós-Graduação esteja sempre em melhoria, propiciando aos alunos excelentes condições de pesquisa, aulas e momentos de prazer, como as inesquecíveis festas. Ao querido professor e amigo Elias Karam Junior, por tanto apoio, carinho, momentos de alegria e cuidados comigo.

Às secretárias do Departamento, Valéria Romeiro, e da pós-graduação, Luciana Marques, por todo carinho, amizade, apoio e fundamentais ajudas em tantos problemas que levamos a elas.

À equipe LIGH:

Fernanda Ribas, por toda ajuda dada desde o início da confecção do projeto até o fim das análises dos dados com os genes estudados, por me ensinar as técnicas SSP e SSOP e a utilizar o programa *HLAVisual*, por me auxiliar nas PCR, na análise dos dados e por sua conduta ética que tanto admiro, sou intensamente grata.

Márcio Moraes por perder grande parte do seu tempo me ajudando com a parte estatística, dando-me uma verdadeira aula, pela paciência, apoio, incentivo e pela companhia agradável nas várias festas juntos.

Clineu Julien que, além de admirável profissional e colega, tornou-se um grande amigo, ajudando-me (e a todo mundo) em todas as situações possíveis, nas aulas, nas discussões de artigos e trabalhos acadêmicos, na coloração dos géis com brometo de etídeo, entre várias outras ajudas.

Alessandro Pirre, cuja presença no laboratório é intensamente marcante, seja na manutenção da organização do laboratório ou seja nos momentos de descontração, agradeço a toda ajuda dada, desde o ensinamento de como fazer solução de TBE, até nas vezes que me cedeu géis de agarose, além de sua

amizade, companhia em todas as festas e momentos tão engraçados;

Rafael Vargas, que também se tornou um grande amigo, além de ter me ajudado em vários momentos, como na discussão do projeto, na extração do DNA e pela companhia nos finais de semana e à noite no laboratório;

José Luiz, que me ensinou a “tirar *buffy*”; Marina Xavier, na extração de DNA; Paulo Costantino, por tantas dicas e ajudas laboratoriais; Gorete Ynaquievi, por tantas ajudas e companhia durante várias noites no laboratório; Pablo Santos, pelos artigos que me enviou diretamente da Alemanha; Isabel Moreira, pela companhia durante a noite no laboratório e por mantê-lo tão limpo e organizado, e a todos os outros que colaboraram de alguma forma com o desenvolvimento desta pesquisa, dando dicas, ajudas no laboratório e apoio: Sônia Machado, Fabiana Poerner, Téo Ruiz, Anna Oliveira, Sibelle Mattar, Cláudia Schuertz, Savana Lima, Carolina Sens, Dani Kazue, Renate Von Linsingen, Eni Bompeixe, Izolde Gaertner, Suelen Zeck, Fabrícia e Waldir.

Ao convênio FUNPAR-LIGH, à Capes e à Fundação Araucária, pelo auxílio financeiro.

‘’Un enfant si je veux, quand je veux’’
Mais ‘‘quand je veux, je peux?’’
Sylvie Epelboin

RESUMO

As moléculas solúveis MIC (sMIC) dos genes relacionados às cadeias MHC de classe I (*MICA* e *MICB*) são constitutivamente transcritas na placenta humana durante uma gravidez normal, e uma desregulação nessa produção de sMIC na decídua pode resultar em abortos recorrentes espontâneos (ARE), podendo estar associada ao polimorfismo dos genes *MICA* e *MICB.* O processo reprodutivo em mamíferos está relacionado à cooperação entre as células *Natural Killer* uterinas (uNK) maternas e as células do trofoblasto fetal. O feto é considerado um enxerto semi-alogênico, uma vez que metade de sua composição genética é do pai, portanto, existem mecanismos imunológicos que evitam a rejeição do feto pela mãe. Os genes *MICA* e *MICB* estão localizados dentro da região *MHC* de classe I no cromossomo 6 e são polimórficos, embora a relevância funcional e implicações desse polimorfismo não sejam bem compreendidas. As proteínas MIC são ligantes dos receptores NKG2D e receptores de células $T_{\gamma\delta}$ ($TCR_{\gamma\delta}$). NKG2D são receptores ativadores presentes na superfície das células NK, T $CD8_+$ e $T_{\gamma\delta}$ e a sua interação com seus ligantes pode desencadear uma atividade citolítica e a produção de citocinas. A interação de MIC com NKG2D foi proposta como um sistema que participa na vigilância imune a tumores epiteliais. Acredita-se que os tumores possam escapar da imunidade mediada por MIC-NKG2D pela liberação de moléculas sMIC, impedindo o funcionamento das células efetoras. Foi sugerido que esse mecanismo de hipo-regulação do NKG2D, a partir da liberação de sMIC, em tumores seja similar ao que ocorra durante uma gravidez bem sucedida, como um escape fetal ao sistema imune materno. Portanto, MIC tem sido associado ao estado de imunotolerância durante a gravidez, e falhas nesse mecanismo podem resultar em ARE. O presente trabalho teve como objetivo avaliar se o polimorfismo dos genes *MICA* e *MICB* está associado ao ARE, comparando-se as freqüências alélicas e haplotípicas de *MICA* e *MICB* entre 70 casais pacientes com ARE e 65 casais controles com pelo menos duas gestações bem sucedidas, todos do sul do Brasil. A tipagem do gene *MICA* foi feita pela técnica PCR-SSOP e PCR-SSP, a última utilizada para resolver ambigüidades genotípicas encontradas com a técnica PCRSSOP, e para o gene *MICB* a tipagem foi feita pela técnica PCR-SSP. Foi encontrada uma associação significativa entre alelo *MICA*004* e o ARE, sendo que os casais cujas mulheres portam esse alelo, e seus respectivos parceiros não, recebem um efeito protetor de *MICA*004* contra o ARE, em cerca de 3 vezes mais que casais contendo outras combinações alélicas *MICA.* Porém, o compartilhamento do alelo *MICA*004* entre os cônjuges aumenta o risco ao ARE em cerca de 8 vezes. *Os* alelos *MICA*001* e *MICB*003* indicaram uma tendência em estarem mais presentes em indivíduos controles que pacientes, enquanto o alelo *MICA*011* demonstrou um efeito contrário, apesar das diferenças não terem sido significativas ($0,10 > p > 0,05$). Possivelmente proteínas sMICA*004 sejam mais eficientes na hipo-regulação de NKG2D que outras proteínas MICA, desde que o pai e a mãe não compartilhem o alelo *MICA*004*, e, portanto, a manipulação da via MIC-NKG2D pode

se tornar um alvo para o desenvolvimento de imunoterapias para o sucesso gestacional.

Palavras-Chave: Aborto Recorrente espontâneo; *MICA; MICB.*

ABSTRACT

The class I chain-related genes (*MICA* and *MICB*) soluble molecules (sMIC) are constitutively transcribed at the human placenta during normal pregnancy and a sMIC production deregulation can result in recurrent spontaneous abortions (RSA) and it may be associated with *MICA* and *MICB* genes polymorphisms. The reproductive process in mammals is related to cooperation between the maternal uterine Natural Killer cells (uNK) and the fetal trophoblast cells. The fetus is considered a semi-allograft, since half of its genetic composition is from its father, therefore, there are immune mechanisms that prevent the fetus rejection by the mother. The *MICA* and *MICB* genes are located within the *MHC* class I region of chromosome 6 and they are polymorphic, although the relevance and implications of this functional polymorphism are not well understood. The MIC proteins are ligands for NKG2D receptors and $T_{\gamma\delta}$ cell receptor ($TCR_{\gamma\delta}$). NKG2D activating receptors are presents on the NK, T $CD8_+$ and $T_{\gamma\delta}$ cells surface, and the interaction with its ligands can trigger a cytolytic activity and the cytokines production. The MIC - NKG2D interaction was proposed as a system that participates in the immune surveillance of epithelial tumors. It is believed that the tumors can escape of immunity mediated MIC-NKG2D by the release of sMIC molecules, preventing the effector cells function. It was suggested that the NKG2D downregulation mechanism because of the tumor's cells sMIC release is similar to that which occurs during successful pregnancy, as an fetal escape to the maternal immune system. Therefore, *MIC* has been linked to the immunotolerant state during pregnancy, and this mechanism failure can result in RSA. This study aimed to evaluate whether the *MICA* and *MICB* genes polymorphism are associated with RSA, comparing the *MICA* and *MICB* allelic and haplotypic frequencies between 70 patients couples with RSA and 65 controls couples with at least two successful pregnancies, all from the south of Brazil. The *MICA* gene typing was performed by PCR-SSOP and PCR-SSP techniques, the latter used to resolve genotypic ambiguities found with the PCR-SSOP, and the *MICB* gene typing was done by the PCR-SSP. We found a significant effect of the *MICA*004* allele and RSA, once that women whose have this allele, and their partners don't, receive a protective effect of *MICA*004* against RSA, at around 3 times more than couples with other allelic *MICA* combinations. However, the *MICA*004* share between spouses increases the risk to ARE in about 8 times. The *MICA*001* and *MICB*003* alleles seem to be more present in control individuals than in patients, while the *MICA*011* allele showed a contrary effect, despite the differences were not significant ($0.10 > p > 0.05$). Possibly, sMICA*004 proteins are more efficient in the NKG2D downregulation that other sMICA proteins, since father and mother did not share *MICA*004* allele, and therefore the MIC-NKG2D mechanism management may become a target for development of immunotherapies for gestational success.

Keywords: Recurrent spontaneous miscarriage; *MICA*; *MICB*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 – MAPA DO COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE (*MHC*) HUMANO ----------28
FIGURA 02 – DISPERSÃO GENÔMICA DO GENES *MHC-I* E DOS RELACIONADOS AO *MHC* DE CLASSE I EM CROMOSSOMOS HUMANOS ---------- -----28
FIGURA 03 – ESTRUTURA DAS PROTEÍNAS MHC DE CLASSE I E DE CLASSE II-------- ----30
FIGURA 04 – ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DE UMA PROTEÍNA MHC DE CLASSE I -----31
FIGURA 05 – GENES E PSEUDOGENES DA FAMÍLIA *MIC* AO LONGO DA REGIÃO DE CLASSE I DO *MHC* HUMANO ----------35
FIGURA 06 – LOCALIZAÇÃO DE *MICA* E *MICB* EM COSMÍDEOS CLONADOS ---------- ----35
FIGURA 07 – REPRESENTAÇÃO DOS DOMÍNIOS DA CADEIA α1 DE MICA E COMPARAÇÃO COM OS DOMÍNIOS DA CADEIA α1 DE HLA-A ----------37
FIGURA 08 – ORGANIZAÇÃO ÉXON-ÍNTRON DO GENE *MICA* E COMPARAÇÃO COM A ESTRUTURA DE GENES *MHC* DE CLASSE I ----------37
FIGURA 09 – COMPARAÇÃO DA ORGANIZAÇÃO ÉXON-ÍNTRON DOS GENES *MICA, MICB* E *HLA-A* ---------- -----38
FIGURA 10 – ESTRUTURA DO COMPLEXO NKG2D E MICA ---------- ----54
FIGURA 11 – TECIDO UTERINO E INVASÃO DO TROFOBLASTO ----------57
FIGURA 12 – AS DUAS COMUNICAÇÕES IMUNOLÓGICAS ENTRE A MÃE E O FETO DURANTE A REPRODUÇÃO HUMANA ----------58
FIGURA 13 – EXEMPLO DE ANÁLISE DA TIPAGEM ALÉLICA DO GENE *MICA* POR SSOP PELO PROGRAMA *HLA* Visual, VERSÃO 2.0 ---------- -----67
FIGURA 14 – INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DO GEL DE ELETROFORESE ---------69
FIGURA 15 – GEL DE AGAROSE A 2,5% CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO DE 40 INDIVÍDUOS DA AMOSTRA PACIENTE ----------86
FIGURA 16 – GEL DE AGAROSE A 2,5% CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO DE 40 INDIVÍDUOS DA AMOSTRA PACIENTE, APRESENTANDO PROBLEMAS NA AMPLIFICAÇÃO ---------- ----87

LISTA DE QUADROS

QUADRO 01 – DESIGNAÇÕES DOS ALELOS *MICA* ----------42
QUADRO 02 – VARIAÇÃO NUCLEOTÍDICA DE *MICA* ----------46
QUADRO 03 – DESIGNAÇÕES DOS ALELOS *MICB* ----------47
QUADRO 04 – VARIAÇÃO NUCLEOTÍDICA DE *MICB* ----------49
QUADRO 05 – SEQÜÊNCIAS DE OLIGONUCLEOTÍDEOS DE *MICA* ----------69
QUADRO 06 – SEQÜÊNCIAS DE OLIGONUCLEOTÍDEOS DE *MICB* ----------75
QUADRO 07 – MIXES DE OLIGONUCLEOTÍDEOS *SENSE* E *ANTISENSE* USADOS PARA IDENTIFICAR OS ALELOS *MICA* ----------76
QUADRO 08 – MIXES DE OLIGONUCLEOTÍDEOS *SENSE* E *ANTISENSE* USADOS PARA IDENTIFICAR OS ALELOS *MICB* ----------79
QUADRO 09 – *WORKSHEET* DE *MICB* ----------80
QUADRO 10 – VALORES PARA CÁLCULO DE *ODDS RATIO* ----------83
QUADRO 11 – REPRESENTAÇÃO POR LETRAS DAS POSSIBILIDADES ALÉLICAS DO GENE *MICA* CONSIDERADAS DURANTE AS TIPAGENS GENOTÍPICAS ----88
QUADRO 12 – MIXES UTILIZADOS PARA SOLUCIONAR AS AMBIGÜIDADES GERADAS PELA TÉCNICA PCR-SSPO ----------89
QUADRO 13 – *WORKSHEET* DE INTERPRETAÇÃO DE SEIS GENÓTIPOS DO GENE *MICB* ----------96

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 01 – FREQÜÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE *MICA* EM PACIENTES COM ARE E EM CONTROLES----------94
GRÁFICO 02 – FREQÜÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE *MICB* EM PACIENTES COM ARE E EM CONTROLES----------97
GRÁFICO 03 – FREQÜÊNCIAS HAPLOTÍPICAS DE PACIENTES COM ARE E DE INDIVÍDUOS CONTROLES ----------100
GRÁFICO 04 – FREQÜÊNCIAS DOS DOS QUATRO TIPOS DE CASAIS PACIENTES E CONTROLES EM RELAÇÃO À PRESENÇA OU AUSÊNCIA DOS PRINCIPAIS ALELOS DO GENE *MICA* ----------106
GRÁFICO 05 – FREQÜÊNCIAS DOS QUATRO TIPOS DE CASAIS PACIENTES E CONTROLES EM RELAÇÃO À PRESENÇA OU AUSÊNCIA DOS PRINCIPAIS ALELOS DO GENE *MICB* ----------107
GRÁFICO 06 – FREQÜÊNCIAS DOS DOS QUATRO TIPOS DE CASAIS PACIENTE E CONTROLE EM RELAÇÃO À PRESENÇA OU AUSÊNCIA DOS PRINCIPAIS HAPLÓTIPOS *MICA_MICB* ----------112

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 – IDADE MÉDIA DOS CASAIS CONTROLES E PACIENTES AO TEREM O PRIMEIRO FILHO (CONTROLES) OU O PRIMEIRO ABORTO (PACIENTES) E AO TEREM O ÚLTIMO FILHO (CONTROLES) OU O ÚLTIMO ABORTO RELATADO (PACIENTES); NÚMERO MÉDIO DE FILHOS (CONTROLES) OU ABORTOS (PACIENTES ----------85

TABELA 02 – FREQÜÊNCIAS DE INDIVÍDUOS PACIENTES COM ARE E CONTROLES COM OS RESPECTIVOS ALELOS *MICA* EM HOMOZIGOSE ---------- ----98

TABELA 03 – FREQÜÊNCIAS DE INDIVÍDUOS PACIENTES COM ARE E CONTROLES COM OS RESPECTIVOS ALELOS *MICB* EM HOMOZIGOSE ----------100

TABELA 04 – HAPLÓTIPOS *MICA_MICB* EM DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO DE INDIVÍDUOS DA AMOSTRA PACIENTE, QUANDO Δ' > 0,5 OU Δ' < -0,5 ------103

TABELA 05 – HAPLÓTIPOS *MICA_MICB* EM DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO DE INDIVÍDUOS DA AMOSTRA CONTROLE QUANDO Δ' > 0,5 OU Δ' < -0,5 -----104

TABELA 06 – *p VALUE* VALOR DE *p* CALCULADO PARA COMPARAÇÃO DAS FREQÜÊNCIAS DOS QUATRO TIPOS DE CASAIS PACIENTES E CONTROLES EM RELAÇÃO À PRESENÇA OU AUSÊNCIA DOS PRINCIPAIS ALELOS DE *MICA* (TABELA DE CONTINGÊNCIA 4 X 2 - G.L. = 3) ----------105

TABELA 07 – VALOR DE *p* CALCULADO PARA COMPARAÇÃO DAS FREQÜÊNCIAS DOS QUATRO TIPOS DE CASAIS PACIENTES E CONTROLES EM RELAÇÃO À PRESENÇA OU AUSÊNCIA DOS PRINCIPAIS ALELOS DE *MICB* (TABELA DE CONTINGÊNCIA 4 X 2 - G.L. = 3) ----------105

TABELA 08 – FREQÜÊNCIA ABSOLUTA DE CASAIS CONTROLES E PACIENTES S ♀ N ♂ E VALOR DE *ODDS RATIO* ---------- ----------109

TABELA 09 – *p* CALCULADO PARA COMPARAÇÃO DAS FREQÜÊNCIAS DOS QUATRO TIPOS DE CASAIS PACIENTE E CONTROLE EM RELAÇÃO À PRESENÇA OU AUSÊNCIA DOS PRINCIPAIS HAPLÓTIPOS ENTRE AMOSTRAS PACIENTE E CONTROLE (TABELA DE CONTINGÊNCIA 4 X 2 – G.L.3) ------112

TABELA 10 – FREQÜÊNCIAS DOS ALELOS *MICA* EM HOMOSIGOSE E COMPARAÇÃO ENTRE CASAIS PACIENTES COM ARE E CONTROLES---------- ------114

TABELA 11 – FREQÜÊNCIAS DOS ALELOS *MICB* EM HOMOSIGOSE E COMPARAÇÃO ENTRE CASAIS PACIENTES COM ARE E CONTROLE---------- -----114

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	– Célula Apresentadora de antígeno (*Antigen Presenting Cell*)
ARE	– Abortamento Recorrente Espontâneo
BD	– Doença de Behçet
Bf	– fator B
β_2m	– β_2-microglobulina
C	– Domínio constante (*Constant domain*)
CTB	– Citotrofoblasto
CYP21B	– Enzima 21-hidroxilase
DO	– Densidade óptica
EA	– Espondilite Anquilosante
EM	– maximização de expectativa
EPCR	– Receptor C de proteína C ativada de células endoteliais
FcRn	– Receptor Fc neonatal(FCGRT)
FIV	– Fertilização *in vitro*
G	– Domínios da fenda de ligação (*Groove domain*)
GH	– Hormônio do Crescimento (*Growth hormone*)
HFE	– Proteína da Hemocromatose
HLA	– Antígeno leucocitário humano (*Human Leukocyte Antigen*)
HRE	– Elementos de resposta de choque térmico (H*eat Shock Response Element)*
HS	– Proteína de choque térmico
IFN-γ	– Interferon γ
Igs	– Imunoglobulinas
IgSF	– Superfamília das Imunoglobulinas
LAIR	– receptores semelhantes a Igs associados a leucócitos
LIR	– Receptores semelhantes a Igs de leucócitos
LRC	– Complexo de receptores leucocitários
LTA	– Linfotoxina A
LTB	– Linfotoxina B

ITAM – Imunoreceptor com motivos de ativação baseados em tirosina (*immunoreceptor tyrosine based activation motif*)

ITIM – Imunorreceptor com motivos de inibição baseados em tirosina (*immunoreceptor tyrosine based inhibitory motif*)

KIR – Receptores semelhantes a Igs de células NK (*Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors*

LRC – Complexo dos receptores leucocitários (*Leukocyte receptor complex*)

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex)*

MHC - I – Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe I

MHC - II – Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe II

MhcSF – Superfamília MHC

MIC – Genes Relacionados a Cadeias *MHC* de classe I (*MHC Class I Chainrelated*)

MICA – Gene A relacionado à cadeia *MHC* de classe I

MICB – Gene B relacionado à cadeia *MHC* de classe I

NK – Célula *Natural Killer*

NKC – Complexo de assassinas naturais (*Natural Killer complex*)

OR – Razão de probabilidades (*Odds Ratio*)

ORF – Matriz de Leitura Aberta (*Open Reading Frame*)

PBMC – Células Mononucleares do Sangue Periférico (*Peripheral Blood Mononuclear cell*)

PCR-SSOP – Reação em Cadeia da Polimerase - sondas com oligonucleotídeos de seqüência específica (*Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotide Probes)*

PCR-SSP – Reação em Cadeia da Polimerase - Oligonucleotídeos de seqüência específica (*Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Primers*

PCR-SBT – Reação em Cadeia da Polimerase – Tipagem baseada em sequenciamento (*Polymerase Chain Reaction – sequencing based typing*)

PSA – artrite psoriática

RR – Risco Relativo

sMIC – Forma Solúvel da Proteína MIC (*Soluble MIC*)

SAPE – Conjugado de R-Phycoerythrina/Streptavidina

STB – Sinciciotrofoblasto

STR – Curta Seqüência Repetida em Tandem (*Short Tandem Repeat Sequence*)

TAP – Transportador Associado com o Processamento de Antígenos

TCR – Receptores de Células T (*T-cell Receptor*)

Th1 – Linfócitos T auxiliares do tipo 1 (T-Helper Type 1 Lymphocytes)

Th2 – Linfócitos T auxiliares do tipo 2 (T-Helper Type 2 Lymphocytes)

TLR – *Toll-like receptors*

UC – Cromatina não relacionada (*Unrelated Chromatin*)

uNK – Célula *Natural Killer* uterina (*Uterine Natural Killer*)

ULBP – Proteínas ligantes de UL-16

UTR – Região não traduzida (U*ntranslated Region*)

V – Domínio variável

WHO – Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*)

ZAG – Glicoproteína1 α-2 ligada ao zinco (AZGP-1)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO ----------22

2. REVISÃO DE LITERATURA ----------24

2.1. ABORTAMENTO ESPONTÂNEO ----------24

2.2. CONSIDERAÇÕES IMUNOGENÉTICAS E COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE (MHC) ----------26

2.2.1. Genes *MICA* e *MICB* ----------34

2.3. *MICA* E *MICB* NO ABORTAMENTO RECORRENTE ESPONTÂNEO ----------55

3. OBJETIVOS ----------62

3.1. OBJETIVO GERAL--- ----------62

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS ----------62

4. MATERIAL E MÉTODOS ----------63

4.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA ----------63

4.2. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO ----------64

4.2.1. Cálculo da concentração do DNA---------- ----64

4.3. TIPAGEM DO GENE *MICA* PELA TÉCNICA PCR-SSOP----------64

4.4. TIPAGEM DOS GENES *MICA* E *MICB* PELA TÉCNICA PCR-SSP----------67

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA ----------81

4.5.1. Freqüências gênicas e haplotípicas ----------81

5. RESULTADOS ----------84

5.1. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS----------84

5.2. TIPAGEM DO GENE *MICA* ----------85

5.2.1. Técnica PCR-SSOP ----------85

5.2.2. Técnica PCR-SSP ----------88

5.2.3. Freqüências alélicas do gene *MICA* ----------93

5.3. TIPAGEM DO GENE *MICB* ----------94

5.3.1 Técnica PCR-SSP ----------94

5.3.2. Freqüências alélicas do gene *MICB* ----------97

5.4. EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG E HETEROZIGOSIDADE ----------98

5.5. FREQÜÊNCIAS HAPLOTÍPICAS *MICA_MICB* ----------99

5.6. DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS GENES *MICA* E *MICB* ----------102

5.7. ASSOCIAÇÃO ENTRE A DIVERSIDADE DOS GENES *MICA* E *MICB* E O ABORTAMENTO RECORRENTE ----------104

5.7.1. Freqüências dos tipos de casais com ARE e controles em relação à presença e ausência dos alelos *MICA* e *MICB* e freqüências dos alelos *MICA* e *MICB* em cada tipo de casal com ARE e controle ----------104

5.7.2. Freqüências dos tipos de casais com ARE e controles em relação à presença e ausência dos haplótipos *MICA_MICB*----------110

5.7.3. Homozigotos para os genes *MICA* e/ou *MICB* ----------112

6. DISCUSSÃO ----------115

7. CONCLUSÃO ----------150

8. REFERÊNCIAS ----------152

9. ANEXOS ----------166

1 INTRODUÇÃO

A gravidez em mamíferos é um fenômeno imunológico, no qual o feto não é rejeitado devido a vários mecanismos associados com modificações do estado imune da mãe.

Vários componentes celulares e moleculares que participam da resposta imune podem influenciar no insucesso reprodutivo em humanos. Muitos desses fatores são estudados sob uma perspectiva imunológica e identificados por análises imunológicas de anticorpos e/ou antígenos. Porém, estudos de imunologia juntamente com métodos moleculares podem proporcionar melhor reprodutibilidade, fidedignidade e precisão, além de permitir aos pesquisadores averiguarem como a expressão de determinados genes pode afetar a reprodução.

Verificações de genes expressos aberrantemente em pacientes com abortamento recorrente espontâneo (ARE) podem ajudar no prognóstico de gravidez de alto risco de aborto, permitindo um possível tratamento para esses casos.

Mecanismos imunogenéticos associados à reprodução em mamíferos, incluindo humanos, já foram descritos, e a descoberta de outros componentes relacionados ao Complexo Principal de Histocompatibilidade (*MHC*) de classe I envolvidos na reprodução, os gene *MICA* e *MICB*, levam à necessidade de se desenvolver um estudo caso-controle de ARE envolvendo esses locos.

Os genes MHC de classe I codificam glicoproteínas de superfície celular, que exercem a função de apresentadoras de peptídeos antigênicos às células T. Os genes *MIC* (genes relacionados a cadeias MHC de classe I) constituem uma segunda linhagem de genes não clássicos do MHC de classe I descoberta em 1994 por dois grupos de pesquisa independentes, um deles adotando a denominação *PERB11* que posteriormente caiu em desuso (BAHRAM *et al*., 1994; 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 (dentre eles, *HLA-E*, *-F*, *-G*, *HFE*, além de 12 pseudogenes) e pelos genes *MIC* (*MICA*, *MICB* e 5 pseudogenes) (HORTON *et al*., 2004).

As células *Natural Killer (*NK) compõem a população linfóide dominante na decídua desde os primeiros estágios da gravidez (DOSIOU e GIUDICE, 2005). Sua

presença e seu contato direto com o trofoblasto conferem às células NK um papel crucial na gravidez (CLARK *et al*., 1996). Além disso, essas células expressam o receptor NKG2D, um dos receptores que interagem com MICA e MICB (RAULET, 20003).

Foi descoberto um mecanismo de escape ao sistema imune, desempenhado por células tumorais, através da interação de moléculas solúveis MICA e MICB com seu receptor NKG2D de membrana das células NK e de células T. A averiguação da presença de proteínas MIC solúveis expressas pela placenta humana permite uma analogia entre um suposto escape fetal ao sistema imune materno em uma gravidez bem sucedida e esse mesmo mecanismo em tumores.

Portanto, o insucesso na reprodução humana, como abortamentos recorrentes espontâneos, pode estar diretamente relacionado a alguma falha nesse mecanismo de escape, englobando os genes *MICA* e *MICB*, em casais envolvidos em ARE.

O presente trabalho pretende investigar a existência de uma relação entre o polimorfismo dos genes *MICA* e *MICB* e o ARE, tendo como hipótese o fato de que as combinações entre alguns alelos paternos e maternos podem conferir predisposição ao aborto enquanto outras podem atribuir proteção.

Devida à grande diversidade alélica dos genes *MICA* e *MICB*, pouco estudada em populações brasileiras, investigações sobre o polimorfismo desses genes em casais brasileiros com ARE podem contribuir para o conhecimento dessa afecção e para a perspectiva do desenvolvimento de imunoterapias que resultem no sucesso reprodutivo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ABORTAMENTO ESPONTÂNEO

Muitos estudos têm demonstrado que vários processos celulares de regulação genética, imunológica, metabólica, vascular e endócrina são necessários para a manutenção de uma gravidez normal.

A regulação anormal desses processos pode causar abortos espontâneos, que se referem à perda da gravidez antes da vigésima semana de gestação, na ausência de procedimentos médicos ou cirúrgicos que interrompem uma gravidez (GRIEBEL *et al.*, 2005). Dá-se o nome de natimorto ao feto que morre após a vigésima semana de gestação, distinguindo essa ocorrência dos nascidos vivos e dos abortos espontâneos (Geary et al., 1997).

O abortamento espontâneo é a complicação mais comum de uma gravidez (BAEK, 2004), ocorrendo em 10-15% das concepções humanas (TULPPALA e YLIKORKALA, 1999), podendo essa taxa ser mais alta, aproximadamente 30%, visto que muitos abortos ocorrem espontaneamente antes da mulher reconhecer que está grávida (MOORE, 1994; GRIEBEL *et al.*, 2005). Além disso, em mulheres com idade superior a 40 anos o número de abortos pode atingir 41% (TULPPALA e YLIKORKALA, 1999).

Existem vários fatores de risco para os abortos espontâneos, como idade materna avançada, uso de álcool e de outras drogas, infecções maternas, anormalidades uterinas, aberrações cromossômicas, entre outros (GRIEBEL *et al.*, 2005). As aberrações cromossômicas ocorrem em 49% dos abortos espontâneos, sendo que as trissomias são as principais anomalias encontradas (52%), seguidas por poliploidias das quais as triploidias são responsáveis por cerca de 20% dos abortos e 6% são causados por tetraploidias, monossomia do X (13%) e menos freqüentemente aberrações cromossômicas estruturais (pouco mais que 3%) (GUERRA, 1988; GODDIJN e LESCHOT, 2000).

Para propósitos clínicos, os abortamentos espontâneos normalmente são divididos em sete subcategorias: aborto completo, quando todos os produtos de concepção são expelidos sem a necessidade de intervenção médica ou cirúrgica;

aborto incompleto, no qual alguns produtos de concepção não são eliminados, como partes do feto, placenta ou membranas; aborto inevitável, em que há dilatação do cérvix, porém o concepto não é expelido; aborto ausente, em que ocorre o falecimento do feto, mas nenhuma atividade uterina elimina os produtos de concepção; aborto séptico, um aborto espontâneo causado por infecções intra-uterinas; ameaça de aborto, quando a gravidez passa por complicações com sangramentos antes da vigésima semana de gestação; aborto recorrente espontâneo, quando ocorrem três ou mais perdas consecutivas da gravidez (GRIEBEL *et al.*, 2005). Há na literatura quem considere RSA quando 2 ou mais abortamentos espontâneos ocorrem (COULAM,1986), sendo essa a definição adotada para o presente trabalho.

O abortamento recorrente espontâneo (ARE) ocorre em aproximadamente 2-5% das gestantes (COULAM *et al.*, 1997), sendo essa uma freqüência mais alta do que a esperada ao acaso, uma vez que a chance de um aborto espontâneo ocorrer é próxima de 15%, portanto a probabilidade de um casal sofrer dois abortos consecutivos seria de $(15\%)^2$ ou 2,25% e três perdas consecutivas poderiam ocorrer em $(15\%)^3$ ou 0,34% dos casais, considerando-se a independência dos eventos.

Uma vez que o ARE ocorre mais freqüentemente do que se espera, vários estudos têm sido desenvolvidos a fim de identificar fatores que podem causá-lo. Dentre esses fatores já foram relatados aberrações cromossômicas, em 4-6% dos ARE (GODDIJN e LESCHOT, 2000), malformação congênita do útero, disfunções endócrinas (RAI *et al.*, 2000), distúrbios imunológicos (JABLONOWSKA *et al.*, 2002), infecções (GILES, 2003), anormalidades metabólicas e homeostáticas (COUMANS *et al.*, 1999) e outros fatores desconhecidos (BAEK *et al.*, 2002), esses em 40-60% dos ARE (DARMOCHWAL-KOLARZ *et al.*, 2002).

A partir da identificação das causas e mecanismos tolerância para perdas recorrentes de embriões “normais” os pesquisadores esperam encontrar mecanismos para prevenir a perda de todos os embriões cujo cariótipo é normal (CLARK *et al.*, 2001).

2.2 CONSIDERAÇÕES IMUNOGENÉTICAS E COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE (*MHC*)

A imunogenética estuda o impacto das variações genéticas de genes envolvidos com o sistema imune em determinadas condições clínicas, como doenças auto-imunes, transplantes, doenças infecciosas e processo reprodutivo.

As respostas imunológicas dependem da habilidade do sistema imune reconhecer moléculas estranhas, os antígenos, normalmente de patógenos potenciais ou proteínas próprias alteradas, e então organizar reações apropriadas para eliminar a fonte dos antígenos.

Os linfócitos T possuem os receptores de células T (TCR) que reconhecem antígenos apresentados pelas células apresentadores de antígenos (APCs). A capacidade das APCs apresentarem antígenos às células T é devida à presença de proteínas especializadas codificadas por genes presentes no complexo principal de histocompatibilidade (*MHC*) (ALAM *et al.,* 1996).

Inicialmente as proteínas do *MHC* foram identificadas como os principais antígenos reconhecidos durante o processo de rejeição a transplantes, que normalmente ocorre quando enxertos são transplantados entre indivíduos da mesma espécie (alo-enxerto) ou de espécies diferentes (xeno-enxerto) (ZINKERNAGEL e DOHERTY, 1979 *apud* ALBERTS *et al.,* 2002). Na década de 50, experimentos com transplante de pele entre camundongos de linhagens genéticas diferentes demonstraram que a rejeição a enxertos é uma resposta imune adaptativa do receptor contra antígenos estranhos a ele, presentes na superfície das células transplantadas (ZINKERNAGEL e DOHERTY, 1979 *apud* ALBERTS *et al.,* 2002).

O *MHC* foi, então, identificado como uma região cromossômica, cujos genes codificam os produtos responsáveis pela rejeição de transplantes entre linhagens de camundongos endogâmicos (ZINKERNAGEL e DOHERTY, 1979 *apud* ALBERTS *et al.,* 2002). Os genes responsáveis pelo reconhecimento de um enxerto como semelhante ou diferente do seu receptor foram chamados de genes de histocompatibilidade, e a região cromossômica onde esses genes localizam-se foi denominada complexo principal de histocompatibilidade (McDEVITT, 2000).

Durante quase 20 anos após a descoberta do *MHC*, sua única função documentada foi a rejeição a transplantes, porém os transplantes sabidamente não são processos naturais dos organismos e, portanto, não havia nenhuma razão óbvia para que esse conjunto de genes fosse preservado no processo evolutivo. Nas décadas de 60 e 70 foi descoberto que os genes do *MHC* eram fundamentais para todas as respostas imunológicas contra antígenos protéicos, uma vez que codificam moléculas MHC que têm habilidade de ligar e apresentar peptídeos derivados de várias proteínas antigênicas (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

O *MHC* foi identificado em uma extensa região do cromossomo 6 humano (fig.1), normalmente com genes altamente polimórficos, considerando-se polimorfismo a coexistência de fenótipos discretos em um grupo reprodutivo, tal que o alelo mais freqüente não ultrapassa a freqüência de 99% (FUTUYMA, 1992).

O *MHC* recebe nomes distintos em diferentes espécies, como *H2* em camundongos, *RT1* em ratos, *ChLA* em chimpanzés, *RhLA* no macaco Rhesus, *BoLA* no gado doméstico, *B* em aves de criação, etc. (RAMMENSEE, BACHMANN e STEVANOVIĆ, 1997). Porém novas designações do *MHC* de diferentes espécies foram propostas, excetuando-se *HLA* e *H2* e, ao invés da antiga denominação do *MHC* que denotava apenas o nome comum das espécies, os novos nomes levam em conta o gênero (as primeiras duas letras) e a espécie (terceira e quarta letras) (RAMMENSEE, BACHMANN e STEVANOVIĆ, 1997).

Os genes do *MHC* são expressos de forma co-dominante em cada indivíduo e são funcionalmente, estruturalmente e evolutivamente relacionados uns aos outros (RAMMENSEE, BACHMANN e STEVANOVIĆ, 1997). Até pouco tempo conhecia-se uma extensão ocupada pelos genes do *MHC* no DNA humano de 3800 kb no braço curto do cromossomo 6 (p21.3) (fig.1) (RAMMENSEE, BACHMANN e STEVANOVIĆ, 1997), mas Bahram (2000) descreve a dispersão de genes relacionados ao *MHC-I* em outros cromossomos além do cromossomo 6 (fig.2).

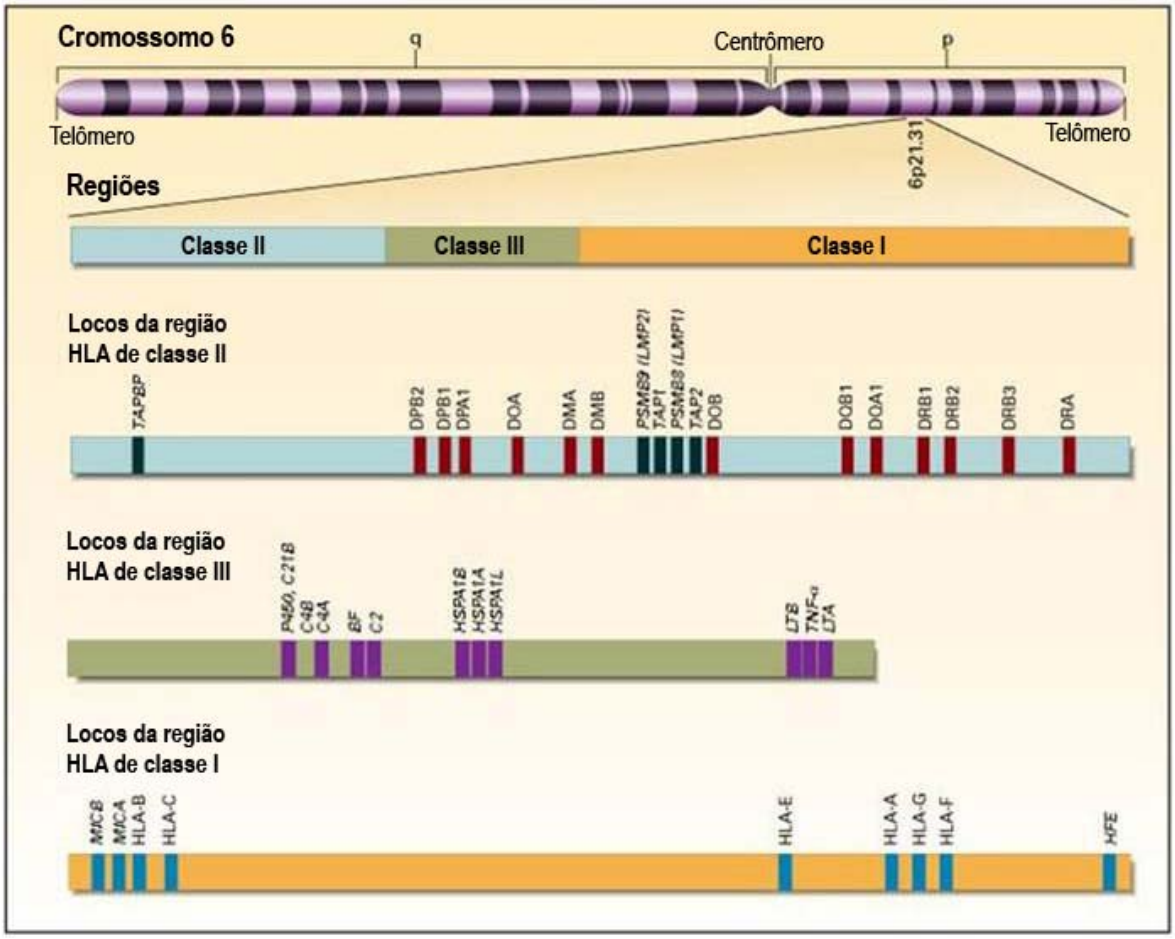

FIGURA 01 – MAPA DO COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE (*MHC*) HUMANO

FONTE: http://e-gastroped.com.br/jun05/cel02.jpg (SOCIEDAD LATINOAMERICANA DE GASTROENTEROLOGÍA PEDIÁTRICA, HEPATOLOGÍA Y NUTRICIÓN, 2006) adaptado.

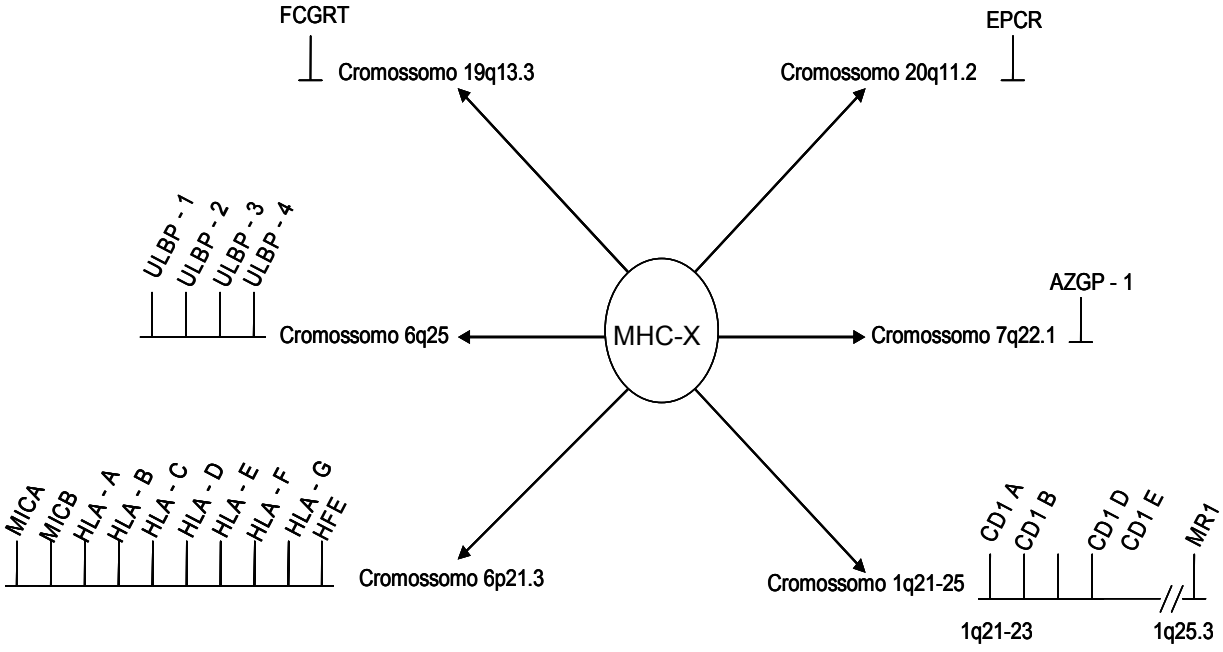

FIGURA 02 – DISPERSÃO GENÔMICA DOS GENES *MHC-I* E DOS RELACIONADOS AO *MHC* DE CLASSE I EM CROMOSSOMOS HUMANOS

FONTE: BAHRAM, 2000 modificado.

NOTA: Essa representação esquemática não está em escala e dentro das famílias multigênicas (*HLA*, *MIC*, *CD1*, e *ULBP*) os locos estão posicionados em ordem alfabética ou ordinal crescente.

O *MHC* compreende genes codificadores de glicoproteínas de membrana que são receptores peptídicos especializados. Os fragmentos de proteínas antigênicas ligam-se a esses receptores e, deste modo os produtos dos genes pertencentes ao *MHC* são aqueles que desempenham alguma função imunológica (VAN DEN BERG e RAND, 2003).

Ao mesmo tempo em que são receptores de peptídeos, as moléculas MHC são componentes integrais dos ligantes que a maioria das células T reconhece, pois os TCR são específicos para complexos de peptídeos antigênicos e moléculas MHC do próprio organismo (McDEVITT, 2000).

Basicamente a função das moléculas MHC é apresentar determinadas proteínas presentes na célula, permitindo ao sistema imune inspecionar a condição geral da célula e, se necessário, desencadear uma resposta imune adaptativa (RAMMENSEE, BACHMANN e STEVANOVIĆ, 1997).

Existem duas classes de moléculas MHC que diferem entre si em estrutura e função. As moléculas MHC de classe I são expressas na maioria das células nucleadas de mamíferos, enquanto as moléculas MHC de classe II são encontradas apenas em alguns poucos tipos celulares, dos quais os mais importantes são as células B, macrófagos, células dendríticas e epitélio tímico (RAMMENSEE, BACHMANN e STEVANOVIĆ, 1997). Duas grandes famílias gênicas codificam dois diferentes tipos de moléculas MHC (fig.3) que são funcionalmente especializadas em exibir peptídeos antigênicos a linfócitos T $CD8^+$ (moléculas de classe I) ou a linfócitos T $CD4^+$ (moléculas MHC de classe II) (RAMMENSEE, BACHMANN e STEVANOVIĆ, 1997).

Cada molécula MHC consiste em uma fenda extracelular que liga os peptídeos antigênicos, seguida de domínios semelhantes a imunoglobulinas (Igs), e está ancorada na membrana celular por meio de domínios transmembrânicos e citoplasmáticos (McDEVITT, 2000) (figs.3 e 4). Os domínios que formam a fenda de ligação são denominados domínios G (G para *groove ou fenda*). Os aminoácidos polimórficos das moléculas MHC estão localizados na fenda de ligação de peptídeos e próximos a ela (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

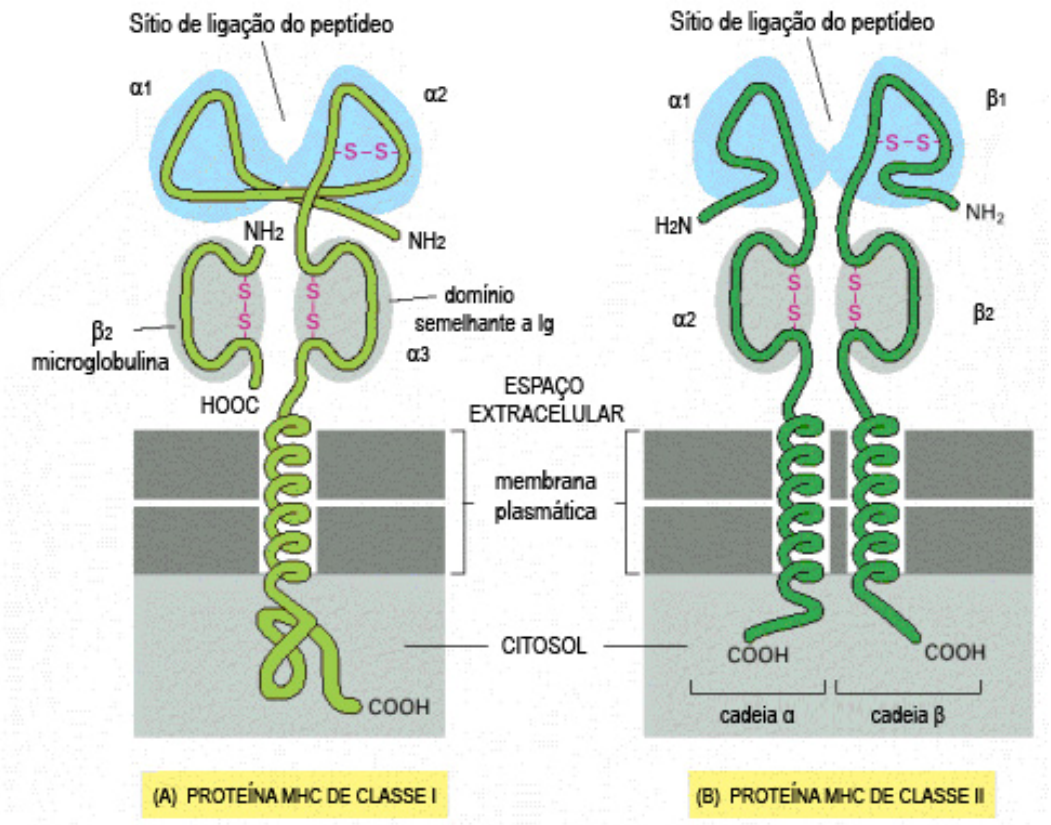

FIGURA 03 – ESTRUTURA DAS PROTEÍNAS MHC DE CLASSE I E DE CLASSE II

FONTE: ALBERTS *et al.*, 2002. adaptado

NOTA: (A) Proteína MHC de Classe I: Domínios α_1, α_2 e α_3 da cadeia α, codificados por diferentes éxons. Cadeia polipeptídica β_2-microglobulina não codificada pelo *MHC*, ligada não covalentemente à cadeia α. Ig = imunoglobulina. (B) Proteína MHC de Classe II: Domínios α_1 e α_2 da cadeia α e β_1 e β_2 da cadeia β. As duas cadeias são codificadas por genes do *MHC*.

