



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – BACHARELADO

ALUNA: ERIZA CRISTINA HAHN

ORIENTADOR: JOSÉ ARTUR BOGO CHIES

Título:

ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS E HAPLÓTIPOS DA  
REGIÃO 3' NÃO TRADUZIDA DO *HLA-G* E FORMAS GRAVES DE SEPSE.

PORTO ALEGRE

2014

Revista escolhida para submissão do artigo científico: *Critical Care*.

Título: Associação entre polimorfismos e haplótipos da região 3' não traduzida do *HLA-G* e formas graves de sepse.

Autores: Eriza Cristina Hahn<sup>1</sup>, Francis Maria Bão Zambra<sup>1</sup>, Anselmo Jiro Kamada<sup>2</sup>, Francieli Delongui<sup>3</sup>, Edna Maria Vissoci Reiche<sup>3</sup> e José Artur Bogo Chies<sup>1</sup>.

Instituições:<sup>1</sup>Laboratório de Imunogenética, Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. <sup>2</sup>Departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco. <sup>3</sup>Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Estadual de Londrina, Paraná.

Lista de e-mails:

Eriza Cristina Hahn: erizacristina@gmail.com; Francis Maria Bão Zambra: fbzambra@gmail.com; Anselmo Jiro Kamada: anselmojiro@gmail.com; Francieli Delongui; Edna Maria Vissoci Reiche: reiche@sercomtel.com.br; José Artur Bogo Chies: jabchies@terra.com.br

## Resumo

**Introdução:** Conceituada como um processo inflamatório sistêmico em resposta a uma infecção local, sepse é a maior causa de mortalidade em Unidades de Terapia Intensiva no Brasil. Os sintomas não são específicos à doença e indivíduos que a desenvolvem constituem população heterogênea em variáveis como idade, sexo e comorbidades. O *HLA-G* (*Human Leukocyte Antigen G*) parece ter como principal função a modulação da resposta imune, sendo importante na manutenção de um estado de tolerância imunológica. A região 3' não traduzida do *HLA-G* apresenta importante papel na regulação da expressão gênica e alguns polimorfismos dessa região foram previamente associados à expressão diferencial deste gene. Neste estudo de associação foram analisados polimorfismos e haplótipos da região 3'UTR do *HLA-G* em pacientes sépticos do município de Londrina (Brasil).

**Metodologia:** A região 3'UTR do *HLA-G* foi amplificada por PCR a partir de 64 amostras de DNA de pacientes sépticos e 191 amostras de indivíduos controle. Os amplicons foram sequenciados e genotipados para 8 polimorfismos: rs66554220, rs1707, rs1710, rs17179101, rs17179108, rs1063320, rs9380142 e rs1610696. Frequências alélicas e genotípicas, Equilíbrio de Hardy-Weinberg e razão de chances foram calculados com uso do programa SPSS 18.0. A inferência de haplótipos e o desequilíbrio de ligação foram feitos utilizando-se o programa *Haploview* 4.2. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estaticamente significativos.

**Resultados:** Dos oito polimorfismos analisados, cinco variantes (rs66554220; rs1710; rs17179101; rs1063320; rs9380142) apresentaram frequências alélicas e genotípicas significativamente maiores no grupo de pacientes. Estas variantes conferem um risco aumentado ao desenvolvimento da doença (OR=1,64 - 95%IC: 1,076-2,510; OR=1,85 - 99%IC: 1,023-3,426; OR=2,57 - 95%IC: 1,100-5,884; OR=1,8 - 99%IC:1,002-3,315; OR:1,79 - 95%IC:1,062-3,105, respectivamente). O haplótipo UTR-7 foi associado ao grupo de pacientes sépticos ( $p=0,0122$ ), enquanto o bloco UTR-1 foi relacionado ao grupo de controles ( $p=0,0223$ ). Esses dados sugerem influência de polimorfismos e haplótipos da região 3'UTR do *HLA-G* no desenvolvimento das formas graves da sepse (sepse grave e choque séptico).

**Conclusão:** Os resultados sugerem a genotipagem e haplotipagem das variantes rs66554220, rs1710, rs17179101, rs1063320 e rs9380142 como uma ferramenta de predição de risco aumentado às formas graves da sepse.

Palavras-chave: sepse, *HLA-G*, 3'UTR, polimorfismos, haplótipos.

## Introdução

Conceituada como uma resposta inflamatória sistêmica em decorrência de uma infecção patogênica local, sepse é a principal causa de mortes em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) brasileiras [1]. O custo para tratamento dessa doença é elevado e, segundo previsões, é esperado o aumento do número de casos, devido a fatores como ausência de terapia específica e aumento da resistência de patógenos a antimicrobianos [2, 3].