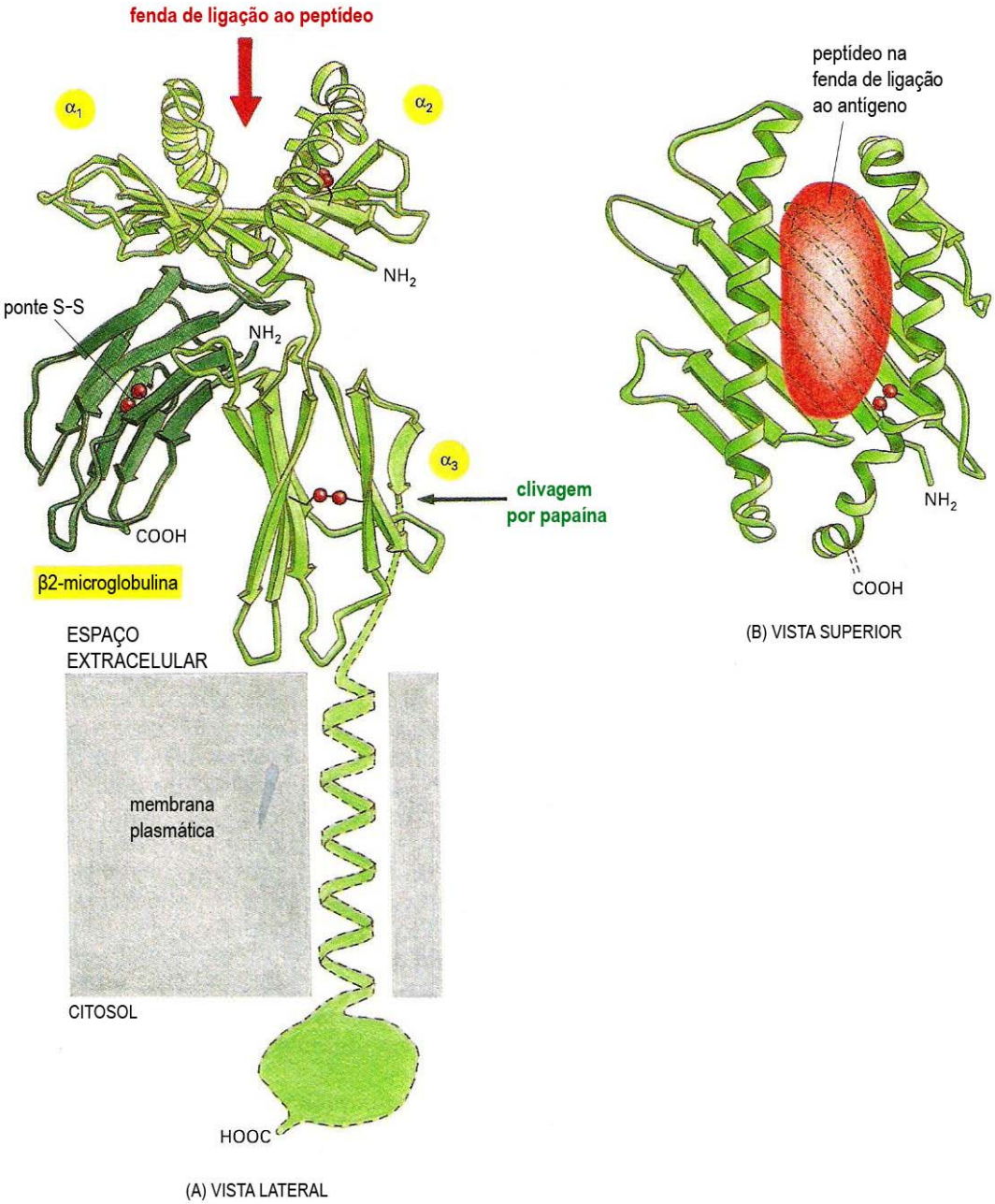

FIGURA 04 – ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DE UMA PROTEÍNA MHC DE CLASSE I

FONTE: ALBERTS *et al.*, 2002. adaptado

NOTA: Esquema do domínio extracelular da proteína MHC de classe I determinada por análises da difração de raio-X do domínio extracelular da molécula. A – vista lateral dos domínios α1, α2, α3 e β_2-microglobulina e da fenda de ligação peptídica; B – peptídeo e fenda de ligação peptídica vistos de cima.

A resposta imune adaptativa pode ser estimulada pela interação entre peptídeos antigênicos ligados às moléculas MHC com o TCR (TIENG *et al.*, 2002; ABBAS e LICHTMAN, 2005). As moléculas MHC de classe I são heterodímeros constituídos por uma cadeia α (peso molecular de 44 a 47 kDa), com domínios α_1, α_2 e α_3, uma subunidade β_2-microglobulina (peso molecular de 12kDa) codificada por um gene do cromossomo 15, que interage de forma não covalente com o domínio α_3 (figs. 3A; 4A e 4B) (ALBERTS *et al.,* 2002; ABBAS e LICHTMAN, 2005). Os domínios α_1, α_2 e α_3 são codificados por éxons diferentes dos genes do *MHC-I*, sendo que os domínios α_1 e α_2 (domínios G) formam a fenda de ligação do peptídeo e o domínio α_3 é semelhante à região constante das Ig (região C de Igs) (LEFRANC et al., 2005). A molécula de classe II totalmente montada é um heterodímero, ligado a um peptídeo antigênico, e consiste em uma cadeia α (32 a 34kDa), com domínios α_1 (domínio G) e α_2 (domínio semelhante a C), uma cadeia β (29 a 32kDa) que possui domínios β_1 (domínio G) e β_2 (domínio semelhante a C) (fig. 3B), sendo ambas codificadas por genes do *MHC-II* (ABBAS e LICHTMAN, 2005). Os domínios α_1 e β_1 formam a fenda de ligação do peptídeo e os domínios α_2 e β_2 são semelhantes a Igs. Essas moléculas apresentam peptídeos de 10 a 30 aminoácidos, sendo o comprimento ideal para a fenda 12 a 18 aminoácidos, para linfócitos T $CD4^+$ (CRESSWELL, 1994; ABBAS e LICHTMAN, 2005), enquanto que as glicoproteínas do *MHC*-I exibem cadeias peptídicas de 8 a 11 aminoácidos a células citotóxicas T $CD8^+$ (TOWNSEND e BODMER, 1989; ABBAS e LICHTMAN, 2005). A ligação dos co-receptores CD4 e CD8 dos linfócitos T CD4+ e T CD8+ ocorre, respectivamente, com os domínios α_3 (classe I) e β_2 (classe II) das moléculas MHC.

Os genes *MHC* - I e aqueles que codificam moléculas relacionadas às moléculas MHC de classe I encontram-se dispersos no genoma humano, nos cromossomos 6, 1, 7, 19 e 20, como mostrado na figura 02 (BAHRAM, 2000). Tradicionalmente são divididos em clássicos (ou de classe Ia) e não clássicos, esses, subdivididos por alguns autores em Ib (*HLA-E, -F, -G*), Ic (*MICA, MICB, HFE*) e Id (*CD1, FcRn, ZAG*) (BAHRAM, 2000). As moléculas de classe Ia (*HLA-A, -B e C*) são amplamente expressas, altamente polimórficas e associadas a β_2-microglobulina (β_2m), enquanto as não-clássicas variam em número de polimorfismos e local de

expressão, e muitos locos não-clássicos são pseudogenes (RAMMENSEE, BACHMANN e STEVANOVIĆ, 1997; BAHRAM, 2000).

Vários locos de classe I estão mapeados na extremidade telomérica do braço curto do cromossomo 6, sendo o *HLA-A* um dos locos mais teloméricos (RAMMENSEE, BACHMANN e STEVANOVIĆ, 1997). A região *HLA* de classe I estende-se em aproximadamente 1800 kb e a região *HLA* de classe II estende-se em pelo menos 800 kb e consiste em três principais sub-regiões denominadas DP, DQ e DR, arranjadas nessa ordem na direção do centrômero ao telômero (RAMMENSEE, BACHMANN e STEVANOVIĆ, 1997). Entre os locos de classe I no lado telomérico e os locos de classe II no sítio centromérico do complexo HLA, existe uma "ilha" de cromatina não relacionada (UC) que é ocupada por genes que desempenham outras funções, principalmente no sistema imune e por outros que ainda não foram caracterizados funcionalmente (RAMMENSEE, BACHMANN e STEVANOVIĆ, 1997; JANEWAY et al., 2001; ABBAS e LICHTMAN, 2005). Nessa região estão presentes os locos que codificam proteínas do complemento como Fator B (Bf), C2, C4A e C4B, genes codificadores das citocinas: fator de necrose tumoral (TNF) e linfotoxinas (LTA e LTB), o gene da enzima 21-hidroxilase (CYP 21B), que está envolvida com a síntese de esteróides, pelo gene que codifica a enzima citocromo P-450 e por alguns genes de proteínas de choque térmico (HS) (RAMMENSEE, BACHMANN e STEVANOVIĆ, 1997; JANEWAY et al., 2001; ABBAS e LICHTMAN, 2005). Esses locos são denominados como região de "classe III" (RAMMENSEE, BACHMANN e STEVANOVIĆ, 1997).

O conhecimento da especificidade alélica de peptídeos MHC pode ser aplicado em vários métodos de manipulação da resposta imune contra infecções, tumores malignos e transplantes, doenças auto-imunes e outros casos imunopatológicos (RAMMENSEE, BACHMANN e STEVANOVIĆ, 1997) como a imunogenética da reprodução.

A interação entre fatores imunológicos e genéticos pode ser crucial para o sucesso da reprodução humana. Vários estudos em humanos sugerem que o insucesso na reprodução muitas vezes é influenciado por fatores imunológicos ou por genes que codificam esses fatores e por mecanismos que regulam a expressão de genes do sistema imune (CHOUDHURY e KNAPP, 2001).

Muitos trabalhos mostram que os processos biológicos que participam na manutenção de uma gravidez estável são controlados por uma seqüência de expressão gênica diferenciada (BAEK, 2004). Foram identificados vários genes envolvidos em ARE, sendo eles mais ou menos expressos na vilosidade coriônica de pacientes com ARE do que em mulheres com gravidez normal (BAEK *et al.*, 2002). Esses genes são relacionados à imunossupressão, angiogênese, apoptose e outros grupos gênicos (BAEK, 2004).

As moléculas MHC desempenham funções críticas na gravidez, podendo influenciar o desenvolvimento gamético, clivagens embrionárias, formação do blastocisto e do trofoblasto, implantação, desenvolvimento e sobrevivência fetal (CHOUDHURY e KNAPP, 2001). Muitos estudos têm demonstrado que alguns genes ou moléculas MHC estão envolvidos em ARE.

2.2.1 Genes *MICA* e *MICB*

Os locos da família *MIC* (genes relacionados a cadeias *MHC* de classe I) estão entre os últimos identificados dentro do *MHC* de classe I (BAHRAM et al., 1994), e correspondem aos locos *MICA, MICB, MICC, MICD, MICE, MICF e MICG* (fig.5). As proteínas MICA e MICB pertencem à superfamília MHC (MhcSF) pois apresentam dois domínios semelhantes à G (que formam a fenda de ligação do peptídeo), e à superfamília das imunoglobulinas (IgSF), devido ao domínio semelhante à C das imunoglobulinas (BAHRAM, 2000).

Membros dessa família de genes e pseudogenes estão espalhados pela região *MHC* de classe I (FODIL *et al.*, 1996). *MICA* e *MICB* codificam glicoproteínas funcionais, enquanto *MICC-G* são pseudogenes (BAHRAM, 2000). *MICA*, localizado no braço curto do cromossomo 6 (6p21.3) (fig.1), encontra-se a apenas 46,5kb de *HLA-B* em direção ao centrômero e *MICB* a 83kb nessa mesma direção de *MICA,* sendo, portanto, esses três genes ligados (figs.5 e 6) (BAHRAM, 2000). Os locos *MICC, MICD* e *MICE* localizam-se proximamente aos genes *HLA-E, -A* e *-F,* respectivamente. *MICG* é flanqueado pelos genes *HLA-G* e *HLA-F* e *MICF* foi identificado a 24kb em direção ao centrômero de *HLA-G* (BAHRAM, 2000) (fig.5).

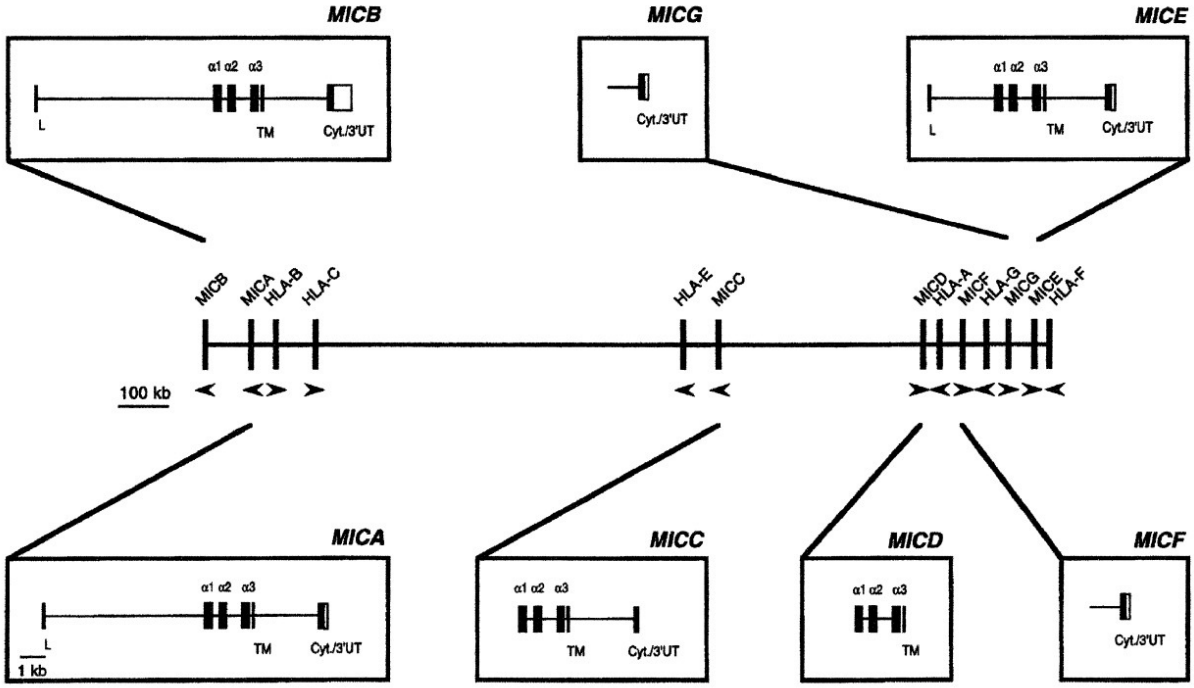

FIGURA 05 – GENES E PSEUDOGENES DA FAMÍLIA *MIC* AO LONGO DA REGIÃO DE CLASSE I DO *MHC* HUMANO

FONTE: BAHRAM, 2000 (extraído de SHIINA *et al.*, 1999).

NOTA: A estrutura gênica de todos os locos está realçada em retângulos. L: líder; TM: transmembrânico; Cyt.: cadeia citoplasmática; UT: não traduzida

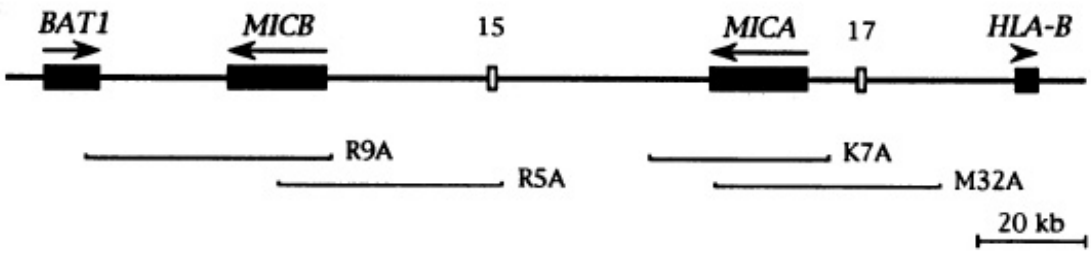

FIGURA 06 – LOCALIZAÇÃO DE *MICA* E *MICB* EM COSMÍDEOS CLONADOS

FONTE: BAHRAM *et al.*, 1994

NOTA: As caixas sombreadas em preto na primeira linha correspondem aos genes. Caixas abertas denominadas 15 e 17 indicam pequenos fragmentos de genes semelhantes aos de classe I, contidos nos fragmentos de restrição gerados pelas enzimas de restrição *Xba* I e *Pst* I de 1,5 e 1,7 Kb, respectivamente. As setas mostram a orientação transcricional dos genes. Apenas cosmídeos relevantes de uma série contígua foram mostrados (R9A, R5A, K7A, M32A)

Assim como a família dos genes *MHC* de classe I evoluiu de duplicações seqüenciais, alguns trabalhos demonstram que os segmentos a montante de todos os membros dos locos *MIC* (exceto *MICC*) apresentam seqüências homólogas por identidade, em distâncias maiores que 15kb (BAHRAM *et al.*, 1994; BAHRAM, 2000). Provavelmente um gene *MIC* primordial originou-se de um gene prototípico de classe I antes da evolução da família dos genes *MHC* de classe I, levando às várias diferenças entre *MIC* e *MHC-I*, apesar de algumas similaridades que foram conservadas (BAHRAM *et al.*, 1994; BAHRAM, 2000). Essa hipótese é apoiada pela conservação das seqüências relacionadas ao *MIC* não apenas em primatas como também em várias espécies de mamíferos filogeneticamente distantes (bovinos, suínos, caprinos, caninos...), (BAHRAM *et al.*, 1994).

A organização incomum dos genes *MICA* e *MICB*, sua expressão mais restrita, seus elementos de controle transcricional distintos e as características da seqüência de aminoácidos dos seus produtos indicam que as cadeias MICA e MICB evoluíram para uma função diferente, porém relacionada à das cadeias MHC de classe I (BAHRAM *et al.*, 1994; BAHRAM, 2000).

As glicoproteínas MICA e MICB são estruturadas de forma semelhante às moléculas MHC-I (BAHRAM, 2000), apresentando algumas diferenças. *MICA* e *MICB* são grandes genes de 11722 e 12930 pb, respectivamente, comparados à média de 3,5-kb dos genes *HLA-A* a *HLA-G* (BAHRAM *et al.*, 1996). *MICA* e *MICB* possuem grandes íntrons de 6840 e 7352 pb, respectivamente (em comparação a íntrons com menos de 200 pb em genes *HLA-A* a *HLA-G*), que separam os dois primeiros éxons (BAHRAM *et al.*, 1994) (figs.7 e 8). O primeiro éxon de *MICA* e o primeiro de *MICB* codificam uma seqüência líder, os segundo, terceiro e quarto éxons codificam as seqüências de domínios externos α-1, α-2 (semelhantes aos domínios G de moléculas MHC-I) e α-3 (semelhante ao domínio C de Igs), respectivamente, o quinto éxon codifica um segmento transmembrânico, e a cauda citoplasmática e as seqüências 3'UTR (região não traduzida) são fusionadas no último éxon (BAHRAM *et al.*, 1994; ANDO *et al.*, 1997) figs.7, 8 e 9). Os genes *MICA* e *MICB* estão em orientação *forward* enquanto *HLA-B* encontra-se em orientação *reverse*, de acordo com o conceito de orientação do IMGT (LEFRANC e FRANCE, 2007).

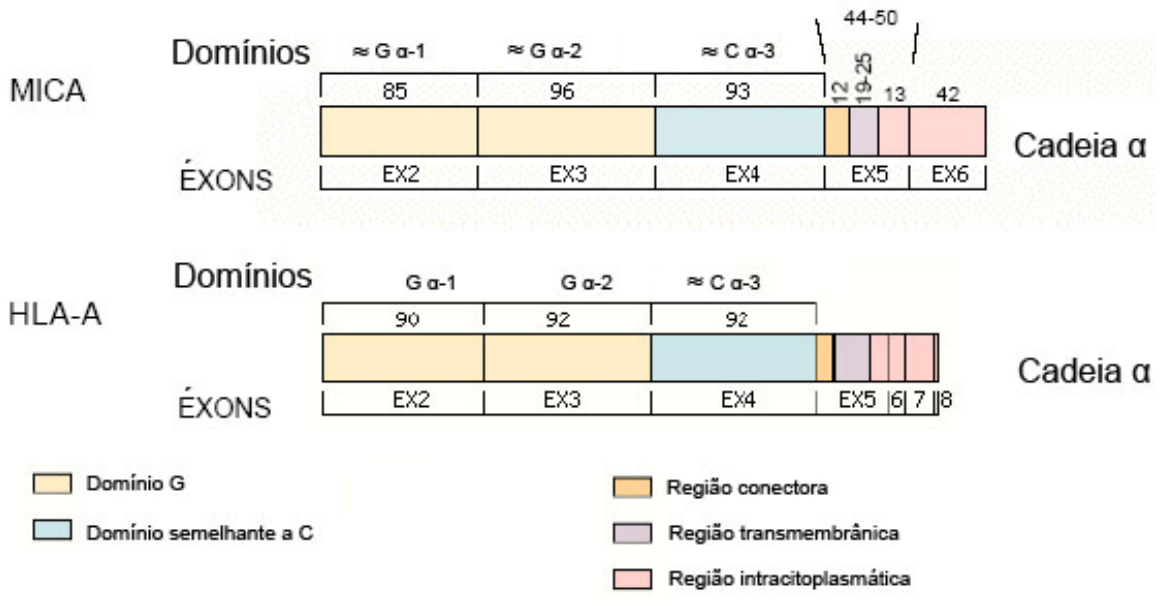

FIGURA 07 – REPRESENTAÇÃO DOS DOMÍNIOS DA CADEIA α1 DE MICA E COMPARAÇÃO COM OS DOMÍNIOS DA CADEIA α1 DE HLA-A

FONTE: Adaptado de FRIGOUL e LEFRANC, 2005

NOTA: ≈ G α-1: Domínio α-1, semelhante à G; ≈ G α-2: Domínio α-2, semelhante à G; ≈ C α-3: Domínio α-3, semelhante à C; G α-1: Domínio α-1 G; G α-2: Domínio α-2 G; EX: éxons; Comprimento dos domínios estão em número de aminoácidos (números dentro dos retângulos).

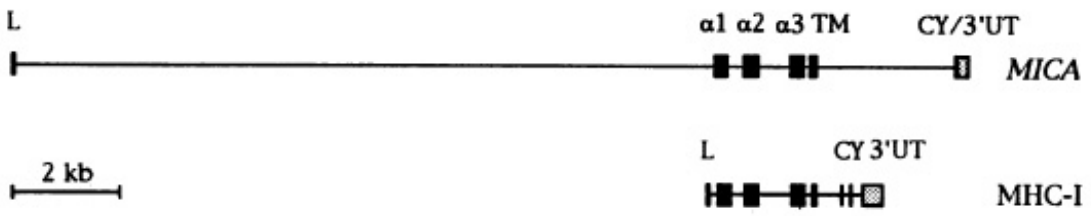

FIGURA 08 – ORGANIZAÇÃO ÉXON-ÍNTRON DE *MICA* E COMPARAÇÃO COM A ESTRUTURA DE GENES *MHC* DE CLASSE I

FONTE: BAHRAM *et al.*, 1994

NOTA: Caixas sombreadas em preto indicam os éxons. L: seqüência líder; α1 – α3: seqüências de domínio extracelular; TM: segmento transmembrânico; CY: cadeia citoplasmática; 3'UT: seqüência não traduzida na extremidade 3';

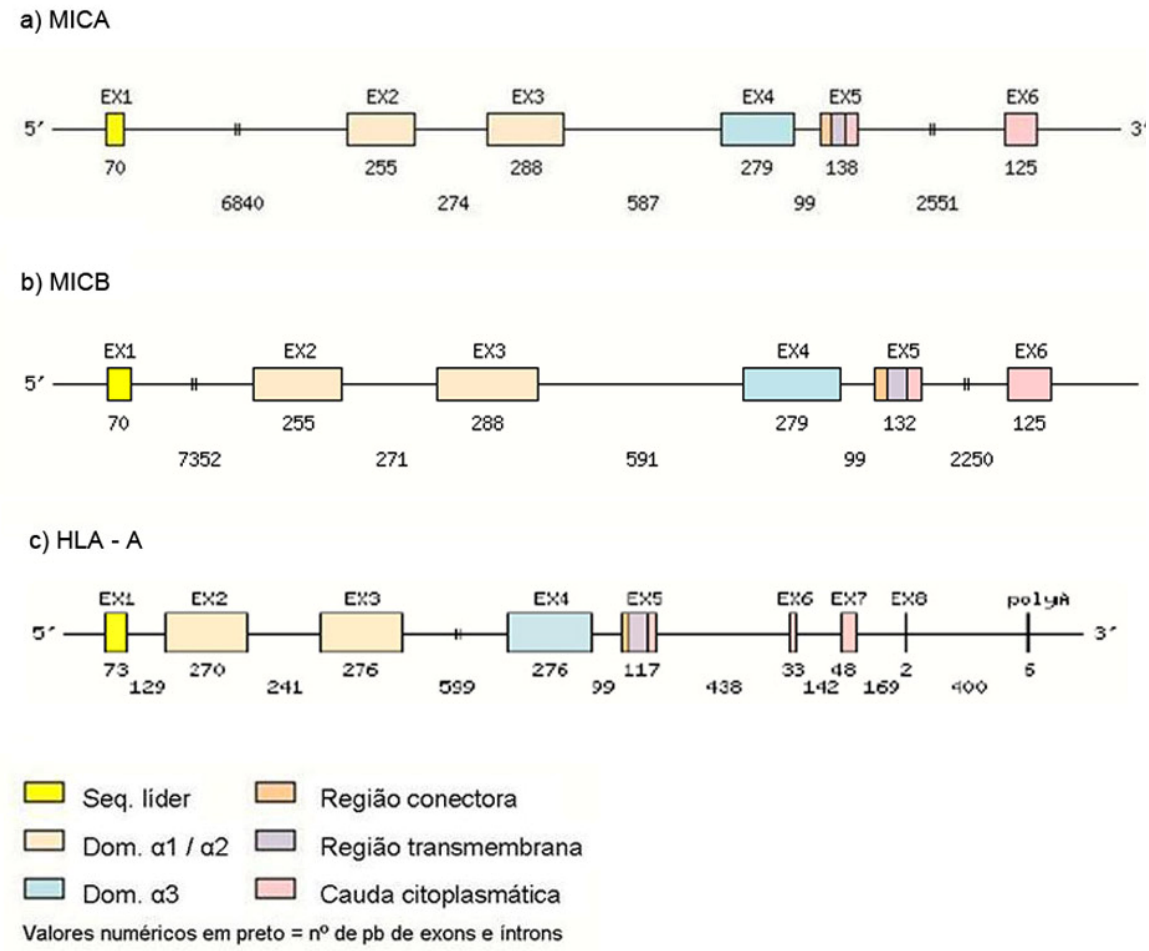

FIGURA 09 – COMPARAÇÃO DA ORGANIZAÇÃO ÉXON-ÍNTRON DOS GENES *MICA, MICB* E *HLA-A*

FONTE: Adaptado de FRIGOUL e LEFRANC., 2005; LEFRANC e FRANCE, 2007

NOTA: As cores da legenda indicam os produtos codificados pelos éxons de mesma cor. Os comprimentos dos íntrons e éxons estão indicados em pares de base (pb); Íntrons indicados com II não estão em escala; Em *MICA* e *MICB* os éxons 2 e 3 codificam os domínios α-2 e α-3 semelhantes ao domínio G das moléculas MHC-I, respectivamente. O éxon 4 codifica o domínio α-3 (semelhante ao domínio C das Igs). Em *MICA*, o comprimento do éxon 5 depende do polimorfismo do microssatélite desse éxon (132 a 150pb), que codifica a região transmembrânica; O comprimento de 138pb para o éxon 5 (46 aminoácidos) corresponde aos alelos A6.

O gene *MICA* é transcrito em um mRNA de 1382pb que possui uma única ORF (matriz de leitura aberta) de 1149pb, a qual dá origem a um polipeptídio precursor de 383 aminoácidos, podendo esse comprimento variar no número de repetições de alanina dentro do segmento transmembrânico (BAHRAM *et al.*, 1994; FRIGOUL e LEFRANC, 2005). A proteína madura possui entre 360 e 366 aminoácidos e uma massa molecular de aproximadamente 43kDa, dependendo do polimorfismo na região de microssatélite do segmento transmembrânico (BAHRAM

et al., 1994; FRIGOUL e LEFRANC, 2005). Como comparação, os genes *MHC-I* clássicos possuem uma ORF de aproximadamente 1100pb e codificam uma cadeia polipeptídica de aproximadamente 360 aminoácidos (BAHRAM, 2000). A proteína MICA madura contém três domínios extracelulares (α1 – α3) que precedem o segmento âncora de membrana, e um segmento citoplasmático relativamente curto (42 aminoácidos) que parece direcionar a molécula à superfície baso-lateral de células epiteliais polarizadas (BAHRAM, 2000).

A molécula MICA apresenta uma única cadeia transmembrânica assim como citoplasmática, apresenta uma ponte dissulfeto a mais (entre as cisteínas 35 e 40) que as moléculas MHC-Ia, as quais apresentam duas pontes dissulfeto entre cisteínas, e apresenta oito sítios potenciais de glicosilação N-ligados (BAHRAM *et al.*, 1994). Resíduos específicos implicados na ligação do co-receptor CD8 nas moléculas MHC de classe I são ausentes em MICA (BAHRAM *et al.*, 1994). MICA é uma proteína de superfície de membrana altamente glicosilada, podendo atingir uma massa de 65-75 kDa, dependendo do nível de glicosilação, não é associada a β_2m, é independente de transportador associado com o processamento de antígeno (TAP), sendo conformacionalmente estável na ausência de ligantes peptídicos de *MHC*-I (GROH *et al.*, 1996), diferentemente das moléculas HLA de classe I. Algumas das cadeias de aminoácidos conhecidas por interagir com pequenos peptídeos, típicas das moléculas de classe I, são preservadas na molécula MICA, o que sugere essa molécula poderia ter a capacidade de se associar a esse tipo de ligante, porém a angulação de sua fenda é imprópria para a ligação de peptídeos (BAHRAM *et al.*, 1994), uma vez que forma um ângulo de quase 90º com a membrana. Além disso, é possível que moléculas não peptídicas se liguem à glicoproteína MICA (BAHRAM *et al.*, 1994).

O gene *MICB* foi menos estudado que *MICA*, porém há evidências de que sua proteína apresenta uma massa molecular de 43kDa, parece não estar ligado a β_2m, ser independente de TAP e não apresentar resíduos específicos implicados na ligação do co-receptor CD8. O produto transcricional de *MICB* possui 2376pb, com uma ORF de mesmo tamanho que a de *MICA* e compartilha uma similaridade de 83% dos aminoácidos da molécula MICA (BAHRAM, 2000).

Ambos os genes *MICA* e *MICB* compartilham apenas uma média de 21%, 19% e 34% de identidade com os domínios extracelulares α1, α2 e α3, respectivamente, dos outros genes *MHC*-I, enquanto que outros locos *MHC*-I compartilham aproximadamente 70% de homologia uns com os outros para esses domínios (BAHRAM, 2000). Comparando-se com os domínios de *MHC*-Ia, o domínio α3 distingue-se pela ausência de um sítio de ligação do co-receptor CD8, como dito anteriormente, o domínio α1 é ligeiramente mais curto (85 aminoácidos ao invés de 90) e o domínio α2 é levemente maior (96 aminoácidos ao invés de 92) (BAHRAM, 2000).

Entre *MICA* e *MICB* existe uma grande região de microssatélite com repetições TA que parece representar um potencial *hot spot* de recombinação entre alelos *MICA* e *MICB* (ANDO *et al.*, 1997), embora ainda exista um conhecimento fragmentado a respeito de desequilíbrio de ligação entre alelos desses genes (BAHRAM, 2000).

MICB possui uma seqüência 3'UTR de 1kb adicional em relação à *MICA*, mas não se sabe se existe alguma significância em nível transcricional-traducional dessa singularidade, e, além disso, *MICB* possui 5 sítios de glicosilação N-ligados, ao invés de oito (BAHRAM, 2000).

Uma divergência notável entre os genes *MICA* e *MICB* é a presença de uma curta seqüência repetida em tandem (STR) codificante presente no éxon 5 que codifica o domínio transmembranânico de *MICA* e ausente em *MICB* (BAHRAM, 2000).

Essa STR no gene *MICA* é constituída por trincas de nucleotídeos GCT (MIZUKI *et al.*, 1997) que codificam o aminoácido alanina. Com base no número de repetições de alanina, os alelos são nomeados (para alanina) como A4, A5, A6, A9 (MIZUKI *et al.*, 1997), A7 (RUEDA *et al.,* 2002), A8 (GAMBELUNGHE *et al.,* 2006), A10 (PEREZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2000) e A5.1, que difere de A5 pela inserção de um nucleotídeo guanina na trinca GCT (GGCT), levando a uma mudança da matriz de leitura que causa um códon de término prematuro dentro do éxon que codifica o domínio transmembrânico (BAHRAM, 2000). Esses alelos A5.1 originam uma glicoproteína truncada de 35-40kDa que eventualmente chega à superfície celular, provavelmente não no seu sítio fisiológico (BAHRAM, 2000).

O loco *MICB* apresenta 30 alelos, e para o loco *MICA* foram identificados 61 alelos (ANTHONY NOLAN RESEARCH INSTITUTE, 2007). Vários desses alelos foram nomeados por BAHRAM (2000) como *MICA001* até *MICA054* pela ordem de identificação, dentre os quais, 47 codificam glicoproteínas distintas (BAHRAM, 2000). A nomenclatura oficial considerada pelo comitê de nomenclatura da *World Health Organization* -WHO está listada no quadro 1. O alelo mais freqüente, possivelmente em nível mundial, é o alelo *MICA*00801* do qual o segmento transmembrânico é definido por STR 5.1. (FODIL *et al.*, 1999).

A maior parte da diversidade alélica de *MICA* provavelmente é devida a mutações de ponto seguidas por recombinação, uma vez que muitos desses alelos diferem um do outro por um único nucleotídeo. Os alelos conhecidos até 1996 são definidos por um total de 40 substituições nucleotídicas, 30 das quais são não sinônimas: 5 de 8 no domínio α-1, 15 de 16 em α-2 e 10 de 16 em α-3 (FODIL, *et al.*, 1996) (quadro 2).

MICB parece ser menos polimórfico que *MICA*, embora ele tenha sido também menos explorado (BAHRAM, 2000), o que pode ser um motivo para um menor número de alelos *MICB* serem conhecidos. Dos 30 alelos identificados (quadro 3), 16 são denominados por Bahram (2000) de *MICB001* – *MICB016*, 13 dos quais divergem pela sua seqüência de aminoácidos. Os alelos *MICB* foram definidos por um total de 15 substituições nucleotídicas (dentro da região extracelular), 12 das quais são não-sinônimas, sendo elas 5 de 5 no domínio α1, 3 de 3 no domínio α2 e 4 de 7 em α3 (ANDO *et al.*, 1997), sendo que esses dados não levam em consideração os alelos descritos posteriormente a 1997 (quadro 4). O trabalho de Ando e colaboradores (1997) documentou um alelo nulo de *MICB*, denominado por eles *MICB010* (*MICB*009N* - WHO) que carrega um códon de término em seu domínio α2 e esse alelo é ligado a uma deleção genômica de 100kb que inclui o gene *MICA* mais telomérico. Essa deleção vista em associação com o alelo *HLA-B*4801* por Komatsu-Wakui e colaboradores (1999),e posteriormente ficou constatado que mais da metade dos indivíduos que apresentam haplótipos contendo o alelo *HLA-B*4801* apresentam ausência do componente *MICA-MICB* (BAHRAM, 2000).

Nomenclatura WHO	Outras designações	Acessos	Origem étnica conhecida
MICA*001	MICA001, PERB11.1-18.2	AF085059 ,AF085060 ,AF085061 ,AF085062 , AF336085 , AF336085, AL845443 , L14848 , L294, U56940 , U69965	Caucasóide
MICA*0201	MICA002	AF085043 , AF085044 , AF085045 , AF085046 , AF336063 , AF336064 , AF336083 , AF336084 , U56941	Caucasóide
MICA*0202	MICA-BEE	AF011877 , AF011878 , AF011879	Desconhecida
MICA*004	MICA001, MICA004	AF085031 , AF085032 , AF085033 , AF085034 , U56943 , X92841	Negra, caucasóide
MICA*005	MICA005	U56944	Desconhecida
MICA*006	MICA006	AF085023 , AF085024 , AF085025 , AF085026 , AF336065 , AF336066 , U56945	Caucasóide
MICA*00701	MICA007	AF085047 , AF085048 , AF085049 , AF085050 , U56946	Caucasóide
MICA*00702	MICA-CEB	AF011880 , AF011881 , AF011882 , Y16805	Caucasóide
MICA*00703	U181	AJ580806	Caucasóide
MICA*00801	MICA008, PERB11.1-60.3, PERB11.1-47.1, PERB11.1-44.1, PERB11.1-8.1, PERB11.	AF085015 ,AF085016 ,AF085017 AF085018 ,AF336067 ,AF336068 ,AL669854 ,AY603357 L29409 L29411 U56947 U69624 U69625 U69628 U69967 U69970 U69976 U69977	Caucasóide, Hispânica
MICA*00802	MICA-AN23	AF011883 , AF011884 , AF011885 , AF106650 , AF106651 , AF106652 , AJ250499 , AJ250500 , Y16809	Negra, caucasóide, Hispânica, oriental
MICA*00803	silent MICA-C	AF106653 , AF106654 , AF106655	Negra
MICA*00804	PGF-MICA	AL645933	Caucasóide
MICA*00901	MICA009, PERB11.1-52.1	AF085019 , AF085020 , AF085021 , AF085022 , AF336069 , AF336070 , U56948 , U69626 , U69971	Ameríndia, caucasóide, oriental

QUADRO 01 – DESIGNAÇÕES DOS 61 ALELOS *MICA* (CONTINUA)

FONTE: adaptado de LEFRANC e FRANCE, 2007

MICA*00902	MICA-AFC	AF011886 , AF011887 , AF011888 , AF079419 , AF079420 , AF079421 , AF097406 , AY029762 , AY029763 , Y16803	Caucasóide
MICA*010	MICA010, PERB11.1-62.1, PERB11.1-46.1	AF085055 , AF085056 , AF085057 , AF085058 , AF336071 , AF336072 , L29408 , U56949 , U69629 , U69969 , U69974 , Y16801	Ameríndia, caucasóide, oriental
MICA*011	MICA011, PERB11.1-65.1	AF085035 , AF085036 , AF085037 , AF085038 , AF336073 , AF336074 , U56950 , U69630 , U69975	Caucasóide
MICA*01201	MICA012, PERB11.1-54.1	AF336081 , AF336082 , U56951 , U69627 , U69972	Oriental
MICA*01202	silent MICA-A	AF106647 , AF106648 , AF106649	Desconhecida
MICA*013	MICA013	U56952	Caucasóide
MICA*014	MICA014	U56953	Caucasóide
MICA*015	MICA015	AF136157 , AF136158 , AF136159 , AF264738 , AF264739 , AF264740 , U56954	Negra
MICA*016	MICA016, PERB11.1-35.1	AF085027 , AF085028 , AF085029 , AF085030 , AF336075 , AF336076 , U56955 , U69623 , U69966 , Y16802	Caucasóide
MICA*017	MICA-KMCE	AF079413 , AF079414 , AF079415 , AF097403 , AF264735 , AF264736 , AF264737 , AJ250803 , Y16810	Caucasóide, oriental
MICA*01801	MICA-GKIT	AF011874 , AF011875 , AF011876 , AF079425 , AF079426 , AF079427 , AF093116 , AF097404 , AF336077 , AF336078 , AJ250805 , BC016929 , Y16806	Caucasóide, oriental
MICA*01802	U180	AJ580805	Caucasóide
MICA*019	MICA-DPCA	AB015600 , AF011835 , AF011836 , AF011837 , AF079416 , AF079417 , AF079418 , AF093113 , AF097405 , AF336079 , AF336080 , AJ250804	Ameríndia, caucasóide, oriental, Ilhas do Pacífico
MICA*020	MICA-002new	AJ249394	Caucasóide
MICA*021	MICA021, MUC-17	Y18110	Caucasóide

QUADRO 01 – DESIGNAÇÕES DOS 61 ALELOS *MICA* (CONTINUAÇÃO)

FONTE: adaptado de LEFRANC e FRANCE, 2007

MICA*022	MICA-BGA	AF011856 , AF011857 , AF011858 , Y16804	Caucasóide, oriental
MICA*023	MICA-BEBC	AF085039 , AF085040 , AF085041 , AF085042	Caucasóide
MICA*024	MICA-AAC	AF011832 , AF011833 , AF011834 , Y16807	Caucasóide
MICA*025	MICA-DEB	AF011853 , AF011854 , AF011855 , Y16808	Oriental
MICA*026	MICA-CEED	AF085051 , AF085052 , AF085053 , AF085054	Caucasóide
MICA*027	MICA-AN21	AF085011 , AF085012 , AF085013 , AF085014 , AJ250802	Caucasóide
MICA*028	MICA-AABC	AF011829 , AF011830 , AF011831 , AF093115 , Y18111	Caucasóide
MICA*029	MICA-AN27	AJ250503 , AJ250504 , Y18112	Desconhecida
MICA*030	MICA-KWHT	AF079422 , AF079423 , AF079424	Negra
MICA*031	MICA-AIB	AF011838 , AF011839 , AF011840	Desconhecida
MICA*032	MICA-AKB	AF011841 , AF011842 , AF011843	Desconhecida
MICA*033	MICA-AN24	AF011844 , AF011845 , AF011846 , AF093114 , AJ250505	Ilhas do Pacífico
MICA*034	MICA-BCC	AF011847 , AF011848 , AF011849	Caucasóide
MICA*035	MICA-BEA	AF011850 , AF011851 , AF011852	Desconhecida
MICA*036	MICA-BHB	AF011859 , AF011860 , AF011861	Caucasóide
MICA*037	MICA-CEA	AF011862 , AF011863 , AF011864	Caucasóide, Aborígenas australianos

QUADRO 01 – DESIGNAÇÕES DOS 61 ALELOS *MICA* (CONTINUAÇÃO)

FONTE: adaptado de LEFRANC e FRANCE, 2007

MICA*038	MICA-CEC	AF011865 , AF011866 , AF011867	Caucasóide
MICA*039	MICA-CEF	AF011868 , AF011869 , AF011870	Caucasóide
MICA*040	MICA-CIB	AF011871 , AF011872 , AF011873	Desconhecida
MICA*041	MICA-AN25	AF106632 , AF106633 , AF106634 , AJ271789	Negra
MICA*042	MICA-newB allele2.	AF106635 , AF106636 , AF106637	Desconhecida
MICA*043	MICA-AN32	AF106638 , AF106639 , AF106640 , AJ250990 , AJ250991	Negra
MICA*044	MICA-newD	AF106641 , AF106642 , AF106643	Negra
MICA*045	MICA-AN30	AF106644 , AF106645 , AF106646 , AJ250506 , AJ250507	Negra, mestiço
MICA*046	MICA-AN28	AJ250501 , AJ250502	Negra
MICA*047	MICA-AN#COYA3408	AF286732 , AJ295250 , AJ295251	Ameríndia, Caucasóide
MICA*048	MICA	AF264741 , AF264742 , AF264743	Oriental
MICA*049	HLA01498	AF264744 , AF264746 , AF264747	Caucasóide
MICA*050	MICA-GR	AY095537	Caucasóide
MICA*051	MICA-G367	AJ563426	Caucasóide
MICA*052	MHC class I related gene MICA, exons 2, 3, 4 and 5	AY748458 , AY748459 , AY748460 , AY748461	Desconhecida
MICA*053	U044	AJ871399	Desconhecida

QUADRO 01 – DESIGNAÇÕES DOS 61 ALELOS *MICA* (CONCLUSÃO)

FONTE: adaptado de LEFRANC e FRANCE, 2007

Posições	Códons	Aminoácidos
Éxon 2 (α1) (5 de 8)		
6	CGT →CCT	Arg → Pro
14	TGG → GGG	Trp → Gly
23	CTC → CTT	Leu → Leu
24	ACT → GCT	Thr → Ala
26	GTA →GGA	Val → Gly
36	TGT → TAT	Cis → Tyr
56	AAT → AAC	Asn → Asn
64	AGA → AGG	Arg → Arg
Éxon 3 (α2) (15 de 16)		
91	CAG → CGG	Gln → Arg
105	AGG → AAG	Arg → Lis
112	TAC →TAT	Tyr → Tyr
114	GGG → CGG	Gly → Arg
122	CTG → GTG	Leu → Val
124	ACT → TCT	Thr → Ser
125	AAG → GAG	Lys → Glu
129	ATG → GTG	Met → Val
142	GTC → ATC	Val → Ile
151	ATG → GTG	Met → Val
156	CAC → CTC	His → Leu
156	CAC → CGC	His → Arg
173	AAA → GAA	Lys → Glu
175	GGC → AGC	Gly → Ser
176	GTA → ATA	Val → Ile
181	ATA → AGA	Thr → Arg
Éxon 4 (α3) (10 de 16)		
191	AGC → AGT	Ser → Ser
193	GCC → GCA	Ala → Ala
198	ATT → ATC	Ile → Ile
205	TCT → TCC	Ser → Ser
206	GGC → AGC	Gly → Ser
210	TGG → CGG	Trp → Arg
213	ACS → ATA	Thr → Ile
215	AGC → ACC	Ser → Thr
221	GTA → CTA	Val → Leu
247	ACC → ACT	Thr → Thr
251	CAA → GAA	Gln → Glu
251	CAA → CGA	Gln → Arg
255	CAG → CAA	Gln → Gln
256	AGG → AGT	Arg → Ser
268	AGC → GGC	Ser → Gly
271	CCT → GCT	Pro → Ala
Exon 5 (região trsmeanmbrânica)		
293	$(GCT)_{4,5,6,9,10}$	$(Ala)_{4,5,6,9,10}$
295	GCT → GGCT	$(Ala)_2$ término em 310

QUADRO 02 - VARIAÇÃO NUCLEOTÍDICA DE *MICA*

FONTE: BAHRAM, 2000 adaptado
NOTA: As posições se referem aos resíduos de aminoácidos. Números em parênteses correspondem à taxa de substituições não sinônimas do total de substituições. Números subescritos após GCT e Ala indicam o número de repetições do triplet ou do aminoácido, respectivamente.