O processo inflamatório gerado em resposta ao patógeno inicia-se após o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (do inglês, *Pathogen-Associated Molecular Patterns* - PAMPs) e de padrões moleculares associados a danos (do inglês, *Damage-Associated Molecular Patterns* - DAMPs), mediado por receptores específicos, como os receptores *Toll-like* e *Nod-Like* [4]. No entanto, quando do desenvolvimento de sepse, a resposta do hospedeiro para eliminação do patógeno resulta em desregulação do sistema imune e de processos fisiológicos, atingindo tecidos e órgãos inicialmente não envolvidos [3, 5, 6].

Durante o curso da doença, duas fases podem ser consideradas. A inicial ou aguda, caracterizada por um estado hiperinflamatório, na qual se observa ativação de células que participam da resposta imune inata, como neutrófilos, células *Natural Killer* (NK) e monócitos, acompanhada de ativação do sistema complemento [6, 7]; e a crônica, fase tardia na qual ocorre uma resposta denominada compensatória, predominantemente anti-inflamatória, que contrapõe-se ao grande processo inflamatório gerado inicialmente [3].

Uma imunossupressão excessiva pode ocorrer durante a segunda fase, ocasionando um estado de imunoparalisia, condição em que o sistema imune está sobrecarregado e não responde mais de maneira adequada, permitindo que a infecção se estabeleça [8]. Quanto ao perfil de citocinas secretadas, ainda que exista predominância de citocinas pró-inflamatórias - como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 - na fase inicial e de anti-inflamatórias - como IL-10 - na fase tardia, há uma mistura destes grupos de moléculas, independente da fase considerada [3].

O diagnóstico da sepse é realizado através da constatação de dois sintomas típicos da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (do inglês, *Systemic Inflammatory Response Syndrome* -SIRS) acrescidos de suspeita ou confirmação de infecção. Contudo, o reconhecimento dessa patologia não é simples, pois além de sintomas não específicos à doença, a população acometida, ainda que apresente alguns padrões, constitui um grupo

heterogêneo em quesitos como sexo, idade, predisposição genética, virulência do patógeno infectante e comorbidades, como câncer e diabetes [9].

Após o desenvolvimento da doença, existe a possibilidade de progressão para formas mais graves. Quando há hipoperfusão sanguínea e disfunção de pelo menos um órgão, tem-se a sepse grave. Já o choque séptico, forma mais grave da patologia, é caracterizado como sepse grave acrescida de pressão sistólica <90mmHg e hipotensão sanguínea, mesmo diante de reposição volêmica adequada [5, 10].

No contexto inflamatório séptico, torna-se interessante o estudo de moléculas como o HLA-G (do inglês, *Human Leukocyte Antigen G*), proteína que parece possuir como principal função a modulação da resposta imune. O HLA-G integra o Complexo Principal de Histocompatibilidade (do inglês, *Major Histocompatibility Complex -MHC*), localizado no cromossomo 6 [11].

A molécula HLA-G é classificada como MHC de classe I não clássico, devido aos atributos particulares que a distinguem dos HLA de classe I clássicos. Dentre essas características estão a baixa variabilidade proteica, distribuição tecidual restrita em condições não-patológicas e parecer possuir como principal função a modulação da resposta imune [12-14]. Em condições patológicas, a expressão de *HLA-G* já foi detectada em tumores malignos [15] e em algumas doenças infecciosas e inflamatórias [16, 17].

Por meio de *splicing* alternativo do transcrito primário são geradas sete isoformas proteicas (HLA-G1-4, proteínas de membrana; HLA-G5-7, formas solúveis) que atuam na manutenção da tolerância imunológica, alcançada por meio da interação do HLA-G com diversos receptores localizados em células do sistema imune, como ILT-2 e ILT-4 (do inglês, *Immunoglobulin-Like Transcript 2,4*) e KIR2DL4 (do inglês, *Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor 2DL4*) [18-20]. A indução da tolerância pelo HLA-G pode ocorrer em diferentes estágios da resposta imune: inibindo a atividade citolítica de linfócitos T citotóxicos e de células *Natural Killer* e a diferenciação de linfócitos B [21]; bloqueando a maturação de células apresentadoras de antígenos [22] ou induzindo a polarização de linfócitos para o tipo T reguladores [23, 24].

O gene *HLA-G* é constituído por sete íntrons e oito éxons e até o momento possui 50 alelos e 16 proteínas descritos [25]. A região codante apresenta poucos polimorfismos, sendo as regiões promotora e 3' não traduzida (3'UTR) as possuidoras de maior variabilidade genética e as mais estudadas. É sabido que polimorfismos da região 3'UTR, localizada no éxon oito do *HLA-G*, são capazes de alterar os níveis de expressão deste gene. Isto porque ao longo dessa região, que possui aproximadamente 400 nucleotídeos no RNA mensageiro (RNAm) maduro, estão presentes sequências nucleotídicas de ancoragem a microRNAs (miRNAs), pequenas

moléculas com capacidade de regular negativamente a expressão gênica, tanto por suprimir a tradução quanto por promover a degradação do RNAm [26, 27].

Nesta região, existe ainda um sítio rico em (AU), sequência cujo reconhecimento por enzimas específicas acarreta a degradação do RNAm e, conseqüentemente, diminui a expressão do gene. Assim, pode-se dizer que a região 3'UTR é relevante para o nível de expressão do *HLA-G*, tanto por interferir na estabilidade do RNAm quanto por influenciar nas taxas de degradação e tradução desta molécula [14, 28].

De acordo com Castelli *et al.* (2011), na região 3'UTR do gene *HLA-G* são reconhecidas oito variantes genéticas [28]. O polimorfismo de deleção de 14pb [NCBI: rs66554220], mais conhecido como 14pb-Ins/Del (inserção/deleção) e localizado na posição +2960 do gene, já foi estudado em diversas condições patológicas. Existem controvérsias quanto às conseqüências da presença dos 14 pares de bases, pois se sabe que tanto pode aumentar a instabilidade do RNAm gerado, como levar a um processamento adicional que, por *splicing* alternativo, retira 92 nucleotídeos do RNAm, aumentando a sua estabilidade [14]. Diferentes estudos associaram variantes deste polimorfismo a doenças autoimunes, como lúpus eritematoso sistêmico [29] e esclerose múltipla [30], e a doenças inflamatórias crônicas, como artrite idiopática juvenil [31].

Quanto ao *SNP* (do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism*) +3142C>G [NCBI: rs1063320], tem-se evidências de que uma guanina nesta posição aumente a afinidade com a qual miRNAs específicos se ligam à sequência nucleotídica do RNAm, levando a uma menor expressão gênica [26, 32]. No entanto, um estudo observou resultado controverso [33], fazendo com que mais investigações sejam necessárias.

O polimorfismo +3187 A>G [NCBI: rs9380142] está situado muito próximo a um sítio rico em (AU). A Adenina nesta posição faz com que esta sequência seja reconhecida como um sítio de poliadenilação e estimule a degradação do RNAm [28]. Os outros cinco *SNPs* descritos na região 3'UTR - +3003C>T [NCBI: rs1707], +3010C>G [NCBI: rs1710], +3027A>C [NCBI: rs17179101], +3035C>T [NCBI: rs17179108] e +3196C>G [NCBI: rs1610696] – foram pouco estudados e ainda não são citados como variantes de importância clínica [14, 28, 34].

Até o momento, poucos estudos envolvendo *HLA-G* e sepsis foram realizados. Níveis aumentados de *HLA-G* solúvel do tipo 5 (sHLA-G5) foram observados em pacientes em choque séptico e chegou-se à conclusão de que níveis maiores de sHLA-G5 correlacionam com um melhor prognóstico no grupo estudado [35]. O primeiro trabalho na área da genética, observou a associação do haplótipo 14pb-Ins\_+3142G\_+3187A ao desfecho choque séptico, sugerindo a genotipagem destas variantes genéticas como uma ferramenta para predição de

prognóstico em pacientes sépticos [36]. Um último estudo reportou que o plasma de pacientes sépticos parece impedir a exocitose de ILT-4 por neutrófilos, importantes receptores inibitórios cujo ligante preferencial é o HLA-G. Esta inibição parece levar a uma atividade fagocítica mais prolongada e auxiliar na sustentação do processo inflamatório exacerbado, observado na fase inicial da sepse [37]. Apesar da existência de poucos dados, o envolvimento do HLA-G no processo séptico pode ser sugerido. Porém, é necessário que mais estudos sejam desenvolvidos, com intuito de que o papel desta molécula seja melhor compreendido no contexto inflamatório séptico.

Assim, com o objetivo de confirmar os resultados observados em trabalho previamente realizado por nosso grupo de pesquisa [36] e a fim de reafirmar a importância do estudo do HLA-G em sepse, o presente trabalho investigou a associação de haplótipos e polimorfismos da região 3'UTR do gene *HLA-G* às formas graves da sepse - sepse grave e choque séptico- em um grupo de pacientes sépticos do município de Londrina (Brasil).

## **Material e Métodos**

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Institucional da Universidade Estadual de Londrina e os indivíduos envolvidos (ou seus familiares) assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido para participação na pesquisa.

### População avaliada

O estudo incluiu 64 pacientes com diagnóstico confirmado de uma das formas graves de sepse - sepse grave ou choque séptico - , quadros clínicos definidos segundo os critérios definidos pelo *American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine (Accp/Sccm)* [38]. Os pacientes foram admitidos no Hospital Universitário de Londrina, entre maio de 2007 e junho de 2008, e foram incluídos no estudo no momento do diagnóstico da doença. Após o diagnóstico, os pacientes receberam tratamento hospitalar padrão e foram monitorados. Dados de idade, gênero, local primário da infecção, gravidade da doença e disfunção de órgãos foram coletados para cada participante. Os critérios de exclusão foram idade inferior a 18 anos e qualquer tipo de imunossupressão, como pacientes recebendo quimioterapia ou infectados pelo vírus da imunodeficiência humana.