Nomenclatura WHO	Outras designações	Acesso	Origem étnica conhecida
MICB*001	MICB-001	X91625	Desconhecida
MICB*020101	MICB0103101;MICB0103102; MICB-002; allele 2	AB003602;AB003603; AB003612;AF021222; U65416;U95729	Negra, caucasóide, oriental
MICB*020102	MICB MCF	CR753864	Caucasóide
MICB*003	MICB0105; MICB003; PERB11.2; allele 3	AB003606;AB003616; CR753820;U69978; U95730	Caucasóide
MICB*0040101	MICB007; MICB0104; allele 7	AB003605; AB003615; AL663061; U95734	Caucasóide, oriental
MICB*0040102	MICB APD	CR7828288	Desconhecida
MICB*0050101	MICB005; allele 5; MICB*00501	U95732	Caucasóide
MICB*0050201	MICB004; MICB01021; MICB-003; allele 4	AB003609;AB003599;AF021223;BX001040; U95731	Caucasóide, oriental
MICB*0050202	MICB	BX927320	Caucasóide
MICB*0050203	MICB SSTO	BX005469	Caucasóide
MICB*0050204	MICB	EF051519	Caucasóide
MICB*00503	MICB01022	AB003600; AB003610	Caucasóide, oriental
MICB*00504	MICB01023	AB003601; AB003611	Ameríndios
MICB*006	MICB006; allele 6	U95733	Ameríndia

QUADRO 03 – DESIGNAÇÕES DOS 30 ALELOS *MICB* (CONTINUA)

FONTE: adaptado de LEFRANC e FRANCE, 2007

MICB*007	MICB0103103	AB003604; AB003614	Oriental
MICB*008	MICB0106; MICB-001; MICB0106v	AB003607;AB003617;AF021221;AJ251158;AJ251159;AL662866	Caucasóide
MICB*009N	MICB0107N	AB003608; AB003618	Oriental
MICB*010	MICB-004	AF021224	Caucasóide
MICB*011	MICB-005	AF021225	Caucasóide
MICB*012	MICB-006	AF021226	Caucasóide
MICB*013	MICB-01022v	AJ251160; AJ251161	Caucasóide
MICB*014	MICB0103101v; MICBH0180101; MICBH022	AJ251156;AJ251157;AJ606912;AJ606913;AJ606914	Caucasóide
MICB*015	MICB; MICB-0114	AJ563706	Desconhecida
MICB*016	MICBH0160101; MICBH020	AJ606906;AJ606907;AJ606908	Desconhecida
MICB*017	MICBH0170101; MICBH021	AJ606909; AJ606910;AJ606911	Desconhecida
MICB*018	MICBH0190101; MICBH023	AJ606915; AJ606916; AJ606917	Desconhecida
MICB*019	MICBH0200101;MICBH024	AJ606918; AJ606919; AJ606920	Desconhecida
MICB*020	MICBH0210101; MICBH025	AJ606921; AJ606922; AJ606923	Desconhecida
MICB*021N	MICBH0140101N; MICBH018N	AJ606926; AJ606927; AJ606928	Desconhecida
MICB*022	MICBH0150101; MICBH019	AJ606929; AJ606930; AJ606931	Desconhecida

QUADRO 03 – DESIGNAÇÕES DOS 30 ALELOS *MICB* (CONCLUSÃO)

FONTE: adaptado de LEFRANC e FRANCE, 2007

Posição	Códon	Aminoácido
Éxon 2 (α1) (5 de 5)		
16	GAA → GCA	Glu → Gly
45	CCC → CAC	Pro → His
52	GAT → AAT	Asp → Asn
57	AAG → GAG	Lys → Glu
82	GAC → GGC	Asp → Gly
Éxon 3 (α2) (3 de 3)		
98	ATC → ATG	Ile → Met
113	GAT → AAT	Asp → Asn
170	CGA → TGA	Arg → Parada
Éxon 4 (α3) (4 de 7)		
189	ACC → ATC	Thr → Ile
192	GAG → AAG	Glu → Lys
210	CGG → CGA	Arg → Arg
243	ACC → ACG	Thr → Thr
256	AGG → AAG	Arg → Lys
267	CAC → CAT	His → His
268	GGC → AGC	Gly → Ser
Éxon 5 (transmembrânica)		
277	CGC → GTG	Ala → Val

QUADRO 04 - VARIAÇÃO NUCLEOTÍDICA DE *MICB*

FONTE: BAHRAM, 2000.

NOTA: As posições se referem aos resíduos de aminoácidos. Números em parênteses correspondem à taxa de substituições não sinônimas do total de substituições.

Em sua região promotora, *MICA* e *MICB* apresentam uma significante homologia por identidade com os promotores de genes de proteínas de choque térmico, apresentando nessa região elementos de resposta de choque térmico ou *heat shock* (HRE) que são comuns a vários genes induzidos por estresse. Dessa forma, os genes *MICA* e *MICB* podem sinalizar um estresse celular e evocar respostas imunes (GROH et al., 1996).

Os genes *MICA* e *MICB* são conservados na maioria dos mamíferos, entretanto não foram encontrados homólogos em camundongos (BAHRAM, 2000). Porém, no trabalho de KASAHARA e colaboradores (2002) foi identificada em camundongos, uma família de genes localizados fora do *MHC*, próxima à região do complexo de receptores leucocitários (LRC) no cromossomo 7. Esses genes foram denominados *Mill 1* e *Mill 2*, codificam glicoproteínas de membrana, apresentam a organização dos domínios semelhante a das moléculas *MHC*-I e esses genes estão proximamente relacionados aos genes *MICA* e *MICB*. Da mesma forma que não foram detectados ortólogos *MICA* e *MICB* em camundongos, não foram identificados

ortólogos *Mill 1* e *Mill 2* em humanos. Além disso, assim como a família *MIC, Mill* tem uma distribuição tecidual restrita, o que permitiria a hipótese de que a família *MILL* em roedores seria homóloga à família *MIC* em humanos (KASAHARA *et al.*, 2002). Mas essa hipótese pode conflitar com alguns dados que demonstraram a ausência de HRE na região promotora de *Mill 1* e *Mill 2*, que a transcrição de *MICA* e *MICB* são induzidas pelo estresse celular, diferentemente do que acontece com a família *MILL,* que *MILL 1* e *MILL 2* são pouco polimórficos e que as duas famílias, *MIC* e *MILL* podem coexistir em outras espécies como em cavalos (KASAHARA et al, 2002). Análises filogenéticas indicam que *MILL1* e *MILL2* estão mais proximamente relacionados à *MICA* e *MICB* que com outros membros de genes *MHC* de classe I (KASAHARA *et al.*, 2002).

Os genes *MICA* e *MICB* são transcritos em baixos níveis em linhagens de células epiteliais do intestino e do timo, em células endoteliais e fibroblastos, mas não são transcritos em células B, células T e monócitos e não são induzidos por intérferon γ (IFN-γ) (GROH *et al.*, 1996; BAHRAM, 2000). *MICA* e *MICB* são freqüentemente expressos em tumores epiteliais, incluindo pulmão, mama, rim, ovário, próstata e carcinomas de cólon (GROH *et al.*, 1999).

MICA e MICB interagem com dois diferentes imunorreceptores, γ/δ (Vδ1) TCR, e NKG2D, presentes em células NK e células T (BAHRAM, 2000).

O $TCR_{\gamma\delta}$ é um heterodímero ligado por pontes dissulfeto e expresso numa pequena população de células T negativas para o receptor αβ, mas associado a CD3 e proteínas ζ (ABBAS e LICHTMAN, 2005). As cadeias γ e δ do TCR consistem em regiões V (variável) e C (constante), semelhantes a Igs, conectadas e com regiões de dobradiça, segmentos transmembrânicos hidrofóbicos e uma curta cauda citoplasmática, muito similar às cadeias α e β (ABBAS e LICHTMAN, 2005). Esses receptores são mais semelhantes a Igs que os $TCR_{\alpha\beta}$ (BAHRAM, 2000). A maioria das células $T_{\gamma\delta}$ não expressa CD4 ou CD8, e várias atividades biológicas descritas para as células $T_{\gamma\delta}$ também são características das células $T_{\alpha\beta}$, incluindo a secreção de citocinas e a lise de células-alvo (ABBAS e LICHTMAN, 2005). As células que expressam o $TCR_{\gamma\delta}$ pertencem a uma linhagem distinta das células $T_{\alpha\beta}$ restritas ao MHC, e normalmente não excedem os 5% nos diferentes tecidos (ABBAS e LICHTMAN, 2005), mas essa proporção aumenta significativamente nas superfícies

epiteliais, nos sítios de inflamação e infecções causadas por alguns microorganismos (GIACOMELLI *et al.,* 2001).

Diferentes subtipos de células $T_{\gamma\delta}$ podem se desenvolver durante a ontogenia, apresentando distintas regiões V, mas não se sabe se esses subtipos apresentam funções diferentes, apesar da região V distinta sugerir que os subtipos podem ser específicos para ligantes distintos (ABBAS e LICHTMAN, 2005). Basicamente esses linfócitos pertencem a dois grupos, a maioria expressando a cadeia Vδ2 e a minoria expressando Vδ1 (GIACOMELLI *et al.,* 2001). As células $T_{\gamma\delta}$ são abundantes no tecido epitelial de várias espécies como camundongos e aves, mas em humanos somente 10% dos linfócitos intra-epiteliais expressam o receptor $TCR_{\gamma\delta}$ (ABBAS e LICHTMAN, 2005). As células $T_{\gamma\delta}$ não reconhecem os antígenos peptídicos associados às moléculas MHC clássicas e não são restritas ao MHC, ao invés, reconhecem uma grande variedade de compostos, variando de pequenas moléculas ligadas a fosfatos até grandes proteínas, alquilaminas e glicolipídeos (BAHRAM, 2000), que podem ser apresentados por moléculas similares às da classe I do MHC, ou seja, uma apresentação não clássica de moléculas normalmente encontradas nas micobactérias e em outros microorganismos (BAHRAM, 2000). Outras células $T_{\gamma\delta}$ reconhecem antígenos protéicos e não protéicos que não necessitam de processamento por parte das APCs. A diversidade limitada das células $T_{\gamma\delta}$ em muitos tecidos sugere que os ligantes desses receptores são bem conservados (BAHRAM, 2000).

As células NK são consideradas linfócitos “não-específicos”, uma vez que são capazes de matar células transformadas e infectadas sem a necessidade de sensibilização prévia (O’CONNOR, HART e GARDINER, 2005). Mas na realidade, as células NK apresentam uma especificidade bem definida e em algumas vezes bastante sutil, apresentando um complexo sistema de receptores (O’CONNOR, HART e GARDINER, 2005). A função efetora mais bem caracterizada de células NK é a citotoxicidade (O’CONNOR, HART e GARDINER, 2005), e em humanos, essas células lisam eficientemente células anormais que tanto carecem da expressão quanto expressam quantidades inadequadas de moléculas HLA-I (BIASSONI *et al.,* 2000). O reconhecimento de alvos apropriados é a primeira etapa fundamental do processo de ativação da citotoxicidade, portanto as células NK possuem receptores

ativadores convencionais, apesar de expressarem constitutivamente receptores inibidores (O'CONNOR, HART e GARDINER, 2005). Os receptores inibidores regulam a atividade das células NK interrompendo a sinalização intracelular quando moléculas MHC-I são devidamente expressas (KELLEY, WALTER e TROWSDALE, 2005). Os receptores ativadores, alguns dos quais possuem ligantes que não são moléculas MHC-I, iniciam as respostas das células NK contra células infectadas por vírus, bactérias ou parasitas, contra células tumorais ou ainda contra outras células alteradas que apresentam moléculas MHC-I hiporreguladas (KELLEY, WALTER e TROWSDALE, 2005). Geralmente os receptores inibidores apresentam em sua cauda citoplasmática motivos inibidores baseados em tirosina (ITIM), enquanto os receptores ativadores possuem resíduos carregados que facilitam a associação de moléculas adaptadoras que contêm motivos ativadores baseados em tirosina (ITAM), como a DAP12 (LANIER, 2001).

Em humanos, os genes que codificam os receptores de células NK são arranjados em dois principais grupos: complexo de receptores leucocitários (*LRC*), localizado no braço curto do cromossomo 19 (19q13.4), e complexo de assassinas naturais (*NKC*), localizado no braço longo do cromossomo 12 (12p13.1) (KELLEY, WALTER e TROWSDALE, 2005). O *LRC* compreende 45 genes, sendo 30 membros da IgSF agrupados em famílias gênicas altamente relacionadas: família dos receptores semelhantes à Igs de células NK (KIRs), família dos receptores semelhantes a Igs de leucócitos (LIRs ou LILRs ou ILTs) e a família dos receptores semelhantes a Igs associados a leucócitos (LAIRs) (KELLEY, WALTER e TROWSDALE, 2005). O NKC abrange genes com estrutura genômica altamente relacionada, organizados em famílias gênicas que codificam proteínas transmembrânicas do tipo II, semelhantes à lectina do tipo C, alguns dos quais são expressos apenas em células NK (TROWSDALE *et al.*, 2001). Dentre os vários genes que codificam moléculas de membrana, principalmente de células NK, estão *KLRA1* (da família Ly49) que codifica uma molécula não funcional em humanos, *KLRB1A* expresso, em humanos, em células NK e linfócitos T, genes *KLRC* que codificam moléculas da família NKG2, *KLRD1* que codifica a molécula invariante CD94, *KLRF1*, ausente em camundongos *KLRG1* e *KLRK1* que codifica a molécula NKG2D, pertencente à família do NKG2 (KELLEY, WALTER e TROWSDALE, 2005).

As moléculas da família NKG2, sendo a família gênica *KLRC,* são dímeros ligados à molécula CD94, na superfície celular (KELLEY, WALTER e TROWSDALE, 2005). *KLRC1* e *KLRC2* codificam receptores inibidores (NKG2A, NKG2B e KLRL1) e ativadores (NKG2C, NKG2E (gene *KLRC3*) e NKG2H), sendo NKG2B, NKG2E e NKG2H produtos de *splicing* alternativo (KELLEY, WALTER e TROWSDALE, 2005). Quando os receptores inibidores e ativadores são co-expressos na superfície celular, as moléculas inibidoras parecem ser funcionalmente dominantes, o que pode estar relacionado ao fato de possuírem maior afinidade de ligação (VALES-GOMEZ, 1999). A família NKG2 contém também um receptor NKG2F, codificado pelo gene *KLRC4*, que possui resíduos carregados na região transmembrânica, um domínio semelhante à ITIM e nenhum domínio semelhante à lectina do tipo C, mas a função dessa molécula é desconhecida (KELLEY, WALTER e TROWSDALE, 2005). NKG2D é distantemente relacionado aos outros membros da família NKG2, e não se associa a CD94, sendo expresso como homodímero (BOTTINO *et al.,* 2005).

NKG2D é um imunorreceptor ativador transmembrânico pertencente à superfamília das lectinas do tipo-2, o qual contém um resíduo transmembrânico carregado que permite a interação com moléculas adaptadoras (como a DAP10 ou KAP10) (BIASSONI et al., 2000; RAULET, 2003). A expressão de NKG2D não é restrita às células NK, sendo expresso também em células $TCD8^{+}_{\alpha\beta}$, células $T_{\gamma\delta}$, NKT e células T $NK1.1^{+}$ (de camundongos, em humanos não foi identificado) e algumas células mielóides (BIASSONI et al., 2000; RAULET, 2003), sendo que em células NK é um dos receptores mais comumente encontrados (BAUER et al., 1999). Os níveis de expressão de NKG2D aumentam pela exposição à IL-15 (SUTHERLAND et al., 2002).

NKG2D reconhece os ligantes MICA (fig.10), MICB, e a família de proteínas-ligantes de UL-16 (ULBP) (RAULET, 2003; KELLEY, WALTER e TROWSDALE, 2005). As estruturas dos complexos ligados a NKG2D indicam que esse receptor se liga diagonalmente sobre as hélices α-1 e α-2 dos ligantes (RAULET, 2003).

Homodímeros NKG2D formam complexos estáveis com as moléculas MICA e MICB em solução, demonstrando que não são necessários outros componentes para facilitar a interação entre receptor-ligante, e, além disso a glicosiliação de MICA não é essencial, mas aumenta a formação do complexo (STEINLE *et al.,* 2001).

A ligação de moléculas à NKG2D é um estímulo suficiente para ativar a citólise e a produção de citocinas por células NK, e promove também um aumento ou um sinal co-estimulatório para a ativação de células $TCD8^+$ e provavelmente de outras células T (RAULET, 2003). A ligação com NKG2D permite que as células NK matem células alteradas que expressam níveis normais de moléculas HLA, superando os sinais inibitórios (O'CONNOR, HART e GARDINER, 2005).

Os ligantes de NKG2D normalmente são pouco expressos por células normais, mas são hiperregulados em células transformadas, infectadas por vírus, em alguns casos estressadas, como em tumores (RAULET, 2003) e em condições auto-imunes (GROH *et al.*, 2003).

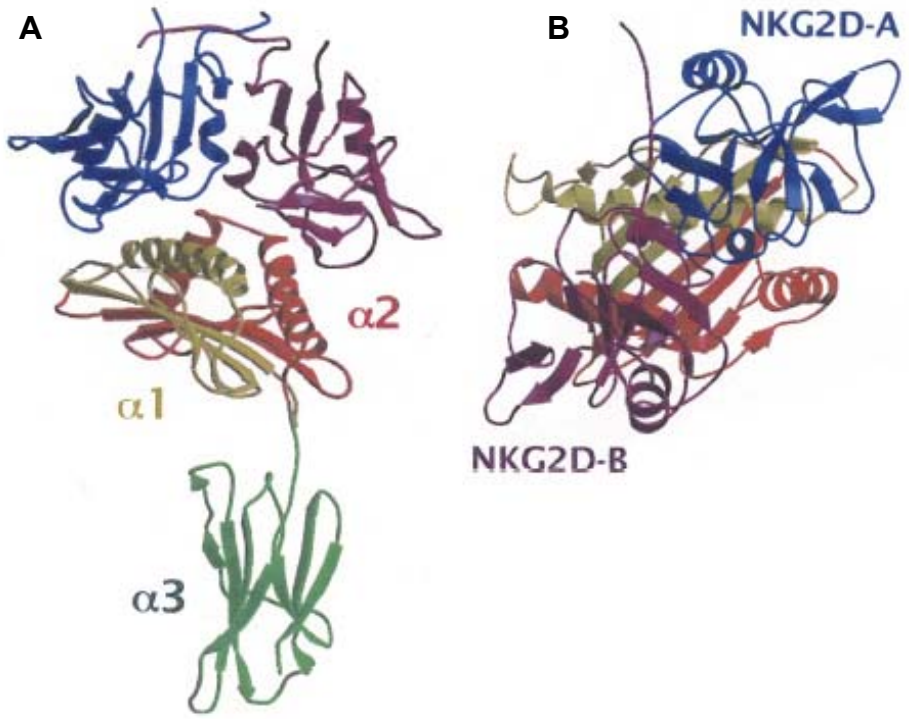

FIGURA 10 – ESTRUTURA DO COMPLEXO NKG2D E MICA

FONTE: LI *et al*., 2001.

NOTA: A - Vista lateral e B - vista de cima do complexo MICA e o homodímero NKG2D, representado em estrutura de fita. Os domínios α1, α2 e α3 de MICA estão coloridos em verde claro, vermelho e verde escuro, respectivamente. O monômero NKG2D-A está representado em azul e NKG2D-B em violeta.

A interação entre NKG2D e MICA ou MICB pode aumentar potencialmente muitas respostas inatas anti-tumorais de células NK e de células T antígeno-específicas (BAUER *et al.*, 1999). MICA-NKG2D pode participar de processos inflamatórios aumentando a produção de IFN-γ por células NK, podendo também promover um sinal co-estimulatório a células T específicas para um auto-antígeno (TIENG *et al.*, 2002). Portanto, MICA e MICB são moléculas MHC de classe I induzidas por estresse que se ligam a receptores NKG2D, principalmente de células NK, e essa ligação, sobretudo de MICA, estimula as células NK, $TCD8^+$ e algumas células $T_{\gamma\delta}$.

Vários estudos mostram evidências de ligação entre várias doenças e os alelos *MICA*, como diabetes tipo-I (SANJEEVI *et al.*, 2002), artrite reumatóide (MARTINEZ *et al.*, 2001), psoríase (CHOI *et al.*, 2000), várias neoplasias, como câncer cervical (GHADERI *et al.*, 2001) e câncer de mama (GROH *et al.*, 1999), doença de Behçet (MIZUKI *et al.*, 1997), doença auto-imune de Addison (GAMBELUNGHE *et al.*, 1999) entre outras.

Conjuntamente, os estudos indicam que os *MIC*s são candidatos evidentes a locos de histocompatibilidade (BAHRAM, 2000) e que existe uma grande relevância de estudos de *MICA* e *MICB* nos processos imunes e em transplantes (BAHRAM *et al.*, 1994). O foco nas moléculas MIC deve ser voltado para a biologia do contato de MICA/B com as células NK e $T_{\gamma\delta,}$ na expressão *in vivo* das moléculas induzidas por estresse tanto em respostas anti-infecciosas como em anti-tumorais, no envolvimento da sua diversidade em diferentes patologias, assim como em transplantes de medula óssea e de órgãos sólidos (BAHRAM, 2000), o que pode ser expandido para um foco nas respostas imunológicas da reprodução.

2.3 *MICA* E *MICB* NO ABORTAMENTO RECORRENTE ESPONTÂNEO

A gravidez em mamíferos é um fenômeno imunológico, no qual o feto não é rejeitado devido a vários mecanismos associados com modificações do estado imune da mãe. Enquanto o feto tem que elaborar mecanismos para escapar do ataque do sistema imune materno para sua sobrevivência, a mãe tem que preservar a sua competência imune durante a gravidez (ØSTENSEN e VILLIGER, 2002).

A imunidade adaptativa e a inata materna são temporariamente tolerantes aos antígenos de histocompatibilidade fetal durante a gestação em mamíferos (SACKS, SARGENT e REDMAN, 1999).

Existem várias moléculas MHC-I relacionadas a essa tolerância. Durante a gravidez, células T maternas adquirem um estado transitório de tolerância específica a alo-antígenos paternos (TAFURI *et al.*, 1995), porém vários estudos indicam que o processo inflamatório é um pré-requisito necessário tanto para uma implantação normal quanto para a gravidez (CHRISTIANSEN *et al.,*2006). Quando a inflamação torna-se excessiva pode causar várias complicações, como reabsorção fetal e abortamento, e quando se torna deficiente pode ocasionar outras complicações, como retardamento do crescimento fetal intrauterino (CHRISTIANSEN *et al.,* 2006).

O principal local de contato direto entre as células derivadas do feto e as células imuno-competentes maternas é a interface materno-fetal no útero, principalmente no local de implantação, nas artérias maternas e no espaço interviloso (CHRISTIANSEN, 1996). O próprio concepto não fica em contato direto com os tecidos uterinos, mas as células epiteliais derivadas do feto, o trofoblasto, invade a mucosa uterina, denominada decídua (fig.11), formando a placenta (MINCHEVA-NILSSON *et al.*, 2006). Existem duas interfaces estruturais na placenta, sendo uma entre o trofoblasto extraviloso e a decídua e a outra entre o sinciciotrofoblasto (STB) e o sangue materno (MINCHEVA-NILSSON, *et al.*, 2006) (fig.12). Os fatores genéticos que regulam as interações entre os diferentes tipos de células nas interfaces materno-fetais e a contribuição relativa dos genomas materno e zigótico são pouco compreendidos.

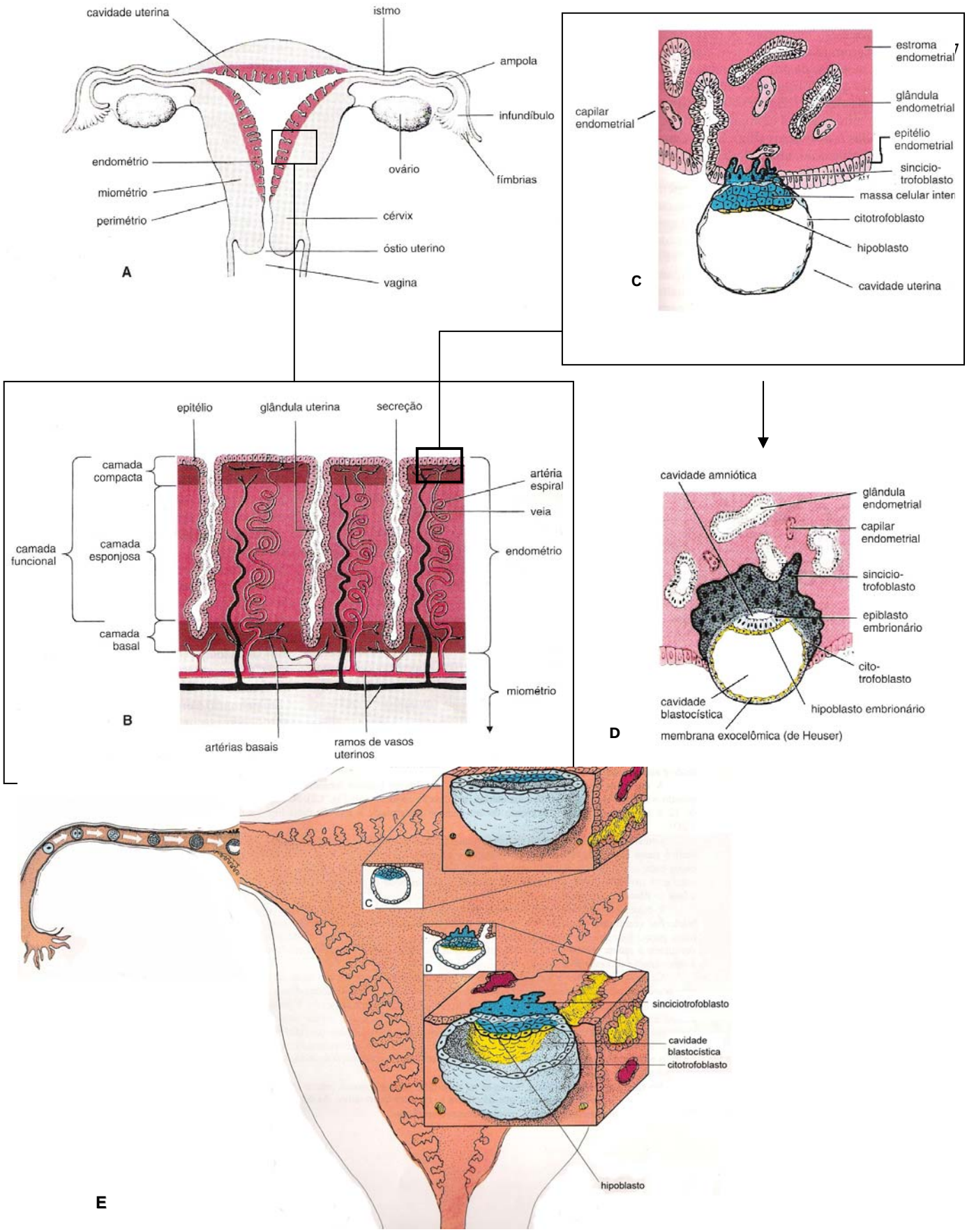

FIGURA 11 – TECIDO UTERINO E INVASÃO DO TROFOBLASTO

FONTE: MOORE, 1994. adaptado.

NOTA: A – Ilustração de uma secção diagramática frontal do útero e trompas uterinas; B – Maior aumento da área delineada em A, mostrando endométrio e miométrio; C – Maior aumento da área delineada em B, mostrando a penetração do sinciciotrofoblasto no epitélio endometrial, após o trofoblasto se prender ao epitélio pelo pólo embrionário do blastocisto. O sinciciotrofoblasto começou a invadir o estroma endometrial ou tecido conjuntivo; D – Corte de um blastocisto parcialmente implantado no endométrio (por volta do 8º dia). Após a rápida proliferação do trofoblasto e desenvolvimento do saco coriônico, os arranjos anatômicos necessários às trocas fisiológicas entre a mãe e o embrião já estão estabelecidos (início da 4ª semana) e por volta da oitava semana a placenta se desenvolve a partir do saco coriônico fetal e uma pequena porção do endométrio (não mostrado). E – Invasão do trofoblasto no tecido uterino: representação em 3D das etapas representadas nas letras C e D (ainda sem a cavidade amniótica).

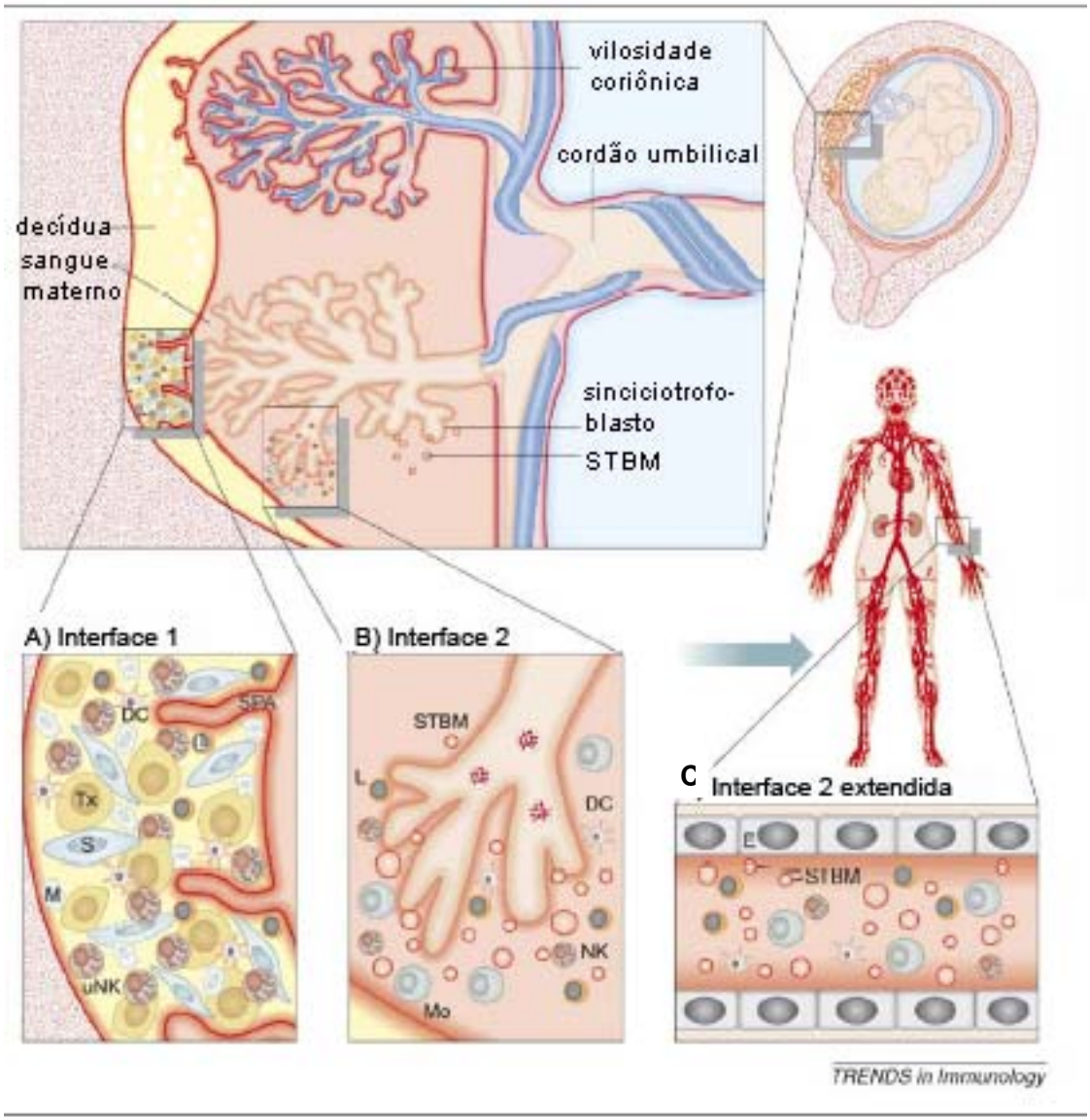

FIGURA 12 – AS DUAS COMUNICAÇÕES IMUNOLÓGICAS ENTRE A MÃE E O FETO DURANTE A REPRODUÇÃO HUMANA

FONTE: SARGENT *et al.*, 2006 adaptado.

NOTA: Durante a gravidez humana existem duas comunicações materno-fetais imunológicas que são separadas espacialmente e, em parte, temporalmente. A – no início da gravidez a interface 1 é dominante e compreende interações locais na decídua entre as células do sistema imune materno, incluindo células NK uterinas (uNK), linfócitos T (L), macrófagos (M) e células dendríticas (DC) e o citotrofoblasto extraviloso invasor (Tx), entre grandes células do estroma (S) e artérias espirais (SPA; não está em escala). A interface 1 praticamente desaparece completamente no terceiro trimestre com regressão do trofoblasto invasor e degeneração de linfócitos associados à decídua. B – A secunda interface (interface 2), separada anatomicamente é entre células imunes maternas circulantes, incluindo linfócitos T (L), células NK (NK), monócitos (Mo) e células dendríticas (DC), e o sinciotrofoblasto que forma a superfície vilosa da placenta hemocorial, uma interação envolvendo respostas imunes sistêmicas. A interface 2 é ativada com o princípio da circulação uteroplacental na 8-9 semana de gravidez, e aumenta com o crescimento placentário até ser a principal comunicação materno-fetal até o fim da gravidez. O sinciciotrofoblasto também libera micropartículas do sinciciotrofoblasto (STBM) na circulação como parte da mudança e arranjo normais da superfície placentária. C – STBMs são liberados diretamente no sangue materno onde circulam por todo corpo (extensão da interface 2) e continuam interagindo com células do sistema imune materno além de células endoteliais (E).

As células imuno-competentes maternas com as quais as células trofoblásticas têm contato estão presentes no sangue periférico materno e na decídua. Espera-se, portanto, que a maioria das reações imunes importantes para sobrevivência fetal ocorra entre essas células (CHRISTIANSEN, 1996; SACKS, SARGENT e REDMAN, 1999).

A tolerância às células fetais é muito complexa e abrange vários mecanismos que modulam o sistema imune materno em nível local e sistêmico (MINCHEVA-NILSSON, *et al.*, 2006). Sendo assim, os antígenos e outros marcadores imunológicos expressos pelas células da interface materno-fetal são de grande interesse.

Apesar de existirem poucas bases científicas para a teoria de que ARE pode ser uma conseqüência de rejeição imune, semelhante à que ocorre em transplantes, por reações alo-imunes contra antígenos HLA paternos presentes no feto, há evidências consideráveis de que as células NK deciduais têm um papel importante na implantação, na invasão inicial do trofoblasto e na patogênese de ARE (CHRISTIANSEN, 1996).

As células NK constituem a população de leucócitos predominante no endométrio no momento da implantação e no início da gravidez (DOSIOU e GIUDICE, 2005), com cerca de 50 a 90% da população leucocitária presente na decídua, onde células B e T são raras (PAHRAM, 2004).

Há dois tipos de células NK de sangue periférico, um com baixa expressão de CD56, especializado em citólise e outro com alta expressão de CD56 que favorece a secreção de citocinas (PAHRAM, 2004).

Durante a gravidez as células NK uterinas (uNK) são encontradas em grande proximidade ao local de implantação e em intenso contato com o trofoblasto extraviloso (DOSIOU e GIUDICE, 2005). O aumento dessas células no início da gravidez, sua dependência hormonal e sua forte proximidade ao trofoblasto sugerem que as uNKs possuem um importante papel na regulação da resposta imune materna ao alo-enxerto fetal, controlando o crescimento e invasão do trofoblasto e o desenvolvimento placentário durante a gravidez humana (DOSIOU e GIUDICE, 2005).

As células uNK expressam altos níveis de CD56, e essas uNK $CD16^{-}$ $CD56^{bright}$ parecem ser os principais reguladores do nível apropriado da reação inflamatória, secretando várias citocinas (CHRISTIANSEN *et al.,* 2006). Os fragmentos trofoblásticos e células apoptóticas provavelmente estimulam a produção de citocinas inflamatórias pelas células uNK, que parecem também sofrer influência da progesterona (CHRISTIANSEN *et al.,* 2006).

A regulação do balanço de citocinas inflamatórias (Th1) e antiinflamatórias (Th2), que se modifica com o avanço da gestação, determinará o resultado da gravidez (CHRISTIANSEN *et al.,* 2006). As citocinas Th1 criam um microambiente propício para a implantação do trofoblasto nos tecidos maternos, ativando fatores angiogênicos e de crescimento, mudando em número e em composição os leucócitos endometriais, reconstruindo a matriz extracelular, ativando células endometriais e estromais. Após o período peri-implantacional um perfil imunológico Th2 é predominante e induz um estado de imunotolerância materna. Além disso, no momento do parto, prematuro ou não, citocinas Th1 passam a ter novamente grande importância (WILCZYŃSKI, 2005).

A decídua uterina secreta proteínas solúveis capazes de inibir respostas imunes mediadas por células maternas, protegendo potencialmente o feto de uma rejeição imune materna durante uma gravidez normal (KAMARAINEN *et al.*, 1996).

Devido à alta capacidade de proliferação e invasão das células do trofoblasto ao penetrarem na decídua e na vascularização uterina para formação da placenta, essa pode ser comparada a um tumor, uma vez que suas células usam mecanismos moleculares similares para crescimento e migração (MINCHEVA-NILSSON *et al.*, 2006).

Foi descrito um mecanismo de escape ao sistema imune em tumores baseado na interação de MICA e MICB com seu receptor NKG2D (RAULET, 2003). Alguns estudos demonstraram que a forma solúvel da proteína MIC (sMIC) é liberada de alguns tipos de tumores no soro de pacientes com câncer e afeta a função de NKG2D agindo como um inibidor competitivo que bloqueia o reconhecimento das moléculas MIC ligadas à membrana, hiporregulando assim a expressão de NKG2D de membrana em células NK e células T (GROH *et al.*, 2002; SALIH *et al.*, 2002).

Em analogia a esses tipos de tumores, as moléculas sMIC presentes no soro de mulheres grávidas são capazes de hiporregular a expressão de NKG2D de superfície em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) (MINCHEVA-NILSSON *et al.*, 2006). Portanto, as moléculas MICA e MICB estão envolvidas não só no aumento da citotoxicidade como também na supressão da resposta citotóxica.

Diferentemente do mecanismo de escape ao sistema imune exercido por células tumorais, na gravidez os ligantes MIC e receptores NKG2D são provenientes de dois indivíduos diferentes.

Células trofoblásticas isoladas no início da gravidez expressam mRNAs de MICA e MICB (MINCHEVA-NILSSON *et al.*, 2006). As moléculas MIC são constitutivamente transcritas na placenta humana durante uma gravidez normal e moléculas sMIC são liberadas a partir de placentas transplantadas para um meio artificial e cultivadas *in vitro* (MINCHEVA-NILSSON *et al.*, 2006). Além disso, nos tecidos envolvidos com o processo reprodutivo, a expressão de proteínas MIC é restrita ao sinciciotrofoblasto (STB), não sendo expressas no citotrofoblasto (CTB), e elas existem na forma intramembrana nas superfícies apical e basal das células e como microvesículas em vacúolos citoplasmáticos (MINCHEVA-NILSSON *et al.*, 2006).

A expressão dos receptores NKG2D na superfície celular é significativamente hiporregulada em PBMC de mulheres grávidas e elevados níveis de moléculas sMIC estão presentes no soro e são capazes de hiporregular receptores NKG2D impedindo a função citotóxica das PBMC de indivíduos saudáveis (MINCHEVA-NILSSON *et al.*, 2006).

A expressão de moléculas MIC na superfície celular em STB expõe a unidade feto-placental ao ataque de linfócitos T citotóxicos maternos, porém, as moléculas sMIC presentes no soro de mulheres grávidas hiporregulam a expressão de NKG2D na superfície de PBMC promovendo o escape ao sistema imune materno por parte do feto. Entretanto, a forma como o sistema MIC/NKG2D funciona em abortamentos é desconhecida sendo, portanto, uma área do conhecimento a ser explorada.

3 OBJETIVOS:

3.1 OBJETIVO GERAL:

Investigar a existência de associação entre polimorfismos dos locos *MICA* e *MICB* com a predisposição a ARE de casais brasileiros em um estudo caso-controle.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Proceder a tipagem dos genes *MICA* e *MICB* em nível alélico em 70 casais brasileiros com ARE de causas desconhecidas e em 65 casais brasileiros férteis, que tenham tido pelo menos dois filhos, como amostra controle;
- Calcular as freqüências alélicas e haplotípicas dos genes *MICA* e *MICB*;
- Calcular o desequilíbrio de ligação entre os locos *MICA* e *MICB* em ambas as amostras.
- Verificar a relação entre a diversidade dos genes *MICA* e *MICB* e o ARE pelo aborto repetitivo através da análise de associação entre esses genes e o ARE.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Esse trabalho é constituído por duas amostras, sendo uma amostra paciente e a outra controle.

A amostra paciente foi composta por 70 casais que tiveram abortos recorrentes espontâneos de causa desconhecida (aqui considerado como pelo menos dois abortamentos espontâneos ocorridos até a vigésima semana do período gestacional) e é predominantemente do grupo étnico caucasóide. Esses casais não são consangüíneos, e as mullheres não têm registros de gestações bem sucedidas, infecções, doenças auto-imunes, assim como alterações hormonais, ginecológicas, anatômicas ou cromossômicas.

A amostra controle foi constituída por 65 casais que não pertencem às mesmas famílias da amostra paciente e não possuem consangüinidade entre si. Esses casais apresentam pelo menos duas gestações bem sucedidas, são saudáveis e não possuem registros de abortos espontâneos. Esses casais pertencem ao mesmo grupo étnico, etário e apresentam o mesmo nível sócio-econômico da amostra paciente.

Os casais pacientes foram atendidos na Unidade de Genética Médica e Reprodução Humana do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná e na Clínica Genetika – Centro de Aconselhamento e Laboratório de Genética, na cidade de Curitiba, no período compreendido entre os anos de 1997 e 2005.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas (Anexo 1), e os casais da amostra paciente e da amostra controle assinaram um termo de consentimento informado (Anexo 2) para participação no estudo e para a coleta de amostras sangüíneas.

4.2 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Dez mililitros (10 mL) de sangue periférico foram coletados de cada indivíduo, através de punção venosa, em tubos estéreis tipo *vacutainer* com EDTA para coleta sangüínea. Essas amostras foram centrifugadas para obtenção da camada de leucócitos da qual foi extraído o DNA pela técnica de *salting-out* (JOHN *et al.*, 1990, modificado por LAHIRI e NURNBERGER, 1991). Esse método desenvolve-se essencialmente em cinco etapas:

- Obtenção da camada de leucócitos por centrifugação do sangue total coletado com anticoagulante EDTA.
- Lise de eritrócitos através do uso de tampão de lise de células vermelhas (RCLB 1X) pH 7,6.
- Quebra da membrana nuclear com SDS a 20% e remoção de enzimas como DNases e RNases por meio de proteinase K e tampão da proteinase K.
- Precipitação de proteínas com NaCl 6M.
- Precipitação do DNA com etanol absoluto.

4.2.1 Cálculo da concentração do DNA

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

4.3 TIPAGEM DO GENE *MICA* PELA TÉCNICA PCR-SSOP

Para a maioria das metodologias baseadas em DNA, o processo de PCR é usado apenas como um passo de amplificação para obter o DNA alvo necessário. Posteriormente, o processo de tipagem de HLA e MICA/B requer um passo de pós-amplificação para discriminar entre os vários alelos (por exemplo, RFLP, SSOP, tipagem reversa por SSO-DNA...) (ONE LAMBDA, INC, 2004).

Para a caracterização dos alelos do gene *MICA* foi empregado o método de tipagem da reação em cadeia da polimerase utilizando-se sondas de oligonucleotídeos seqüência-específicos, do inglês: *Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotide Probes* (PCR-SSOP), através do Kit LABType MICA, fabricado por One Lambda Inc. Esse método utiliza a tecnologia Luminex® em seu método de tipagem reversa por SSO-DNA. Essa tecnologia consiste em um sistema de multi-análise que trabalha com um conjunto de microesferas codificadas por cores de diferentes comprimentos de onda, as quais são analisadas num avançado Fluorímetro de Fluxo. Microesferas codificadas por uma determinada cor contêm em sua superfície apenas sondas de oligonucleotídeos de mesma seqüência, sendo assim, diferentes microesferas podem ser usadas em um único tubo, substituindo o formato convencional de multi-poços.

Todos os procedimentos para o uso do Kit LABTypeMICA foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. A metodologia se assemelha ao SSOP padrão, na qual primeiramente a região alvo do DNA é amplificada por PCR na região do gene de interesse, no entanto, na tecnologia Luminex a região alvo do DNA é amplificada com o uso de oligonucleotídeos iniciadores biotinilados. Para a PCR, o kit LABTypeMICA acompanha um D-mix, contendo as soluções necessárias para a reação (tampão, $MgCl_2$, dNTPs) e uma solução contendo os oligonucleotídeos iniciadores específicos para hibridização com os éxons 2, 3, 4 e 5 e a PCR é realizada no Termociclador Perkin-Elmer 9600.

Cada produto de PCR marcado foi desnaturado, mantido na forma de fita simples através do uso de tampões. O produto de PCR em fita simples foi re-hibridizado às sondas complementares de DNA (sondas de oligonucleotídeos seqüência-específicos) conjugadas com as microesferas fluorescentes. Após o processo de lavagem das microesferas, o DNA biotinilado (proveniente da amostra) foi marcado com conjugado de R-Ficoeritrina/Estreptoavidina (SAPE). A leitura das reações foi realizada utilizando-se um fluorímetro de fluxo (LABScan™ 100), o qual emprega a tecnologia Luminex, em que um laser de cor vermelha com comprimento de onda de 633nm reconhece a cor da microesfera e outro laser, de cor verde, com comprimento de onda de 532nm reconhece a intensidade da fluorescência emitida

pela Ficoeritrina presente na superfície de cada microesfera, identificando se a mesma estava ou não marcada com SAPE, determinando assim a sua positividade.