O grupo de controles é composto por 191 doadores de sangue saudáveis da mesma região geográfica dos pacientes. A coleta de sangue foi realizada no Banco de Sangue do Hospital de Londrina, durante o mesmo período de amostragem de pacientes com sepse.

### Obtenção da amostra para estudo

O DNA genômico foi extraído de células sanguíneas periféricas pelo método de *Salting-out* [39].

### Avaliação da região 3'UTR do gene *HLA-G*

Um fragmento com cerca de 500 pares de bases da região 3'UTR do gene *HLA-G* foi amplificado por PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*). A região amplificada englobou os oito polimorfismos de interesse do estudo: 14pb- Ins/Del [NCBI: rs66554220] e os SNPs localizados nas posições +3003C>T [NCBI: rs1707], +3010C>G [NCBI: rs1710], +3027A>C [NCBI: rs17179101], +3035C>T [NCBI: rs17179108], +3142C>G [NCBI: rs1063320], +3187A>G [NCBI: rs9380142] e +3196C>G [NCBI: rs1610696].

Os *primers* utilizados foram HLA-G8-F 5' TGTGAAACAGCTGCCCTGTGT 3' [36] e GmiRNA-R 5' CTGGTGGGACAAGTTCTACTG 3' [40]. A reação foi conduzida com volume final de 25µL, com concentração final de cada reagente como segue: 10pmol de cada *primer*; 0,2mM de cada dNTP; 0,2mM de MgCl<sub>2</sub>; tampão 1X; e 1,0U de *Taq Platinum DNA Polimerase* (Invitrogen Corporation, CA, USA). As amostras foram levadas ao termociclador Techne TC-412 (Bibby Scientific Ltd., Stone, UK) e submetidas à temperatura de 94°C por 5 minutos para desnaturação inicial; 32 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 65,5°C e 60 segundos a 72°C; seguido por extensão final de 5 minutos a 72°C. Os produtos do PCR foram sequenciados pela empresa MacroGen Inc utilizando-se *primer* reverso, em sequenciador ABI 3730 XL, através de método descrito pelo fabricante. As genotipagens foram realizadas por meio da interpretação de eletroferogramas, com auxílio do programa *FinchTV* versão 1.4.

### Análise estatística

Frequências alélicas e genotípicas, razão de chances e verificação de concordância com o equilíbrio de Hardy-Weinberg foram realizados por meio do programa estatístico SPSS 18.0 (Windows, Chicago, Illinois, USA). O valor de significância adotado foi  $p < 0,05$ .

As comparações entre frequências alélicas do grupo controle e frequências alélicas observadas em estudos anteriores foram realizadas pelo teste Exato de Fisher, utilizando-se o programa WinPepi versão 11.42.

O programa Haploview versão 4.2 [41] foi utilizado para inferência dos haplótipos dentro dos grupos estudados, cálculo do desequilíbrio de ligação entre as variantes genéticas – com base

no valor de  $D'$  - e para o teste de associação entre haplótipos e grupos.

## **Resultados e Discussão**

### Dados demográficos

Na tabela 1 são mostrados os dados demográficos dos indivíduos envolvidos no estudo. Entre os 191 indivíduos controles, a média de idade foi de 37,9 anos (desvio padrão= $\pm$ 11 anos). A média de idade do grupo de pacientes, constituído por 64 indivíduos, foi de 61,8 anos (desvio padrão= $\pm$ 18,5 anos). A taxa de mortalidade entre os pacientes sépticos foi de 68,3% e o foco primário de infecção de maior prevalência foi o trato respiratório, observado em 60,7% dos indivíduos. As características gerais dos pacientes sépticos assemelham-se aos dados do último relatório nacional publicado pelo Instituto Latino Americano de Sepse [42] e aos resultados de um estudo epidemiológico realizado no Brasil [43].

### Frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas

A tabela 2 apresenta as frequências alélicas e genotípicas dos grupos de pacientes e controles. A descrição utilizada para os polimorfismos segue a nomenclatura utilizada por Castelli *et al.* (2011) [28]. Todos os genótipos estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (dados não mostrados).

As frequências alélicas observadas no grupo de controles, com exceção das variantes da posição +3003 [NCBI: rs1707], foram semelhantes às de um trabalho previamente realizado [28]. Interessantemente, as frequências do polimorfismo +3003 não diferiram significativamente das frequências observadas para uma população do nordeste brasileiro (dados não mostrados) [44].

A frequência dos alelos 14pb- Ins, +3010C, +3027A, +3142G e +3187A foi significativamente maior em pacientes, em comparação ao grupo de controles ( $p=0,020$ ;  $p=0,008$ ;  $p=0,022$ ;  $p=0,011$  e  $p=0,030$ , respectivamente). Estas variantes conferem um risco aumentado ao desenvolvimento da doença (OR=1,64 - 95%IC: 1,076-2,510; OR=1,85 - 99%IC: 1,023-3,426; OR=2,57 - 95%IC: 1,100-5,884; OR=1,8 - 99%IC: 1,002-3,315; OR=1,79 - 95%IC: 1,062-3,105, respectivamente). Este é o primeiro trabalho a associar estas variantes genéticas às formas graves de sepse.

A maioria dos polimorfismos está em forte desequilíbrio de ligação (figura 1), confirmando dados observados em outros estudos [28, 36]. Um total de sete haplótipos foi inferido. Estes

haplótipos estão presentes tanto no grupo caso quanto no controle (tabela 3). A descrição haplotípica segue a nomenclatura utilizada por Castelli *et al.* (2011) e os haplótipos com maior frequência – UTR-2, UTR-1, UTR-3, UTR-5, UTR-6, UTR-7 e UTR-4 - estão de acordo com os observados por este mesmo grupo ao descrever a região 3'UTR do gene *HLA-G*, em uma amostra de 155 brasileiros saudáveis da região Sudeste do Brasil [28].

O haplótipo UTR-7 (frequência de 5,7%) foi associado ao grupo caso, constituído por pacientes com diagnóstico de sepse grave ou choque séptico. Este bloco contém as três variantes genéticas (14pb-Ins, +3142G e +3187A) presentes no haplótipo previamente associado a um grupo de pacientes com choque séptico, em estudo longitudinal realizado por nosso grupo de pesquisa, utilizando amostras de pacientes do estado do Rio Grande do Sul (Brasil) [36]. Assim, pela segunda vez, em amostras obtidas com delineamento distinto e em populações de diferentes localidades, é observada a associação do haplótipo contendo as variantes 14pb-Ins, +3142G e +3187A a formas graves da sepse. Esta associação sugere ser este haplótipo um fator de predisposição ao desenvolvimento de quadros graves da patologia. Interessantemente, o haplótipo UTR-7 já foi correlacionado a níveis baixos de expressão do *HLA-G*, e então classificado como um haplótipo de baixa produção proteica [45]. Somando-se isso ao resultado observado neste trabalho, pode-se sugerir que este haplótipo confere predisposição às formas graves de sepse, provavelmente, devido aos menores níveis de expressão de *HLA-G*.

Já o haplótipo UTR-1 (frequência de 25,6%) apresentou associação significativa ao grupo de controles ( $p=0,0223$ ), mostrando-se como um fator de proteção às formas graves da sepse. Este haplótipo já foi considerado um fator de proteção contra outra doença inflamatória, lúpus eritematoso sistêmico [46]. As variantes genéticas previamente relacionadas à baixa expressão de *HLA-G* (14pb- Ins, +3142G e +3187A) e os outros dois polimorfismos que foram associados à sepse pela primeira vez neste trabalho (+3010C e +3027A) não estão presentes neste haplótipo. Em estudo anterior, este bloco foi correlacionado a maiores níveis de expressão de *HLA-G* solúvel, indicando que os haplótipos UTR-1 e UTR-7 são opostos quando se trata de níveis de expressão [45].

De maneira geral, os resultados de pesquisas acerca de *HLA-G* e sepse mostram que o haplótipo contendo variantes relacionadas à baixa expressão de *HLA-G* confere predisposição ao desenvolvimento de formas mais graves de sepse (neste trabalho, o bloco UTR-7). Isso mostra a necessidade de que estudos posteriores continuem investigando o envolvimento do *HLA-G* em sepse. Além disso, como sugestão, há que se destacar a importância do desenvolvimento de pesquisas que realizem tanto a dosagem de *HLA-G* solúvel quanto a

genotipagem das variantes genéticas de importância localizadas na região 3'UTR do *HLA-G*, a fim de se constatar se nessa patologia há correlação entre haplótipos e níveis de expressão de *HLA-G*.

Como sugestão final, indica-se a reflexão sobre a importância de ferramentas que auxiliem na triagem de indivíduos com risco aumentado de desenvolver sepse. Para isso, dados já conhecidos podem ser utilizados na construção de um quadro com importantes genes envolvidos no processo séptico [6, 47]. Estes genes devem possuir variações genéticas que sabidamente afetem a função da proteína gerada, como é o caso do *HLA-G* e polimorfismos da sua região 3'UTR, a fim de que a genotipagem e a haplotipagem destas variantes possam ser utilizadas como ferramentas para triagem de pacientes com risco aumentado de desenvolvimento de sepse. A maior atenção a estes pacientes talvez possa ser usada como uma estratégia para a diminuição do número de casos graves, bem como para a redução das taxas de mortalidade devido à sepse.