As tipagens foram realizadas com auxílio do software *HLA Visual*, versão 2.0 que faz a coleta de dados e a determinação dos alelos. O programa considera a combinação de microesferas hibridizadas com o DNA amplificado para determinar cada alelo, tendo um padrão de quais e da percentagem de microesferas que hibridizam em cada alelo. Quando uma microesfera que deveria ter hibridização negativa é contada acima do *cutoff* padrão de um determinado alelo, porém a combinação com as outras microesferas indicam que a tipagem seria esse determinado alelo, o resultado é apresentado tendo essa microesfera como falso-positiva (FP). O contrário acontece quando uma microesfera é hibridizada em menor quantidade do que ocorre em indivíduos controles, utilizados pelo programa, para um determinado alelo (microesfera abaixo do *cutoff* padrão), sendo que a combinação com as outras microesferas sugerem que o indivíduo seria portador desse determinado alelo. Nesse caso, a tipagem é dada sendo indicado que a microesfera é falso-negativa (FN). A figura 13 exemplifica uma tipagem sem microesferas FP ou FN (quadros A e B da figura 13) e uma tipagem com uma microesfera FN (quadros C e D da figura 13).

4.4 TIPAGEM DOS GENES *MICA* E *MICB* PELA TÉCNICA PCR-SSP

A metodologia de reação em cadeia da polimerase utilizando oligonucleotídeos iniciadores seqüência-específicos, do inglês: *Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primers* (PCR-SSP) baseia-se no princípio de que oligonucleotídeos iniciadores apresentam complementaridade completa ou quase completa com uma seqüência de DNA alvo, e utiliza a Taq DNA polimerase recombinante, para amplificar essa seqüência (ONE LAMBDA, INC., 2004). Os pares de oligonucleotídeos são concebidos para apresentar apenas correspondências perfeitas com um único alelo ou grupo de alelos. Sob condições de PCR estritamente controladas, os pares de oligonucleotídeos permitem a amplificação de seqüências alvos (ou seja, um resultado positivo), enquanto que pares de

oligonucleotídeos sem correspondência não resultam em amplificação (ou seja, um resultado negativo) (ONE LAMBDA, INC., 2004).

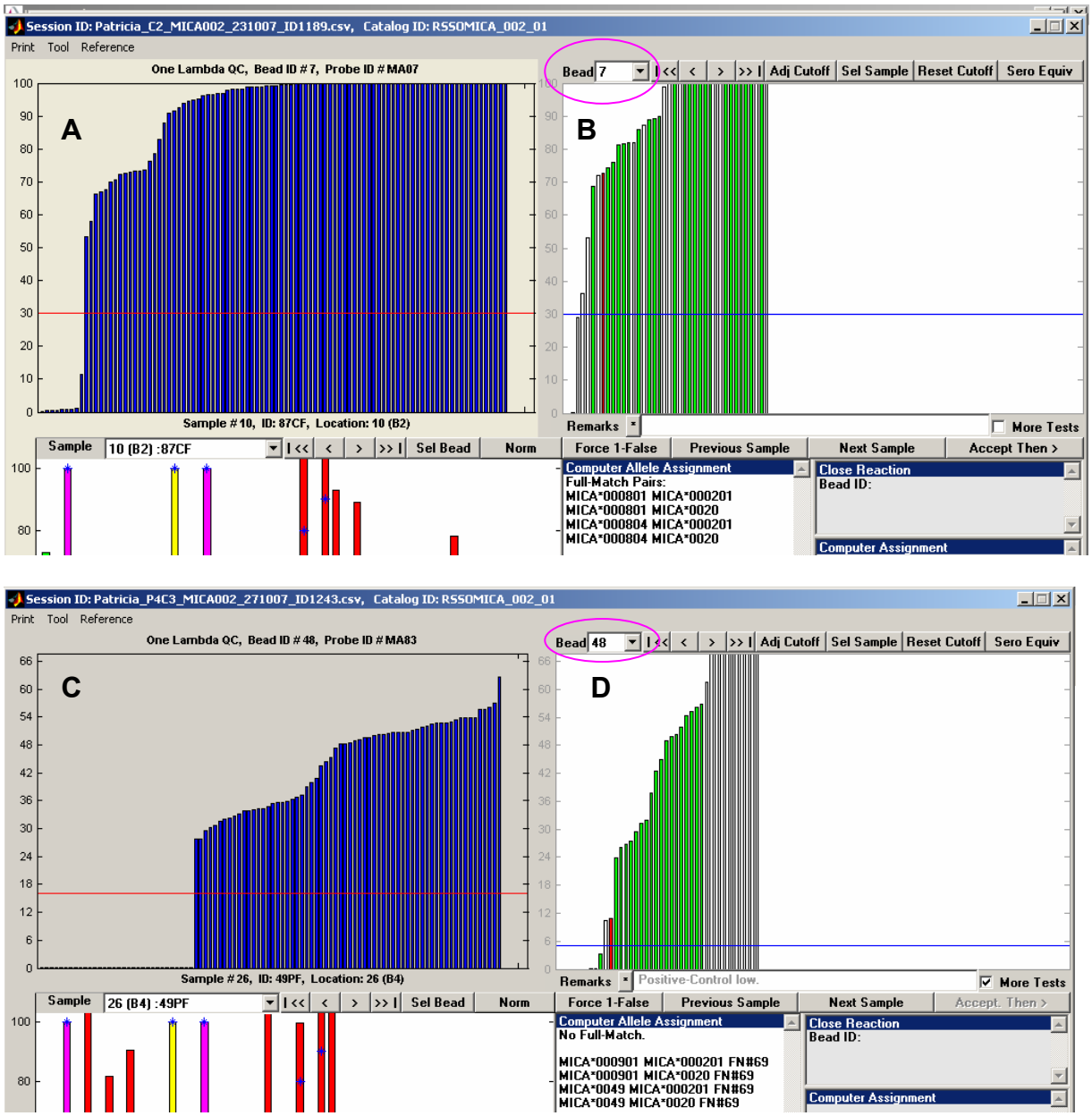

FIGURA 13 – EXEMPLO DE ANÁLISE DA TIPAGEM ALÉLICA DO GENE *MICA* POR SSOP PELO PROGRAMA *HLA Visual* , VERSÃO 2.0

FONTE: A Autora (2008).

NOTA: Os quadros A e C contêm a representação gráfica da microesfera indicada no quadro B e D, respectivamente (número referente à *bead* circulado em rosa), em indivíduos negativos e positivos para essa microesfera, utilizados como controle pelo programa. Barras abaixo da linha vermelha (*cutoff*) nos quadros A e C são de indivíduos negativos para essa microesfera, barras azuis acima do *cutoff* são de indivíduos positivas para essa microesfera. Nos quadros B e D, cada barra verde representa uma microesfera diferente, barras brancas representam microesferas que hibridizam em regiões controles (presentes em todos os alelos) e a barra vermelha representa a microesfera cujo número está circulado em rosa. As linhas vermelha e azul nos gráficos dos quadros A, B e C marcam o *cutoff* padronizado (limite da percentagem de microesferas hibridizadas), e a linha azul do quadro D marca um *cutoff* alterado pelo pesquisador, para uma percentagem menor. No quadro B a microesfera demonstrada (*bead* 7) é positiva, uma vez que a percentagem de microesferas 7 que hibridizaram no gene *MICA* do indivíduo em questão ultrapassa o valor do *cutoff* (30%), excedendo 70% de hibridização. Já no quadro D, a microesfera 48 apresentou menos de 30% de hibridização, podendo ser negativa ou falso-negativa (FN). Entretanto, indivíduos controles do quadro C, negativos para essa microesfera, apresentam menos que 1% de hibridização, sugerindo que a microesfera 48 é positiva, apesar de ter hibridizado menos (~12%) que o padrão (30%) no gene *MICA* do indivíduo em questão. Portanto, a linha do *cutoff* foi reduzida para considerar a microesfera 48 FN como positiva.

Após o 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 pH 8,0) e visualizados por coloração com brometo de etídio durante exposição à luz ultravioleta.

A reação de PCR foi feita para 10μl de volume final, sendo que para cada reação foram utilizados: 20ng de DNA, tampão 1x (Invitrogen), 1,5mM de $MgCl_2$ (Invitrogen), 0,2mM de cada dNTP (Invitrogen), 0,5U/μl de Platinum Taq polimerase (Invitrogen), 0,5μM dos oligonucleotídeos específicos de cada reação e 0,08μM dos oligonucleotídeos 5' (5' CAGTGCCTTCCCAACCATTCCCTTA 3') e 3' (5' ATCCACTCACGGATTTCTGTTGTGT 3') para o controle interno da reação, que reconhecem seqüências conservadas do gene do hormônio de crescimento (GH). As ciclagens são efetuadas no termociclador Perkin-Elmer 9600. As temperaturas e tempos de ciclagem foram: a) 94ºC por 5 minutos, b) 94ºC por 20 segundos, c) 63ºC por 50 segundos, d) 72ºC por 30 segundos e e) 4ºC até a retirada dos tubos de PCR do termociclador para posterior corrida eletroforética. Os passos b, c, d foram repetidos 30 vezes. Os oligonucleotídeos *sense* e *anti-sense* de *MICA* e *MICB* estão listados nos quadros 5 e 6, respectivamente.

O volume total de 10μl dos produtos dos genes *MICA* ou *MICB* amplificados por PCR-SSP foi misturado a 1μl de azul de bromofenol e separado em gel de agarose 1,0 a 1,2% a 100V, ou 2,5% a 150 V, com tempo de corrida variando de 5 a 20 minutos. A interpretação dos resultados de PCR-SSP baseia-se na presença ou ausência de um fragmento de DNA amplificado específico. Dado que a amplificação durante a reação de PCR pode ser influenciada adversamente por vários fatores (erros de pipetagem, DNA de qualidade deficiente, presença de inibidores etc.), existe um par de oligonucleotídeos de controle interno incluído em todas as reações de PCR. O par de oligonucleotídeos de controle amplifica uma região conservada do gene do GH, que está presente em todas as amostras de DNA, e é usado para confirmar a integridade da reação de PCR. (Fig 14).

FIGURA 14 – INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DO GEL DE ELETROFORESE

FONTE: ONE LAMBDA INC., 2004 adaptado.

NOTA: A banda de controle interno e a ampla banda de oligonucleotídeos iniciadores não incorporados atuam como marcadores de tamanho. Qualquer banda visível entre os dois marcadores de tamanho deverá ser considerada como banda de tipagem positiva. Na presença de uma banda de tipagem positiva (amplificação específica de um alelo *de MICA* ou *MICB*), a banda do controle interno pode ser fraca ou ausente.

As tipagens dos genes *MICA* e *MICB* foram baseadas no protocolo proposto por Collins e colaboradores (2002) com algumas modificações nas condições da PCR que possibilitaram uma melhor sensibilidade e especificidade de algumas reações. Segundo os autores, os oligonucleotídeos iniciadores listados nos quadros 5, 6 foram desenhados com base na análise das seqüências nucleotídicas dos alelos disponíveis na página http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez. Como outros alelos foram descritos após 2002, outros oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados nesse trabalho para amplificar os novos alelos e estão listados nos quadros 5 e 6.

OLIGONUCLEOTÍDEOS *SENSE MICA*				
Código do Oligonucleotídeo	Localização Exon	Posição 3`	Seqüência (5'---- 3')	Alelos alvo *MICA**
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

QUADRO 05 - SEQÜÊNCIAS DE OLIGONUCLEOTÍDEOS DE *MICA* (CONTINUA)

FONTE: RIBAS, 2007.

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

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
176ª	2	176	TCAgCCCTTCCTgCgCTA	004-006, 008-010, 016, 019, 024, 025, 027, 028, 031-033, 042, 044, 048, 049, 051
176G	2	176	TCAgCCCTTCCTgCgCTg	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
261ª	2	261	CATgggACAgAgAgACCAgA	001, 012, 018, 021
341A	3	341	AAggCTTgCATTCCCTCCA	001-016, 018-053
405T	3	405	AgCTCCCAgCATTTCTACTAT	00703, 00902
409ª	3	409	CCAgCATTTCTACTACgATA	014, 015
433G	3	433	gCTCTTCCTCTCCCAAAACg	004, 006, 009, 044, 049

QUADRO 05 - SEQÜÊNCIAS DE OLIGONUCLEOTÍDEOS DE *MICA* (CONTINUAÇÃO)

FONTE: RIBAS, 2007.

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

439ª	3	439	CTCTCCCAAAACCTggAgA	001, 002, 005, 007, 008, 010-032, 034-043, 045-048, 050-053. Com mm na posição 433: 004, 006, 009, 044, 049
454ª	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
520ª	3	520	ATTTCTTgAAggAAgATgCCA	001-010, 012-033, 035-053
520G	3	520	TCTTgAAggAAgATgCCg	011, 034
586ª	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
592ª	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
648ª	4	648	gTCACCCgCAgCgAggCA	00803

QUADRO 05 - SEQÜÊNCIAS DE OLIGONUCLEOTÍDEOS DE *MICA* (CONTINUAÇÃO)

FONTE: RIBAS, 2007.

NOTA: mm= missmatch; [#] alelos alvo não disponíveis pois a seqüência do intron 5 foi descrita para o gene *MICA*, mas não para os alelos individualmente.

663C	4	663	gCCTCAgAgggCAACATC	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	Deleção de *MICA*
OLIGONUCLEOTÍDEOS *ANTI-SENSE MICA*				
Código do Oligonucleotídeo	Localização Exon	Posição 3`	Seqüência (5'---- 3')	Alelos alvo *MICA**
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

QUADRO 05 - SEQÜÊNCIAS DE OLIGONUCLEOTÍDEOS DE *MICA* (CONTINUAÇÃO)

FONTE: RIBAS, 2007.

NOTA: mm= missmatch; [#] alelos alvo não disponíveis pois a seqüência do intron 5 foi descrita para o gene *MICA*, mas não para os alelos individualmente.

433C’	3	433	TCCATTCCTCAgTCTCCAC	004, 006, 009, 044, 049
439A’	3	439	ggCACTgTCCATTCCTCAgA	033
442T’	3	442	TggggCATTgTCCATTCCTT	001, 031, 040
442C’	3	442	ggggCATTgTCCATTCCTC	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

QUADRO 05 - SEQÜÊNCIAS DE OLIGONUCLEOTÍDEOS DE *MICA* (CONTINUAÇÃO)

FONTE: RIBAS, 2007.

NOTA: mm= missmatch; [#] alelos alvo não disponíveis pois a seqüência do intron 5 foi descrita para o gene *MICA*, mas não para os alelos individualmente.

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
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	gTgTCgTggCTCAAAgATAg	016, 039
730C'	4	730	gTgTCgTggCTCAAAgATAC	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	ATAACAAAAATAgCAgCAgCC	00801, 00802, 023, 028, 053
1002G'	5	1002	TTCTTCTTACAACAACAgACg	00201, 015, 017, 020, 041, 046, 050
1038ª'	5	1038	gCTTTTCTCACCTggACCA	048
1088ª'	6	1088	gCATCCCTgTggTCACTCA	049
delR'		2236*	TgACCCCACATTTggTCg	*MICA deletion*

QUADRO 05 - SEQÜÊNCIAS DE OLIGONUCLEOTÍDEOS DE *MICA* (CONCLUSÃO)

FONTE: RIBAS, 2007.

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

OLIGONUCLEOTÍDEOS *SENSE MICB*				
Código do Oligonucleotídeo	Localização Exon	Posição 3`	Seqüência (5'---- 3')	Alelos alvo *MICB**
98 T	2	98 T	CCC ACA G TC TTC GTT ACA ACC TCA T	todos
116 G	2	116 G	TGG TGC TGT CCC AGG ATG G	- 001[a]
116 A	2	116 A	TGG TGC TGT CCC AGG ATG A	001
203 A	2	203 A	AGA AAC GCA GGG CAA AGC A	011
203 C	2	203 C	GAA ACG CAG GGC AAA GCC	-011[a]
263 G	2	263 G	TGG GAC ACA GAG ACC GAG GG	022
314 G	2	314 G	GAG GAC CCT GAC TCA TAT CAA GGG	012
314 A	2	314 A	GGA GGA CCC TGA CTC ATA TCA AGG A	-012[a]
552 G	3	552 G*	GAC ACA CTA TCG CGC TAT GCA G	todos
577 C	3	577 C	GAC TGC CTG CAG AAA CTA CAG C	-009N[a]
406 A	3	406 A	GGC TCC CGG CAT TTC TAC TAC A	20101; 2012; 007; 008; 014;015; 018; 020; 022
643 A	4	643 A	ATG GTG AAT GTC ACC TGC AGC A	006;015
643 G	4	643 G	ATG GTG AAT GTC ACC TGC AGC G	-(006;015)
798 G	4	798 G	TGG GAA TGG AAC CTA CCA GAC G	0504

OLIGONUCLEOTÍDEOS *ANTI-SENSE MICB*				
Código do Oligonucleotídeo	Localização Exon	Posição 3`	Seqüência (5'---- 3')	Alelos alvo *MICB**
223 T	2	223 T	CAG GTC TTA GCT CCC AGG ACA TT	40101;40102; 20

QUADRO 06 – SEQÜÊNCIAS DE OLIGONUCLEOTÍDEOS DE *MICB* (CONTINUA)

FONTE: adaptado de COLLINS *et al.,* 2002.

NOTA:
[a]: compartilham homologia com alelos MICA.
[b]: foi incluído um mismatch no nt 13 do primer 635 G para prevenir falso-positivo na tipagem de *MICB*.
- : Exceto o alelo.

223 C	2	223 C	CAG GTC TTA GCT CCC AGG AC	-(40101;40102;20)
238C	2	238 C	GGT CTC TGT GTC CCA GGT CTC	20101; 20102; 7; 8; 14; 15; 16; 19; 22
238 T	2	238 T	GGT CTC TGT GTC CCA GGT CTT	1; 3; 40101; 40102; 50101;50201;50202; 50203; 503; 504; 6; 9N; 10; 11; 12; 3;17; 18; 20; 21N;
303 A	2	303 A [f]	CCT CCT TTC TGG TCC TTG ATA TGA GT	-17
303 G	2	303 G	CTT TCT GGT CCT TGA TAT GAG G	17
363 C	3	363 C	TGG TGC TGC TGT CTT CAT GC	8
363 G	3	363 G	CTG GTG CTG CTG TCT TCA TGG	-8
406 C	3	406 C	GGA GAG GAA GAG CTC CCC ATC	1; 3; 40101; 40102; 50101; 50201; 50202; 50203; 503; 504; 6; 9N; 10; 11; 12; 13; 16;17; 19; 21N;
552 C	3	552 C	TTC TGC AGG CAG TCT GCC	todos
577 A	3	577 A	GCC ACC CCG GAT TTC AGA TAT CA	9N
635 A	4	635 A	TCT GAG ACC TCG CTG CAG A	3; 9N
635 G	4	635 G	CCT CTG AGA CCT CG**T** TGC AGG	-(3; 9N) [b]
643 C	4	643 C	TGA TGT TGC CCT CTG AGA CCT C	-(6; 15)
699 T	4	699 T	TGA CGC CAG GTC AGT GTG ATA TTT	503; 13; 16
707 G	4	707 G	CCT GAC GCC AGG TCA GTG	todos
836 T	4	836 T	TGT GTT CCA TGT AGC AGG TGA ACT	007
870 G	4	870 G	GGC ACA GGG TGA GTG CCG	-50101
871 T	4	871 T	GGG CAC AGG GTG AGT GCT	13; 14; 15; 16
871 C	4	871 C	GGG CAC AGG GTG AGT GCC	-(13;14;15;16)

QUADRO 06 – SEQÜÊNCIAS DE OLIGONUCLEOTÍDEOS DE *MICB* (CONCLUSÃO)

FONTE: adaptado de COLLINS *et al.,* 2002.

NOTA:
[a]: compartilham homologia com alelos MICA.
[b]: foi incluído um mismatch no nt 15 do primer 635 G para prevenir falso-positivo na tipagem de *MICB*.
- : Exceto os alelos.

As reações de amplificação por SSP para *MICA* foram organizadas em mixes para discriminação dos diferentes alelos desse gene (quadro 7). Esses mixes foram modificados segundo Ribas (2007), sendo que alguns deles possuem controles positivos para validação das reações. Devido à grande dificuldade de se conseguir esses controles, alguns mixes não os possuem, mas ainda assim serão considerados nas análises. A SSP para o gene *MICA* foi realizada somente nos casos de ambigüidade pela SSOP. De acordo com as ambigüidades foi feita uma listagem de alelos ambíguos para determinação do mix a ser usado na SSP. Alguns mixes apresentaram temperaturas de anelamento ou concentração dos oligonucleotídeos específicos distinta da descrita anteriormente.

O quadro 8 foi adaptado de COLLINS e colaboradores (2002), incluindo-se iniciadores para novos alelos e representa os mixes de oligonucleotídeos *sense* e *anti-sense* para identificação dos alelos de *MICB*. O *worksheet* para *MICB* está representado no quadro 9.

Mix	Alelos *MICA* alvo	Tamahno fragmento (pb)	Código do Oligonucleotídeo *Sense*	Código do Oligonucleotídeo *anti-sense*	ºC para anelamento
1	001	616	139CA	442T'	63
2	00201/020,015,017,041,050	449	692A	1002G'	63
3	002/020,015,017,046	1854	146T	1002G'	63
4	002/020,015,041,046	1317	341A	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	176A	663A'	63
9	006	731	176A	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	648A	821C'	63
13	004,006,009,044,049	568	176A	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

QUADRO 07 - MIXES DE OLIGONUCLEOTÍDEOS *SENSE* E *ANTISENSE* USADOS PARA IDENTIFICAR OS ALELOS *MICA* (CONTINUA)

FONTE: RIBAS, 2007.

NOTA: Concentração final de oligonucleotídeos iniciadores: [c]0,25µM, [d]0,5µM e [e]2µM. As demais reações tiveram concentração final de 1,0µM.

21 [e]	014	216	409A	586C’	60
22 [e]	015	217	409A	586T’	63
23	016	770	586G	730G’	63
24	017	516	139CG	341C’	68
25	001,018	590	261A	536T’	63
26	012,018,021	615	139CA	442C’	63
27	010,016,019,022,033	854	592A	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	592A	730C’	63
30 [e]	010,016,019,022,032,036,044,049	191	439A	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	586A	952C’	63
35	004,006,009,014,024,028,036,044,049	860	586G	821T’	63
36	005,008,024,027,034,035,037 038,039,042,048053	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’	65
43	031	578	176A	442T’	63
44	032	673	176A	536A’	63
45	033	575	176A	439A’	63
46	034	814	520G	713G’	60
47	035,037,039,042	746	586A	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	454A	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]	002,007,011,015,017,020,023,026,029,030 034,035,037-041,043,045,046,047, 050,052	761	139CG	586T’	63
53	034,035,037,038,039,042	834	454A	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	586A	730G’	63
56	040	617	139CG	442T’	63
57	041,047	753	146G	586T’	63
58	042	850	586A	810A’	63
59	043	762	86G	536C’	63
60	044	607	139CG	433C’	63
61	045	861	586A	820C’	63

QUADRO 07 - MIXES DE OLIGONUCLEOTÍDEOS *SENSE* E *ANTISENSE* USADOS PARA IDENTIFICAR OS ALELOS *MICA* (CONTINUAÇÃO)

FONTE: RIBAS, 2007.

NOTA: Concentração final de oligonucleotídeos iniciadores: [c]0,25µM, [d]0,5µM e [e]2µM. As demais reações tiveram concentração final de 1,0µM.

62	046	868	520A	692C'	63
63 [d]	030,047	985	520A	880C'	63
64	048	1137	586G	1038A'	63
65 [c]	049	680	10820A	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	001,002,007,011,012,014,015,017,018,020 021, 023,026,029-032,034-043,045-047,050-052	680	86G	454T'	63
69	050	475	176G	337A'	63

QUADRO 07 - MIXES DE OLIGONUCLEOTÍDEOS *SENSE* E *ANTISENSE* USADOS PARA IDENTIFICAR OS ALELOS *MICA* (CONCLUSÃO)

FONTE: RIBAS, 2007.

NOTA: Concentração final de oligonucleotídeos iniciadores: [c]0,25µM, [d]0,5µM e [e]2µM. As demais reações tiveram concentração final de 1,0µM.

Mix	Alelos *MICB* alvo	Tamanho fragmento (pb)	Código do Oligonucleotídeo *Sense*	Código do Oligonucleotídeo *anti-sense*	ºC para anelamento
1	001	225	116 A	303 A	58,6
2	001; 003; 0040101; 0040102; 0050101; 0050201; 0050202; 0050203; 00503; 00504; 006; 009N; 010; 011; 012; 013; 017; 018; 020; 021N	180	98 T	238 T	55,1
3	0020101; 0020102; 007; 008; 014; 015; 016; 019; 022	180	98 T	238 C	56
4	00503; 013; 016	652	577 C	699 T	58,4
5[a]	013; 014; 015; 016	948	552 G	871 T	60,6
6	0040101; 0040102; 020	167	98 T	223 T	58,6
7	003	587	577 C	635 A	58,3
8	008	558	116 G	363 C	60
9	009N	792	98 T	577 A	59
10	011	512	203 A	406 C	59
11	012	546	314 G	552 C	59,3
12	006; 015	264	643 A	870 G	62
13	0020101; 0020102; 007; 008; 014; 015; 018; 020; 022	185	406 A	552 C	59
14	022	597	263 G	552 C	61
15	00504	112	798 G	871 C	61,8
16	007	1066	406 A	836 T	59
17	-008	576	98 T	363 G	58,6
18	-011	1300	203 C	707 G	58,4
19	-012; -013; -014; -015; -016	1356	314 A	871 C	62
20	-006; -015	725	552 G	643 C	58,6
21	-001; -017	229	116 G	303 A	60
22	-009N; -013; -014; -015; -016	822	577 C	871 C	61,8
23	-0040101; -0040102; -020	167	98 T	223 C	58,8
24	-003; -009N	1339	98 T	635 G	59,6
25	-0050101	266	643 G	870G	62

QUADRO 08 – MIXES DE OLIGONUCLEOTÍDEOS *SENSE* E *ANTISENSE* USADOS PARA IDENTIFICAR OS ALELOS *MICB*

FONTE: adaptado de COLLINS *et al.,* 2002.

NOTA: Todas as misturas de oligonucleotídeos foram preparadas combinando-se os oligonucleotídeos sense e anti-sense em uma concentração final de 1µM, exceto quando indicado (0,25µM[a]).

MICB MIX	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
001																									
0020101																									
0020102																									
003																									
0040101																									
0040102																									
0050101																									
0050201																									
0050202																									
0050203																									
00503																									
00504																									
006																									
007																									
008																									
009N																									
010																									
011																									
012																									
013																									
014																									
015																									
016																									
017																									
018																									
019																									
020																									
021N																									
022																									

QUADRO 09 – *WORKSHEET* DE *MICB*
FONTE: A AUTORA (2008)

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.5.1 Freqüências alélicas e haplotípicas

As freqüências alélicas e genotípicas foram obtidas por contagem direta através do pacote de programas ARLEQUIN versão 3.0 (EXCOFFIER *et al.,* 2005), o qual realiza este cálculo pela fórmula:

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

Onde:

F_{al}: freqüência alélica (ou 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 de cada gene.

Para verificar se as freqüências genotípicas encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg foi utilizado o programa ARLEQUIN versão 3.0, que emprega o método de Guo e Thompson (1992).

As freqüências haplotípicas foram estimadas pelo método de máxima verossimilhança que utiliza o algoritmo EM (maximização de expectativa), descrito por Excoffier e Slatkin (1995), que faz parte do conjunto de programas disponíveis no pacote ARLEQUIN. Para a comparação de freqüências e teste do equilíbrio de Hardy- Weinberg foi utilizado o teste do X^2. A partir dos dados de freqüências, foram estimados os valores de desequilíbrio de ligação para os locos estudados, mediante a utilização do programa ARLEQUIN. 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 loco

p_b: freqüência observada do alelo (b) de um outro loco

$p_a p_b$: freqüência esperada de um haplótipo (ab)

Porém, 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:

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

onde o valor de $\Delta_{ab,\,Max}$ 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' 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. O grau de significância do desequilíbrio de ligação foi avaliado através do teste exato de Fisher, em tabelas de contingência 2 x 2.

A diversidade gênica, medida que indica a heterozigosidade esperada para um dado loco sob equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi estimada pelo programa ARLEQUIN, pela fórmula de Nei (1987):

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

onde:

n: número de cópias de cada gene na amostra

k: número de alelos

p_i^2: freqüência observada os i_s genótipos homozigotos na amostra

As comparações entre os grupos amostrais Paciente e Controle das freqüências alélicas, haplotípicas e de homozigotos foram feitas utilizando-se tabelas de contingência L X C, do programa BioEstat – Aplicações Estatísticas nas áreas das Ciências Biomédicas (AYRES *et al.,* 2005).

Os casais pacientes e controles foram agrupados em quatro grupos, dentro de cada amostra estudada: S ♀ S ♂: Quando a mulher e o homem são portadores do alelo/haplótipo em questão; S ♀ N ♂: Quando apenas a mulher porta o alelo/haplótipo em questão; N ♀ S ♂: Quando apenas o homem possui o alelo/haplótipo em questão; N ♀ N ♂: Quando o casal não apresenta o alelo/haplótipo em questão.

Foi realizado o teste de contingência, em uma tabela 4 x 2, com grau de liberdade igual a 3, para verificar se existe diferença entre os tipos de casais de cada amostra (Controle x Paciente) para cada alelo e haplótipo. Os alelos/haplótipos, cujos resultados foram significativos, foram examinados em tabelas L X C, comparando-se cada tipo de casal das duas amostras separadamente.

As freqüências dos alelos em cada tipo de casal foram calculadas por contagem direta e o teste do X^2 foi utilizado para verificação da existência de

diferenças estatisticamente significativas entre as freqüências alélicas de cada grupo de casal das amostras Paciente e Controle.

As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas (indicando associação) nos casos em que $p \leq 0,05$. A correção de Yates foi aplicada quando necessário, de acordo com as freqüências observadas dentro de cada classe utilizada no teste de contingência.

Nos casos em que a diferença entre as freqüências alélicas ou haplotípicas de pacientes e controles apresentaram significância estatística, foi calculado "*Odds Ratio*" ("OR" ou razão de probabilidades) (WOLF,1955), através da fórmula:

$$OR = (AxD) / (BxC)$$

Onde:

A, B, C e D são os valores correspondentes às letras do quadro 10:

	Pacientes	Controles
Positivo para o fator pesquisado	A	B
Negativo para o fator pesquisado	C	D

QUADRO 10 – VALORES PARA CÁLCULO DE ODDS RATIO
FONTE: WOLF, 1955

O valor da OR, em análises de associação, é considerado como sinônimo do valor de risco relativo (RR), que exprime quantas vezes a característica é mais freqüente entre os portadores de um determinado fator comparando-se com indivíduos sem o fator (SVEJGAARD *et al.*, 1974).

Nos casos em que o valor de alguma das células (A, B, C ou D) foi 0, foi realizada a correção de Haldane, cuja fórmula é: $RR=[(A+1/2).(D+1/2)/(B+1/2).(C+1/2)]$ (SVEJGAARD e RYDER, 1994).

Valores de OR acima de 1 indicam que o fator está associado a uma maior probabilidade de se desenvolver o ARE; valores abaixo de 1, a uma menor probabilidade.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Foi extraído o DNA genômico de indivíduos pacientes e controles, que possuíam amostras de sangue periférico estocadas, a partir das células leucocitárias do sangue periférico pela técnica de *salting-out*.

As amostras de DNA dos casais pacientes e controles, congeladas a uma temperatura de -20ºC, foram selecionadas após a quantificação da concentração de DNA, verificação da qualidade das amostras (baixa taxa de impureza) analisada através da leitura da DO, e detecção da quantidade de amostra disponível.

Todas as amostras selecionadas foram diluídas em água ultra-pura para uma concentração final de 20ng/µl (solução uso).

Com a finalidade de aumentar o número amostral de pacientes e controles disponíveis no LIGH, foi realizado um levantamento dos dados de casais com abortamento espontâneo de repetição, atendidos pela Clínica Genetika – Centro de Aconselhamento e Laboratório de Genética – conforme caracterização descrita anteriormente. Esse levantamento resultou em uma lista de 106 casais com ARE, dos quais todos os residentes no estado do Paraná (85,9%) foram contactados para a certificação de que estavam realmente incluídos no grupo amostral desejado e para um convite de participação do Projeto de Pesquisa “Detecção de Marcadores Moleculares Relevantes no Prognóstico e Aceitação do Alo-enxerto”.

Aproximadamente 60% desses casais foram eliminados da amostra Paciente deste projeto, pelo fato de terem tido, felizmente, pelo menos uma gravidez bem sucedida entre o tempo em que compareceram à Clínica Genetika e a contactação pelos pesquisadores do LIGH. Dentre os demais casais a maioria não concordou em participar do projeto por motivos psicológicos, sociais e éticos sofridos e relatados por eles, o que é inteiramente compreensível devido ao desgaste emocional decorrente da frustração em após inúmeras tentativas, não conseguirem ter a satisfação do nascimento de um filho. Ainda assim, desse grupo que satisfatoriamente se enquadrou nos critérios adotados para a amostra Paciente, 6 casais concordaram em participar da pesquisa.

Somando-se as amostras incluídas no estudo o *n* amostral do grupo de pacientes foi de 70 casais (140 indivíduos) e de 65 casais controles (130 indivíduos).

A idade média dos casais, ao terem o primeiro aborto detectado, foi de 27 anos para as mulheres e 25 anos para os homens; o número médio de abortos espontâneos de repetição foi de 3,56 (TABELA 1). Entre os casais controles, a idade média, ao terem o primeiro filho, foi de 23 anos para as mulheres e de 25 anos para os homens; o número médio de filhos desses casais foi 3,24 (TABELA 1).

TABELA 1 – IDADE MÉDIA DOS CASAIS CONTROLES E PACIENTES AO TEREM O PRIMEIRO FILHO (CONTROLES) OU O PRIMEIRO ABORTO (PACIENTES) E AO TEREM O ÚLTIMO FILHO (CONTROLES) OU O ÚLTIMO ABORTO RELATADO (PACIENTES); NÚMERO MÉDIO DE FILHOS (CONTROLES) OU ABORTOS (PACIENTES). (Pacientes n = 140; Controles: n = 130)

	Controles		Pacientes	
Dados dos casais	Mulheres	Homens	Mulheres	Homens
Idade média ao ter o primeiro filho/aborto	23,35	25,18	27,22	25,44
Idade média ao ter o último filho/aborto	29,5	31,58	31,67	29,75
Número médio de filhos/abortos	3,24		3,56	

FONTE: A autora (2008).

5.2 TIPAGEM DO GENE *MICA*

5.2.1 Técnica PCR-SSOP

Foi utilizada a técnica PCR-SSOP para tipagem do gene *MICA* de todos os indivíduos.

A PCR foi feita utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores biotinilados e D-mix provenientes do kit LABTypeMICA e a DNA polimerase *Taq platinum*. Os ciclos de desnaturação, hibridização e anelamento no termociclador duraram em média uma hora e meia.

Para verificar se as amostras foram amplificadas satisfatoriamente, foram feitos géis de agarose 2,5% para corrida eletroforética, que duraram 08 minutos cada uma. Amplificações bem sucedidas resultaram em um gel no qual cada amostra apresenta 3 bandas, correspondentes ao éxon 2, éxon 3 e éxons 4 e 5 do

gene *MICA*. A quarta banda verificada corresponde aos oligonucleotídeos e outros produtos não incorporados à reação. A foto de um gel no qual todas as amostras amplificaram satisfatoriamente está representada na figura 15.

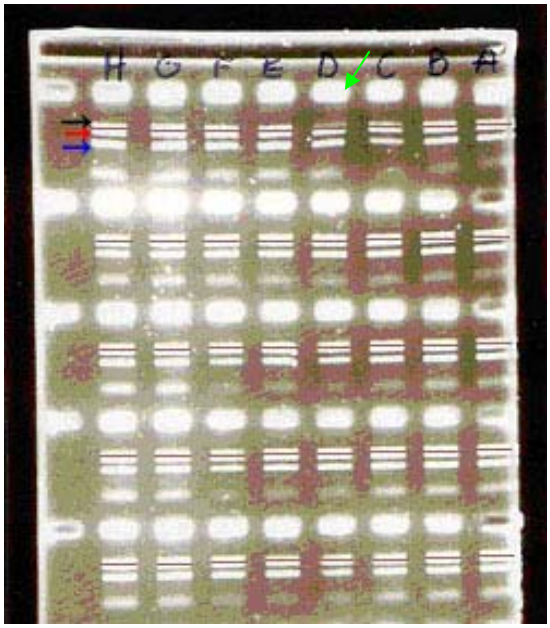

FIGURA 15 – GEL DE AGAROSE A 2,5% CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO DE 40 INDIVÍDUOS DA AMOSTRA PACIENTE, APLICADOS EM CINCO FILEIRAS

FONTE: A autora (2008).

NOTA: Seta preta indica a primeira banda, correspondente à região amplificada dos éxons 4 e 5; Seta vermelha indica a segunda banda, referente à região amplificada do éxon 3; seta azul mostra a terceira banda, representando a região amplificada do éxon 2. Seta verde indica uma banda mais fraca, que pode significar uma menor concentração de produtos amplificados dos éxons 4 e 5.

As amostras amplificadas de maneira satisfatória foram hibridizadas com as microesferas contendo as sondas de oligonucleotídeos, marcadas com SAPE e a leitura foi feita no fluorímetro de fluxo LABScan™ 100. Cada procedimento de desnaturação, neutralização e hibridização de 40 amostras ocorreu em aproximadamente 3 horas e a leitura no fluorímetro em cerca de meia hora. Para cada reação de hibridização foi utilizado 1µl de amostra, porém para as amostras que amplificaram mais fracamente (exemplificadas pela amostra indicada pela seta verde na figura 15), foi utilizado 1 µl a mais de produto de amplificação. As tipagens foram determinadas com auxílio do software *HLA Visual,* versão 2.0.

Várias amostras apresentaram problemas na PCR, amplificando apenas as regiões correspondentes a duas bandas (à primeira e à segunda ou à segunda e à

terceira) ou não amplificaram nada, conforme exemplificado na figura 16. As amostras que tiveram apenas duas bandas detectadas passaram para a etapa de hibridização, sendo analisadas posteriormente. Dessas, as que apresentaram uma tipagem definida pelo software foram refeitas para confirmação dos resultados.

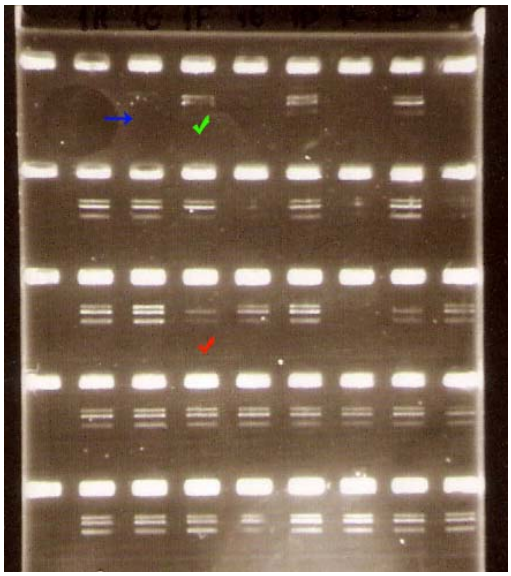

FIGURA 16 – GEL DE AGAROSE A 2,5% CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO DE 40 INDIVÍDUOS DA AMOSTRA PACIENTE, APLICADOS EM CINCO FILEIRAS, APRESENTANDO PROBLEMAS NA AMPLIFICAÇÃO

FONTE: A autora (2008)

NOTA: Seta azul indica uma amostra não amplificada; Marca verde mostra amplificação de apenas os segmentos correspondentes às bandas 1 e 2 (região do éxon 2 não amplificada – terceira banda); Marca vermelha indica amplificação somente dos fragmentos correspondentes às bandas 2 e 3, e a não amplificação da região correspondente aos éxons 4 e 5 – primeira banda.

Algumas tipagens (2 indivíduos do grupo Controle e 2 indivíduos do grupo Paciente) foram determinadas pelo programa considerando-se algumas microesferas como falso-positivas (FP) ou falso-negativas (FN). Todas as microesferas que apresentaram hibridização FN ou FP foram analisadas detalhadamente para a certificação de que eram realmente falsas. Entretanto, as amostras que apresentaram tais resultados foram reanalizadas após nova PCR, hibridização e leitura no fluorímetro. O programa de análises chegou aos mesmos resultados fornecidos na análise anterior, com as mesmas microesferas falso-positivas ou falso-negativas, portanto, essas tipagens foram consideradas como verdadeiras.

A maioria das tipagens para os alelos *MICA* apresentou ambigüidade pela técnica SSOP, como esperado, sendo que apenas 19 dos 130 indivíduos controles e 23 dos 140 indivíduos pacientes obtiveram os dois alelos definidos. Os alelos que apresentaram ambigüidade foram representados por letras que consideram todas as possibilidades alélicas para aquele genótipo, conforme o quadro 11.

Representação	**Ambigüidade *MICA****
*MICA*A*	01201 ou 01202 ou 021
*MICA*B*	00701 ou 026
*MICA*C*	00901 ou 049 ou 004
*MICA*D*	016 ou 019 ou 033
*MICA*E*	00701 ou 026 ou 045
*MICA*F*	016 ou 019
*MICA*G*	00201 ou 020 ou 030 ou 052
*MICA*H*	030 ou 052
*MICA*I*	023 ou 052
*MICA*J*	010 ou 016 ou 019 ou 033
*MICA*L*	00702 ou 029
*MICA*M*	Homozigotos ou deleção *MICA*
*MICA*X*	00901 ou 049
*MICA*Y*	027 ou 008
*MICA*Z*	00201 ou 020

QUADRO 11 – REPRESENTAÇÃO POR LETRAS DAS POSSIBILIDADES ALÉLICAS DO GENE *MICA* CONSIDERADAS DURANTE AS TIPAGENS GENOTÍPICAS

FONTE: A autora (2008).

5.2.2 Técnica PCR-SSP

A partir das ambigüidades detectadas para o gene *MICA* pela técnica PCR-SSOP, as amostras que apresentaram as mesmas ambigüidades foram agrupadas para a realização da tipagem por SSP, cujos mixes de amplificação para identificar os alelos *MICA* foram definidos conforme a necessidade apresentada pela análise dos alelos ambíguos (quadro 12).

Ambigüidade	Mixes	Ambigüidade	Mixes
*MICA*A*	19 19A 32	*MICA*G*	4 42 Microssatélite [a]
*MICA*B*	Microssatélite [a]	*MICA*H*	42
*MICA*C*	14 65	*MICA*I*	34
*MICA*D*	23 29 30 45	*MICA*J*	16 23 28 30 45
*MICA*E*	61	*MICA*L*	41
	Microssatélite [a]	*MICA*M*	66
*MICA*F*	23 29 51	*MICA*X*	65
		*MICA*Y*	Microssatélite [a]
		*MICA*Z*	Microssatélite [a]

QUADRO 12 – MIXES UTILIZADOS PARA SOLUCIONAR AS AMBIGÜIDADES GERADAS PELA TÉCNICA PCR-SSOP

FONTE: A autora (2008).

NOTA: [a] Na ausência de algum mix para solucionar ambigüidades, análises dos microssatélites poderão fornecer uma tipagem única.

A ambigüidade *MICA*A* envolve os alelos *MICA*01201*, *MICA*01202* e *MICA*021*. O mix 32 separa o alelo *MICA*021* dos outros dois. O mix 19 amplifica os alelos *MICA*012* e não o alelo *MICA*021*, portanto esse mix foi utilizado para confirmação dos resultados fornecidos pelo mix 32. O mix 19A foi usado para detecção do alelo *MICA*01202*, quando a amplificação com o mix 32 foi negativa e com o mix 19, positiva.

Os alelos *MICA*00701* (A4) e *MICA*026* (A6) são diferenciados apenas por análise dos microssatélites, portanto nenhum mix seria capaz de solucionar essa ambigüidade (*MICA*B*). A ambigüidade *MICA*E* (alelos *MICA*00701, MICA*026* ou *MICA**045), porém, pôde ser parcialmente resolvida com a utilização do mix 61, que resulta em amplificação para indivíduos que apresentam o alelo *MICA*045*. Sendo o resultado da amplificação por esse mix, positiva, os alelos *MICA**026 e *MICA*00701* foram descartados como possíveis genótipos. No caso da amplificação ser negativa, apenas análises de microssatélites podem resolver a ambigüidade.

Os alelos *MICA*00901*, *MICA*049* ou *MICA*004* apareceram em ambigüidade (ambigüidade *MICA*C*) apenas quando o alelo no cromossomo homólogo era o

*MICA*004*. Essa ambigüidade pôde ser resolvida utilizando-se o mix 14, que possui controle positivo, e amplifica apenas os alelos *MICA*009* e *MICA*049*, eliminando-se assim a possibilidade de homozigose para o alelo *MICA*004*. A razão pela qual não se utilizou um mix para detecção do alelo *MICA*004* é o fato do outro alelo desses genótipos ser *MICA*004.* Quando o resultado da amplificação do mix 14 foi positivo, foi usado o mix 65 na tentativa de separar *MICA*009* e *MICA*049*.

A discriminação dos alelos *MICA*033*, *MICA*016* e *MICA*019* (ambigüidade *MICA*D*) foi feita utilizando-se os mixes 23, 29, 30 e 45. O mix 29 resulta na amplificação dos alelos *MICA*033* e *MICA*019*, esses podendo ser distinguidos um do outro se utilizando o mix 45 que amplifica o alelo *MICA*033*. O mix 30 separa os alelos *MICA*016* e *MICA*019* do alelo *MICA*033*, aqueles podendo ser discriminados através do mix 23, que amplifica apenas um segmento do alelo *MICA*016*. Nenhum desses mix tem como alelo alvo o alelo do cromossomo homólogo dos genótipos que possuem a ambigüidade *MICA*D*.

O mix 23 permite a detecção do alelo *MICA*016* e foi aplicado para resolver a ambigüidade denominada *MICA*F*, separando os alelos *MICA*016* e *MICA*019*. No caso da não amplificação correspondente ao alelo *MICA*016* por esse mix, o mix 29 foi utilizado para a amplificação do alelo *MICA*019*, confirmando a tipagem, no caso do outro alelo do mesmo indivíduo não ser um dos alelos amplificados por esse mix. Os mixes que discriminam os alelos *MICA*019* e *MICA*016* (29 e 51) amplificam também regiões correspondentes aos alelos *MICA*009* e *MICA*049*. Como alguns genótipos que possuem a ambigüidade *MICA*F* também possuem um dos alelos *MICA*009* ou *MICA*049* no cromossomo homólogo, esses mixes não puderam ser usados, uma vez que promoveriam a amplificação de algum segmento. Portanto, apenas para confirmação, um dos mixes 27 ou 30, cujos alelos alvos são *MICA*016* e *MICA*019*, foram aplicados no caso da amplificação com o mix 23 ter sido negativa.

Para a ambigüidade *MICA*Z* não há nenhum mix que possa distinguir os alelos *MICA*020* (A10) e *MICA*00201* (A9). Apenas análises de microssatélite diferenciarão os dois alelos. A ambigüidade *MICA*G* que envolve esses dois alelos além dos alelos *MICA*030* ou *MICA*052* pôde ser parcialmente resolvida através do mix 42, o qual amplifica os alelos *MICA*011* e *MICA*030*. Como os genótipos que

acompanham essa ambigüidade não possuem o alelo *MICA*011*, esse mix pôde ser utilizado satisfatoriamente. Não há mix para se detectar o alelo *MICA*052*, portanto, quando a reação com o mix 42 foi negativa, o mix 04 foi aplicado para separar os alelos *MICA*020* e *MICA*000201* do alelo *MICA*052.* Análises dos microssatélites poderão separar o alelo *MICA*020* do alelo *MICA*00201*.