## **Conclusões**

No presente estudo, mostrou-se pela primeira vez a associação dos polimorfismos 14pb-Ins [NCBI: rs66554220], +3010 [NCBI: rs1710], +3027 [NCBI: rs17179101], +3142 [NCBI: rs1063320] e +3187 [NCBI: rs9380142] às formas graves de sepse – sepse grave e choque séptico.

Embora o presente estudo apresente uma pequena amostragem de pacientes sépticos, esta limitação não diminui sua relevância, visto que uma pesquisa previamente realizada já havia mostrado a associação do haplótipo contendo as variantes 14pb-Ins, +3142G e +3187A (no presente trabalho, o bloco UTR-7) às formas graves de sepse. Assim, a importância deste estudo está na confirmação da associação de um haplótipo que contém variantes genéticas relacionadas à baixa expressão de *HLA-G* a formas graves de sepse.

Os resultados sugerem a genotipagem e haplotipagem das variantes 14pb-Ins [NCBI: rs66554220], +3010 [NCBI: rs1710], +3027 [NCBI: rs17179101], +3142 [NCBI: rs1063320] e +3187 [NCBI: rs9380142], presentes na região 3'UTR do *HLA-G*, como uma ferramenta de predição de risco aumentado aos desfechos graves da sepse.

### **Key-message**

Determinados polimorfismos e haplótipos da região 3'UTR do gene *HLA-G* estão associados às formas graves de sepse – sepse grave e choque séptico.

### **Conflito de Interesses**

Os autores declaram a inexistência de conflitos de interesses.

### **Contribuição dos Autores**

EMVR e FD foram responsáveis pela coleta de dados. ECH foi responsável pelos experimentos e genotipagens. ECH, AJK e FMBZ contribuíram para análise estatística. ECH, FMBZ e JABC realizaram interpretação dos dados, redação e revisão do manuscrito.

### **Agradecimentos**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

### **Detalhes dos Autores**

<sup>1</sup>Laboratório de Imunogenética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Avenida Bento Gonçalves, 9500. Prédio 43.323/sala 212, Porto Alegre, Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco – Avenida Professor Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, Recife, Brasil. <sup>3</sup>Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Patologia Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Estadual de Londrina - Avenida Robert Koch, 60, Londrina, Brasil.

### **Referências**

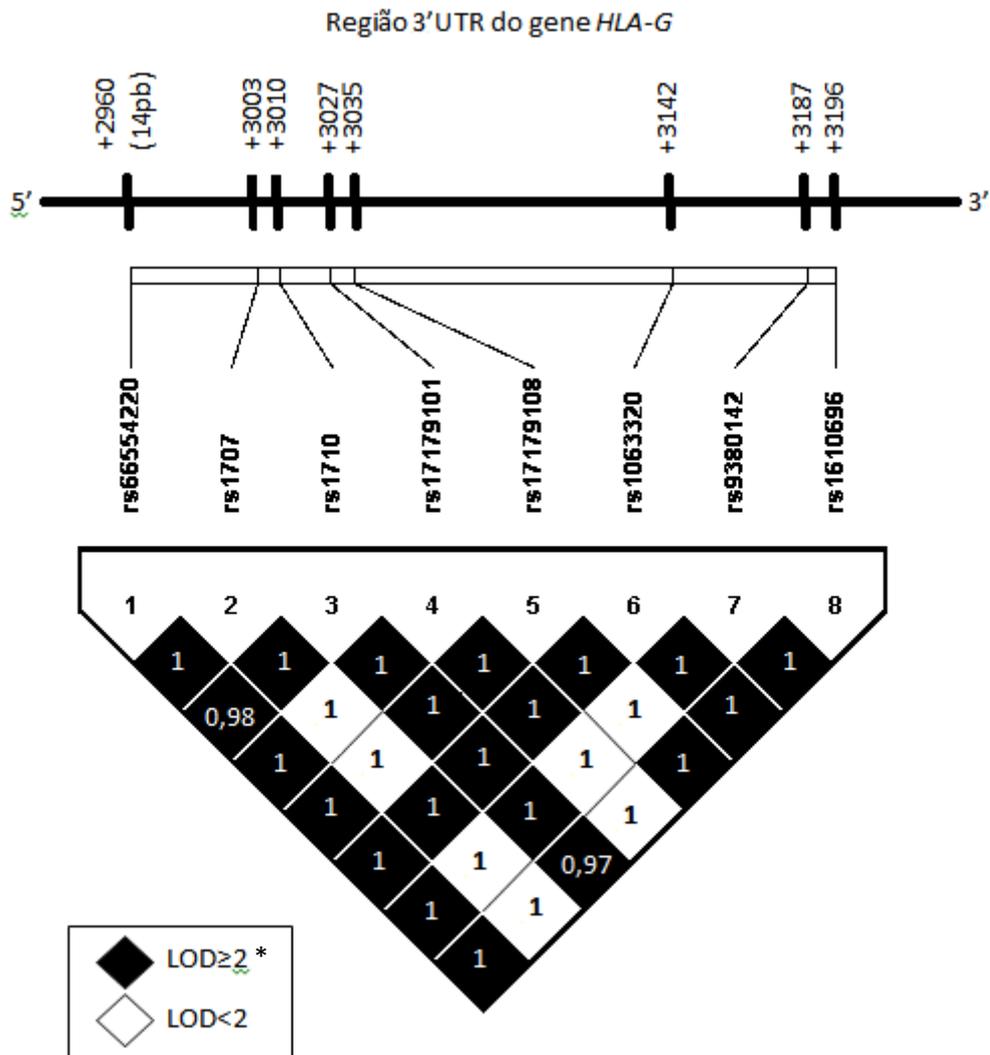
1. Instituto Latino Americano da Sepse [<http://www.ilas.org.br/>].

2. Ana M. C. Sogayar FRM, Alvaro Rea-Neto, Amselmo Dornas, Cintia M. C. Grion, Suzana M. A. Lobo, Bernardo R. Tura, Carla L. O. Silva, Ruy G. R. Cal, Idal Beer, Vulto Michels Jr, Jorge Safi Jr, Marcia Kayath, Eliezer Silva: **A Multicentre, Prospective Study to Evaluate Costs of Septic Patients in Brazilian Intensive Care Units.** *Pharmacoeconomics* 2008, **26** (5):425-434.
3. Iskander KN, Osuchowski MF, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Stepien D, Valentine C, Remick DG: **Sepsis: multiple abnormalities, heterogeneous responses, and evolving understanding.** *Physiol Rev* 2013, **93**(3):1247-1288.
4. Gentile LF, Moldawer LL: **DAMPs, PAMPs, and the origins of SIRS in bacterial sepsis.** *Shock* 2013, **39**(1):113-114.
5. King EG, Bauza GJ, Mella JR, Remick DG: **Pathophysiologic mechanisms in septic shock.** *Lab Invest* 2014, **94**(1):4-12.
6. Cohen J: **The immunopathogenesis of sepsis.** *Nature* 2002, **420**(6917):885-891.
7. Vincent JL, Abraham E: **The last 100 years of sepsis.** *Am J Respir Crit Care Med* 2006, **173**(3):256-263.
8. Sagy M, Al-Qaqaa Y, Kim P: **Definitions and pathophysiology of sepsis.** *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 2013, **43**(10):260-263.
9. Vincent JL, Martinez EO, Silva E: **Evolving concepts in sepsis definitions.** *Crit Care Nurs Clin North Am* 2011, **23**(1):29-39.
10. Angus DC, van der Poll T: **Severe sepsis and septic shock.** *N Engl J Med* 2013, **369**(9):840-851.
11. Dyer P, McGilvray R, Robertson V, Turner D: **Status report from 'double agent HLA': health and disease.** *Mol Immunol* 2013, **55**(1):2-7.
12. Carosella ED, Moreau P, Le Maoult J, Le Discorde M, Dausset J, Rouas-Freiss N: **HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance.** *Adv Immunol* 2003, **81**:199-252.
13. Claiton Viegas Brenol TDV, José Artur Bogo Chies, RMX: **The role of the HLA-G gene and molecule on the clinical expression of rheumatologic diseases.** *Rev Bras Reumatol* 2012, **52**(1):75-91.
14. Castelli EC, Veiga-Castelli LC, Yaghi L, Moreau P, Donadi EA: **Transcriptional and posttranscriptional regulations of the HLA-G gene.** *Journal of immunology research* 2014, **2014**:734068.
15. Loumagne L BJ, Favier B, Montespan F, Carosella ED, Rouas-Freiss N.: **In vivo evidence that secretion of HLA-G by immunogenic tumor cells allows their evasion from immunosurveillance.** *Int J Cancer* 2014.
16. Amiot L, Vu N, Samson M: **Immunomodulatory Properties of HLA-G in Infectious Diseases.** *Journal of immunology research* 2014, **2014**:298569.
17. Rizzo R BD, Baricordi OR, Fainardi E.: **New insights into HLA-G and inflammatory diseases.** *Inflamm Allergy Drug Targets* 2012, **11**(6):448-463.
18. Hofmeister V, Weiss EH: **HLA-G modulates immune responses by diverse receptor interactions.** *Semin Cancer Biol* 2003, **13**(5):317-323.
19. Carosella ED: **The tolerogenic molecule HLA-G.** *Immunol Lett* 2011, **138**(1):22-24.
20. Kamishikiryo J, Maenaka K: **HLA-G molecule.** *Curr Pharm Des* 2009, **15**(28):3318-3324.