A ambigüidade *MICA*H* ocorre entre os alelos *MICA*052* e *MICA*030* e foi solucionada pelo mix 42, que amplifica o alelo *MICA*030*, apesar desse não apresentar controle positivo.

A ambigüidade *MICA*I* (alelos *MICA*023* ou *MICA*052*) foi resolvida com a utilização do mix 34 que amplifica apenas o alelo *MICA*023.*

Os alelos *MICA*010, MICA*016, MICA*019* e *MICA*033* (ambigüidade J) foram separados através da utilização de 5 mixes. O mix 28 foi utilizado para separar os alelos *MICA*016, MICA*019* e *MICA*033* do alelo *MICA*010.* No caso da não amplificação com a utilização desse mix, o mix 16 foi utilizado para confirmar a presença do alelo *MICA*010*. O mix 23 foi utilizado para a detecção do alelo *MICA*016* e o mix 45 para a amplificação do alelo *MICA*033*. Quando todos esses mixes resultaram na não amplificação, a tipagem considerada foi a presença do alelo *MICA*019*. O mix 30 foi utilizado para confirmação dos resultados obtidos pela amplificação pelo mix 45, quando esse foi negativo, uma vez que os alelos *MICA*010, MICA*016* e *MICA*019* são amplificados com o mix 30, diferentemente do alelo *MICA*033*.

O mix 41 foi utilizado para separar os alelos *MICA*029* e *MICA*00702* de indivíduos com a ambigüidade L. Esse mix promove a amplificação do alelo 029.

A diferença entre os alelos *MICA*049* e *MICA*00901* está no éxon 6, não detectada pela técnica SSOP. Os mixes 30 e 65 amplificam o alelo *MICA*049*, sendo o último mix específico para *MICA*049*. O mix 30 amplifica outros alelos, dentre eles *MICA*010, MICA*016* e *MICA*019* que estão presentes em vários dos genótipos que apresentaram a ambigüidade MICA*X (*MICA*00901* e *MICA*049*). Portanto, esse mix não foi utilizado na resolução dessa ambigüidade para esses indivíduos. O mix 65 foi aplicado, apesar de não possuir um controle positivo. Nenhum indivíduo apresenta o alelo *MICA*049*.

Indivíduos tipados como homozigotos pela técnica SSOP, foram enquadrados na ambigüidade *MICA*M*, uma vez que esses indivíduos podem ter em um cromossomo a deleção do gene *MICA* e no outro um alelo *MICA* detectado pela SSOP. O mix 66 amplifica uma região característica da deleção desse gene, e portanto, foi utilizado para confirmar se os indivíduos com a ambigüidade *MICA*M* eram realmente homozigotos, não amplificando assim nenhum segmento. Nenhum indivíduo apresenta a deleção de *MICA* no presente estudo.

Os alelos *MICA*00801* e *MICA*00804* são diferenciados do alelo *MICA*027* apenas por análise de microssatélite, portanto a ambigüidade *MICA*Y* (*MICA*008* e *MICA*027*) será solucionada por análises de microssatélites.

Indivíduos portadores dos alelos *MICA*00801* ou *MICA*00804* foram considerados como tendo o alelo *MICA*008*, uma vez que o produto funcional desses alelos é o mesmo.

Para as ambigüidades *MICA*B*, *MICA*Y* e *MICA*Z*, identificadas diretamente pelo software *HLA Visual*, ou obtidas após resolução parcial das ambigüidades *MICA*E* e *MICA*G*, análises dos microssatélites serão feitas por Liana Oliveira, do laboratório de Imunogenética da Universidade Federal do Paraná, coordenado pela professora Dra. Maria Luiza Petzl-Erler. A análise será realizada por um método semi-automatizado, no qual é amplificada a região do microssatélite por PCR com oligonulclotídeos inciadores marcados com fluorescência. Os segmentos, depois de desnaturados, são submetidos à corrida eletroforética, juntamente com um marcador de peso molecular, no aparelho seqüenciador MegaBACE 1000, no qual são separados por tamanho. Os alelos são designados com o uso do programa *Fragment Profiler version 1.2* (GE Healthcare).

Pelos estudos de genética de populações existentes sobre a população brasileira para esse loco, o alelo *MICA*00201* apareceu em todas as amostras com ambigüidades do tipo *MICA*Z*, permitindo a inferência de que os indivíduos com a ambigüidade *MICA*Z* desse estudo possuem esse alelo e não o alelo *MICA*020*, da mesma forma que indivíduos com a ambigüidade *MICA*B* provavelmente possuem o alelo *MICA*00701* ao invés do *MICA*026* (RIBAS, 2007). A ambigüidade *MICA*Y*, não é suficiente para se inferir que os indivíduos podem ser considerados como tendo o alelo *MICA*008* e não *MICA*027*, porque, apesar do alelo *MICA*008* ser

mais de 5 vezes mais freqüente que *MICA*027* (RIBAS, 2007), foram encontrados indivíduos tipados para *MICA*027* no presente estudo.

Até as análises dos microssatélites confirmarem as inferências feitas acima, os alelos envolvidos com as ambigüidades *MICA*B*, *MICA*Y* e *MICA*Z* serão designados por esses nomes.

5.2.3 Freqüências alélicas do gene *MICA*

Dos 61 alelos *MICA* já descritos, foram observados 22 alelos na amostra Paciente e 18 alelos na amostra Controle deste estudo, todos listados com suas respectivas freqüências em cada amostra no gráfico 1.

Nos grupos de pacientes e de controles o alelo mais freqüentemente encontrado foi o alelo *MICA*008*, incluindo todos os indivíduos que possuem o alelo *MICA*00801* ou o alelo *MICA*00804*, com uma freqüência de 19,29% em pacientes e 24,61% nos controles.

Com uma freqüência de 16,07% em pacientes e 15,00% em controles o alelo *MICA*Z* teve a segunda freqüência mais alta em ambas as amostras, seguido pelos alelos *MICA*009* e *MICA*004,* com freqüências de 12,5% em pacientes e 13,85% em controles, e 14,29% em pacientes e 10,38% nos controles, respectivamente.

Os alelos *MICA*007*, *MICA*00802* e *MICA*019* foram encontrados em apenas um indivíduo no grupo Controle, cada um, sendo os alelos mais raros nessa amostra. Nos pacientes, os alelos *MICA*001, MICA*005, MICA*015* e *MICA*024* foram os alelos mais raros, encontrados também em apenas um indivíduo dessa amostra, cada um.

Cinco alelos estão presentes na amostra Paciente e ausentes na amostra Controle (alelos *MICA*005, MICA*015, MICA*024, MICA*030* e *MICA*052*), e o alelo *MICA*007* foi encontrado apenas em um indivíduo da amostra Controle e nenhum da amostra Paciente. Porém, essas diferenças não são estatisticamente significativas.

Não houve diferença estatística significativa entre as freqüências alélicas dos grupos amostrais, porém as letras minúsculas diferentes no gráfico 1, dos alelos *MICA*001* e *MICA*011,* destacam que seus respectivos alelos possuem um *p value*

(0,0571 e 0,0792, respectivamente) próximo ao limite da margem de confiança considerado. Os resultados foram considerados significativamente diferentes quando p≤0,05.

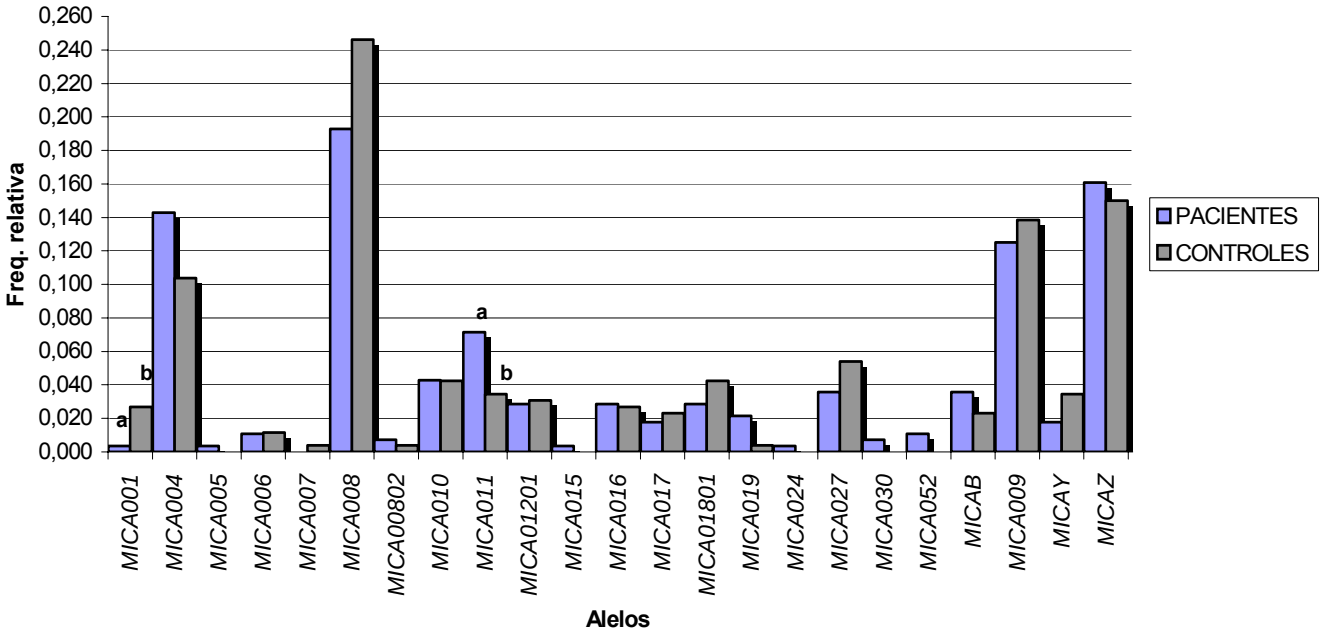

GRÁFICO 1 – FREQÜÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE *MICA* EM PACIENTES (n = 140) COM ARE E EM CONTROLES (n = 130)

FONTE: A autora (2008)

NOTA: Letras minúsculas diferentes representam um valor de *p* próximo à margem de confiança, porém não significativo [p = 0,0571 (alelo *MICA*001*) e 0,0792 (alelo *MICA*011*)]. Para os demais alelos *p* > 0,10. Significativo: *p* ≤ 0,05.

5.3 TIPAGEM DO GENE *MICB*

5.3.1 Técnica PCR-SSP

Todos os indivíduos foram tipados pela técnica PCR-SSP para identificação dos alelos do gene *MICB*. Todos os mixes foram aplicados em todos os indivíduos e cada alelo foi identificado a partir das combinações dos mixes demonstrados no *worksheet* do quadro 09.

Dos 30 alelos já identificados para o gene *MICB,* foram encontrados 7 nas amostras Paciente e Controle (alelos *MICB*001, MICB*00201, MICB*003, MICB*00503, MICB*008, MICB*011* e *MICB*019*).

Todos os indivíduos que amplificaram com o mix 1, possuem o alelo *MICB*001*, uma vez que esse mix amplifica apenas esse alelo. Os outros mixes foram feitos para confirmação do resultado.

Os alelos *MICB*0020101* e *MICB*0020102* foram agrupados em *MICB*00201*, identificado a partir da amplificação com os mixes 3, 13, 17 a 25.

O alelo *MICB*003* possui um mix específico (mix 7), e assim, como para o alelo *MICB*001* os demais mixes foram testados com o objetivo de confirmar o resultado obtido com o mix 7.

Os alelos *MICB*00503* e *MICB*019* não possuem um mix específico, portanto a combinação da amplificação com os mixes 2, 4 e 17 a 25 (alelo *MICB*00503*) e 3 e 17 a 25 (alelo *MICB*019*) permitiu a identificação desses alelos.

Os mixes 8 e 11 amplificam apenas os alelos *MICB*008* e *MICB*011*, respectivamente, portanto todos os indivíduos que apresentaram amplificação com esses mixes foram considerados como tendo esses alelos, e os outros mixes foram aplicados para confirmação dos resultados.

O quadro 13 exemplifica a interpretação de resultados das tipagens para o gene *MICB* de seis indivíduos.

	Mixes:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Indivíduo	RPF01																									
Alelo *MICB**	*0020101*																									
Alelo *MICB**	*0020102*																									
Alelo *MICB**	*00503*																									
Indivíduo	1PF																									
Alelo *MICB**	*001*																									
Alelo *MICB**	*00503*																									
Indivíduo	41PF																									
Alelo *MICB**	*003*																									
Alelo *MICB**	*008*																									
Indivíduo	74CM																									
Alelo *MICB**	*0020101*																									
Alelo *MICB**	*0020102*																									
Alelo *MICB**	*011*																									
Indivíduo	259CF																									
Alelo *MICB**	*003*																									
Alelo *MICB**	*011*																									
Indivíduo	71CM																									
Alelo *MICB**	*019*																									
Alelo *MICB**	*019*																									

QUADRO 13 – *WORKSHEET* DE INTERPRETAÇÃO DE SEIS GENÓTIPOS DO GENE *MICB*

FONTE: A autora (2008)

NOTA: Indivíduo Paciente RPF01: Mixes 2 a 4, 13 e 17 a 25 resultaram em amplificação. A única possibilidade de tipagem foi *MICB*00201 / MICB*00503*, cujos padrões de tipagem estão demonstrados nas três linhas abaixo da linha "Indivíduo RPF01"; Indivíduo paciente 1PF: Mixes 1,2,4, 17 a 25 resultaram em amplificação. A única possibilidade de tipagem foi *MICB*001 / MICB*00503*, cujos padrões de tipagem estão demonstrados nas duas linhas abaixo da linha "Indivíduo 1PF"; Indivíduo Paciente 41PF: Mixes 2, 3, 7, 8, 13, 17 a 25 resultaram em amplificação. A única possibilidade de tipagem foi *MICB*003 / MICB*008*, cujos padrões de tipagem estão demonstrados nas duas linhas abaixo da linha "Indivíduo 41PF"; Indivíduo Controle 74CM: Mixes 2, 3, 10, 13, 17 a 25 resultaram em amplificação. A única possibilidade de tipagem foi *MICB*00201 / MICB*011*, cujos padrões de tipagem estão demonstrados nas três linhas abaixo da linha "Indivíduo 74CM"; Indivíduo Controle 259CF: Mixes 2, 7, 10 resultaram em amplificação. A única possibilidade de tipagem foi *MICB*003 / MICB*011*, cujos padrões de tipagem estão demonstrados nas duas linhas abaixo da linha "Indivíduo 259CF". Indivíduo Controle 71CM: Mixes 2, 17 a 25 resultaram em amplificação. A única possibilidade de tipagem foi *MICB*019 / MICB*019* cujos padrões de tipagem estão demonstrados nas duas linhas abaixo da linha "Indivíduo 71CM".

5.3.2 Freqüências alélicas do gene *MICB*

O alelo *MICB*00503* apresentou a maior freqüência nas duas amostras, com freqüência de 37,10% na amostra Paciente e 38,10% na amostra Controle.

Os alelos *MICB*00201* e *MICB*019* apareceram com freqüências de 19,20% e 16,90% na amostra Controle, respectivamente, e 18,2% e 15,00% na amostra Paciente, respectivamente. O alelo *MICB*007* foi o menos freqüente nas amostras Controle (0,77%) e paciente (2,1%). As freqüências dos alelos do gene *MICB* nos grupos de pacientes e de controles não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre elas, porém o alelo *MICB*003* possui uma freqüência maior no grupo dos indivíduos controles, com valor de *p* (*p* = 0,0677) próximo ao limite da margem de confiança considerada (*p* ≤ 0,05). Os alelos encontrados e suas respectivas freqüências estão demonstradas no gráfico 2.

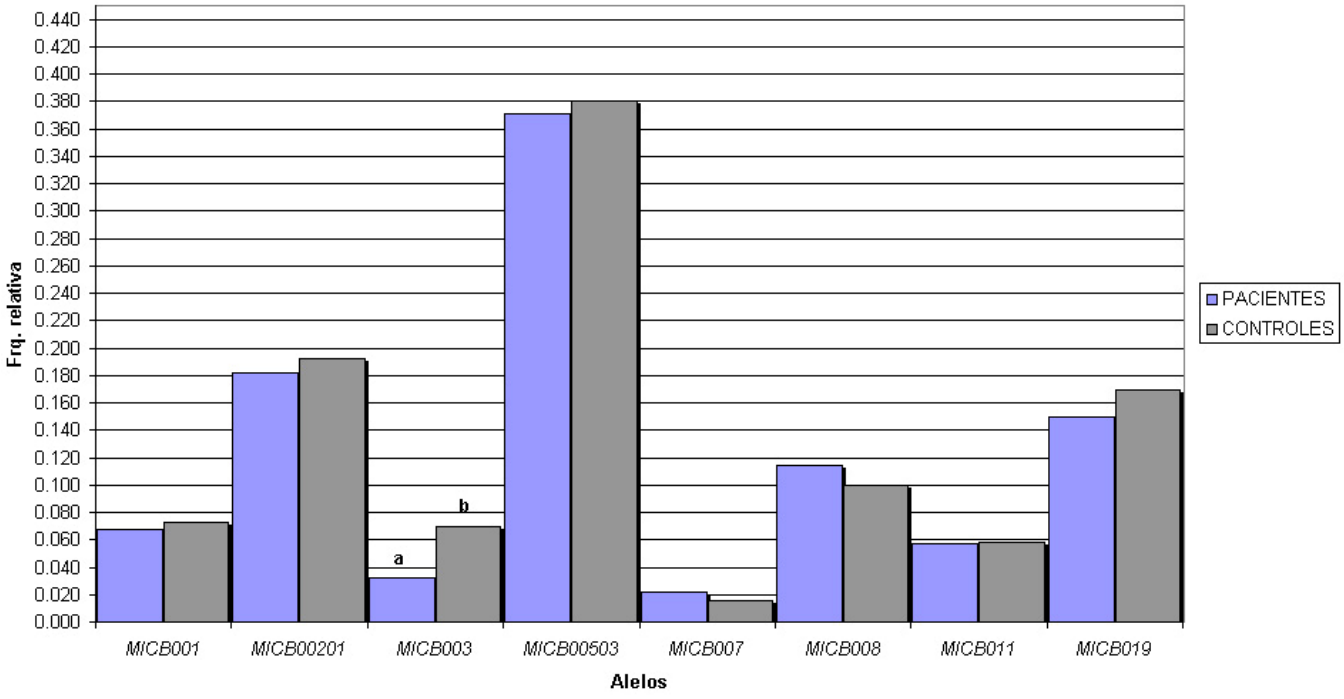

GRÁFICO 2 – FREQÜÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE *MICB* EM PACIENTES (n = 140) COM ARE E EM CONTROLES (n = 130)

FONTE: A autora (2008).

NOTA: Não há diferença estatística significativa entre as freqüências alélicas dos grupos amostrais, porém as letras minúsculas diferentes destacam que seu respectivo alelo possui um valor de *p* (*p* = 0,0677) próximo ao limite da margem de confiança. Para as comparações quanto aos demais alelos *p* > 0,10. Significativo: p≤0,05.

5.4 EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG E HETEROZIGOSIDADE

Para o loco *MICA* foi realizado o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW), considerando-se os 19 alelos encontrados e os 3 grupos alélicos *MICA*B*, *MICA*Y*, *MICA*Z*, demonstrados no gráfico 01.

Para esse loco, ambas as amostras Paciente e Controle estão em equilíbrio segundo o teorema de HW (p = 0,8548 e p = 0,0709, respectivamente), apesar de no grupo controle o valor de p estar próximo ao limite da margem de confiança adotado ($p < 0,05$ é significativo).

O número de homozigotos observados na amostra Controle (5,38%) é inferior ao esperado (12,56%), porém a heterozigosidade observada (94,61%) não é significativamente diferente da esperada (87,44%). A heterozigosidade observada na amostra Paciente (88,57%) foi muito próxima à esperada (87,37%), e dentre os indivíduos pacientes, 11,43% são homozigotos, sendo a percentagem esperada de homozigotos de 11,25%.

Na amostra Controle, os genótipos *MICA*008/MICA*008* e *MICA*009/MICA*009* apresentaram freqüência de 1,5% cada um, sendo esses, os genótipos homozigotos mais freqüentes encontrados nessa amostra. 3,6% dos indivíduos pacientes são homozigotos para o alelo *MICA*004* e a mesma percentagem é homozigota para o alelo *MICA*008* , sendo esses os genótipos mais freqüentes dentre todos os homozigotos do grupo Paciente (tabela 02).

TABELA 02 – FREQÜÊNCIAS DOS ALELOS *MICA* EM HOMOZIGOSE EM PACIENTES COM ARE E EM CONTROLES

	PACIENTES	**CONTROLES**	
Alelo	**Frq.**	**Frq.**	**p**
*MICA*001*	0	0,008	0,9704
*MICA*004*	0,036	0,008	0,2511
*MICA*008*	0,036	0,015	0,5047
*MICA*016*	0,007	0,000	0,9704
*MICA*027*	0,007	0,000	0,9704
*MICA*052*	0,007	0,000	0,9704
*MICA*009*	0,014	0,015	0,6676
*MICA*Z*	0,007	0,008	0,5108
TOTAL	0,114	0,054	0,1189

FONTE: A autora (2008).

NOTA: Os resultados foram considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$. n = 130 (controles); n = 140 (pacientes).

As amostras Paciente e Controle também se encontram em equilíbrio de HW para o gene *MICB*, sendo o valor de *p* = 0,4708 e 0,3145, respectivamente. A heterozigosidade observada para esse loco foi de 85,00% e a esperada de 78,67%, na amostra Paciente. Dentre os indivíduos controles, a heterozigosidade observada foi de 83,08% e a esperada 77,34%.

Dos 16,92% indivíduos homozigotos observados na amostra Controle (esperado 22,66%), 10,8% são homozigotos para o alelo mais freqüente (*MICB*00503*), e na amostra Paciente, dos 17,10% indivíduos homozigotos observados (esperado 15,00%), 11,4% também são homozigotos para o alelo *MICB*00503* (tabela 03).

TABELA 03 - FREQÜÊNCIAS DOS ALELOS *MICB* EM HOMOZIGOSE EM PACIENTES COM ARE E EM CONTROLES

	PACIENTES	**CONTROLES**	
Alelo	**Frq.**	**Frq.**	**p**
*MICB*001*	0,007	0,008	0,511
*MICB*00201*	0,021	0,031	0,921
*MICB*003*	0,000	0,000	0,935
*MICB*00503*	0,114	0,108	0,983
*MICB*007*	0,000	0,000	0,933
*MICB*008*	0,000	0,000	0,856
*MICB*011*	0,000	0,000	0,871
*MICB*019*	0,029	0,023	0,563
TOTAL	0,171	0,169	0,909

FONTE: A autora (2008)

NOTA: Significativo: $p \leq 0,05$. n = 130 (controles); n = 140.

5.5 FREQÜÊNCIAS HAPLOTÍPICAS *MICA_MICB*

Foram observados 36 haplótipos *MICA_MICB* na amostra Paciente e 31 na amostra Controle, todos demonstrados no gráfico 03, com suas respectivas freqüências observadas.

O haplótipo *MICA*009_MICB*008* foi observado com maior freqüência na amostra Paciente (9,3%), enquanto na amostra Controle apenas 5,0% dos indivíduos possuem esse haplótipo. Apesar da diferença não ser estatisticamente

significativa, o *p* encontrado foi de 0,0675, próximo ao limite da margem de confiança (*p*≤0,05).

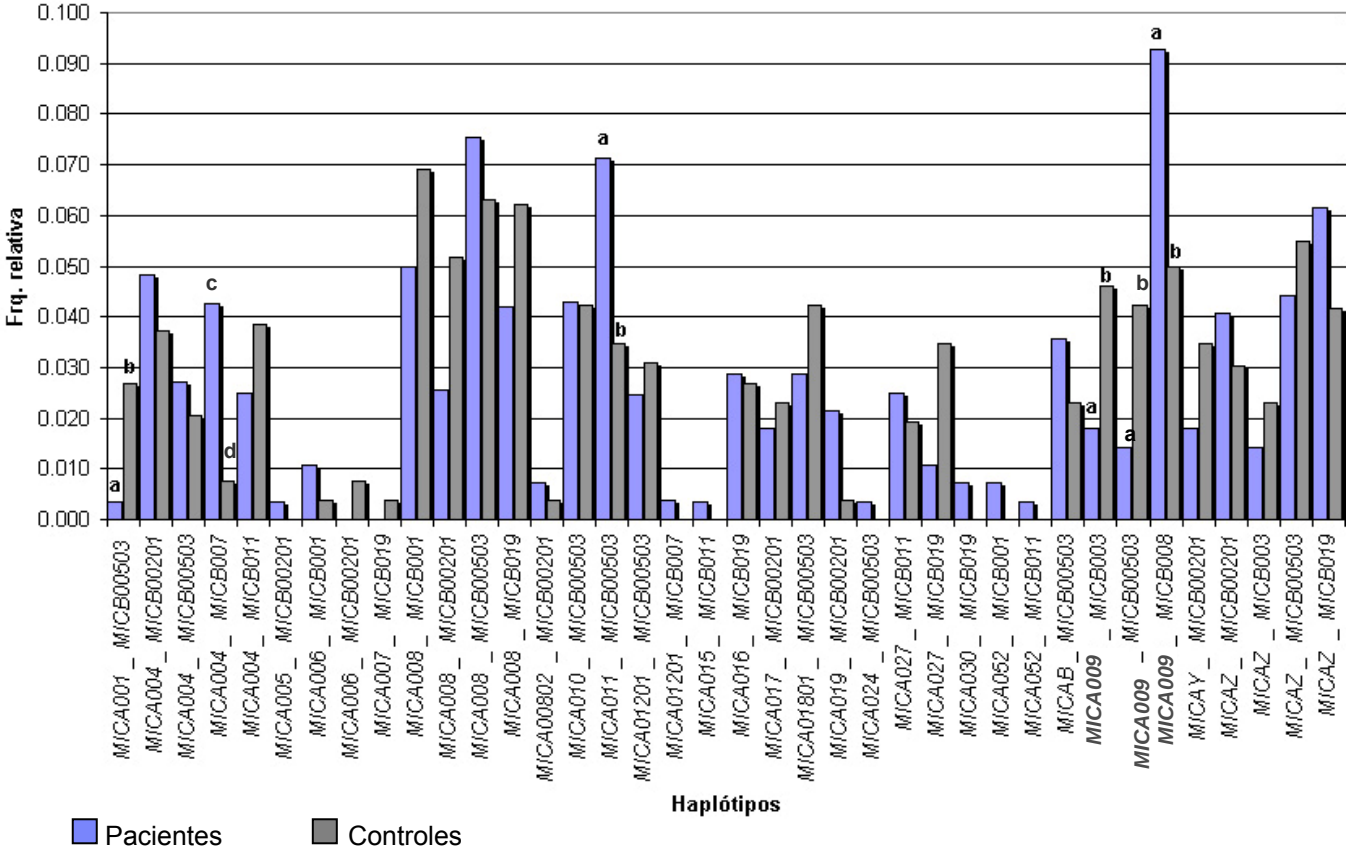

GRÁFICO 03 – FREQÜÊNCIAS HAPLOTÍPICAS DE PACIENTES COM ARE E DE INDIVÍDUOS CONTROLES

FONTE: A autora (2008)

NOTA: Letras minúsculas c e d, indicam que há diferença estatística significativa apenas para o haplótipo *MICA*004_MICB*007, p* = 0,0198; Não há diferença estatística significativa entre as demais freqüências haplotípicas dos grupos amostrais, porém as letras minúsculas diferentes destacam que seu respectivo haplótipo possui um valor de *p* próximo ao limite da margem de confiança (*MICA*001_MICB*00503*: *p* = 0,0571; *MICA*011_MICB*00503: p* = 0,0792; *MICA*009_MICB*003: p* = 0,0965; *MICA*009_MICB*00503: p* = 0,0814; *MICA*009_MICB*008: p* = 0,0675). Para os demais haplótipos *p* > 0,10. Os resultados foram considerados significativamente diferentes quando *p* < 0,05.

No grupo dos indivíduos controles, o haplótipo mais freqüente foi *MICA*008_MICB*001*, encontrado em 6,9% dos indivíduos, uma percentagem próxima à encontrada nos indivíduos pacientes (5,0%) (*p* = 0,4304).

Na amostra Paciente os haplótipos menos freqüentemente encontrados (freqüência de 0,4%) foram *MICA*005_MICB*00201, MICA*024_MICB*00503, MICA*01201_MICB*007, MICA*015_MICB*011, MICA*052_MICB*011* e

*MICA*001_MICB*00503,* o último apresentando um valor de *p* de 0,0571, próximo ao limite da margem de confiança adotado (p < 0,05), quando comparadas as freqüências desse haplótipo entre os dois grupos amostrais. Na amostra Controle os haplótipos *MICA*006_MICB*001, MICA*007_MICB*019, MICA*00802_MICB*00201* e *MICA*019_MICB*00201* foram os menos freqüentes, aparecendo em 0,4% dos indivíduos.

Além do haplótipo *MICA*001_MICB*00503*, os haplótipos *MICA*009_MICB*00503* e *MICA*009_MICB*003* também foram mais freqüentes nos indivíduos controles do que nos pacientes (4,2% e 4,6% nos indivíduos controles, respectivamente e 1,4% e 1,8% nos indivíduos pacientes, respectivamente), sendo o valor de *p* = 0,0814 e 0,0965, respectivamente, porém não significativos. Já a situação oposta foi observada para os haplótipos *MICA*009_MICB*008*, como descrito anteriormente, e *MICA*011_MICB*00503*, sendo esse último observado com freqüência de 7,1% nos pacientes e 3,5% nos controles (*p* = 0,0792), uma diferença que não é significativa, porém o valor de *p* é próximo ao limite de 0,05, considerado significativo.

Apenas o haplótipo *MICA*004_MICB*007* apresentou freqüência diferente na amostra Controle da Paciente, com significância estatística (*p* = 0,0198). Esse haplótipo foi mais freqüente nos pacientes (4,3%) que nos controles (0,8%).

5.6 DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS GENES *MICA* E *MICB*

Foram estimados os valores do parâmetro de desequilíbrio de ligação D (medida de freqüência das combinações de dois locos em relação ao esperado pelo acaso) e o parâmetro de desequilíbrio de ligação relativo D' (Δ')(valor de D padronizado pelo valor máximo que ele pode ter). A significância da associação entre os dois locos foi calculada utilizando-se tabelas de contingência. Observou-se que *MICA* e *MICB* estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg e em forte desequilíbrio de ligação.

Dos 36 haplótipos observados nos pacientes, 20 possuem alelos que estão em desequilíbrio de ligação, como demonstrado na tabela 04 e dos 31 haplótipos observados no grupo Controle, 17 contêm alelos em desequilíbrio de ligação (tabela

05). Nas tabelas de desequilíbrio de ligação, foram considerados os alelos em associação ou em repulsão, dos quais os valores de Δ' foram entre - 0,5 e - 1,0 ou entre 0,5 e 1,0, sendo $p < 0,05$. Os alelos em associação são aqueles que estão presentes no mesmo haplótipo mais vezes do que o esperado ao acaso (valor de Δ' entre 1,0 e 0,5), e os alelos em repulsão não se encontram juntos no mesmo haplótipo, mais freqüentemente do que o esperado casualmente (valor de Δ' entre -1,0 e -0,5).

Dos haplótipos com freqüência maior que 1,0% nas amostras Paciente e Controle, 15 possuem alelos que estão em forte desequilíbrio de ligação, como demonstrado nas tabelas 04 e 05.

Apesar do alelo *MICA*004* ter sido encontrado em associação com os alelos *MICB*00*201, *MICB*00503*, *MICB*007* e *MICB*011*, sendo o valor de *p* significativo para todos nas duas amostras, Δ' foi maior que 0,5 (ou menor que -0,5) apenas quando *MICA*004* estava associado com *MICB*007*, nos pacientes, e com *MICB*007, MICB*00503* e *MICB*011* nos controles. Nas duas amostras o alelo *MICA*004* apareceu em repulsão com o alelo *MICB*00503* porém apenas para o grupo Controle Δ'< -0,5 (Δ' = -0,5106), sendo Δ' nos indivíduos pacientes igual a -0,4635.

*MICA*006* sempre está associado ao alelo *MICB*001*, nos pacientes, porém nos controles a associação entre esses alelos não foi significativa ($p = 0,0824$) e a freqüência desse haplótipo é menor que 0,5% nos controles.

O alelo *MICA*008* foi encontrado em associação com vários alelos do gene *MICB*, porém apresentou associação significativa (em desequilíbrio de ligação) com *MICB*001* nas amostras Paciente e Controle.

O alelos *MICA*010, MICA*011, MICA*01801* e *MICA*B* estão em associação absoluta com o alelo *MICB*00503* (p = 0,000), nas duas amostras, enquanto que *MICA*009* foi encontrado em repulsão com esse mesmo alelo nos indivíduos pacientes (Δ' = - 0,6934) e controles (Δ' = -0,1925), não sendo o último demonstrado na tabela 05, porque Δ' < 0,5.

O alelo *MICA*016* está em associação absoluta com o alelo *MICB*019* para os indivíduos pacientes e controles, e o alelo *MICA*027* está associado com o alelo *MICB*019* apenas no grupo Controle, não sendo significativo na amostra Paciente

deste estudo (*p* = 0,18), a qual apresentou freqüência de 1,1% desse haplótipo contra 3,5% nos controles.

*MICA*017, MICA*019* e *MICA*Y* estão em associação absoluta com o alelo *MICB*00201* entre os pacientes e controles. O alelo *MICA*027* está associado com o alelo *MICB*011*, com Δ' = 0,6817, na amostra Paciente, porém entre os controles, Δ' foi menor que 0,5, apesar de *p* ter sido significativo (*p* = 0,00) .

O alelo *MICA*009* está em desequilíbrio de ligação com os alelos *MICB*003* e *MICB*008*, significativamente, nos dois grupos amostrais, porém a primeira associação não foi demonstrada na tabela 04 pelo fato de nos pacientes, Δ' ser menor que 0,5. *MICA*009* e *MICB*008* estão em associação absoluta nos dois grupos.

TABELA 04 - HAPLÓTIPOS *MICA_MICB* EM DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO NA AMOSTRA PACIENTE, QUANDO Δ' > 0,5 OU Δ' < - 0,5.

Haplótipo	**Frq.**	Δ'	*p*
*MICA*004 _ MICB*007*	0,043	0,9102	0,0000
*MICA*005 _ MICB*00201*	0,004	-1,0000	0,0320
*MICA*006 _ MICB*001*	0,011	1,0000	0,0000
*MICA*008 _ MICB*001*	0,050	0,6737	0,0000
*MICA*00802 _ MICB*00201*	0,007	1,0000	0,0024
*MICA*010 _ MICB*00503*	0,043	1,0000	0,0000
*MICA*011 _ MICB*00503*	0,071	1,0000	0,0000
*MICA*01201 _ MICB*00503*	0,025	0,8007	0,0029
*MICA*015 _ MICB*011*	0,004	1,0000	0,0000
*MICA*016 _ MICB*019*	0,029	1,0000	0,0000
*MICA*017 _ MICB*00201*	0,018	1,0000	0,0000
*MICA*01801 _ MICB*00503*	0,029	1,0000	0,0000
*MICA*019 _ MICB*00201*	0,021	1,0000	0,0000
*MICA*027 _ MICB*011*	0,025	0,6817	0,0000
*MICA*030 _ MICB*019*	0,007	1,0000	0,0000
*MICA*052 _ MICB*001*	0,007	0,6423	0,0000
*MICA*B _ MICB*00503*	0,036	1,0000	0,0000
*MICA*009 _ MICB*00503*	0,014	-0,6934	0,0000
*MICA*009 _ MICB*008*	0,093	1,0000	0,0000
*MICA*Y _ MICB*00201*	0,018	1,0000	0,0000

FONTE: A autora (2008)

NOTA: Significativo: $p \leq 0,05$. n = 140

TABELA 05 - HAPLÓTIPOS *MICA_MICB* EM DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO NA AMOSTRA CONTROLE QUANDO Δ' > 0,5 OU Δ' < - 0,5.

HAPLÓTIPOS	**Frq.**	Δ'	*p*
*MICA*001 _ MICB*00503*	0,027	1,0000	0,0006
*MICA*004 _ MICB*00503*	0,020	-0,5106	0,0287
*MICA*004 _ MICB*007*	0,008	1,0000	0,0000
*MICA*004 _ MICB*011*	0,038	0,6279	0,0000
*MICA*008 _ MICB*001*	0,069	0,9305	0,0000
*MICA*010 _ MICB*00503*	0,042	1,0000	0,0000
*MICA*011 _ MICB*00503*	0,035	1,0000	0,0000
*MICA*01201 _ MICB*00503*	0,031	1,0000	0,0002
*MICA*016 _ MICB*019*	0,027	1,0000	0,0000
*MICA*017 _ MICB*00201*	0,023	1,0000	0,0000
*MICA*01801 _ MICB*00503*	0,042	1,0000	0,0000
*MICA*019_MICB*00201*	0,004	1,0000	0,0405
*MICA*027 _ MICB*019*	0,035	0,5698	0,0000
*MICA*B _ MICB*00503*	0,023	1,0000	0,0015
*MICA*009 _ MICB*003*	0,046	0,6129	0,0000
*MICA*009 _ MICB*008*	0,050	1,0000	0,0000
MICA*Y _ *MICB*00201*	0,035	1,0000	0,0000

FONTE: A autora (2008)

NOTA: Os resultados foram considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$. n = 130

5.7 ASSOCIAÇÃO ENTRE A DIVERSIDADE DOS GENES *MICA* E *MICB* E O ABORTAMENTO RECORRENTE

5.7.1 Freqüências dos tipos de casais com ARE e controles em relação à presença e ausência dos alelos *MICA* e *MICB*

Foi feita a contagem da presença ou ausência de todos os alelos dos genes *MICA* e *MICB* nos casais pacientes com ARE e nos casais controles. Os casais foram divididos em quatro grupos: Presença do alelo na mulher e no homem (S ♀ S ♂); Presença do alelo na mulher e ausência no homem (S ♀ N ♂), Ausência do alelo na mulher e presença no homem (N ♀ S ♂); Ausência do alelo na mulher e no homem (N ♀ N ♂).

Para verificar se existiu alguma diferença estatística significativa entre as freqüências dos casais em relação à presença e ausência dos alelos *MICA* e *MICB* foi feito um teste de contingência em uma tabela 4 x 2. Quando existiu diferença estatística significativa, cada grupo de casal foi comparado entre amostras Paciente

e Controle, separadamente, em tabelas L x C. Não há diferença estatística significativa entre os casais para a maioria dos alelos do gene *MICA* e para todos do gene *MICB*, como demonstrado nas tabelas 06 (*MICA*) e 07 (*MICB*), que mostram os valores de *p* referentes às comparações dos alelos que foram encontrados em todos os grupos de casais. As freqüências dos casais em relação à presença e ausência dos alelos *MICA* e *MICB* podem ser vistas nos gráficos 4 (*MICA*) e 5 (*MICB*).

TABELA 06 – VALOR DE *p* CALCULADO PARA COMPARAÇÃO DAS FREQÜÊNCIAS DOS QUATRO TIPOS DE CASAIS PACIENTES E CONTROLES EM RELAÇÃO À PRESENÇA OU AUSÊNCIA DOS PRINCIPAIS ALELOS DE *MICA* (TABELA DE CONTINGÊNCIA 4 X 2 - G.L. = 3)

Alelo	*p*
*MICA*004*	0,0277
*MICA*008*	0,1358
*MICA*011*	0,1720
*MICA*027*	0,1846
*MICA*B*	0,9533
*MICA*009*	0,6165
*MICA*Z*	0,6424

FONTE: A autora (2008)

NOTA: Significativo: $p \leq 0,05$. n = 140 (pacientes) e n = 130 (controles)

TABELA 07 – VALOR DE *p* CALCULADO PARA COMPARAÇÃO DAS FREQÜÊNCIAS DOS QUATRO TIPOS DE CASAIS PACIENTES E CONTROLES EM RELAÇÃO À PRESENÇA OU AUSÊNCIA DOS PRINCIPAIS ALELOS DE *MICB* (TABELA DE CONTINGÊNCIA 4 X 2 - G.L. = 3)

Alelo	*P*
*MICB*001*	0,3612
*MICB*00201*	0,6268
*MICB*003*	0,1980
*MICB*00503*	0,8746
*MICB*008*	0,2068
*MICB*011*	0,9977
*MICB*019*	0,9183

FONTE: A autora (2008)

NOTA: Significativo: $p \leq 0,05$. n = 70 (casais pacientes) e n = 65 (casais controles)

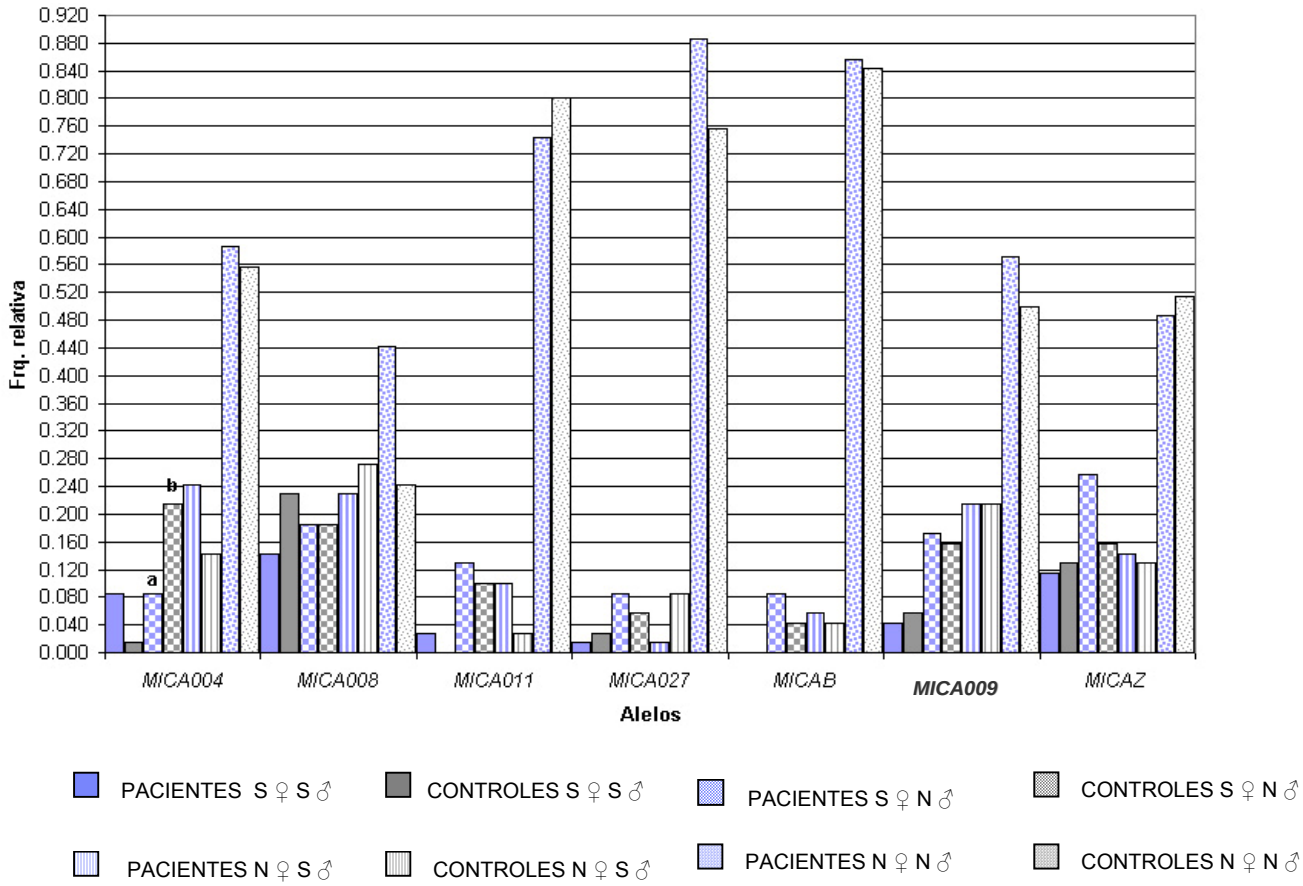

GRÁFICO 04 – FREQÜÊNCIAS DOS QUATRO TIPOS DE CASAIS PACIENTES E CONTROLES EM RELAÇÃO À PRESENÇA OU AUSÊNCIA DOS PRINCIPAIS ALELOS DE *MICA*

FONTE: A autora (2008)

NOTA: Foram demonstrados apenas os alelos presentes nos quatro grupos de casais de pelo menos uma das amostras; Pacientes: Casais com ARE; Controles: Casais com pelo menos duas gravidez bem sucedidas; S ♀ S ♂: Mulheres e homens apresentam o alelo; S ♀ N ♂: Apenas as mulheres apresentam o alelo; N ♀ S ♂: Apenas os homens apresentam o alelo; N ♀ N ♂: Nem homens nem mulheres apresentam o alelo. As letras minúsculas diferentes significam que a diferença entre a freqüência do alelo *MICA*004* no grupo de casal indicado no gráfico é estatisticamente significativa (p = 0,02). Os resultados foram considerados significativamente diferentes quando $p \leq 0,05$. n = 70 (casais pacientes) e n = 65 (casais controles)

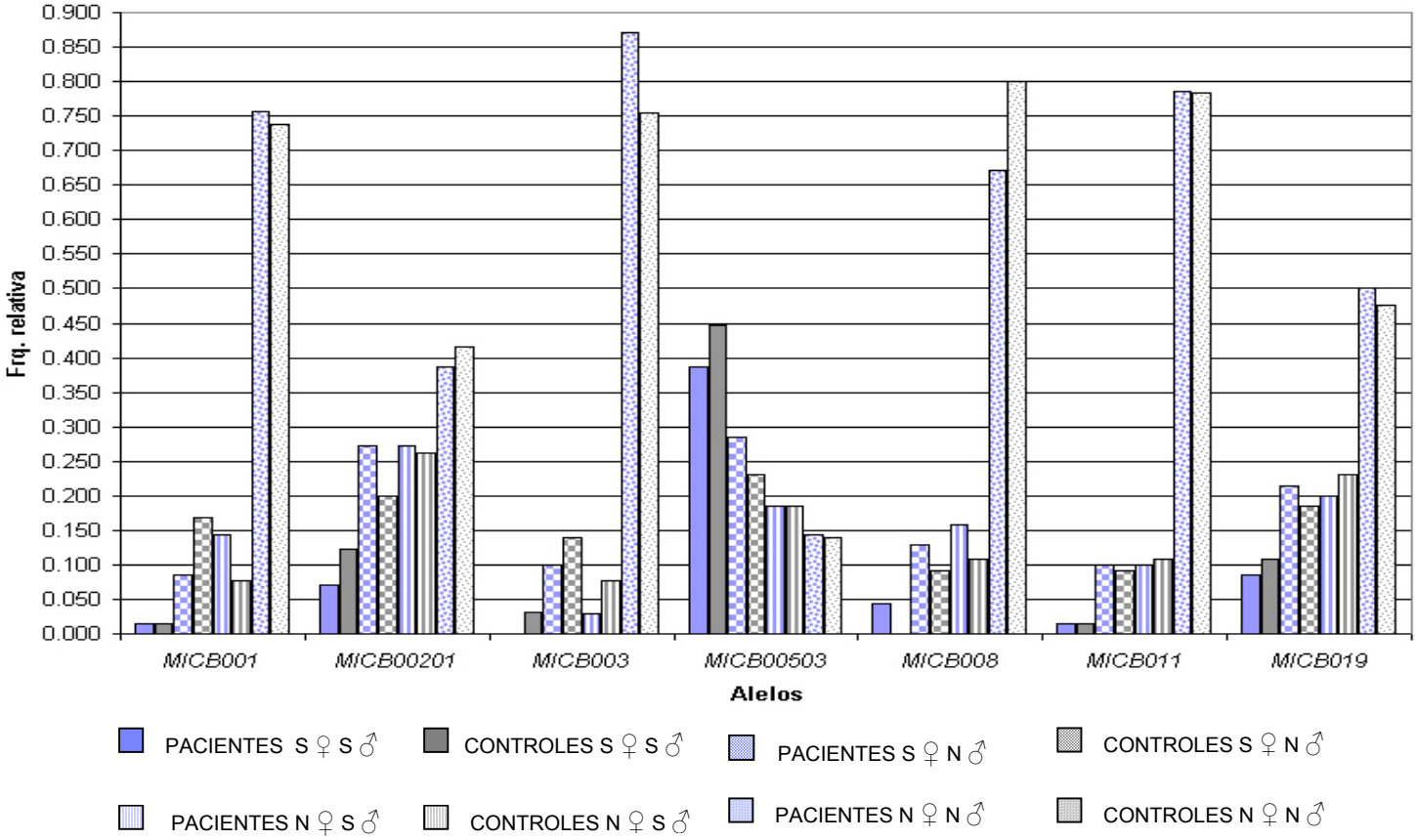

GRÁFICO 05 – FREQÜÊNCIAS DOS QUATRO TIPOS DE CASAIS PACIENTES E CONTROLES EM RELAÇÃO À PRESENÇA OU AUSÊNCIA DOS PRINCIPAIS ALELOS DE *MICB*

FONTE: A autora (2008)

NOTA: Foram demonstrados apenas os alelos presentes nos quatro grupos de casais; Pacientes: Casais com ARE; Controles: Casais com pelo menos duas gravidezes bem sucedidas; S ♀ S ♂: Mulheres e homens apresentam o alelo; S ♀ N ♂: Apenas as mulheres apresentam o alelo; N ♀ S ♂: Apenas os homens apresentam o alelo; N ♀ N ♂: Nem homens nem mulheres apresentam o alelo. Não houve diferença significativa entre as freqüências alélicas de cada grupo de casais controles e dos casais pacientes. Significativo: $p \leq 0,05$. Casais pacientes n = 70 casais; Casais controles n = 65 casais

98,57% dos casais com ARE era do tipo N ♀ N ♂ para os alelos *MICA*001, MICA*005, MICA*015* e *MICA*024*, sendo essa percentagem encontrada para cada um desses alelos. Mais de 90% desses casais também foram classificados como N ♀ N ♂ em relação a cada um dos seuintes alelos: *MICA*006, MICA*00802,*

*MICA*1201, MICA*016, MICA*017, MICA*1801, MICA*019, MICA*027, MICA*030, MICA*052* e *MICA*Y.*

Os dados obtidos para os casais Controle foram semelhantes aos encontrados para os pacientes, sendo que dos alelos listados acima, apenas no caso de *MICA*016* e *MICA*017* foram encontrados casais N ♀ N ♂ em percentagens menores que 90%, porém as diferenças não foram significativas.