21. Naji A, Menier C, Morandi F, Agaoglu S, Maki G, Ferretti E, Bruel S, Pistoia V, Carosella ED, Rouas-Freiss N: **Binding of HLA-G to ITIM-bearing Ig-like transcript 2 receptor suppresses B cell responses.** *J Immunol* 2014, **192**(4):1536-1546.
22. Horuzsko A LF, Munn DH, Mellor AL.: **Maturation of antigen-presenting cells is compromised in HLA-G transgenic mice.** *Int Immunol* 2001, **13**(3):385-394.
23. Castellaneta A, Mazariegos GV, Nayyar N, Zeevi A, Thomson AW: **HLA-G level on monocytoid dendritic cells correlates with regulatory T-cell Foxp3 expression in liver transplant tolerance.** *Transplantation* 2011, **91**(10):1132-1140.
24. Wang Z, Fu XY, Shi BY, Qian YY, Xiao L, Bai HW: **Antigen-specific suppression by induced CD4+CD25high regulatory T cells in kidney recipients.** *Transplant Proc* 2009, **41**(5):1574-1576.
25. **The International Immunogenetics Information System** [<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html>].
26. Castelli EC, Moreau P, Oya e Chiromatzo A, Mendes-Junior CT, Veiga-Castelli LC, Yaghi L, Giuliani S, Carosella ED, Donadi EA: **In silico analysis of microRNAs targeting the HLA-G 3' untranslated region alleles and haplotypes.** *Hum Immunol* 2009, **70**(12):1020-1025.
27. Veit TD, Chies JA: **Tolerance versus immune response -- microRNAs as important elements in the regulation of the HLA-G gene expression.** *Transpl Immunol* 2009, **20**(4):229-231.
28. Castelli EC, Mendes-Junior CT, Deghaide NH, de Albuquerque RS, Muniz YC, Simoes RT, Carosella ED, Moreau P, Donadi EA: **The genetic structure of 3'untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes.** *Genes Immun* 2010, **11**(2):134-141.
29. Veit TD, Cordero EA, Mucenic T, Monticelo OA, Brenol JC, Xavier RM, Delgado-Canedo A, Chies JA: **Association of the HLA-G 14 bp polymorphism with systemic lupus erythematosus.** *Lupus* 2009, **18**(5):424-430.
30. Wisniewski A, Bilinska M, Klimczak A, Wagner M, Majorczyk E, Nowak I, Pokryszko-Dragan A, Kusnierczyk P: **Association of the HLA-G gene polymorphism with multiple sclerosis in a Polish population.** *Int J Immunogenet* 2010, **37**(4):307-311.
31. Veit TD, Vianna P, Scheibel I, Brenol CV, Brenol JC, Xavier RM, Delgado-Canedo A, Gutierrez JE, Brandalize AP, Schuler-Faccini L *et al*: **Association of the HLA-G 14-bp insertion/deletion polymorphism with juvenile idiopathic arthritis and rheumatoid arthritis.** *Tissue Antigens* 2008, **71**(5):440-446.
32. Manaster I, Goldman-Wohl D, Greenfield C, Nachmani D, Tsukerman P, Hamani Y, Yagel S, Mandelboim O: **MiRNA-mediated control of HLA-G expression and function.** *PLoS One* 2012, **7**(3):e33395.
33. Tan Z, Randall G, Fan J, Camoretti-Mercado B, Brockman-Schneider R, Pan L, Solway J, Gern JE, Lemanske RF, Nicolae D *et al*: **Allele-specific targeting of microRNAs to HLA-G and risk of asthma.** *Am J Hum Genet* 2007, **81**(4):829-834.
34. Donadi EA, Castelli EC, Arnaiz-Villena A, Roger M, Rey D, Moreau P: **Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association.** *Cell Mol Life Sci* 2011, **68**(3):369-395.
35. Monneret G, Voirin N, Krawice-Radanne I, Bohe J, Lepape A, Rouas-Freiss N, Carosella ED: **Soluble human leukocyte antigen-G5 in septic shock: marked and persisting elevation as a predictor of survival.** *Crit Care Med* 2007, **35**(8):1942-1947.

36. Graebin P, Veit TD, Alho CS, Dias FS, Chies JA: **Polymorphic variants in exon 8 at the 3' UTR of the HLA-G gene are associated with septic shock in critically ill patients.** *Crit Care* 2012, **16**(5):R211.
37. Baudhuin J, Migraine J, Faivre V, Loumagne L, Lukaszewicz AC, Payen D, Favier B: **Exocytosis acts as a modulator of the ILT4-mediated inhibition of neutrophil functions.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, **110**(44):17957-17962.
38. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G *et al*: **2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference.** *Crit Care Med* 