8,6% dos casais pacientes foram classificados como S ♀ N ♂ para o alelo *MICA*B*; 5,7% N ♀ S ♂ para esse mesmo alelo, e 85,7% são N ♀ N ♂, enquanto nos controles 4,6% dos casais são S ♀ N ♂, a mesma percentagem N ♀ S ♂ e 90,77% N ♀ N ♂ (diferenças não significativas). Já para o alelo *MICA*010,* 8,6% dos casais pacientes são S ♀ N ♂ e a mesma percentagem N ♀ S ♂, portanto, 82,86% são N ♀ N ♂. Entre os casais controles, 10,77% são S ♀ N ♂ , 3,08% N ♀ S ♂ e 85,15% N ♀ N ♂, não sendo essas diferenças estatisticamente significativas.

O alelo *MICA*008* foi observado no homem e na mulher de cada casal 26,15% das vezes nos casais controles e 44,29% nos pacientes, sendo essas diferenças não significativas. O grupo S ♀ S ♂ apresenta percentagem de 14,29% e 24,62% nas amostras Paciente e Controle, respectivamente, enquanto o grupo S ♀ N ♂ , 18,57% e 20,00%, respectivamente e o grupo N ♀ S ♂ 22,86% e 29,23%, respectivamente. Nenhuma dessas diferenças é estatisticamente significante.

Casais N ♀ N ♂ para o alelo *MICA*011* são 74,29% no grupo Paciente e 86,15% no controle, enquanto os grupos S ♀ N ♂, N ♀ S ♂ e S ♀ S ♂ são 10,77%, 3,08% e 0% na amostra Controle, respectivamente e 12,86%, 10,00% e 2,86%, respectivamente entre os Pacientes (diferenças não significativas).

Para os alelos *MICA*009* e *MICA*Z*, as diferenças entre os dois grupos amostrais também não foi estatisticamente significativa, sendo para o primeiro alelo, N ♀ N ♂: 57,14% (pacientes) e 53,85% (controles), S ♀ N ♂: 17,14% (pacientes) e 16,92% (controles), N ♀ S ♂: 21,43% (pacientes) e 23,08% (controles) e S ♀ S ♂: 4,29% (pacientes) e 6,15% (controles). Para o alelo *MICA*Z* 48,57% dos pacientes e 55,38% dos controles são N ♀ N ♂, S ♀ N ♂: 25,71% (pacientes) e 16,92% (controles), N ♀ S ♂: 14,29% (pacientes) e 13,85% (controles) e S ♀ S ♂: 11,43% (pacientes) e 13,85% (controles).

Apenas o alelo *MICA*004* do grupo S ♀ N ♂ apresentou diferença estatística significativa entre os grupos amostrais (*p* = 0,0277). Em 23,08% dos casais controles, as mulheres possuem o alelo *MICA*004* enquanto os homens não o portam, porém, nos pacientes apenas 8,57% dos casais demonstram esse perfil. Os parceiros dessas mulheres não apresentam nenhum alelo *MICA* específico (portanto, casais N ♀ S ♂ não apresentaram nenhum resultado estatisticamente significativo), sendo encontrados os alelos *MICA*008, MICA*010, MICA*01201* entre outros, nos homens.

A partir do cálculo de *Odds Ratio* pode-se dizer que os casais dos quais as mulheres possuem o alelo *MICA*004* e os seus respectivos parceiros possuem qualquer outro alelo *MICA*, exceto o *MICA*004,* têm 3,2 vezes menos chances de sofrerem um aborto recorrente de repetição que casais com outros alelos *MICA* (*p = 0,037*). A tabela 08 mostra os resultados do teste de *Odds Ratio*.

TABELA 08 – FREQÜÊNCIA ABSOLUTA DE CASAIS CONTROLES E PACIENTES S ♀ N ♂ E VALOR DE *ODDS RATIO*

casais	S ♀ N ♂ pacientes	S ♀ N ♂ controles
Mulheres com *MICA*004*	6	15
Mulheres sem *MICA*004*	64	50
odds ratio (μ)	3,200	
p	0,037	
IC 95%	1,158 < μ < 8,843	

FONTE: A autora (2007)

NOTA: IC = Intervalo de Confiança; *p* < 0,05 foi considerado significativo. N = 70 casais pacientes e 65 casais controles

Para o gene *MICB* nenhum alelo foi mais ou menos freqüente de forma significativa em um dos grupos de casais nas amostras Controle ou Paciente.

Nas duas amostras o alelo *MICB*007* foi o menos freqüente entre os casais controles (grupos N ♀ N ♂ foram 96,92%) e o segundo menos freqüente nos casais pacientes (grupos N ♀ N ♂ foram 81,43%).

Os alelos *MICB*003* e *MICB*011* também não foram muito freqüentes nas duas amostras, sendo os grupos N ♀ N ♂ 75,38% e 78,46%, respectivamente, na amostra Controle e 87,14% e 78,57, respectivamente, na amostra Paciente.

O alelo *MICB*001* foi encontrado em 1,43% nos casais S ♀ S ♂, 8,57% nos casais S ♀ N ♂, 14,29% nos casais N ♀ S ♂ e 75,71% nos casais N ♀ N ♂, da amostra Paciente. Entre os controles esses grupos de casais foram encontrados respectivamente com freqüências de 1,54%, 16,92%, 7,69% e 73,85%.

Para o alelo *MICB*00201,* os casais N ♀ N ♂ foram 12,31% (controles) e 7,14% (pacientes), S ♀ N ♂: 20,00% (controles) e 27,14% (pacientes), N ♀ S ♂: 26,15% (controles) e 27,14% (pacientes) e S ♀ S ♂: 41,54% (controles) e 38,57% (pacientes).

As percentagens observadas para o alelo *MICB*00503,* foram: N ♀ N ♂: 13,87% (controles) e 14,29% (pacientes), S ♀ N ♂: 23,08% (controles) e 28,57% (pacientes), N ♀ S ♂: 18,46% (controles) e 18,57% (pacientes) e S ♀ S ♂: 44,61% (controles) e 38,57% (pacientes).

Para os alelos *MICB*008* e *MICB*019*, a distribuição de freqüências entre os casais foi, respectivamente, N ♀ N ♂: 67,14% e 50,00% (controles) e 80,00% e 47,69% (pacientes), S ♀ N ♂: 12,86% e 21,43% (controles) e 9,23% e 18,46% (pacientes), N ♀ S ♂: 15,71% e 20,00% (controles) e 10,77% e 23,08% (pacientes) e S ♀ S ♂: 4,23% e 8,57% (controles) e 0,00% e 10,77% (pacientes).

5.7.2 Freqüências haplotípicas *MICA_MICB* de casais com ARE e de casais controles

Os haplótipos encontrados em cada grupo de casais das amostras Controle e Paciente tiveram freqüências semelhantes, não sendo significativas as diferenças observadas (tabela 08).

O gráfico 6 mostra as freqüências relativas dos haplótipos os quais foram encontrados nos quatro tipos de casais classificados neste estudo, nas amostras Controle e Paciente.

Na amostra Paciente, o haplótipo *MICA*009_MICB*008* foi o mais freqüente no grupo de casais S ♀ S ♂, com freqüência de 4,3%, porém não houve nenhum casal controle do tipo S ♀ S ♂ para esse haplótipo (diferenças não significativas). Esse grupo de casais da amostra Controle apresentou os haplótipos *MICA*008_MICB*00503* e *MICA*Z_MICB*00503* mais freqüentemente que os outros

haplótipos, com freqüência de 3,1% cada um, contra 1,4%, cada um, na amostra Paciente.

O grupo de casais pacientes S ♀ N ♂ possui o haplótipo *MICA*011_MICB*00503* mais amiudadamente que os outros haplótipos (12,90%), sendo a freqüência desse haplótipo nos controles S ♀ N ♂ de 10,80%. Entre os controles, o haplótipo encontrado mais reiteradamente, presente na mulher e ausente no homem, foi *MICA*008_ MICB*001*, cuja freqüência foi de 18,50%, e nos pacientes, esse mesmo haplótipo teve freqüência de 7,1% (não significativo).

Já o haplótipo *MICA*009_MICB*008* foi o que mais apareceu no padrão de casais pacientes N ♀ S ♂, sendo a sua freqüência de 15,70% e nos controles de 10,80%, diferença também não significativa. Nos controles, os haplótipos *MICA*008_MICB*00201* e *MICA*008_MICB*001* foram os mais freqüentes de todos os casais N ♀ S ♂, com freqüência de 15,40% cada um, e nos pacientes de 10,00% e 5,70%, respectivamente.

O haplótipo MICA*Z_*MICB*00201* foi o menos encontrado entre os casais pacientes e controles, sendo que 88,60% dos casais pacientes e 90,80% dos casais controles foram classificados como N ♀ N ♂.

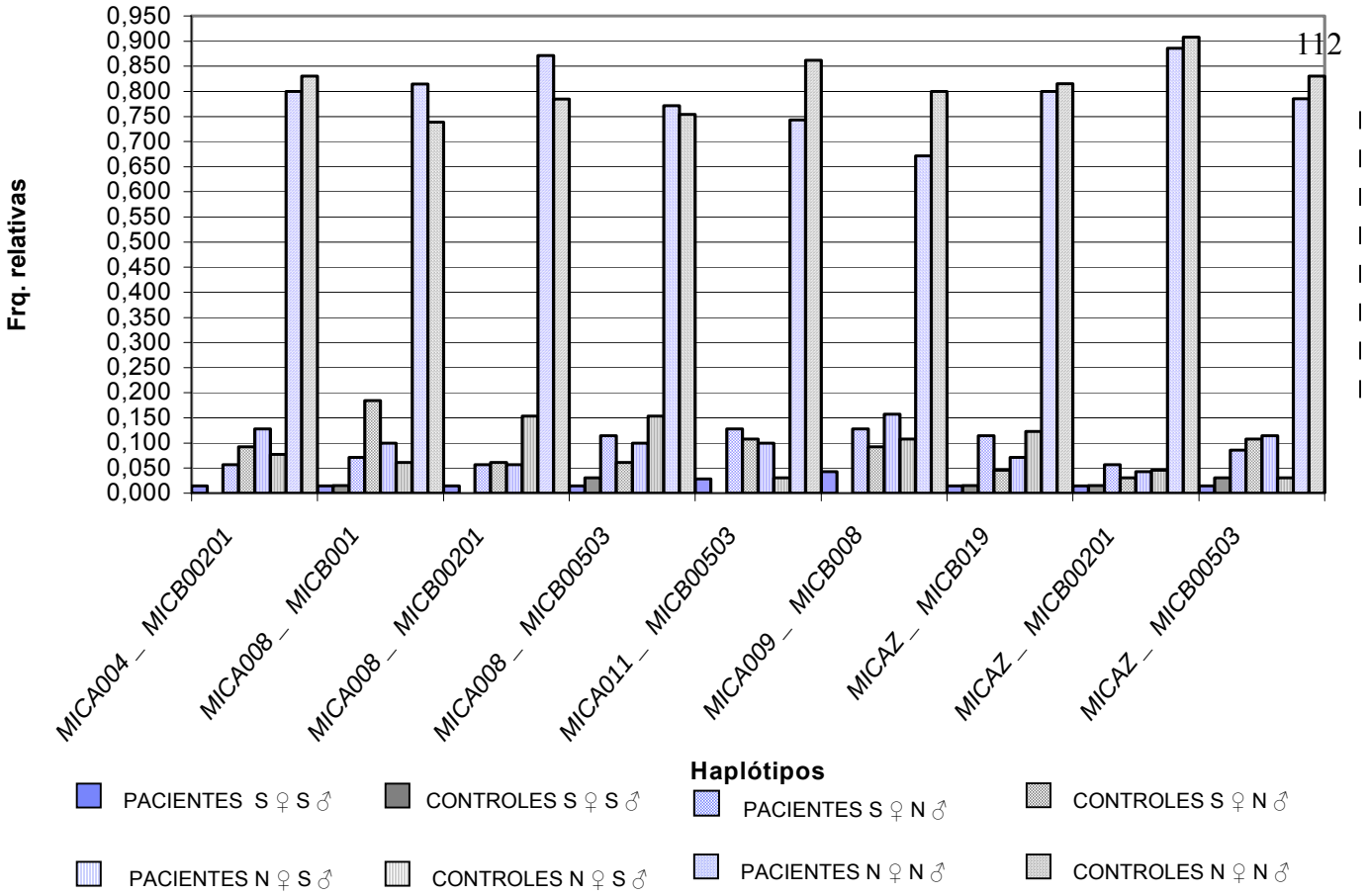

GRÁFICO 06 – FREQÜÊNCIAS DOS PRINCIPAIS HAPLÓTIPOS DOS CASAIS PACIENTES COM ARE E CASAIS CONTROLES

FONTE: A autora (2007)

NOTA: Não houve diferença significativa entre as freqüências haplotípicas de cada grupo de casais controles e dos casais pacientes. Os resultados foram considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$. Casais pacientes n = 70 casais; Casais controles n =65 casais

TABELA 09 - *p* CALCULADO PARA COMPARAÇÃO DAS FREQÜÊNCIAS DOS PRINCIPAIS HAPLÓTIPOS ENTRE AMOSTRAS PACIENTE E CONTROLE (TABELA DE CONTINGÊNCIA 4 X 2 - G.L.3)

Haplótipos	*p*
*MICA*004 _ MICB*00201*	0.4941
*MICA*008 _ MICB*001*	0.2315
*MICA*008 _ MICB*00201*	0.5209
*MICA*008 _ MICB*00503*	0.2323
*MICA*011 _ MICB*00503*	0.1720
*MICA*009 _ MICB*008*	0.2068
*MICA*Z _ MICB*019*	0.4127
*MICA*Z _ MICB*00201*	0.2793
*MICA*Z _ MICB*00503*	0.9063

FONTE: A autora (2007)

NOTA: Não houve diferença significativa entre as freqüências haplotípicas de cada grupo de casais controles e dos casais pacientes. Os resultados foram considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$. Casais pacientes n = 70 casais; Casais controles n =65 casais

5.7.3 Homozigotos para os genes *MICA* e/ou *MICB*

7,14% do total de indivíduos pacientes são homozigotos para os genes *MICA* e *MICB*, enquanto 3,08% do total de indivíduos controles são assim. Apesar do número de indivíduos duplo heterozigoto ser maior entre os pacientes, essa diferença não foi estatisticamente significativa (p = 0,2184).

Não houve nenhuma combinação de homozigotos *MICA/MICB* específica predominante nas duas amostras, sendo observados genótipos homozigotos para os alelos *MICA*008* com homozigotos *MICB*001, MICB*00201* ou *MICB*00503,* homozigotos *MICA*016* com homozigotos *MICB*019,* homozigotos *MICA*009* com homozigotos *MICB*00503* e homozigotos *MICA*001* com homozigotos *MICB*00503.*

Os casais foram agrupados nos quatro tipos de casais possíveis, S ♀ S ♂, S ♀ N ♂, N ♀ S ♂ e N ♀ N ♂, nas duas amostras, e foi feita a contagem de homozigotos para cada alelo dos genes *MICA* e *MICB* dentro de cada grupo, mas as diferenças não foram significativas, e o número de casais homozigotos de cada tipo foi muito pequeno, sendo a maior freqüência de 12,31% para homozigotos *MICB*00503* de casais N ♀ S ♂ nos controles e 4,29% para homozigotos *MICA*004* de casais S ♀ N ♂ nos pacientes.

O número total de casais em que pelo menos um dos indivíduos é homozigoto para cada alelo do gene *MICA* ou do gene *MICB* foi obtido e foi feita a comparação entre os grupos amostrais de pacientes e controles. Não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos, conforme demonstrado nas tabelas 10 e 11.

TABELA 10 - FREQÜÊNCIAS DOS ALELOS *MICA* EM HOMOZIGOSE E COMPARAÇÃO ENTRE CASAIS PACIENTES COM ARE E CONTROLES

Alelo em homozigose	Frq controles	Frq. Pacientes	*p*
*MICA*001*	0,0154	0,0000	0.9703
*MICA*004*	0,0154	0,0769	0.2457
*MICA*008*	0,0308	0,0462	0.9327
*MICA*X*	0,0308	0,0308	0.6652
MICA*Z	0,0154	0,0154	0.5092
*MICA*016*	0,0000	0,0154	0.9703
*MICA*027*	0,0000	0,0154	0.9703
*MICA*052*	0,0000	0,0308	0.5092

FONTE: A autora (2007)

NOTA: Não houve diferença significativa entre as freqüências de homozigotos dos casais controles e dos casais pacientes. Os resultados foram considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$. Casais pacientes n = 70 casais; Casais controles n = 65 casais

TABELA 11 - FREQÜÊNCIAS DOS ALELOS *MICB* EM HOMOZIGOSE E COMPARAÇÃO ENTRE CASAIS PACIENTES COM ARE E CONTROLES

Alelo em homozigose	Frq controles	Frq. Pacientes	*p*
*MICB*001*	0,0154	0,0143	0.5092
*MICB*00201*	0,0615	0,0429	0.9198
*MICB*00503*	0,2000	0,2286	0.8460
*MICB*019*	0,0462	0,0143	0.5598

FONTE: A autora (2007)

NOTA: Não houve diferença significativa entre as freqüências de homozigotos dos casais controles e dos casais pacientes. Os resultados foram considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$. Casais pacientes n = 70 casais; Casais controles n = 65 casais

6 DISCUSSÃO

Inúmeros estudos vêm sendo desenvolvidos a fim de se tentar descobrir causas e possíveis tratamentos dos abortos recorrentes de repetição, porém os mecanismos genéticos moleculares que mantém uma gravidez normal são pouco compreendidos.

A falha na gravidez de vários mamíferos parece ocorrer por mecanismos imunológicos ou imunologicamente modificáveis, os quais serviram de base para a proposição de modelos que explicam os abortos de repetição (CLARK *et al.,* 1996). Um dos modelos mais aceitos recentemente propõe que as células imunes efetoras teriam toxicidade ao trofoblasto fetal muito semelhante à que ocorre na rejeição aos tumores (CLARK *et al.,* 1996).

O presente trabalho teve como objetivo verificar a existência de uma relação entre o polimorfismo dos genes *MICA* e/ou *MICB* com o aborto espontâneo de repetição, tendo como base o fato da placenta liberar moléculas MIC solúveis durante a gravidez e a existência de um mecanismo de escape ao sistema imune de células tumorais através da expressão de moléculas MIC. Além disso os genes *MICA* e *MICB* já foram encontrados em associação com várias doenças auto e aloimunes, o que confirma a possibilidade do polimorfismo desses genes estar envolvido no ARE, o qual é uma patologia que contém causas imunes.

Em 1953, Medawar propôs o conceito do alo-enxerto fetal para explicar a relação imune entre a mãe e o feto (MEDAWAR, 1953, *apud* SACKS; SARGENT; REDMAN, 1999), na qual ocorreria uma supressão da interação imunológica materna com o feto, que poderia ser tanto pela ausência da apresentação de antígenos fetais quanto pela cessação da atividade funcional de linfócitos maternos (SACKS; SARGENT; REDMAN, 1999).

Nas últimas décadas um número considerável de pesquisas visava identificar os constituintes celulares e os processos imunes que estariam putativamente envolvidos com ARE (DOSIOU; GIUDICE, 2006). Até a década de 80, acreditava-se que os linfócitos T eram as principais células do sistema imune que participariam do processo reprodutivo, porém há pouco mais de dez anos, as células NK têm sido mais extensivamente estudadas, uma vez que elas constituem a principal população

leucocitária presente no endométrio no momento da implantação e no início da gravidez (DOSIOU; GIUDICE, 2006).

Os sistemas imune e endócrino se interagem intensamente durante a implantação e para a manutenção da gravidez. Sob a influência de hormônios esteróides há um forte aumento em número de uma única população de linfócitos, as células NK uterinas (uNK), no útero no início da gravidez (DOSIU; GIUDICE, 2006), chegando a compreender cerca de 70% das células linfóides presentes no útero no primeiro trimestre da gravidez (BULMER *et al.,* 1991). Essas células derivam predominantemente de células NK do sangue periférico, que sob influências hormonais são recrutadas ao útero (DOSIU; GIUDICE, 2006). Em camundongos sabe-se que essas células são cruciais para a vascularização placentária, porém em humanos, os papéis dessas células não estão concretamente definidos, havendo apenas hipóteses e indícios de que elas estão envolvidas com o crescimento da placenta e do trofoblasto e promovem a imunomodulação na interface materno-fetal (DOSIU; GIUDICE, 2006). Em contraste com esse papel presumível em manter uma gravidez saudável, as células uNK e NK do sangue periférico são encontradas desreguladas em ARE de causas desconhecidas (DOSIU; GIUDICE, 2006).

Ainda durante os primeiros estudos mais aprofundados sobre o insucesso gestacional, não havia uma explicação consensual entre os pesquisadores para o fato de após a imunização da mãe com alo-antígenos paternos, diferentes dos da mãe, o *pool* de anticorpos anti-HLA paterno, melhorava a aceitação fetal. Completando a hipótese de Medawar em 1953, de que ocorreria uma supressão do sistema imune materno para a aceitação do alo-enxerto fetal, Thomas Wegmann e colaboradores postularam que citocinas do tipo TH2 inibiriam respostas TH1, permitindo a sobrevivência fetal, porém desempenhando defesa imune contra possíveis patógenos que entrassem em contato com a mãe (WEGMANN *et al.,* 1993). Sabe-se hoje que o alo-reconhecimento é importante para a produção inicial de citocinas de células imunocompetentes em várias etapas da gravidez, sendo crucial para o processo implantacional, e o paradigma da cooperação TH1-TH2 é muito mais próximo ao que realmente ocorre durante a gravidez do que apenas um fenômeno TH2.

Os principais antígenos de histocompatibilidade tornaram-se alvo de estudos no campo da imunologia da reprodução, uma vez que o feto é interpretado como um enxerto semi-alogênico pelo organismo da mãe. Sabe-se hoje que ocorre uma hipo-regulação de moléculas HLA-A e HLA-B na placenta, eliminando a possibilidade de reconhecimento das moléculas HLA-I clássicas paternas pelas células T citotóxicas da mãe (PATEL, *et al.,* 2003). Após a descoberta de que o feto não expressa os principais antígenos HLA clássicos, genes e moléculas HLA-I não clássicas foram focados mais intensamente.

As células uNK estão em contato direto com o trofoblasto invasivo na gravidez, sendo responsáveis pela produção de citocinas e outros mediadores envolvidos no controle da invasão e diferenciação do trofoblasto, remodelação das artérias deciduais e aumento da placenta, além de serem os principais candidatos a atacarem o trofoblasto nos casos de abortos alo-imunes (VARLA-LEFTHERIOTI, 2005). Todo o funcionamento das células NK é regulado pelo balanço entre os sinais inibitórios e ativadores, fornecidos por seu vasto repertório de receptores quando reconhecem seus ligantes específicos que são, normalmente, moléculas HLA de classe I (HLA-C, HLA-E, HLA-G) expressos pelas células trofoblásticas invasoras (VARLA-LEFTHERIOTI, 2005). MICs, ligantes de receptores de células NK, funcionam como sinalizadoras de estresse celular e disparam uma gama de mecanismos efetores imunes incluindo citotoxicidade celular, secreção de citocinas e proliferação celular (BAHRAM, 2000).

As moléculas MICA e MICB parecem estar no centro da vigilância imune para detectar células danificadas, infectadas ou estressadas, incluindo tumores, porém há indícios de que a presença dessas moléculas não é essencial à sobrevivência humana (BAHRAM, 2000).

O fato de terem sido encontrados alguns indivíduos espanhóis com o haplótipo *delMICA_MICB* nulo (deleção de *MICA* e presença do alelo nulo *MICB*009N*), ligado ao alelo HLA-B*4801, em homozigose, sugere que esse fenótipo não é letal (*OTA et al*., 2000). Esse fato indica que algumas moléculas HLA de classe I podem substituir a função de MICA/MICB.

56.5% de uma população ameríndia do Paraguai (Angaite) apresentou o haplótipo *HLA-B*015_delMICA_MICB*009N*. O fato de existirem indivíduos

homozigotos para o haplótipo *delMICA_MICB* nulo, indica que a expressão de *MICA* e *MICB* não é essencial para a sobrevivência

As moléculas MICA e MICB são hiper-expressas em situações de estresse celular e evocam respostas imunes ao ligarem-se aos seus receptores, como γ/δ ($V\delta1$) TCR, de células T, e NKG2D, presentes em células NK e células T. Sendo as uNK as principais células do sistema imune presentes na região de implantação do feto e durante o primeiro trimestre de gravidez, as moléculas MIC podem ter alguma relevância no processo reprodutivo, o que as faz importante matéria de estudo nessa área juntamente com as outras moléculas MHC.

Uma grande dificuldade existente para estudos de associação entre diversos parâmetros e o ARE é a obtenção de uma amostra Paciente e uma Controle que atendam a todos os critérios para enquadramento no perfil desejado, e que sejam suficientemente grandes para que os resultados sejam os mais próximos da realidade.

Vários estudos demonstram a mesma dificuldade, como o trabalho de Baek e colaboradores (2002), o qual fez uma comparação da expressão gênica na interface materno-fetal entre pacientes com gravidez normal e pacientes com ARE, sendo o *n* amostral desse estudo de 12 mulheres, sendo 6 pacientes com ARE e 6 controles.

Coumans e colaboradores (1999) fizeram um estudo para verificar anormalidades metabólicas e homeostáticas em mulheres com aborto recorrente de repetição de causa desconhecida, conseguindo um número de 60 mulheres para participarem da pesquisa, porém 8 delas apresentaram causas conhecidas após alguns exames, restando 52 mulheres para a avaliação do estudo.

O estudo caso controle com o polimorfismo dos genes *IL6* e *TGFB1* e o ARE em pacientes do sul do Brasil foi realizado com 57 mulheres pacientes e 74 mulheres controles (VON LINSINGEN; BOMPEIXE; BICALHO, 2005) e o trabalho que analisou a relação das falhas implantacionais com a expressão de citocinas intracelulares em grupos de células NK de sangue periférico em mulheres com ARE, teve como amostra paciente 20 mulheres com duas ou mais falhas de implantação após técnicas de reprodução assistida e 25 mulheres com ARE sem técnicas de fertilização *in vitro* (FIV), e, como grupo controle, participaram 15 mulheres sem histórias de infertilidade ou abortos (FUKUI et al., 2007).

O trabalho de Jokimaa e colaboradores (2002) verificou que a infertilidade sem causa aparente e o ARE estão relacionados com a expressão alterada de genes envolvidos com a produção e degradação da matrix extracelular endometrial, e nesse estudo, o grupo controle constitui-se de 14 mulheres férteis, 9 mulheres formaram o grupo com infertilidade idiopática e 10 mulheres foram enquadradas no grupo com ARE.

O trabalho de Komlos, Klein e Korostishevsky (2007) sobre a associação entre HLA-I e ARE utilizou um número de casais semelhante ao do presente estudo, sendo 63 casais férteis e 78 casais com ARE.

O presente trabalho teve como amostra Controle 65 casais saudáveis que tiveram 2 filhos ou mais e nenhum histórico de aborto e como amostra Paciente, 70 casais que nunca tiveram filhos e tiveram 2 perdas gestacionais espontâneas de causa desconhecida, todos nascidos no sul do Brasil, sendo a maioria do estado do Paraná.

A contagem da população do Paraná em 2007 foi de 10.284.503 habitantes, sendo 50% mulheres e 49% homens (IBGE, 2007). No ano de 2005 foram registrados 164588 nascimentos e 1560 óbitos fetais, segundo dados do IBGE, 2007. Considerando-se que por ano, cada casal tem apenas um filho, pode-se considerar que aproximadamente 166148 mulheres tiveram gestações no ano de 2005. Segundo Coulam e colaboradores (1997), de 2 a 5% dos casais sofrem ARE, portanto, das aproximadamente 166148 mulheres que conseguiram engravidar no Paraná em 2005, de 3322 a 8307 teriam tido abortos espontâneos de repetição, sendo registrados apenas 1560 óbitos fetais. Esses números seriam satisfatórios para a realização da pesquisa em questão, porém deve-se salientar que dos óbitos fetais registrados, grande parte, provavelmente, foi um aborto único e de causa conhecida, uma vez que apenas 2 a 5% das mulheres sofrem ARE contra 10 a 15% que sofrem abortos únicos (COULAM *et al.,* 2007; TULPPALA e YLIKORKALA, 1999). Além disso, das mulheres cujas perdas gestacionais foram de repetição e de causa desconhecida, poucas procuram clínicas de medicina reprodutiva especializadas, o que faz com que os pesquisadores da área tenham acesso a um número extremamente restrito de casais com ARE de causas desconhecidas.

A busca por esses casais pela equipe do LIGH ocorre desde 1997, porém estoques de DNA acabam, a qualidade do material genético de algumas amostras é perdida e a reposição do sangue de casais desse tipo é sempre muito pequena.

Como descrito anteriormente, se conseguiu uma lista de 106 casais da Clínica Genetika, porém mais da metade conseguiu ter filhos, o que é de grande contentamento para esses casais, porém dentre os casais que não conseguiram ter filhos, assuntos relacionados a esse fato são de extremo incômodo psicológico, o que faz com que eles não queiram participar da pesquisa, por mais que se tente explicar os benefícios que pesquisas dessa área podem, conjuntamente, trazer no futuro.

O fato de algumas amostras estarem estocadas há pelo menos 10 anos, e por serem congeladas e descongeladas várias vezes para a realização das pesquisas pode explicar porque muitas amostras apresentaram problemas na amplificação tanto na técnica PCR-SSOP quanto na técnica de PCR-SSP. Além disso, algumas amostras apresentaram uma baixa concentração de DNA, e podem não ter tido material suficiente para uma amplificação satisfatória. Por esse motivo os procedimentos de PCR-SSOP foram repetidos para essas amostras.

A tipagem das amostras por SSOP que não foi bem sucedida foi refeita pelo fato da análise levar em conta a hibridização das sondas das microesferas a quatro éxons de *MICA* (éxons 2, 3, 4 e 5) e no caso de um dos éxons não ter sido amplificado, a análise pode gerar um resultado distorcido.

Optou-se pela técnica PCR-SSOP para tipagem do gene *MICA* pelo fato dessa técnica já ter sido utilizada por uma pesquisadora do laboratório e ter sido satisfatória quando comparada aos dados disponíveis na literatura (RIBAS, 2007).

A definição dos alelos para o gene *MICA* dos indivíduos tipados foi realizado em uma análise conjunta dos dados obtidos a partir do método de PCR-SSOP e PCR-SSP. 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 “oligonucleotídeos positivos”, considerando-se que os dois alelos de um indivíduo são analisados simultaneamente.

As ambigüidades apresentadas na SSOP foram as mesmas encontradas no estudo de Ribas (2007), que utilizou a técnica PCR-SSP para confirmação das tipagens obtidas por SSOP, obtendo-se alta concordância dos resultados, e para a resolução das ambigüidades encontradas com a técnica SSOP. Portanto, a técnica PCR-SSP foi utilizada no presente estudo para tipagem do gene *MICA,* com fins apenas de resolução das ambigüidades encontradas com a técnica PCR-SSOP, que é uma técnica mais rápida, facilitada pela utilização de um kit comercial que também diminui as variáveis indesejadas no experimento. As amostras utilizadas no estudo de Ribas (2007) foram utilizadas como controle positivo do gene *MICA* no presente trabalho.

O gene *MICB*, significativamente menos estudado que o gene *MICA,* ainda não possui um kit comercial para ser tipado pela técnica PCR-SSOP e poucos estudos utilizaram essa técnica para tipagem de *MICB* (FISCHER *et al.,* 1999). Portanto, das técnicas já utilizadas para a tipagem desse gene, como PCR-SSP (COLLINS *et al.,* 2002; GONZALÉZ *et al.,* 2003), análises de microssatélites (FENG *et al.,* 2004) e PCR-SBT (tipagem baseada em seqüenciamento) (GLAS *et al.,* 2001), a técnica PCR-SSP foi escolhida para tipagem nesse estudo, por já ser bem padronizada no laboratório, ter custo mais acessível e ser de ótima qualidade. Alguns mixes foram feitos com base nos desenhados por Collins e colaboradores (2002), porém como vários outros alelos foram descritos após a publicação do trabalho de Collins, outros oligonucleotídeos foram desenhados para a realização do presente estudo, e novas combinações foram feitas para detecção dos alelos *MICB.* Para a tipagem desse gene não foi possível obter amostras para serem utilizadas como controle positivo de cada alelo, o que resultou em algumas dúvidas da confiabilidade dos dados no que se refere à presença ou ausência de bandas, pois a falta de amostras de referência dificultou a otimização das condições da PCR para cada reação. A dificuldade em se obter amostras como controles positivos é devida a vários motivos, como o fato da tipagem desse gene em outros estudos ser de apenas um éxon ou íntron, ou de microssatélites intrônicos, levando a uma classificação alélica independente da adotada pela WHO (GLAS *et al.*, 2001; KULSKI *et al.,* 2002) ou a tipagem ter sido

realizada em populações orientais, distinta da população investigada no presente estudo (SHICHI *et al.* 2005), portanto com alelos não encontrados nos indivíduos estudados no presente trabalho e vice-versa.

As tipagens do gene *MICA* pela técnica SSOP que foram definidas, porém determinadas com microesferas falso-positivas ou falso-negativas, foram repetidas, e os mesmos resultados foram obtidos. Em alguns casos a contagem de determinadas microesferas foi mais baixa do que a considerada nas amostras de referência do programa *HLA Visual*, versão 2.0, por alguma falha na hibridização das microesferas, ou por um padrão ligeiramente diferente na amostra do presente estudo, ou a contagem foi mais alta devido a hibridizações inespecíficas. As tipagens com resultados falso-positivo ou falso-negativo são dadas pelo programa *HLA visual* se a microesfera indicada como FP ou FN for desprezada. Isso pode acontecer por vários motivos, como uma amplificação inespecífica da sonda dessa microesfera com outra região do DNA não correspondendo ao alelo ao qual ela se hibridizaria, ou por essa sonda hibridizar em uma mesma região na qual outra sonda hibridiza dando uma combinação diferente de microesferas, o que não resultaria em nenhuma tipagem. Em alguns casos as amostras da OneLambda usadas para comparação com a amostra testada apresentam maior taxa de hibridização das microesferas que a da amostra teste, favorecendo uma linha de corte (*cut off*) alta para a amostra teste. Isso pode fazer com que alguma microesfera que tenha hibridizado em sua região alvo de *MICA* menos intensamente fique abaixo da linha de corte, dando um resultado falso-negativo para aquela sonda. A linha de corte pode ser aumentada ou diminuída durante a análise no programa, e em alguns casos, após análise dos padrões das taxas de hibridização da amostra controle da OneLambda e da amostra teste, essa linha foi alterada para eliminar resultados com FP ou FN.

Entretanto, a possibilidade dos indivíduos dos quais as microesferas foram falso-positivas ou negativas, possuírem novos alelos ainda não descritos e não considerados no kit LABTypeMICA, deve ser considerada.

Alguns alelos *MICA* foram encontrados na amostra Paciente e não na controle e o contrário também foi visto, porém as diferenças não foram significativas. Esse fato ocorreu, provavelmente, porque o *n* amostral não foi suficientemente grande para que os alelos encontrados apenas em uma das amostras fosse observado

também na outra amostra, uma vez que a freqüência desses alelos é baixa na população.

Nenhuma das duas técnicas utilizadas para tipagem do gene *MICA* foi capaz de distinguir o alelo *MICA*00801* do alelo *MICA*00804*. Apenas a técnica de seqüenciamento poderia confirmar a tipagem desses indivíduos, uma vez que apenas quatro alelos foram seqüenciados para a região na qual esses alelos diferem. Os dois alelos se diferenciam pela presença de uma timina no alelo *MICA*00804* ao invés de citosina no nucleotídeo 21 do éxon 1, presente nos alelos *MICA*00801*, *MICA*004* e *MICA*001*, sendo esses quatro alelos os únicos com a seqüência do éxon 1 definida até o momento (EUROPEAN BIOINFORMATIC INSTITUTE, 2006). Essa substituição não implica em diferenças funcionais da seqüência líder desses alelos, uma vez que os códons que contêm essa substituição nucleotídica (TTT e TTC, respectivamente) codificam o mesmo aminoácido (fenilalanina) (mutação silenciosa). Portanto, os indivíduos tipados como *MICA*00801* ou *MICA*00804* foram considerados simplesmente como *MICA*008,* apesar de a probabilidade dos indivíduos serem *MICA*00801* ser significativamente maior que *MICA*00804*, uma vez que pouquíssimos indivíduos *MICA*00804* foram encontrados até o momento (STEWART *et al.,* 2004), e o alelo *MICA*00801* é o alelo mais freqüente em várias populações estudadas (FODIL *et al.*, 1999; RIBAS, 2007).

As outras ambigüidades encontradas pela técnica SSOP e que não puderam ser eliminadas através da técnica PCR-SSP são devidas à região de microssatélite presente no éxon 5, que codifica o segmento transmembrânico da proteína MICA, e poderão ser solucionadas pela análise dos microssatélites, que será feita pela aluna Liana Oliveira, posteriormente.

Indivíduos que foram considerados *MICA*B*, podem ser *MICA*00701* ou *MICA*026*. A freqüência do alelo *MICA*026* em populações euro-brasileiras (RIBAS, 2007), indígenas Sul-Americanas (ZHANG *et al.,* 2002) e Nigerianas (TIAN *et al.,* 2003) foi nula. Esse alelo foi encontrado apenas, e com freqüência de aproximadamente 1,4%, em Tailandeses (ROMPHRUK *et al.,* 2001). Todas essas populações possuem *n* amostral superior a 130 indivíduos, com exceção das tribos indígenas, que possuem *n* superior a 40 indivíduos cada uma.

Indivíduos com a ambigüidade MICA*Y, entre os alelos *MICA*008* e *MICA*027*, provavelmente possuem o alelo *MICA*008*, que é o alelo mais freqüente em várias populações estudadas, como euro-brasileira (26,5%) (RIBAS, 2007), brasileira (27,2%) (MARIN *et al.,* 2004), afro-americana, com freqüência de 31,7% e euro-americana, atingindo a freqüência de 43,33% (GAO *et al.,* 2006), na tribo nigeriana Efik esse alelo ocorre em freqüência de 32,8% (TIAN *et al.,* 2003), entre os tailandeses *MICA*008* ocorreu em 21,4% da população estudada (ROMPHRUK *et al.,* 2001) e em japoneses 30,8% (KATSUYAMA *et al.,* 1999), além de ser o alelo mais freqüente entre os indivíduos da população espanhola saudável estudada por Muñoz-Saá (2006), em seu trabalho com doença de Behçet (BD) e *MICA*.

Esse alelo também foi o mais freqüente nas duas amostras desse estudo, apresentando freqüência de 24,61% nos controles e 19,29% em pacientes. Se os indivíduos que apresentam a ambigüidade *MICA*Y* realmente forem *MICA*008*, a freqüência desse alelo sobe para 21,07% nos pacientes e 28,08% nos controles. Já o alelo *MICA*027* apareceu em 1,7% na população euro-brasileira, estudada por Ribas (2007),e não foi verificado nos estudos com populações de brasileiros, afro-americanos e euro-americanos (MARIN *et al.,* 2004; GAO *et al.,* 2006). Porém nas tribos indígenas sul-americanas Toba, Wichi e Terena, estudadas por Zhang e colaboradores (2002), o alelo *MICA*027* foi um dos alelos mais freqüentemente encontrados, com freqüência de 30,9%, 31,0% e 35,2%, respectivamente. Pelo fato da população do sul do Brasil possuir algum grau de miscigenação com índios sul-americanos, o alelo *MICA*027* pode aparecer em alguns indivíduos euro-descendentes, o que explicaria a sua presença em 1,7% dos indivíduos estudados por Ribas (2007), de um total de 204 indivíduos, e no presente estudo, quando não foi observada a ambigüidade, em 3,6% e 5,4% dos indivíduos pacientes e controles, respectivamente.

Os brasileiros, os afro-americanos, os euro-americanos, os japoneses e os coreanos foram estudados a partir de amostras com mais de 130 indivíduos e as tribos nigerianas, com *n* superior a 30 indivíduos cada uma.

A ambigüidade *MICA*Z* coloca a possibilidade dos indivíduos que a apresentam possuírem os alelos *MICA*00201* ou *MICA*020*. O alelo *MICA*020* é extremamente raro, apresentando freqüência nula em populações euro-brasileira,

nigeriana e indígenas sul-americana (ZHANG *et al.,* 2002*;* TIAN *et al.,* 2003; RIBAS, 2007) e não foi verificado nos trabalhos com brasileiros, afro-americanos, euro-americanos, japoneses e coreanos (KATSUYAMA *et al.,* 1999; PYO *et al.,* 2003; MARIN *et al.,* 2004; GAO *et al.,* 2006). Esse alelo foi encontrado em 0,4% de indivíduos tailandeses (ROMPHRUK *et al.,* 2001). Já o alelo *MICA*00201* foi um dos alelos mais freqüentemente encontrados entre os euro-brasileiros, com freqüência de 17,7% (RIBAS, 2007), brasileiros, 15,4% (MARIN *et al.,* 2004), afro-americanos 25,4%, euro-americanos 14,1% (GAO *et al.,* 2006), tribo Efik da Nigéria, com freqüência de 17,2% (TIAN *et al.,* 2003) e tailandeses 17,6% (ROMPHRUK *et al.,* 2001), assim como foi o terceiro alelo mais freqüente no estudo de Muñoz-Saá (2006) (14,24%) e foi o alelo mais freqüente nas tribos indígenas sul-americanas Toba, Wichi e Terena (34,6%, 47,6% e 44,5%, respectivamente) (ZHANG *et al.,* 2002), e nas tribos nigerianas Yoruba e Igbo, com freqüências de 33,1% e 42,4%, respectivamente (TIAN *et al.,* 2003). O presente estudo encontrou 16,10% e 15,00% dos indivíduos pacientes e controles, respectivamente, apresentando a ambigüidade *MICA*Z*, o segundo alelo mais freqüente de ambas as amostras, e a partir dos dados obtidos para as outras populações brasileira, euro-brasileira e euro-americana é possível inferir que os indivíduos das amostras Paciente e Controle com essa ambigüidade sejam positivos para o alelo *MICA*00201* e negativos para o alelo *MICA*020.*

O mix 45, que detecta a amplificação de um segmento do alelo *MICA*033*, não possui um controle positivo e alguns trabalhos com populações euro-descendentes, como o trabalho de Ribas (2007), não detectaram nenhum indivíduo com esse alelo, resultado confirmado pela técnica de SSOP. Pelo fato de algumas tipagens SSOP terem detectado *MICA*033* o mix 45 foi utilizado na tentativa de confirmar o resultado da SSOP. Como o esperado, nenhum indivíduo foi considerado como tendo o alelo *MICA*033* no presente estudo.

Os alelos *MICA*049* e *MICA*045* (mixes 61 e 65c, respectivamente) também não possuem controle positivo, mas apenas como tentativa de se solucionar as ambigüidades detectadas por SSOP, os mixes foram utilizados. Esses alelos não são freqüentes em populações euro-brasileira, brasileira, indígena sul-americanas

(ZHANG *et al.,* 2002; MARIN *et al.,* 2004; RIBAS, 2007), e também não foram encontrados na população basicamente euro-descendente do presente trabalho.

Os alelos menos freqüentemente encontrados nas duas amostras do presente estudo (freqüência igual ou inferior a 2,5%) também apresentaram freqüências menores que 2,5% em populações euro-descendente, brasileira e euro-americana, sendo eles, os alelos *MICA*001, MICA*006, MICA*00802, MICA*015, MICA*017, MICA*019, MICA*024, MICA*030* e *MICA*052.* Ainda com freqüência inferior a 2,5% no presente estudo foram observados os alelos *MICA*005* e *MICA*007*, o primeiro não sendo tipado nos demais estudos e o segundo apresentando freqüência de 3,2% na população euro-descendente (RIBAS, 2007), e 5,08% nos euro-americanos (GAO *et al.,* 2006), entretanto, essas diferenças não são significativas (p = 0,2508 e p = 0,1644, respectivamente). Para a população brasileira esse alelo ocorreu em freqüência inferior a 2,5% (MARIN *et al.,* 2004).

O alelo *MICA*00802* não foi tipado para a população brasileira do estudo de Marin e colaboradores (2004). No estudo de Ribas (2007), 1,2% da população de euro-brasileiros apresentou esse alelo, não sendo essa diferença estatisticamente significativa em relação às freqüências obtidas no presente estudo (p = 0.7949), porém foi significativa com a população de euro-americanos, na qual e apenas 0,28% dos indivíduos possuem o alelo *MICA*00802*, sendo essa diferença significativa também para o presente trabalho (p < 0.0001). O alelo *MICA*00802* possui uma timina no códon 247 (éxon 4) no lugar de citosina, encontrada nos alelos *MICA*00801* e *MICA*00804*, porém ambos os códons ACC, dos alelos *MICA*00801* e *MICA*00804* e ACT do alelo *MICA*00802* codificam uma treonina (substituição silenciosa), não causando uma diferença funcional no produto protéico, portanto todos os indivíduos *MICA*00802* podem também ser considerados como *MICA*008* . Somando-se os indivíduos *MICA*00802* aos indivíduos *MICA*008,* a diferença entre as populações euro-americana (GAO *et al.,* 2006), euro-brasileira (RIBAS, 2007) e a do presente estudo se torna não significativa.

Os alelos *MICA*010, MICA*01201, MICA*016, MICA*01801* e *MICA*027* apresentaram freqüências superiores a 2,5% e inferiores a 6,0% nas amostras Paciente e Controle desse estudo. Esses dados foram ligeiramente diferentes dos encontrados para as populações euro-brasileira, brasileira e euro-americana (MARIN

et al., 2004; GAO *et al.,* 2006; RIBAS, 2007), porém não houve diferenças estatisticamente significativas.

O alelo *MICA*010* apresentou freqüência de 7,1%, 5,7% e 5,8% nas populações de euro-brasileiros (RIBAS, 2007), brasileiros (MARIN *et al.,* 2004) e euro-americanos (GAO *et al.,* 2006), respectivamente, e de 4,3% e 4,2% nas amostras Paciente e Controle do presente trabalho, respectivamente, não sendo essas diferenças estatisticamente significativas.

Os alelos *MICA*01201* e *MICA*016* tiveram freqüência de menos que 2,5% nas populações euro-brasileira, brasileira e euro-americana estudadas por Ribas (2007), Marin e colaboradores (2004) e Gao e colaboradores (2006), respectivamente, mas esses alelos não foram significativamente mais freqüentes nas amostras Paciente e Controle do presente estudo (2,9% e 3,1%, respectivamente, para o alelo *MICA*1201* e 2,9% e 2,7%, respectivamente, para o alelo *MICA*016*).

O alelo *MICA*027* foi mais freqüente nas amostras de pacientes e de controles, estudadas no atual trabalho, que na amostra de euro-brasileiros estudada por Ribas (2007), mas essa diferença não foi significativa entre as duas populações.

Os alelos que apresentaram freqüências intermediárias nas duas amostras desse estudo (*MICA*004, MICA*009* e *MICA*011*) com freqüências entre 10,0% e 15,00%, apareceram em freqüências semelhantes nas populações de euro-brasileiros, de brasileiros e de euro-americanos (RIBAS, 2007; MARIN *et al.,* 2004 e GAO *et al.,* 2006, respectivamente).

*MICA*004,* o terceiro alelo mais freqüente na amostra Paciente e o quarto mais freqüente na amostra Controle, apareceu com freqüências entre 11,00% e 15,00% nas populações de euro-brasileiros e brasileiros, porém na população de euro-americanos, esse alelo teve uma freqüência inferior (7,5%), significativamente diferente para as freqüências obtidas nas outras populações e no presente estudo (p = 0,0057). No estudo de Muñoz-Saá (2006), *MICA*004* foi o segundo alelo mais freqüentemente encontrado entre os indivíduos saudáveis (17,58%).

O alelo *MICA*009* apareceu em 13,7%, 12,5% e 8,5% dos indivíduos das populações euro-brasileira, brasileira e euro-americana, respectivamente, mas essas diferenças não são estatisticamente significativas entre elas e entre as amostras

desse estudo. Esse foi o terceiro alelo mais freqüente na amostra Controle do presente trabalho e o quarto na amostra Paciente, sendo também o quarto alelo mais freqüente entre os indivíduos espanhóis saudáveis no estudo de Muñoz-Saá (2006).

O alelo *MICA*011* foi mais freqüente na amostra Paciente (7,1%) que na amostra Controle (3,5%), porém a diferença entre as duas amostras não foi significativa. 4,7% dos indivíduos da amostra de euro-brasileiros são portadores do alelo *MICA*011* (RIBAS, 2007), 3,3% dos brasileiros estudados por Marin e colaboradores (2004) têm esse alelo e 2,9% dos euro-americanos possuem *MICA*011* (GAO *et al.,* 2006). Apesar da diferença entre os grupos Paciente e Controle do presente estudo não ter sido significativa, o valor de *p* foi próximo a 0,05, o qual é o valor limite de significância dos dados. Valores abaixo de 0,05 indicam que as amostras contrastantes teriam probabilidades menores que 5% de serem diferentes ao acaso. Portanto, as freqüências alélicas das duas amostras foram comparadas separadamente com as populações estudadas por Gao e colaboradores (2006), Marin e colaboradores (2004) e Ribas (2007).

A freqüência do alelo *MICA*011,* encontrada na amostra Controle, não diferiu significativamente das populações euro-brasileira (RIBAS, 2007) (p = 0,7355), brasileira (MARIN *et al.,* 2004) (p = 0,9136) e euro-americana (GAO *et al.,* 2006) (p = 0,7517). Já a amostra Paciente apresentou, significativamente, mais indivíduos portadores do alelo *MICA*011* que a população brasileira (MARIN *et al.,* 2004) (p = 0,0351) e a euro-americana (GAO *et al.,* 2006) (p = 0,0003), entretanto a população euro-brasileira (RIBAS, 2007) não diferiu significativamente da amostra Paciente do presente estudo (p = 0,1493).

As freqüências dos alelos *MICA*001* e *MICA*011* foram as mais discrepantes entre os indivíduos pacientes e os controles. A partir do teste de contingência L x C para testar se a freqüência desses alelos foi diferente entre os dois grupos devido ao acaso (H_0) ou não (H_1), foi obtido um valor de p menor que 0,10 e maior que 0,05. Para *MICA* 001*, *p value* foi igual a 0,0571 e para *MICA*011* p = 0,0792. A partir desses valores e na condição em que esse experimento foi realizado, não é possível rejeitar H_0, porém, observa-se uma tendência para que exista diferença significativa entre os grupos. O tamanho das amostras estudadas no presente trabalho pode não

ter sido grande suficientemente para que os alelos *MICA*001* e *MICA*011* aparecessem em freqüências equivalentes nas duas amostras, porém a diferença encontrada nas freqüências desses dois alelos entre os dois grupos poderia ser maior se houvesse mais indivíduos em cada uma das amostras.

Há poucos estudos sobre o polimorfismo funcional dos genes *MICA* e, principalmente, *MICB.* Porém, se sabe que existem grandes diferenças da ligação das variantes alélicas MICA com NKG2D, as quais estão associadas a uma substituição simples de aminoácido na posição 129 no domínio alfa 2 da molécula MICA (STEINLE *et al.,* 2001). Alelos que apresentam o códon ATG na posição 129 do éxon 3, são negativos para o aminoácido valina-129, e alelos que possuem o códon GGT, são positivos para esse aminoácido (STEINLE *et al.,* 2001). Dos 22 alelos encontrados no presente trabalho, 10 são negativos para valina, apresentando, no lugar, o aminoácido metionina. A presença do aminoácido valina 129 é associada à redução de afinidade por NKG2D, o que inibiria uma resposta imune das células que expressam esse receptor e a presença da metionina-129 aumenta a afinidade pelo receptor podendo levar as células com esses receptores a respostas imunes mais rápidas e eficientes. Dos alelos encontrados nesse estudo que apresentam o aminoácido metionina 129 (*MICA*001, MICA*B, MICA*007, MICA*011, MICA*012, MICA*015, MICA*017, MICA*018, MICA*030* e *MICA*052*), *MICA*007, MICA*012, MICA*015, MICA*017, MICA*018, MICA*030* e *MICA*052* apresentam freqüências menores que 2,0%, sendo que MICA*015, MICA*030 e MICA*052 foram encontrados somente nos pacientes, apesar da diferença com o grupo controle da freqüência alélica não ter sido significativa. MICA*B foi um dos alelos mais freqüentes nas duas amostras desse estudo, sendo encontrado em um maior número de indivíduos pacientes que controles (não significativo), e tanto os alelos *MICA*00201* quanto o alelo *MICA*020*, envolvidos nessa ambigüidade, apresentam o aminoácido metionina 129.

O alelo *MICA*001* foi encontrado mais freqüentemente em indivíduos controles que pacientes, diferentemente do alelo *MICA*011,* mais freqüente nos indivíduos pacientes, não sendo essas diferenças significativas. A presença da metionina-129 aumenta a afinidade pelo receptor NKG2D de 10 a 50 vezes em comparação a alelos com a valina-129 (MUÑOZ-SAÁ, 2006), podendo ser feita a

inferência de que alelos com a metionina-129 desencadeariam mais fortemente uma resposta das células que expressam o receptor NKG2D em situações de estresse celular que alelos com a valina-129. Portanto, a presença do alelo *MICA*011* mais freqüentemente entre os indivíduos pacientes poderia ser uma das explicações para a ocorrência de ARE, se, com o aumento das duas amostras, fosse confirmada a diferença da freqüência alélica entre os dois grupos.

O cálculo de OR para o alelo *MICA*011* entre pacientes e controles foi feito, mesmo o valor de *p* sendo maior que 0,05, e foi obtido o valor de 2.1453, com *p* = 0,0882 (não significativo), porém próximo ao limite de significância (como esperado). Indivíduos com a presença do alelo *MICA*011* podem ter uma predisposição a ARE, cerca de duas vezes maior que indivíduos sem esse alelo, porém o impacto desse polimorfismo deve ser tênue para essa patologia.

Já para o alelo *MICA*001* ocorre o oposto, porém, a freqüência desse alelo nas duas amostras é muito baixa (menor que 2,5%), podendo ser considerado que essa diferença é ao acaso, o que justifica a freqüência desse alelo ser mais alta entre os indivíduos controles que os pacientes. Além disso, esse alelo é do grupo *A4*, tendo, portanto, um número inferior de alaninas na região transmembrânica, quando comparado aos outros alelos (*A5, A5.1, A6, A7, A8, A9* e *A10*). Essa região do domínio transmembrânico é um forte sítio de glicosilação, que aumenta a afinidade pelo receptor NKG2D, e o fato dos controles terem apresentado esse alelo com mais freqüência que os pacientes pode também ser explicado pela baixa afinidade do alelo *MICA*001* com NKG2D nessa região transmembrânica.

Em um estudo de associação entre a espondilite anquilosante (EA) e o polimorfismo funcional de *MICA* em argelinos foi verificada uma associação entre genótipos MICA-129 met/met e EA juvenil (p = 0,02) independente do gene *HLA-B*027*, cujas variantes podem ser significativamente mais ou menos freqüente entre os pacientes que os controles, (AMROUN *et al*., 2005).

O polimorfismo *MICA-A9*, com alta afinidade por NKG2D devida à alta glicosilação nesses alelos, foi encontrado mais freqüentemente em pacientes com artrite psoriática (PsA) que em controles saudáveis (p < 0,009), sugerindo que o gene *MICA* ou outro gene próximo a ele pode estar envolvido no desenvolvimento de PsA (GONZÁLEZ et al., 2001).

Já no trabalho de Muñoz-Saá (2006), os alelos *MICA* encontrados nos pacientes com a doença de Behçet pertencem principalmente ao grupo de baixa afinidade por NKG2D. Nenhum dos pacientes desse trabalho apresentou o genótipo homozigoto de alta-afinidade, em contraste com 14% dos indivíduos saudáveis (MUÑOZ-SAÁ, 2006). A ausência de fortes ligantes de NKG2D em doença de Behçet pode ser uma particularidade de BD (MUÑOZ-SAÁ, 2006), indicando a existência de outras características das variantes da molécula MICA na resposta imune, específicas a diferentes patologias.

Esses dados conjuntamente sugerem um papel potencial para a relevância da funcionalidade do polimorfismo do gene *MICA* na susceptibilidade a doenças autoimunes, inflamatórias e no processo reprodutivo.

A deleção do gene *MICA*, apesar de não ter sido encontrada em associação com nenhuma doença, pode ser estudado em casos de associação com o ARE, emoutras populações. Não é possível fazer inferências sobre esse genótipo no presente estudo, uma vez que nenhum individuo apresentou a deleção do gene *MICA.* Estudos de associação de ARE com a deleção do gene *MICA*, ou ainda, com o haplótipo nulo *delMICA_MICB*009N*, pode trazer informações interessantes, porém possivelmente será muito difícil se conseguir uma amostra suficientemente grande para tais análises, pelo fato desse haplótipo ser raro conjuntamente com a dificuldade em se conseguir um número de pacientes com ARE satisfatório.

O número de alelos e o padrão qualitativo dos alelos *MICA* e *MICB* varia significativamente entre as populações, possivelmente devido à história demográfica e à mistura étnica.

O polimorfismo do gene *MICA* foi observado em associação com várias doenças como Doença de Behçet (alelos *MICA*009, A5* e *A6*), Diabetes Melitus insulina-dependente (alelos *A4, A5, A5.1, A6, A9*), Doença de Addison (*A5, A5.1, A6*), Psoríase (*MICA*002, MICA*008, MICA*010, A5.1, A4*...), Espondilite Anquilosante (*MICA*007, MICA*010, A4*), Lupus Sistêmico Eritematoso (*A5, A9, A5.1*), Doença Celíaca (*A5.1, A9*), Hepatite B e C (*MICA*015*), lepra (*MICA*A5.1*) entre várias outras doenças, sendo que para cada população estudada, diferentes variantes *MICA* conferem susceptibilidade ou proteção ou não estão associados às doenças (FRIGOUL e LEFRANC, 2005).

A variação da afinidade dos alelos de *MICA* por NKG2D pode afetar o disparo de células NK e a modulação de células T. (STEINLE et al., 2001).

Os níveis de expressão de NKG2D são aumentados pela exposição à IL-15 (SUTHERLAND et al., 2002). Células NK e linfócitos $T_{\gamma\delta}$ de indivíduos com lesões BD, uma desordem inflamatória multisistêmica, são ativados por proteínas MICA através da sua interação com o receptor NKG2D (MUÑOZ-SAÁ, 2006). A expressão local aumentada de MICA foi observada em doença celíaca, artrite reumatóide e diabetes melitus do tipo 1, como descrito anteriormente. Esse aumento de *MICA* foi relacionado, em alguns casos, ao aumento de IL-15 (MUÑOZ-SAÁ, 2006), que pode ser um alvo terapêutico no futuro para várias patologias relacionadas ao aumento de MICA.

A ação das células NK é finamente regulada por uma rede extensa de receptores ativadores e inibidores. Os imunorreceptores ativadores, através da interação com seus ligantes, transduzem sinais ativadores, através de proteínas adaptadoras (como CD3ξ, FcεRIγ e DAP12), que resultam na destruição de células anormais (infectadas, estressadas, etc.). Já os receptores inibidores ligam-se a moléculas MHC de classe I e moléculas relacionadas, mantendo a vigilância das células presentes no organismo, desencadeando a destruição das células anormais na ausência dos sinais inibidores (DOSIOU; GIUDICE, 2006). As células NK têm habilidade de lisar células alvo sem a necessidade de sensibilização prévia ou sem restrições a antígenos HLA (DOSIOU; GIUDICE, 2006).

A variação alélica do gene MICA pode influenciar a ligação desses ligantes ao receptor NKG2D das células NK, podendo afetar o transplante de órgãos e/ ou doenças patogênicas (GAO et al., 2006), assim como as respostas imunológicas que ocorrem durante o processo reprodutivo.

A resposta das células NK vai depender do balanço entre os sinais ativadores e inibidores, sendo que há epistasia entre genes KIR inibidores e genes ativadores (KIR, NKP46, TLR, NKG2D...). Quando os receptores KIR inibidores estão ligados a moléculas MHC-I, os receptores ativadores são inibidos, dependendo então, de um balanço entre os sinais ativadores/inibidores, portanto, os efeitos que podem ser observados a partir da hiperregulação de NKG2D (pela hiperexpressão de MICs), vão depender também de vários outros fatores desencadeadores de resposta imune.

Não foi encontrada nenhuma associação entre ARE e o polimorfismo do gene *MICB.* Dos 8 alelos encontrados, apenas *MICB*003* foi encontrado mais freqüentemente entre os controles que os pacientes, não sendo essa diferença significativa (p = 0,0677), entretanto o valor de p foi próximo ao limite de confiança estipulado. Para os demais alelos a diferença de freqüências entre pacientes e controles foi menor que 2,0%, enquanto que para *MICA*003*, 6,9% dos indivíduos o apresentaram contra 3,2% dos pacientes.

Há poucos trabalhos de genética de populações e de associação a doenças com o gene *MICB*, sendo que aqueles existentes usam nomenclaturas diferentes da padronizada pela WHO, e avaliam apenas alguns segmentos do gene criando novas identificações para os alelos encontrados, com base em microssatélites intrônicos existentes para esse gene.

No de trabalho de González e colaboradores (2003) o gene *MICB* foi tipado em 100 indivíduos espanhóis não relacionados e saudáveis. Analisando os alelos encontrados por esse autor na população estudada com o quadro 03 do presente trabalho, foi possível estabelecer uma comparação entre as freqüências alélicas dos dois trabalhos. No presente estudo, foram encontrados 8 alelos *MICB*, enquanto no trabalho de González e colaboradores (2003), 9 alelos foram identificado, alguns coincidindo com os alelos observados nos indivíduos pacientes e controles desse estudo.

O alelo *MICB*0050201*, denominado MICB01021 no trabalho de González e colaboradores (2003), foi o mais freqüente, enquanto não foi encontrado nenhum indivíduo portando esse alelo em nosso estudo. O alelo mais freqüentemente encontrado nas amostras Paciente e Controle foi o alelo *MICB*00503*, encontrado com freqüência de 4,5% no trabalho de González e colaboradores. O segundo alelo mais freqüente foi MICB0103101 (*MICB*0020101*), também encontrado no presente trabalho como o segundo alelo mais freqüente, com freqüência entre 18% e 20% nas amotras Paciente e Controle. Os alelos MICB0104 e MICB0106 (*MICB*00401* e *MICB*008*) também foram muito freqüentes na população espanhola (12,5%) (GONZÁLEZ *et al.,* 2003), não apresentando diferença estatística significativa para o alelo *MICB*008*, que foi encontrado no presente trabalho com frequencia de 11,4% nos pacientes e a 10% nos controles, entretanto, *MICB*00401* não foi encontrado

em nenhuma das amostras desse estudo. O alelo *MICB*0050101* não foi observado em nenhum indivíduo desse trabalho, mas foi identificado em 1,0% dos indivíduos espanhóis (GONZÁLEZ *et al.,* 2003), não sendo essa diferença estatisticamente significante. Não foi possível identificar que alelo os autores se referiram ao descreverem o alelo MICB01021v, encontrado em 4,0% dos indivíduos estudados, portanto, esse alelo não pôde ser comparado com as freqüências alélicas encontradas no presente. Os alelos *MICB*001*, *MICB*007, MICB*011* e *MICB*019* foram encontrados no presente trabalho, porém não foram observados em espanhóis (GONZÁLEZ, 2003). *MICA*007* foi encontrado em freqüência extremamente baixa nas duas amostras desse trabalho. Sabe-se que esse alelo possui uma origem étnica oriental, indicando que há algum grau de miscigenação com orientais nas amostras estudadas, porém a freqüência desse alelo não ultrapassou 2,1%.

Um estudo com ingleses investigou a relação dos genes *MICA, MICB* e *HLA-B* com a susceptibilidade a doenças intestinais inflamatórias (AHMAD *et al.,* 2002). Os 8 alelos *MICB* encontrados em indivíduos ingleses saudáveis foram MICB01022v (*MICB*013*), MICB0103101v (*MICB*014*), MICB0104 (*MICB*0040101*), MICB0105 (*MICB*003*), MICB0106 (*MICB*008*) e MICB0112, esse não relacionado a nenhum alelo designado pela WHO. Desses alelos apenas dois foram encontrados também nas amostras do presente estudo (*MICB*003* e *MICB*008*). Os alelos *MICA* encontrados na população inglesa também diferiram qualitativamente dos observados nas amostras Paciente e Controle, havendo correspondência na diferença dos dois genes encontrados na população estuda e nas amostras do presente trabalho. Nenhum alelo *MICA* ou *MICB* foi mais ou menos freqüente na amostra controle ou paciente do estudo com doenças intestinais inflamatórias (AHMAD *et al.,* 2002).

O trabalho de Rodriguez-Rodero e colaboradores (2006) estudou os polimorfismos existentes na região promotora do gene *MICB* em associação com a Doença Celíaca. Os polimorfismo estudados foram dos alelos *MICB*00502, MICB*002, MICB*004, MICB*008* e *MICB*003*, os mais freqüentes encontrados na população espanhola, sendo que o alelo *MICB*00502* apresenta dois polimorfismos na região promotora (RODRIGUEZ-RODERO *et al.,* 2006). Dados como esse

indicam que a funcionalidade dos produtos protéicos do gene *MICB* pode estar relacionada a outros fatores e a outras regiões gênicas de *MICB*, além do polimorfismo conhecido na região traduzível do gene.

Outros trabalhos que identificaram freqüências de alelos *MICB* focaram repetições Alu dentro do íntron 1 de *MICB* (KULSKI *et al.,* 2002; HUI *et al.,* 2006), mas esses alelos *AluMICB* não foram relacionados às suas respectivas denominações pela WHO, portanto, não puderam servir de base de comparação com os dados obtidos no presente estudo.

Foi observado que alelos *MICAA5.1* e uma região de microssatélite que flanqueia o gene *MICB* estão associados com a susceptibilidade à lepra, independentemente do alelo *HLA-DRB1*, que é conhecido por também estar associado à suscetibilidade a essa doença (TOSH *et al.,*2006), sabendo-se que não há desequilíbrio de ligação entre *HLA* de classe II e *MIC*. Porém, como a região do gene *MICB* analisada não permite as associações com os alelos já conhecidos e nomeados pela WHO, comparações de freqüências do presente trabalho com o estudo de Tosh e colaboradores (2006) também não puderam ser feitas.

Para o gene *MICB*, é difícil elucidar o significado desses resultados, principalmente porque diferentes nomenclaturas são adotadas, juntamente com novas técnicas utilizadas atualmente em comparação com estudos anteriores.

Em um estudo de associação entre *MICB* e a Doença de Behçet, não foram encontradas diferenças significativas das freqüências dos alelos *MICB* entre pacientes e controles, um dado não esperado devido à proximidade entre os locos *MICA* e *MICB* (HUGHES *et al.,* 2005). Esses resultados sugerem que enquanto *MICB* não influencia no desenvolvimento de BD, o polimorfismo no gene *MICA* pode ser patogênico (HUGHES *et al.,* 2005), e a mesma interpretação pode ser feita para os dados obtidos no presente trabalho, uma vez que foi encontrada uma diferença significativa da freqüência de um alelo *MICA* entre pacientes e controles, como descrito posteriormente, e nenhuma associação entre *MICB* e ARE.

No trabalho de Ahmad e colaboradores (2002) foram verificados 20 haplótipos *MICA_MICB* com freqüência superior a 1% , enquanto foram obsdervados 27 haplótipos *MICA_MICB* nos indivíduos pacientes e 25 nos controles do presente estudo. Enquanto a associação entre HLA-B e *MICA* foi muito forte, o valor de D'

para o desequilíbrio entre *MICA_MICB* foi muito menor do que o esperado, considerando-se a proximidade física entre esses genes (86,1kb) em vários trabalhos (AHMAD *et al.,* 2002). Esse fato é consistente com um hotspot de recombinação entre *MICA* e *MICB*, embora isso possa ser parcialmente devido ao fato de um número relativamente pequeno dos alelos *MICB* terem sido estudados (AHMAD *et al.,* 2002). No presente trabalho, dos 36 haplótipos verificados nos pacientes e 31 nos controles foram encontrados 15 haplótipos em desequilíbrio de ligação com valor de D' acima de 0,5, dentro de cada grupo.

Em contraste com o desequilíbrio de ligação de HLA-B e *MICA,* a medida do desequilíbrio de ligação entre *MICA* e *MICB* variou amplamente de acordo com o haplótipo e foi freqüentemente mais fraco (AHMAD *et al.,* 2002). Não foi verificada associação de nenhum haplótipo *MICA_MICB* com as doenças inflamatórias estudada (AHMAD *et al.,* 2002).

Ao contrário do que foi descrito no trabalho de Ahmad e colaboradores (2002), o número de haplótipos encontrados nos quais os alelos estão em desequilíbrio de ligação não foi tão baixo no presente estudo. Comparando-se com o trabalho do Ribas (2007), dos 63 haplótipos *HLA-B* e *MICA* observados, 25, com freqüência superior a 1%, apresentam os alelos em desequilíbrio de ligação, representando cerca de um terço dos haplótipos encontrados. No presente estudo, dos aproximadamente 35 haplótipos observados em cada amostra, mais da metade possuem alelos em desequilíbrio de ligação com freqüência superior a 1%, e os valores de D' considerados foram acima de 0,5 (ou abaixo de –0,5), sendo a maioria muito próxima de 1,0 ou –1,0. Isso significa que dentre os alelos *MICA* e *MICB* que apareceram nos indivíduos estudados, muitos estão em forte desequilíbrio de ligação.

No presente trabalho, alelos *MICA*005* e *MICB*00201*; *MICA*01201* e *MICB*007; MICA*015* e *MICB*011; MICA*024* e *MICB*00503; MICA*030* e *MICB*019; MICA*052* e *MICB*001; MICA*052* e *MICB*011* não estão em associação nos controles como estão nos pacientes, possivelmente porque as freqüências desses haplótipos são baixas, mas as diferenças entre os grupos não são estatisticamente significativas (p = 0,9704). Os desequilíbrios de ligação encontrados

para essas associações, apesar de significativos, podem não ser reais pelo fato da freqüência em que esses haplótipos foram encontrados ser muito baixa (0,4%).

Alguns alelos foram encontrados em desequilíbrio de ligação em um grupo amostral e não no outro. Entretanto, essas situações ocorreram apenas quando o número de indivíduos que apresentam esses haplótipos foi pequeno no grupo em que a associação não foi significativa (*MICA*027* e *MICB*019*; *MICA*006* e *MICB*001*). Se o *n* amostral fosse aumentado, possivelmente essas diferenças não ocorreriam. Como o valor de *p* do desequilíbrio de ligação entre *MICA*006* e *MICB*001* foi próximo a 0,05 nos controles, é possível que se aumentando o *n* amostral, esse desvio se pronuncie, equivalendo-se ao observado na amostra paciente. Portanto, para esse haplótipo, o desequilíbrio entre os alelos pode ser real.

Os haplótipos *MICA*009_MICB*008* e *MICA*011_MICB*00503* foram encontrados mais freqüentemente entre os indivíduos pacientes que nos controles, sendo o *p* (0,07> p > 0,06) próximo ao valor de significância dos dados.

Já a situação inversa ocorreu com os haplótipos *MICA*009_MICB*00503* (*p* ~ 0,08)*; MICA*009_MICB*003* (*p* ~ 0,09) e *MICA*001_MICB*00503* (*p* = 0,0571), mais freqüentes nos controles que nos pacientes.

Nas condições em que o experimento foi realizado experimento foi realizado, não é possível rejeitar H_0 (não há diferença das freqüências haplotípicas *MICA_MICB* entre pacientes e controles), porém, observa-se uma tendência para que exista diferença significativa entre os grupos. O tamanho das amostras estudadas no presente trabalho pode não ter sido grande suficientemente para que os haplótipos fossem encontrados em freqüências semelhantes nos dois grupos, porém, essa diferença poderia também ser exacerbada com o aumento do número amostral, obtendo um valor de *p* significativo.

A freqüência maior do haplótipo *MICA*011_MICB*00503* nos pacientes e do haplótipo *MICA*001_MICB*00503* nos controles é explicada pela maior freqüência dos alelos *MICA* desses haplótipos nesses mesmos grupos. O alelo *MICB*00503* foi muito freqüente em ambas as amostras, indicando que a sua presença não tem significado de proteção ou de susceptibilidade ao ARE, sendo a diferença desses haplótipos devida ao gene *MICA* e não ao *MICB.*

O alelo *MICB*003* foi mais observado nos controles que nos pacientes, não significativamente, porém próximo ao limite de confiança, e, uma vez que *MICA*009* apresentou freqüências muito similares nos dois grupos amostrais, pode-se concluir que a maior freqüência do haplótipo *MICA*009_MICB*003* nos controles é devida ao alelo do gene *MICB*.

A freqüência do alelo *MICA*009* praticamente não foi diferente nos dois grupos, assim como a dos alelos *MICB*008* e *MICB*00503*. Entretanto, os haplótipos envolvendo esse alelo *MICA* com os dois alelos *MICB* foram mais freqüentes nos controles ou nos pacientes, como descrito acima. Mesmo essas diferenças não sendo significativas, é possível que indivíduos que tenham o haplótipo *MICA*009_MICB*008* tenham mais propensão a sofrerem ARE que indivíduos com o haplótipo *MICA*009_MICB*00503*, esses tendo uma proteção mais aguçada que indivíduos com outros haplótipos.

Apenas o haplótipo *MICA*004_MICB*007* apresentou freqüências diferentes entre os grupos amostrais, com significância estatística. Esse dado apresenta incoerência com o esperado, uma vez que o alelo *MICA*004* é mais freqüente em mulheres do grupo Controle que em mulheres da amostra Paciente, quando seus respectivos parceiros apresentam qualquer outro alelo *MICA*. Além disso, o alelo *MICB*007* é raro nas duas amostras, com freqüências de 2,1% na amostra Paciente e 1,5% na amostra Controle. Possivelmente a baixa freqüência desse alelo, e a relativa alta freqüência do alelo *MICA*004*, seja a explicação para a diferença estatística da freqüência desse haplótipo. Como poucos indivíduos possuem o alelo *MICB*007*, e pelo fato desse alelo estar fortemente em desequilíbrio com o alelo *MICA*004*, outras associações de *MICA* com *MICB*007* são raras. Porém, essas associações foram encontradas apenas na amostra Paciente, o que fez com que todos os indivíduos da amostra Controle que apresentam o alelo *MICB*007* possuam o alelo *MICA*004* associado, e apenas alguns da amostra Paciente apresentam esse haplótipo. Um aumento do *n* amostral poderia eliminar as diferenças encontradas, uma vez que o valor de *p* encontrado foi pouco menor que 0,05.

As duas amostras desse estudo estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, o que indica que não há fatores evolutivos atuando significativamente nos locos estudados. A heterozigosidade observada em ambos os locos analisados foi maior

que a esperada porém, esses valores não foram significativos. Oito alelos *MICA* foram encontrados em homozigose nos pacientes e cinco nos controles, e os oito alelos *MICB* foram encontrados em homozigose nas duas amostras. Não houve diferença estatística significativa entre as amostras para ambos os locos.

Na amostra Controle, foi encontrada uma menor percentagem de homozigotos do gene *MICB* que a esperada e que a encontrada entre os pacientes. Já a amostra Paciente apresentou uma maior freqüência de homozigotos do que a esperada ao acaso e do que a encontrada na amostra Controle. Entretanto, as diferenças entre pacientes e controles em relação às freqüências de homozigotos não foram significativas. Um aumento no tamanho das duas amostras poderia eliminar esse desvio, ou poderia intensificá-lo, sendo então necessária uma maior discussão sobre os genótipos homozigotos para o gene *MICB* em associação com o ARE.

Foi avaliado se existe diferença entre os casais das amostras Paciente e Controle quanto a presença de alelos em homozigose em um pelo menos um indivíduo do casal, mas isso não foi observado para nenhum dos dois genes estudados, sendo o valor de *p* maior que 0,5 para todos os alelos que apareceram em homozigose, com exceção do alelo *MICA*004*, cujo valor de *p* foi maior que 0,2.

Apesar da heterozigosidade não ter sido diferente da esperada ao acaso para ambos os locos, o gene *MICA* apresentou um valor de *p* (p = 0,0709) muito próximo ao limite de 0,05, o qual é considerado significativo. Com o aumento da amostra controle, esse desvio pode se tornar menor (aumentaria o valor de *p*), indicando que não existe tendência em haver mais heterozigotos na amostra que o esperado ao acaso. Entretanto, o aumento do número de indivíduos dessa amostra poderia confirmar a existência de uma heterozigosidade aumentada no grupo Controle do que a esperada ao acaso, fato que ocorre para os genes clássicos *HLA.* Para os pacientes, o valor de *p* foi acima de 0,8, indicando que o número de indivíduos homozigotos e heterozigotos está de acordo com o esperado ao acaso, mesmo que o tamanho da amostra fosse aumentado. Caso a heterozigosidade de *MICA* realmente seja maior que a esperada, ela ocorreu apenas entre os indivíduos controles desse estudo, podendo ser um indício de que entre os pacientes há um maior número de indivíduos homozigotos que os controles, suportando a hipótese de

que a incompatibilidade do gene *MICA* entre os parceiros seja importante para o processo reprodutivo.

Ao contrário do que foi visto no presente trabalho, no estudo de Ribas (2007) a heterozigosidade observada para os genes *MICA* e *HLA-B* foi um pouco inferior à esperada, apesar de não ter sido significativo. Pelo fato do gene *HLA-B* apresentar uma heterozigosidade maior que a esperada em vários estudos (MEYER e THOMSON, 2001), o que indica a atuação da seleção natural balanceadora nesse gene, é possível que o desvio encontrado na população estudada no trabalho de Ribas (2007) seja diferente do que normalmente acontece em relação à heterozigosidade dos dois genes, uma vez que existem evidências de que a pressão seletiva está induzindo a diversidade alélica também nos genes *MICA* e *MICB* (STEPHENS, 2001).

A evolução no *MHC* não é neutra, e sim esse complexo está sob influência da seleção natural, possivelmente seleção balanceadora, que mantém a variação dos genes do *MHC*, fundamental para a população humana na apresentação de antígenos para as células do sistema imune (MEYER e THOMSON, 2001). Há evidências de que os produtos de alguns genes não clássicos, como *HLA-G, HLA-E,* interagem e inibem células NK, promovendo uma resposta inata a certas infecções (MEYER e THOMSON, 2001). A função distinta dos genes não clássicos parece favorecer que eles estejam sob diferentes regimes de seleção dos que atuam nos genes clássicos (MEYER e THOMSON, 2001), portanto, os genes *MICA* e *MICB*, os quais evoluíram para uma função diferente, porém relacionada aos genes *MHC* de classe I (BAHRAM *et al.*, 1994; BAHRAM, 2000), podem estar sob influência de outros tipos de seleção natural, ou ainda, podem não estar sofrendo interferência dos fatores evolutivos. Sendo essa última hipótese verdadeira, um aumento de indivíduos nas amostras estudadas no presente trabalho acabaria com o desvio da heterozigosidade de *MICA* encontrada na amostra Controle, confirmando que o número de heterozigotos observados não é maior que o esperado ao acaso, estando a população em equilíbrio de H.W. Como descrito anteriormente há evidências de que os genes *MICA* e *MICB* estão sob influência da seleção natural (STEPHENS, 2001).

A incompatibilidade HLA, principalmente HLA-G, entre o casal é um fator favorável ao sucesso gestacional. Já foi observado que a incompatibilidade de HLA-G entre os indivíduos de um casal está relacionado com a presença de anticorpos bloqueadores que se ligam a antígenos placentários, impedindo que o feto seja reconhecido como um enxerto alogênico pelo sistema imune materno (KRIPOV *et al*., 1992 apud CHONG; MATZNER e CHING, 1995). Em alguns estudos, casais com história de aborto de repetição apresentam reação cruzada negativa com o sangue do esposo, não havendo os anticorpos bloqueadores na mãe (KRIPOV *et al*., 1992 apud CHONG; MATZNER e CHING, 1995). No presente estudo, entretanto, não houve diferença estatística significativa entre os casais pacientes e controles que compartilham os mesmos alelos e/ou haplótipos (S♀ S♂), indicando que para os genes *MICA* e *MICB* a incompatibilidade entre os parceiros não é essencial ao processo reprodutivo.

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 trabalho de Panigrahi e colaboradores (2007) foi analisada a relevância clínica pós-transplante da presença de anticorpos anti-MICA em resposta ao transplante renal de doadores relacionados. 16% dos pacientes desenvolveram anticorpos anti MICA*001, MICA*002, MICA*004, MICA*008, ou MICA*009, e a sobrevivência do enxerto foi comprometida significativamente quando comparada com o grupo negativo para anticorpos anti-MICA p = 0.001 (PANIGRAHI *et al.,* 2007). Apesar de não ter sido observada significância da incompatibilidade MICA e MICB entre os parceiros do presente estudo, estudos de prova-cruzada de casais com ARE podem trazer dados importantes à área da Imunologia da Reprodução, uma vez que a presença de anticorpos anti-MICA e, supostamente, anti-MICB pode desencadear rejeição a aloenxertos.

Os receptores das células uNK reconhecem antígenos leucocitários, liberados pelo trofoblasto, clássicos, como HLA-C, e não clássicos, como HLA-E e HLA-G, que podem prevenir o ataque fetal pelo sistema imune materno e também regular a produção de citocinas por células NK. A presença de supernadantes da molécula HLA-G solúvel, cuja expressão na interface materno-fetal modula as células NK na

produção de citocinas, tem sido associada às maiores taxas de implantação de embriões após uma FIV (WARNER *et al.,* 2004) e as interações entre receptores KIR das uNK maternas com HLA-C também podem influenciar o sucesso reprodutivo (PARHAM, 2004). Além disso, as uNK possuem um fenótipo único e características funcionais que diferem das suas contrapartes de células NK do sangue periférico (PAHRAM, 2004). Qualquer disfunção das células uNK pode representar uma falha no processo de implantação e na reprodução (PORCU-BUISSON *et al.,* 2007).

Foi testada a significância das diferenças encontradas entre os casais das amostras Paciente e Controle para as freqüências alélicas dos dois genes, freqüências haplotípicas e freqüência de homozigose. Os casais foram classificados como S♀S♂, S♀N♂, N♀S♂ e N♀N♂, como descrito anteriormente. Para todos os parâmetros avaliados, as classes de casais encontradas nas amostras de pacientes e de controles apresentaram as freqüências alélicas, haplotípicas e de homozigose semelhantes, sem diferença estatística significativa dos dados, com exceção do alelo *MICA*004*.

Nos casais S♀N♂, o alelo *MICA*004* foi mais freqüente entre os controles que os pacientes. Em outras palavras, esse alelo esteve presente nas mulheres do grupo Controle significativamente mais vezes que nas mulheres da amostra Paciente, porém nenhum alelo esteve mais presente nos parceiros dessas mulheres em nenhuma das amostras, ou seja, não há diferença estatística significativa entre pacientes e controles dos grupos N ♀ S ♂. A partir desse fato pode-se inferir que não existe uma combinação específica do alelo *MICA*004* com outro alelo *MICA* que promova um efeito protetor ao sucesso gestacional. Portanto, quando as mulheres possuem o alelo *MICA*004* e os seus respectivos parceiros apresentam qualquer outro alelo *MICA*, a não ser o próprio *MICA*004,* a gestação tem 3,2 vezes mais chances de ser bem sucedida do que quando as mulheres não possuem esse alelo.

MICA e MICB são expressos em várias células tumorais epiteliais e são reconhecidas por células NK e $T_{\gamma\delta}$ (GROH *et al.,* 1999), sugerindo que essas moléculas possuem um importante papel na imunidade anti-tumoral (AIDA *et al.,* 2002).

A expressão de diferentes ligantes de NKG2D é semelhante e, em células adultas é normalmente, ausente ou presente em baixos níveis, entretanto, em

condições patológicas a expressão desses ligantes é hiperregulada (exemplificado pelos padrões de expressão de MICA, MICB em humanos e Rae1 em camundongos) (RAULET, 2005). A expressão de MICA e MICB é hiperregulada por muitas linhagens de células tumorais e tumores primários de origem epitelial (GROH et al., 1999), e essa hiperregulação parece ser resultado da ativação de elementos de transcrição de choque-térmico, nos promotores desses genes, um evento que é acompanhado pela transformação. Uma expressão ectópica de REA-1 ou H60 em células tumorais resulta em uma potente rejeição aos tumores por células NK,o que sugere um papel potencial para a ativação de células efetoras citolíticas mediante NKG2D, na imunidade tumoral.

As moléculas sMIC são um dos vários ligantes para o receptor ativador NKG2D, e a ligação entre eles parece liberar tanto sinais ativadores quanto inibidores ao sistema imune (PORCU-BUISSON *et al.,* 2007).

Os ligantes solúveis de NKG2D são sinais co-estimulatórios para a atividade citotóxica das células NK, proliferação e produção de citocinas (RAULET *et al.,* 2003).

As moléculas Rae1 em camundongos, apesar de não apresentar homologia por identidade com MICs, são muito semelhantes em expressão e funcionamento. Rae1 é amplamente expresso pelos embriões, especialmente no cérebro, no início da gravidez, e a partir do décimo oitavo dia, ele é hiporregulado, permanecendo assim nos tecidos adultos normais (NOMURA *et al.,* 1996).

A ligação de moléculas MIC com seu receptor NKG2D ativa as células NK e aumenta a especificidade antigênica CTL na imunidade anti-tumoral. MIC-NKG2D foi proposto como um sistema que participa na vigilância imune de tumores epiteliais. Paradoxicalmente estudos sugerem que os tumores podem escapar da imunidade mediada por MIC-NKG2D pela indução de liberação de moléculas MIC impedindo o funcionamento das células efetoras. O trabalho de Wu e colaboradores (2004) foi o primeiro a demonstrar uma evidência de uma correlação significativa entre a liberação de MICs e uma deficiência no funcionamento das células NK em câncer de próstata.

Alguns estudos demonstraram que a imunidade mediada por MIC-NKG2D é impedida em pacientes com cânceres progressivos de mama, intestino, ovário ou

cólon (GROH *et al.,* 2002; DOUBROVINA *et al.,* 2003). Na maioria dos casos, tumores malignos liberam MIC e subseqüentemente induzem a hiporregulação da expressão de NKG2D de superfície em células NK e/ou CTLs. Essa deficiência na função da célula efetora mediada por NKG2D tem sido proposta como um dos mecanismos pelos quais as células tumorais podem escapar da vigilância imune de células NK e CTL, progredindo, dessa forma (GROH *et al.,* 2002; DOUBROVINA *et al.,* 2003).

Existem estudos que mostram que a expressão de MIC foi prevalente em carcinomas de próstata, sugerindo um papel para a imunidade mediada por MIC-NKG2D em cânceres de próstata. Entretanto, MIC ligada à membrana foi predominante apenas em cânceres de baixo grau, e níveis significantes de sMIC no soro foram detectados em cânceres de mais alto grau, indicando que tumores de próstata neutralizam a imunidade de NKG2D estimulada por MIC, via liberação de sMIC (WU *et al.,* 2004). Altos níveis de sMIC foram encontrados no soro de pacientes com metástase óssea (WU *et al.,* 2004)

Wu e colaboradores demonstraram vários efeitos negativos resultantes da liberação de MIC. Um dos efeitos foi a perda da localização de MIC em sua superfície predominante, em carcinomas de próstata de alto-grau (WU *et al.,* 2004).

A presença da molécula MICA na membrana basolateral depende do motivo em tandem diidrofóbico dos aminoácidos Leu-Val e Val-Leu (éxon 6, posições 2-3 e 7-8) na cauda citoplasmatica, que é ausente em alelos *A5.1* (FRIGOUL e LEFRANC, 2005), sendo *MICA*008* e *MICA*00802* os únicos alelos A5.1 encontrados no presente estudo. A proteína MICA de 309 aminoácidos ao invés de 361 (proteínas A5) e sem a região intracitoplasmática, não é fixada à membrana basolateral, mas sim é transportada para a superfície apical da célula (SUEMIZU *et al.,* 2002), entretanto essas moléculas são funcionais, principalmente porque o alelo *MICA*008* é o alelo mais freqüente em várias populações. Portanto, a perda da localização de MIC em sua superfície predominante devido à liberação de sMIC, não significa que as moléculas MIC passam a ser expressas na membrana apical, uma vez que existem alelos funcionais com essa característica.

Outro efeito negativo da liberação de sMIC em câncer de próstata foi o impedimento da expressão de receptores ativadores NKG2D na superfície das células NK e células T CD8+ (WU *et al.,* 2004).

A partir dessa possibilidade de escape dos tumores ao sistema imune, foi sugerido que essa hiporregulação de NKG2D, através da internalização desses receptores após liberação de sMIC placentário no soro, seja um mecanismo de escape que pode hiporregular as respostas imunes maternas durante a gravidez (MINCHEVA-NILSSON *et al.,* 2006). Além disso, MIC tem sido associado ao estado de imunotolerância durante a gravidez (PORCU-BUISSON *et al.,* 2007).

Foi testada a presença de sMIC em mulheres férteis multíparas, porém níveis de sMIC não foram detectados, sugerindo que em contraste com mulheres inférteis ou mulheres grávidas, com gravidez normal, altos níveis de sMIC não são características comuns de mulheres férteis não grávidas (MINCHEVA-NILSSON *et al.,* 2006; PORCU-BUISSON *et al.,* 2007).

Um trabalho avaliou que a detecção de níveis de sMIC no soro de mulheres que passarão por uma FIV é um bom prognóstico do resultado da FIV (PORCU-BUISSON *et al.,* 2007). Os níveis de sMIC no soro acima de 2,45ng/ml são preditivos de altas taxas das falhas na implantação e os níveis de sMIC no soro maiores que 6ng/ml nunca resultou em uma gravidez a termo, enquanto níveis maiores que 28ng/ml foram sempre associados com a falha na FIV (PORCU-BUISSON *et al.,* 2007).

A liberação de sMIC pela membrana de céluLas que estão exprssando MIC parece envolver clivagens por mataloproteinases (WALDHAUER e STEINLE, 2006) e uma atividade da metaloproteinase alterada tem sido associada a falhas na implantação (SHIBAHARA *et al.,* 2005).

O fato de sMIC ser também um marcador de processos auto e aloimunes juntamente com os dados obtidos por Porcu-Buisson e colaboradores (2007) e Mincheva-Nilsson (2006), sugerem que sMIC pode ser um marcador de uma potencial rejeição do embrião, auto ou aloreativo, pela mãe.

O alelo *MICA*004*, encontrado com maior freqüência em mulheres controles que mulheres pacientes no presente estudo, pode indicar que o produto protéico desse alelo seja mais eficiente na liberação de moléculas sMIC pela placenta que

outros alelos. Supostamente, a placenta pode liberar moléculas MIC que impeçam as células NK de destruírem o trofoblasto invasor, sendo a molécula do alelo *MICA*004* mais eficiente nesse papel.

A hiporregulação de NKG2D em células uNK pode evitar a lise das células trofoblásticas, que, portanto invadem a decídua promovendo a implantação do embrião satisfatoriamente. Mas o estímulo de uma atividade inflamatória no início da gravidez também é importante, podendo outros alelos *MICA* e vários outros fatores imunológicos estarem envolvidos.

Como a combinação S♀N♂ foi significativa para esse alelo e não a combinação S♀S♂, possivelmente a presença do alelo *MICA*004* no pai, diminua esse efeito protetor observado para mães positivas e pais negativos para esse alelo. Isso pode ser explicado pelo fato de que as células que liberam sMIC tenham que ser heterozigotas para o gene *MICA* para surtirem o efeito de proteção por esse mecanismo, sendo que as células homozigotas para *MICA*004* não seriam tão eficientes, sendo necessárias também moléculas MICA ancoradas à membrana para induzir um processo inflamatório essencial para a implantação e para o início da gravidez.

As associações entre *MICA**004 e o ARE encontradas no presente trabalho podem também ser devidas a outros genes ou regiões que estão em desequilíbrio de ligação com esse alelo, como genes *HLA* de classe I, que já foram estudados em associação a ARE. Para os genes *HLA-A* e *HLA-B*, o último localizado muito próximo aos genes *MICA* e *MICB*, foi sugerido que na presença da molécula HLA-A2 a distribuição dos antígenos dos locos *HLA-A* e *HLA-B* pode ser diferente entre casais férteis quando comparados aos casais com ARE (KOMLOS, KLEIN e KOROSTISHEVSKY, 2007).

Estudos sobre o mecanismo de liberação das moléculas MIC solúveis podem elucidar se existem diferenças marcantes entre as diferentes proteínas MICA e MICB, quanto à liberação de sMIC pelas células.

Dos estudos de associação entre genes relacionados ao sistema imune e ARE, o LIGH já analisou a associação dos genes HLA-G, KIR, TNF-α, INF-γ, IL-10, TGFB1, IL-6, HLA de classe II e agora *MICA* e *MICB*.

Os principais resultados encontrados foram que os alelos HLA-G do agrupamento de alelos com substituições nucleotídicas não sinônimas (HLA-G*010401, G*010403, G*0103 e G*0105N), e a variante del (deleção de 14pb no exon 8 de HLA-G) foram encontrados em associação positiva com ARE. Os mRNA de alguns alelos sofrem splicing alternativos gerando variantes que codificam moléculas solúveis. Essas moléculas se interagem com receptores KIR de células NK impedindo a secreção de determinadas citocinas pró-inflamatórias por essas células, o que evita a lise das células trofoblásticas, que, portanto invadem a decídua promovendo a implantação do embrião.

Alelos com associação negativa a ARE foram alelos do grupo G*0101A e a variante *14* (ausência da deleção de 14pb no éxon 8) de *HLA-G*. Esses alelos estariam conferindo função protetora ao feto contra a rejeição, provavelmente mediante receptores inibidores de células NK.

O gene KIR2DS1, cujo produto protéico é relacionado à ativação de células NK, parece ser significativamente mais expresso em pacientes com ARE que em casais com gravidez normal. Receptores ativadores em células NK fetais poderiam desencadear uma sinalização positiva levando à produção de citocinas pró-inflamatórias por essas células e desencadeando uma resposta Th1 excessiva, gerando um processo inflamatório que causaria abortamento do embrião.

Diferentemente de ter sido demonstrado que determinados alelos HLA-G seriam fatores genéticos predisponentes ao ARE, assim como o gene KIR2DS1, não foram encontradas associações positivas entre variantes alélicas e genotípicas das citocinas pró-inflamatórias TNF-α e INF-γ e ARE. Porém pode haver variação nos perfis de expressão entre as populações de grupos étnicos diferentes, e um estudo contendo indivíduos desses diferentes grupos pode tender a nivelar associações reais.

Baixos níveis de IL-10 e altos de TGF- β1 poderiam estar relacionados ao ARE. Entretanto, diferentes alelos das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGFB1 também não foram relacionados à predisposição ao ARE. Possivelmente a variação genética desses genes não reflete os seus padrões de expressão, sendo as respostas celulares dos seus produtos dependentes da atividade de vários co-fatores ou ainda essas citocinas teriam papéis redundantes com outras citocinas. A

citocina IL-6, apesar de pró-inflamatória, desempenha papéis anti-inflamatórios e é bastante importante nos processos de implantação do embrião na decídua.

A variante alélica C na posição -174 do gene da IL-6 foi encontrada em associação positiva com ARE e o genótipo CC estaria relacionado à baixa produção de IL-6, prejudicando o processo de implantação do embrião.

Detritos do trofoblasto podem ser recolhidos por macrófagos em nível sistêmico materno, e peptídeos fetais de origem paterna poderiam estar sendo apresentados por moléculas HLA de classe II por células apresentadoras de antígenos a linfócitos T, desencadeando uma reação alogênica contra o feto. Foi identificada uma associação positiva entre HLA-DRB1*1104 e o ARE, o que sugere que este alelo é um fator genético de predisposição ou, que está em desequilíbrio de ligação com o verdadeiro alelo de suscetibilidade. E foi detectada uma associação negativa com o genótipo HLA-DQB1*02 /HLA-DQB1*03 e o ARE, o que sugere um efeito protetor deste genótipo.

O papel biológico das moléculas MICA e MICB ainda não nos permite compreender totalmente o significado do polimorfismo encontrado nesses locos e a associação com o ARE, sendo possível apenas se fazer inferências dos possíveis efeitos que as diferenças de freqüências ente os grupos Controle e Paciente têm nessa patologia.

As discrepâncias entre diferentes grupos étnicos podem ser atribuídas à heterogeneidade genética, ao efeito da recombinação da estrutura haplotípica ancestral e a diferenças nas freqüências alélicas entre as populações. Portanto, as associações encontradas no presente estudo podem não ser verificadas em estudos com outras populações e as que não foram identificadas no presente, podem ser observadas em outros trabalhos. Portanto, o enfoque na associação entre o polimorfismo dos genes *MICA* e *MICB* deve ser continuado em futuros trabalhos, como promissores na identificação e desenvolvimento de possíveis tratamentos para a patologia do ARE.

A diminuta verificação de associação do polimorfismo de MIC com susceptibilidade ao ARE não necessariamente exclui a interação MICA/B – NKG2D de um envolvimento nessa patogênese, sendo importante verificar fatores que regulam a expressão NKG2D ou que alteram a sua ligação com as moléculas MIC.

Existem terapias de aloimunização com linfócitos paternos HLA como uma terapia efetiva para alguns casos de ARE, sendo verificada a eficácia dessas terapias em alguns trabalhos (KANO *et al.,* 2007)

Estudos com MIC e IL-15, das vias MIC-NKG2D, da funcionalidade do polimorfismo de *MICA* e *MICB* enfocando suas moléculas solúveis e o mecanismo de escape ao sistema imune pelas células que as liberam, entre outros, são promissores no campo da reprodução envolvendo esses genes, e podem, conjuntamente com os demais trabalhos da área, trazerem aplicações médicas futuras para o prognóstico e tratamento com imunoterapias da patologia do ARE.

Um fator individualmente não é essencial para o processo reprodutivo. A complexidade da reprodução é muito grande, sendo um processo multifatorial que depende de causas endógenas e exógenas. Um único gene não é essencial e nem é suficiente para o processo da reprodução, tendo uma participação pouco intensa, porém, isso não significa que esse gene específico não seja importante para o sucesso reprodutivo. Pelo contrário, cada gene descoberto na participação da gravidez é mais uma contribuição para a Ciência, para que cada vez mais seja possível desenvolver terapias e medicamentos, que interfiram nas diversas vias da reprodução, permitindo a todos os casais que desejam gerar filhos, ter a possibilidade de os terem.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo verificou a existência de associação entre o polimorfismo dos genes *MICA* e *MICB* com o abortamento recorrente espontâneo, em casais do sul do Brasil.

O alelo *MICA*008* foi o alelo mais freqüentemente encontrado nas duas amostras estudadas (Paciente e Controle), como descrito para várias populações.

O alelo *MICB*00503* foi o alelo mais freqüente em ambos os grupos, não sendo descrito com tanta freqüência em outras populações, seguido pelo alelo *MICB*00201*, que é um dos alelos mais freqüentes encontrados em algumas populações européias.

Dos 36 e 31 haplótipos encontrados nas amostras Paciente e Controle, respectivamente, foram observados 15 haplótipos *MICA_MICB* em desequilíbrio de ligação, com freqüência superior a 1%, cada um, nas duas amostras estudadas.

Os alelos *MICA*001* e *MICB*003* parecem ter uma tendência em conferir um efeito protetor, em cerca de 2 vezes, em pessoas que apresentam um desses alelos, porém, pelo tamanho das amostras Paciente e Controle e as condições nas quais foi realizado esse estudo, foi rejeitada a hipótese de associação desses alelos com o sucesso reprodutivo.

O alelo *MICA*011* demonstrou um efeito contrário, sendo mais presente em pacientes que em controles, porém, o valor de *p* também não foi significativo para essa associação, estando muito próximo do limite de confiança adotado ($p < 0,05$ é significativo). Portanto, a hipótese de que a presença desse alelo poderia conferir susceptibilidade ao ARE foi descartada devido às limitações encontradas para esse trabalho, principalmente, com relação ao tamanho amostral de 70 casais pacientes e 65 casais controles.

Os haplótipos *MICA*004_MICB*007, MICA*011_MICB*00503* e *MICA*009_MICB*008* foram encontrados mais freqüentemente em indivíduos pacientes que em indivíduos controles, e a situação inversa foi observada para os haplótipos *MICA*009_MICB*00503*, *MICA*009_MICB*003* e *MICA*001_MICB*00503*, porém, apesar dos valores de *p* terem sido muito próximos a 0,05, não é possível rejeitar a hipótese da nulidade, a qual diz que as diferenças

das freqüências haplotípicas encontradas entre pacientes e controles são devidas ao acaso, pelos mesmos motivos citados acima. Apenas para o haplótipo *MICA*004_MICB*007* a diferença foi significativa, entretanto, pelo fato do alelo *MICB*007* ser bastante raro nas duas amostras, esse resultado pode ter sido tendencioso.

Foi encontrada uma associação significativa do alelo *MICA*004* e o ARE, sendo que os casais cujas mulheres portam esse alelo e seus respectivos parceiros não, recebem um efeito protetor de *MICA*004* contra o ARE em cerca de 3 vezes mais que casais contendo outras combinações alélicas *MICA.*

O alelo *MICA*004* pode ter um produto funcional MICA*004 que seja de mais fácil liberação pelas células trofoblásticas que outras moléculas MICA, fazendo com que moléculas sMICA sejam liberadas e hipo-regulem o receptor NKG2D em células T $CD8^+$, células $T_{\gamma\delta}$ e em células NK, como ocorre em células tumorais que escapam do sistema imune.

Os genes *MIC* são genes candidatos atrativos de associação com aborto recorrente de repetição devido a sua função, posição na região *HLA* e expressão no epitélio decidual. Além disso, esses genes estão envolvidos no mecanismo de escape das células tumorais ao sistema imune mediado pela interação NKG2D-MIC, mecanismo considerado semelhante a um dos que ocorre na aceitação do alo-enxerto fetal pelo sistema imune materno.

O presente trabalho revelou que outras pesquisas que investiguem a associação entre o polimorfismo genético e funcional dos genes *MICA* e *MICB* terão grande relevância na descoberta dos mecanismos pelos quais a reprodução pode ser influenciada pelos produtos desses genes.

A manipulação da via MIC-NKG2D pode se tornar um alvo para o desenvolvimento de imunoterapias para o sucesso gestacional.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia Celular e Molecular.** REALI, C. [Trad] 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

AHMAD, T.; MARSHALL, S.E.; MULCAHY-HAWES, K.; ORCHARD, T.; CRAWSHAW, J.; ARMUZZI, A.; NEVILLE, M.; VAN HEEL, D.; 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, Copenhagen: **Tissue Antigens**, v. 60, p. 164-179, p. 2002.

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

ALAM, SM.; TRAVERS, P.J.; WUNG, J.L.; NASHOLDS, W.; REDPATH, S.; JAMESON, S.C.; GASCOIGNE, N.R. T cell receptor affinity and thymocyte positive selection. London: **Nature,** v. 381, p. 616-620, 1996.

ALBERTS, B.; JOHNOSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of The Cell.** 4.ed. USA: Garland Science, 2002.

Amroun H, Djoudi H, Busson M, Allat R, El Sherbini SM, Sloma I, Ramasawmy R, Brun M, Dulphy N, Krishnamoorthy R, Toubert A, Charron D, Abbadi MC, Tamouza R. Early-onset ankylosing spondylitis is associated with a functional MICA polymorphism. New York: **Human immunology**, v. 66, n.10, p.1057-1061, 2005.

ANDO, H.; MIZUKI, N.; OTA, M.; YAMAZAKI, M.; OHNO, S.; GOTO, K.; MIYATA, Y.; WAKISAKA, K.; BAHRAM, S.; INOKO, H. Allelic variants of the human *MHC* class I chain-related B gene (MICB). New York: **Immunogenetics,** v. 46, n.6, p. 499-508, 1997.

ANTHONY NOLAN RESEARCH INSTITUTE. **The Anthony Nolan Trust.** Disponível em: < http://www.anthonynolan.org.uk/HIG/lists/otherlist.html> Acesso em: 18 ago. 2007.

AYRES, M.; AYRES, M.JR; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A.S. Bioestat – Aplicações Estatísticas nas áreas das Ciências da Saúde. Belém, 2005.

BAEK, K.H.; CHOI, B.C.; LEE, J.H.; CHOI, H.K.; LEE, S.H.; KIM, J.W.; HILL, J.A.; CHUNG, H.M.; KO, J.J.; CHA, K.Y. Comparison of gene expression at the feto-maternal interface between normal and recurrent pregnancy loss patients. East Melbourne: **Reproduction, fertility, and development**, v.14, p. 235-240, 2002.

BAEK, K.H. Aberrant gene expression associated with recurrent pregnancy loss. Oxford: **Molecular Human Reproduction**, v.10, n. 5, p. 291-297, 2004.

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

BAHRAM, S.; SPIES, T. Nucleotide sequence of a human *MHC* class I MICB cDNA. New York: **Immunogenetics**, v. 43, p. 230, 1996.

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

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. Washington: **Science,** v. 285, p. 727-729, 1999.

BIASSONI, R.; CANTONI, C.; FALCO, M.; PENDE, D.; MILLO, R.; MORETTA, L.; BOTTINO, C.; MORETTA, A. Human natural killer cell activating receptors. Oxford: **Molecular Immunology,** v. 37, p. 1015-1024, 2000

BOTTINO, C.; CASTRICONI, R.; MORETTA, L.; MORETTA, A. Cellular ligands of activating NK receptors. Oxford: **Trends in Immunology,** v. 26, n.4, 2005.

BRAUD, V.M.; ALLAN, D.S.; O'CALLAGHAN, C.A.; SODERSTROM, K.; D'ANDREA, A. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. London: **Nature,** v. 391, p. 795-799,1998.

BULMER, J.N.; MORRISON, L.; LONGFELLOW, M.; RITSON, A.; PACE, D. Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies Oxford: **Human Reproduction** , v. 6, p.791–798, 1991.

CHONG, P.J.; MATZNER, W.L.; CHING, W.T.W. Immunology of Recurrent Spontaneous Abortion. New York: **THE FEMALE PATIENT**, v. 20, 1995.

CHOI, H.B.; HAN, H.; YOUN, J.I.; KIM, T.Y.; KIM, T.G. *MICA* 5.1 allele is a susceptibility marker for psoriasis in the Korean population. Copenhagen: **Tissue Antigens**, v. 56, p. 548-550, 2000.

CHOUDHURY, S.R.; KNAPP, L.A. Human reproductive failure II: Immunogenetic and interacting factors. Oxford: **Human Reproduction Update**, v.7, n.2, p. 135-160, 2001.

CHRISTIANSEN, O.B. A fresh look at the causes and treatments of recurrent miscarriage, especially its immunological aspects. Oxford: **Human Reproduction Update**, v. 2, n.4, p. 271-293, 1996.

CHRISTIANSEN, O.B.; NIELSEN, H.S.; KOLTE, A.M. Inflammation and miscarriage. Amsterdam: **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, v. 11, p. 302-308, 2006.

CLARK, D.A.; ARCK, P.C. JALALI, R.; MERALI, F.S.; MANUEL, J.; CHAOUAT, G. UNDERWOOD, J.L.; MOWBRAY, J.F. Psycho-neuro-cytokine/endocrine pathways in immunoregulation during pregnancy. New York: **American journal of reproductive immunology,** v. 35, n.4, p. 330-337, 1996

CLARK, D.A.; COULAM, C.B.; DAYA, S.; CHAOUAT, G. Unexplained sporadic and recurrent miscarriage in the new millennium: a critical analyses of immune mechanisms and treatmenst. Oxford: **Human Reproduction Update,** v.7, n.5, p. 501–511, 2001.

COLLINS, R.W.M.; STEPHENS, H.A.F.; CLARE, M.A.; VAUGHAN, R.W. High resolution molecular phototyping of MICA and MICB alleles using sequence specific primers. New York: **Humman Immunology,** v. 63, p. 783 – 794, 2002.

COULAM, C. B. Unexplained recurrent pregnancy loss: Epilogue. Hagerstown: **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 29, p. 999-1004, 1986.

COULAM, C.B.; CLARK, D.A.; BEER, A.E.; KUTTEH, W.H.; SILVER, R.; KWAK, J. Current clinical options for diagnosis and treatment of recurrent spontaneous abortion. New York: **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 38, p. 57-74, 1997.

COUMANS, A.B.C; HUIJGENS, P.C.; JAKOBS, C.; SCHATS, R.; VRIES, J.I.P; VAN PAMPUS, M.G.; DEKKER, G.A. Haemostatic and matabolic abnormalities in women with unexplained recurrent abortion. Oxford: **Human Reproduction**, v. 14, p. 211-214, 1999.

CRESSWELL, P.; Antigen presentation. Getting peptides into *MHC* class II molecules. Cambridge**: Current Biology**, v.4, n.6, p. 541-543, 1994.

DARMOCHWAL-KOLARZ, D.; LESZCZYNSKA-GORZELAK, B.; ROLINSKI, J.; OLESZCZUK, J. The immunophenotype of patients with recurrent pregnancy loss. Amsterdam: **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 103, p. 53-57, 2002.

DOSIOU, C.; GIUDICE, L.C. Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives. Baltimore: **Endocrine Reviews**, v. 26, p. 44-62, 2006.

DOUBROVINA, E.S.; DOUBROVIN, M.M.; VIDER, E.; SISSON, R.B.; O'REILLY, R.J.; DUPONT, B.; VYAS, Y.M. Evasion from NK cell immunity by MHC class I chain-related molecules expressing colon adenocarcinoma. Baltimore: **The Journal of immunology : official journal of the American Association of Immunologists**, v. 171, p. 6891-6899, 2003.

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

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

FENG, M.L.; GUO, X.J.; ZHANG, J.Y.; XIE, J.H.; CHEN, L.; LU, Q.; YANG, J.H.; JI, Y.; QIAN, K.C. Study on the haplotypes of *MICA* AND *MICB* microsatellite and *HLA-B* locus in the Guangzhou Han population. Copenhagen: **Tissue Antigens**, v. 64, p.281-285, 2440.

FISCHER, G.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, M.; ARGÜELLO, J.R.; COX, S.T.; McWHINNIE, A.; TRAVERS, P.J.; MADRIGAL, J.A. Three novel MICB alleles. Copenhagen: **Tissue Antigens**, v. 55, p. 166-170, 2000.

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**.** New York: **Immunogenetics**, v. 44, p. 351–357, 1996.

FODIL, N.; PELLET, P.; LALOUX, L.; HAUPTMANN, G.; THEODOROU, I.; BAHRAM, S. *MICA* haplotypic diversity. New York: **Immunogenetics,** v. 49, p. 557–560, 1999.

FRIGOUL, A.; LEFRANC, M.P. MICA: Standardized IMGT allele nomenclature, polymorphisms and diseases. Kerala: **Research Signpost: Recent Research Development in Human Genetics**, v. 3, p. 95-145, 2005.

FUKUI, A.; KWAK-KIM, J.; NTRIVALAS, E.; GILMAN-SACHS, A.; LEE, S.K.; BEAMAN, K. Intracellular cytokine expression of peripheral blood natural killer cell subsets in women with recurrent spontaneous abortions and implantation failures. New York: **Fertility and Sterility**, Epub ahead of print, 2007.

FUTUYMA, D. J. **Biologia Evolutiva**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética /CNPq, 1992.

GAMBELUNGHE, G.; FALORNI, A.; GHADERI, M.; LAURETI, S.; TORTOIOLI, C.; SANTEUSANIO, F.; BRUNETTI, P.; SANJEEVI, C.B. Microsatellite polymorphism of the *MHC* class I chain-related (MIC-A and MIC-B)genes marks the risk for autoimmune Addison's disease. Springfiel: **The journal of clinical endocrinology & metabolism**, v. 84, n.10, 1999.

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 population. New York: **Human Immunology**, v.67, p. 152-158, 2006.

GAMBELUNGHE, G.; BROZZETTI, A.L.; GHADERI, M.; TORTOIOLI, C.; FALORNI, A. MICA A8: a new allele within MHC class I chain-related A transmembrane region with eight GCT repeats. New York: **Human Immunology,** v. 67, n.12, p. 1005-1007, 2006.

GEARY, M.; RAFFERTY, G.; MURPHY, J.F. Comparison of liveborn and stillborn low birthweight babies and analysis of aetiological factors. Dublin: **Irish medical journal**, v. 90, n. 7, p.269-271, 1997.
GHADERI, M.; NIKITINA, Z.L.; WALLIN, K.; WIKLUND, F.; HALLMANS, G.; LENNER, P.; DILLNER, J.; SANJEEVI, C.B. Tumor necrosis factor A and *MHC* class I chain related gene A (*MIC*-A) polymorphisms in Swedish patients with cervical cancer. New York: **Human Immunology**, v. 62, p. 1153 – 1158, 2001.
GILES, R.W. Recurrent abortion caused by haemophilus influenzae with subsequent successful pregnancy. Lahore: **Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 23, p. 87, 2003.

GIACOMELLI, R.; CIPRIANI, P.; FULMINIS, A.; BARATTELLI, G.; MATUCCI-CERINIC, M.; D'ALÒ, S.; CIFONE, G.; TONIETTI, G. Circulating γ/δ T lymphocytes from systemic sclerosis (SSc) patients display a T helper (Th) 1 polarization. Oxford: **Clinical and experimental immunology**, v. 125, n. 2, p. 310-315, 2001.

GLAS, J.; WERNER, A.I.; BRÜNNLER, G.; WITTER, K.; SCHOLZ, S.; WEISS, E.H.; ALBERT, E.D. Linkage disequilibria between HLA-B, C1_4_1, MICA AND MICB. Copenhagen: **Tissue Antigens**, v.58, p. 411-418, 2001.

GODDIJN, M.; LESCHOT, N.J. Genetic aspects of miscarriage. London: **Bailliere's Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 14, p. 855-865, 2000.

GONZÁLEZ, S.; BRAUTBAR, C.; MARTÍNEZ-BORRA, J.; LÓPEZ-VAZQUEZ, A.; SEGAL, R.; BLANCO-GELAZ, M.A.; ENK, C.D.; SAFRIMAN, C.; LÓPEZ-LARREA, C. Polymorphism in MICA rather than HLA-B/C genes is associated with psoriatic arthritis in the Jewish population. New York: **Human immunology**, v. 62, n. 6, p. 632-638, 2001.

GONZÁLEZ, S.; RODRÍGUEZ-RODERO, S.; MARTÍNEZ-BORRA, J.; LÓPEZ-VÁSQUEZ, A.; RODRIGO, L.; LÓPEZ-LARREA, C. MICB typing by PCR amplification with sequence specific primers. New York: **Immunogenetics,** v. 54, p. 850-855, 2003.

GRIEBEL, C.P.; HALVORSEN, J.; GOLEMON, T.B.; DAY, A.A. Management of spontaneous abortion. Kansas: **American Family Physician**, v.72, n.7, p. 1243-1250, 2005.

GROH, V.; BAHRAM, S.; BAUER, S.; HERMAN, A.; BEAUCHAMP, M. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. Oxford: **Immunology**, v. 93, p. 12445-12450, 1996.

GROH, V.; RHINEHART, R.; SECRIST, H.; BAUER, S.; GRABSTEIN, K.H.; SPIES,T. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived $T_{\gamma\delta}$ cells of *MICA* and *MICB*. Washington: **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 96, p. 6879-6884, 1999.

GROH, V.; RHINEHART. R.; RANDOLPH-HABECKER, J.; TOPP, M.S.; RIDDEL, S.R.; SPIES, T. Costimulation of CD8alphabeta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. New York: **Nature Immunology**, v. 2, p. 255-260, 2001.

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

GROH, V.; BRÜHL, A.; EL-GABALAWY, H.; NELSON, J.L, SPIES, T. Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in reumathoid arthritis. Washington: **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.100, n. 16, p. 9452-9457, 2003.

GUERRA, M.S. **Introdução à citogenética geral.** Rio de Janeiro: Guanabara S.A., 1988.

GUO, S.; THOMPSON, E. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. Washington: **Biometrics,** v. 48, n. 2, p. 361-372, 1992.

HORTON, R.; WILMING, L.; RAND V.; LOVERING, R.C.; BRUFORD, E.A.; KHODIYAR, V.K.; LUSH, M.J.; POVEY, S.; TALBOT, C.C.J.; WRIGHT, M.W.; WAIN, H.M.; TROWSDALE, J.; ZIEGLER, A.; BECK, S. Gene map of the extended human MHC. London: **Nature reviews. Genetics**, v.5, n.12, p.889-899, 2004

HUGHES, E.H.; COLLINS, R.W.; KONDEATIS, E.; WALLACE, G.R.; GRAHAM, E.M.; VAUGHAN, R.W.; STANFORD, M.R. Associations of major histocompatibility complex class I chain-related molecule polymorphisms with Behcet's disease in Caucasian patients. Copenhagen: **Tissue Antigens**, v. 66, n. 3, p.195-199, 2005.

HUI, J.; PALMER, L.J.; JAMES, A.L.; MUSKZ, A.; BEILBY, J.P. AluyMICB dimorphism within the class I region of the major histocompatibility complex is associated with asthma and airflow obstruction in the Busselton population. Oxford : **Clinical and Experimental Allergy**, v. 36, p. 728-734, 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Banco de Dados: Dezembro/2007. Versão 2.0 Disponível em <http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=pr>. Acesso em: 15/12/2007.

JABLONOWSKA, B.; PALFI, M.; MATTHIESEN, L.; SELBING, A.; KJELLBERG, S.; ERNERUDH, J.T. T and B lymphocyte subsets in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion: IVIG versus placebo treatment. New York: **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 48, p. 312-318, 2002.

JANEWAY, C.A.J; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHICK, M. **Immunobiology : the immune system in health and disease.** 5 ed. New York: Garland Publishing, 2001.

JOKIMAA, V.; OKSJOKI, S.; KUJARI, H.; VUORIO, E.; ANTTILA, L. Altered expression of genes involved in the production and degradation of endometrial extracellular matrix in patients with unexplained infertility and recurrent miscarriages. Oxford : **Molecular Human Reproduction**, v. 8, n.12, p. 1111-1116, 2002.

KAMARAINEN, M.; LEIVO, I.; KOISTINEN, R.; JULKUNEN, M.; KARVONEN, U.; RUTANEN, E.M.; SEPPALA, M. Normal human ovary and ovarian tumors express glycodelin A glycoprotein with immunosuppressive and contraceptie properties. Philadelphia: **The American Journal of Pathology**, v.148, p. 1435- 1443, 1996.

KANO, T.; MORI, T.; FURUDONO, M.; ISHIKAWA, H.; WATANABE, H.; KIKKAWA, E.; WARITA, T.; ONIZUKA, M.; TAKAHASHI, M.; MAEDA, Y.; NARUSE, T.; INOKO, H.; KIMURA, A. Human leukocyte antigen may predict outcome of primary recurrent spontaneous abortion treated with paternal lymphocyte alloimmunization. New York: **American journal of reproductive immunology**, v. 58, n.4, p.383-387, 2007.

KASAHARA, M.; WATANABE, Y.; SUMASU, M.; NAGATA, T. A family of *MHC* class I-like genes located in the vicinity of the Mouse leukocyte receptor complex. Oxford: **Immunology,** v.99, n.21, p. 13687-13692, 2002.

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. Copenhagen: **Tissue Antigens,** v.54, n.2, p.178-184, 1999.

KELLEY, J.; WALTER, L.; TROWSDALE, J. Comparative genomics of natural killer cell receptor gene clusters. San Francisco: **PLoS Genetics**, v. 1, n. 2, p.129-139, 2005.

KIMURA T.; GOTO K.; YABUKI K.; MIZUKI N.; TAMIYA G.; SATO M.; KIMURA M.; INOKO H.; OHNO S. Microsatellite polymorphism within the MICB gene among Japanese patients with Behcet's disease. New York: **Human Immunology,** v. 59, p. 500-502, 1998.

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 MIC-A-MIC-B null haplotype. New York: **Immunogenetics,** v. 49, n. 7-8, p. 620-628, 1999.

KOMLOS, L.; KLEIN, T.; KOROSTISHEVSKY, M. HLA-A2 class I antigens in couples with recurrent spontaneous abortions. Oxford: **International journal of immunogenetics,** v. 34, n.4, p.241-246, 2007.

KULSKI, J.K.; DUNN, D.S.; HUI, J.; MARTINEZ, P.; ROMPHRUK, A.V.; LEELAYUWAT, C.; TAY, G.K.; OKA, A.; INOKO, H. Alu polymorphism within the

MICB gene and association with HLA-B alleles. New York : **Immunogenetics**, v.53, p.975-979, 2002.

LAHIRI, D.K.; NUMBERGER, J.I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. London: **Nucleic Acids Research,** v. 19, p. 5444, 1991.

LANIER, L.L. On Guard – Activating NK cell receptors. New York, **Nature Immunology,** v.2, n. 1, p. 23-27, 2001

LEELAYUWAT, C.; DEGLI-ESPOSTI, M.A.; TAYLOR, E.; ABRAHAM, L.J.; DAWKINS, R.L. PCR SSCP reveals haplotype related polymorphism of PERB1: a new marker for MHC beta block typing. Oxford: **European journal of immunogenetics : official journal of the British Society for Histocompatibility and Immunogenetics**, v. 21, n.6, p. 431-436, 1994

LEFRANC, M.P.; DUPRAT, E.; KAAS, Q.; TRANNE, M.; THIRIOT, A.; LEFRANC, G. IMGT unique numbering for MHC groove G-DOMAIN and MHC superfamily (MhcSF) G-LIKE-DOMAIN. New York: **Developmental and Comparative Immunology,** v.29, p. 917-938, 2005.

LEFRANC, M.P.; FRANCE, M**. IMGT, the international ImMunoGeneTics information system®**. Disponível em: <http://imgt.cines.fr/> Acesso em: 16 ago. 2007.

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

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

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. Oxford: **European Journal of Immunogenetics,** v. 31, n.2, p.63-71, 2004.

MARTINEZ, A.; FERNANDEZ-ARQUERO, M.; BALSA, A., RUBIO, A.; ALVES, H.; PASCUAL-SALCEDO, D.; MARTIN-MOLA, E.; DE LA CONCHA, E.G. Primary association of a *MICA* allele with protection against rheumatoid arthritis. Atlanta: **Arthritis and Rheumatism**, v.44, p. 1261-1265, 2001.

McDEVITT, H.O. Discovering the role of the major histocompatibility complex in the immune response. Palo Alto: **Annual review of immunology**, v. 18, p. 1-17, 2000.

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

MINCHEVA-NILSSON, L.; NAGAEVA, O.; CHEN, T.; STENDAHL, U.; ANTSIFEROVA, J.; MOGREN, I.; HERNESTAL, J.; BARANOV, V. Placenta-derived soluble *MHC* class I chain-related molecules down-regulate NKG2D receptor on peripheral blood mononuclear cells during human pregnancy: A possible novel immune escape mechanism for fetal survival. [S.I.] **The Journal of Immunology**, v. 176, p. 3585-3592, 2006.

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 Behc¸et disease. Washington: **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,** v. 94, p. 1298-1303, 1997.

MOORE, K.L. **Embriologia Clínica.** VUGMAN, F.S. [Trad] 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1994.

MUÑOZ-SAÁ, I.; CAMBRA, A.; PALLARÉS, A.; ESPINOSA, G.; JUAN, A.; PUJALTE, F.; MATAMOROS, N.; MILÀ, J.; JULIÀ, M.R. Allelic Diversity and Affinity Variants of MICA are Imbalanced in Spanish Patients with Behçet's Disease. Oslo: **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 64, n.1, 2006.

NOMURA, M.; ZOU, Z.; JOH, T.; TAKIHARA, Y.; MATSUDA, Y.; SHIMADA, K. Genomic structures and characterization of Rae1 family members encoding GPI-anchored cell surface proteins and expressed predominantly in embryonic mouse brain. Tokyo: **Journal of biochemistry**, v. 120, p. 987-995, 1996.

O'CONNOR, G.M.; HART, O. M.; GARDINER, C.M. Putting the natural killer cell in its place. Oxford: **Immunology,** v. 117, p. 1-10, 2005., 117, 1–10

ONE LAMBDA, INC. **Micro SSP™ HLA DNA typing trays.** Ago. 2004. Folheto Informativo do Produto.

ØSTENSEN, M.; VILLIGER, P.M. Immunology of pregnancy – pregnancy as a remission inducing agent in rheumatoid arthritis. Dunton Green: **Transplant Immunology,** v. 9, p. 155-160, 2002.

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. Compenhagen: **Tissue Antigens** , 56, p. 268-271, 2000.

PANIGRAHI, A.; GUPTA, N.; SIDDIQUI, J.A.; MARGOOB, A.; BHOWMIK, D.; GULERIA, S.; MEHRA, N.K. Post transplant development of MICA and anti-HLA antibodies is associated with acute rejection episodes and renal allograft loss. New York: **Human immunology**, v. 68, n.5, 2007.

PARHAM, P. NK cells and trophoblasts: partners in pregnancy. Rockefeller: **The Journal of experimental medicine**, v. 200, n.8, p. 951-955, 2004.

PATEL, R.N.; QUACK, C.; HILL, J.; SCHUST, D.J. Expression of membrane-bound HLA-G at the maternal-fetal interface is not associated with pregnancy maintenance among patients with idiopathic recurrent pregnancy loss. Oxford : **Molecular Human Reproduction**, v.9, n.9, p.551-557, 2003.

PEREZ-RODRIGUEZ, M.; CORELL, A.; ARGUELLO, J.R.; COX, S.T.; MCWHINNIE, A.; MARSH, S.G.; MADRIGAL, J.A. A new *MICA* allele with ten alanine residues in the exon 5 microsatellite**.** Compenhagen: **Tissue Antigens**, v. 55, n. 2, p. 162-165, 2000.

PORCU-BUISSON, G.; LAMBERT, M.; LYONNET, L.; LOUNDOU, A.; GAMERRE, M.; CAMOIN-JAU, L.; DIGNAT-GEORGE, F.; CAILLAT-ZUCMANN, S.; PAUL, P. Soluble MHC Class I chain-related molecule serum levels are predictive markers of implantation failure and successful term pregnancies following IVF. Oxford: **Human Molecular Genetics**, v. 15, n. 19, 2006.

RAI, R.; BACKOS, M.; RUSHWORTH, F.; REGAN, L. Polycystic ovaries and recurrent miscarriage - a reappRAIsal**.** Oxford: **Human Reproduction**, v. 15, p. 612-615, 2000.

RAMMENSEE, H.G.; BACHMANN, J.; STEVANOVIĆ, S. ***MHC* ligands and peptide motifs.** Austin: Landes Bioscience, 1997.

RAULET, D.H. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. London: **Nature Reviews Immunology**, v.3, p. 781-790, 2003.

RIBAS, F.Z. Polimorfismo do gene *MICA* e seu desequilíbrio de ligação com *HLA-B*. Curitiba: **Universidade Federal do Paraná**. Dissertação de mestrado, 2006.

ROBINSON, J.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, M.; WALLER, M.J.; CUILLERIER, B.; BAHRAM, S.; YAO, Z.; ALBERT, E.D.; MADRIGAL, J.A.; MARSH, S.G.E. MICA sequences 2000: Brief communication. New York: **Immunogenetics,** v. 53, p. 150 – 169, 2001.

RODRIGUEZ-RODERO, S.; RODRIGO, L.; FDEZ-MORERA, J.L.; MARTINEZ-BORRA, J.; LOPEZ-VÁZQUEZ, A.; FUENTES, D.; LOPEZ-ARBESU, R.; LOPEZ-SOTO, A.; GONZALEZ, S.; LOPEZ-LARREA, C. MHC Class I Chain-Related Gene B Promoter Polymorphisms and Celiac Disease New York: **Humman Immunology** , v. 67, p. 208-214, 2006

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. Copenhagen: **Tissue Antigens,** v. 58, n.2, p.83-89, 2001.

RUEDA, B.; PASCUAL, M.; LÓPEZ-NEVOT, M.A.; GONZÁLEZ, E.; MARTÍN, J. A new allele within the transmembrane region of the human MICA gene with seven GCT repeats. Copenhagen: **Tissue Antigens,** v. 60, n. 6, p. 526-528, 2002.

SACKS, G.; SARGENT, I.; REDMAN, C.; An innate view of human pregnancy. Amsterdam: **Immunology Today**, v. 20, p. 114-118, 1999.

SALIH, H.R.; RAMMENSEE, H.G.; STEINLE, A. Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. [S.I.] **The Journal of Immunology**, v. 169, p. 4098-4102, 2002.

SANJEEVI, C.B.; GAMBELUNGHE, G.; FALORNI, A.; SHTAUVERE-BRAMEUS, A.; KANINGO, A. Genetics of latent autoimmune diabetes in adults. **New York Academy of Sciences,** v. 958, p. 107-111, 2002.

SARGENT, I.L.; BORZYCHOWSKI, A.M.; REDMAN, C.W.G. NK cells and human pregnancy – an inflammatory view. Oxford: **Trends in immunology,** v. 27, n. 9, p. 399 – 404, 2006.

SCHNEIDER, S.; KUEFER, J.M.; ROESLLI, D.; EXCOFIER, L. **ARLEQUIN: a software for population genetics analysis, version 1.1. jar.** Genetics and Biometry laboratories, Dept. of Anthropology, University of Genebra, 2000.

SHIBAHARA, H.; SUZUKI, T.; KIKUCHI, K.; HIRANO, Y.; SUZUKI, M. Serum matriz metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase concentrationss in infertile women achieved pregnancy following IVF-ET. New York: **American Journal of Reproduction Immunology**, v. 54, p. 186-192, 2005.

SHICHI, D.; KIKKAWA, E.F.; OTA, M.; KATSUYAMA, Y.; KIMURA, A.; MATSUMORI, A.; KULSKI, J.K.; NARUSE, T.K.; INOKO, H. The haplotype block, NFKBIL1-ATP6V1G2-BAT1-MICB-MICA, within the class III – class I boundary region of the human major histocompatibility complex may control susceptibility to hepatitis C virus-associated dilated cardiomyopathy. Copenhagen: **Tissue Antigens**, v. 66, p. 200-208, 2005.

SOCIEDAD LATINOAMERICANA DE GASTROENTEROLOGÍA PEDIÁTRICA, HEPATOLOGÍA Y NUTRICIÓN. **The eletronic journal pediatric gastroenterology, nutrition and liver diseases.** Disponível em: <http://e-gastroped.com.br/jun05/cel02.jpg> Acesso em: 02 ago. 2006.

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

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. New York: **Immunogenetics,** v. 53, n.4, p.279-287, 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. New York: **Genome Research**, v. 14, p. 1176-1187, 2004.

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

SUTHERLAND, C.L; CHAULUPNY, N.J.; SCHOOLEY, K.; VANDENBOS, T.; KUBIN, M.; COSMAN, D. UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells. Baltimore: **The Journal of immunology : official journal of the American Association of Immunologists,** v. 168, p. 671-679, 2002.

SVEJGAARD, A.; JERSILD, C.; NIELSEN, L. S.; BODMER, W. F. HL-A antigens and disease. Statistical and genetical considerations. Copenhagen: **Tissue Antigens**; v.4, n. 2, p. 95-105, Review, 1974.

SVEJGAARD, A.; RYDER, L.P. HLA and disease associations: detecting the strongest association. Copenhagen: **Tissue Antigens.** v. 43, n. 1, p. 18-27. Review. 1994.

TAFURI, A.; ALFERINK, J.; MOLLER, P.; HAMMERLING, G.J.; ARNOLD, B. T cell awareness of paternal alloantigens during pregnancy. Washington: **Science,** v. 270, p. 630-633, 1995.

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. Houndmills: **Genes and Immunity,** v. 4, n.7, p.500-505, 2003.

TIENG, V.; LE BOUGUÉNEC, C.; DU MERLE, L.; BERTHEAU, P.; DESREUMAUX, P.; JANIN, A.; CHARRON, D.; TOUBERT, A. Binding of *Escherichia coli* adhesin AfaE to CD55 triggers cell-surface expression of the *MHC* class I-related molecule *MICA*. Washington: **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 99, n.5, p. 2977-2982, 2002.

TOSH, K.; RAVIKUMAR, M.; BELL, J.T.; MEISNER, S.; HILL, A.V.S.; PITCHAPPAN, R. Variation in MICA and MICB genes and enhanced susceptibility to paucibacillary leprosy in South India. Oxford: **Human Molecular Genetics**, v. 15, n. 19, p. 2880-2887, 2006.

TOWNSEND, A.; BODMER, H. Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes. Palo Alto: **Annual Review of Immunology**, v. 7, p. 601-624, 1989.

TROWSDALE, J.; BARTEN, R.; HAUDE, A.; STEWART, C.A.; BECK, S. The genomic context of natural killer receptor extended gene families. Copenhagen: **Immunological Reviews,** v. 181, p. 20-38, 2001.

TULPPALA, M.; YLIKORKALA, O. Current concepts in the patogénesis of recurrent miscarriage. Edinburgh: **Current Obstetrics & Gynaecology**, v.9, p. 2-6, 1999.

VALES-GOMEZ, M.; REYBURN, H.T.; ERSKINE, R.A.; LOPEZ-BOTET, M.; STROMINGER, J.L. Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD94/NKG2-A and the activating receptor CD94/NKG2-C to HLA-E. Oxford: **The EMBO journal**, v. 18, p. 4250–4260, 1999.

VAN DEN BERG, H.A.; RAND, D.A. Antigen presentation on *MHC* molecules as a diversity filter that enhances immune efficacy. Amsterdam: **Journal of Theoretical Biology**, v. 224, n. 2, p. 249 – 267, 2003.

VARLA-LEFTHERIOTI, M. The significance of the women's repertoire of natural killer cell receptors in the maintenance of pregnancy. New York: **Chemical immunology and allergy**, v. 89, p. 84-95, 2005.

VON LINSINGEN, R.; BOMPEIXE, P.E.; BICALHO, M.G. A Case–Control Study in IL6 and TGFB1 Gene Polymorphisms and Recurrent Spontaneous Abortion in Southern Brazilian Patients. New York: **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 53, p. 94-99, 2005.

WALDHAUER, I. STEINLE, A. Proteolytic release of soluble UL16-binding protein 2 from tumor cells. Chicago: **Cancer Research,** v. 66, p. 2520-2526, 2006.

WARNER, C.M.; COMISKEY, M.; CLISHAM, P.R.; BRENNER, C.A.; Soluble HLA-G (sHLA-G) a predictor of IVF outcome? New York: **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 21, p. 315-316, 2004.

WEGMANN, T.G.; LIN, H.; GUILBERT, L.; MOSMANN, T.R. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? Amsterdam: **Immunology Today**, v. 14, n. 7, p. 353-356, 1993.

WILCZYŃSKI, J.R. Th1/Th2 cytokines balance--yin and yang of reproductive immunology. Amsterdam: **European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology**, v. 122, n. 2, p. 136-143, 2005.

WU, J.D.; HIGGINS, L.M.; STEINLE, A.; COSMAN, D.; HAUGK, K.; PLYMATE, S.R. Prevalent expression of the immunostimulatory MHC class I chain–related molecule is counteracted by shedding in prostate cancer. New Haven: **The Journal of clinical investigation**, v. 114, p. 560-568, 2004.

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

ANEXOS

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DA PESQUISA PELO COMITÊ DE ÉTICA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ----------167
ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO----------169

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DA PESQUISA PELO COMITÊ DE ÉTICA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

HOSPITAL DE CLÍNICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Curitiba, 02 de agosto de 2.001.

Ilmo (a) (s) Sr. (a)(s)
MARIA DA GRAÇA BICALHO DE LACERDA
Nesta

Prezado(a) Senhor(a):

Comunicamos que o Projeto de pesquisa **"DETECÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES RELEVANTES NO PROGNÓSTICO E ACEITAÇÃO DO ALO-ENXERTO"**, está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução nº 196/96 do Ministério da Saúde.
Protocolo CEP-HC nº 037ext.019/2001-07

O referido projeto foi apresentado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, em reunião realizada no dia 31 de julho de 2.001.

Sendo o que se apresenta para o momento, subscrevo-me,

Atenciosamente

Prof. Dr. Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa em
Seres Humanos do Hospital de Clínicas – UFPR

ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

a) Você está sendo convidado a participar

como paciente ( )

como controle ( ) de um estudo intitulado " DETECÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES RELEVANTES NO PROGNÓSTICO E ACEITAÇÃO DO ALO-ENXERTO". Ë através das pesquisas, inclusive básicas, que ocorrem os avanços na Medicina, e sua participação é de fundamental importância.

b) O objetivo desta pesquisa é tentar contribuir para que órgãos transplantados como o rim sejam melhor aceitos pelo receptor bem como contribuir para tentar esclarecer fenômenos relacionados aos abortos recorrentes de causas desconhecidas. E a participação de controles neste caso é de fundamental importância, pois através das comparações entre transplantes bem aceitos ou não é que poderemos chegar a fatos importantes, assim como entre aqueles casais com abortos de repetição e aqueles casais com número de dois ou mais filhos

c) Caso você participe da pesquisa, será necessário que você forneça uma amostra de sangue (10 ml)

d) O único inconveniente que você poderá experimentar é a dor pela picada na hora da coleta de sangue, bem como pequenos hematomas que possam vir a ocorrer, e que não causam dano a pacientes ou controles.

e) Não há riscos para você.

f) Para tanto você deverá comparecer ao LIGH, para a coleta do sangue.

g) A pesquisadora responsável pelo projeto, Profa. Maria Da Graça Bicalho - fone: 3361-1729, poderá ser contactada no LIGH.

h) Está garantido que você terá todas as informações que você queira, antes, durante e depois da pesquisa.

i) A sua participação neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de recusar participar da pesquisa.

j) As informações relacionadas à pesquisa poderão ser inspecionadas pelos pesquisadores que executam a pesquisa e pelas autoridades legais, no entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação ou por qualquer meio, isto será feito de forma codificada, para que a confidencialidade seja mantida.

l) Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames) <u>não</u> são de responsabilidade dos pacientes ou controles.

m) Pela sua participação na pesquisa, você não receberá qualquer valor em dinheiro.

n) Quando os resultados forem divulgados, não aparecerá seu nome e sim um código.

Eu,_____li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo da pesquisa para a qual fui convidado a participar. A explicação que recebi menciona o fato relacionado à coleta de sangue e seus inconvenientes. Eu entendi que sou livre para interromper ou não participar da pesquisa.

Eu concordo voluntariamente em participar desta pesquisa.

_____	___/ ___ /___	_____	___/ ___ /__
Assinatura do paciente/controle	Data	Pesquisador	Data

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo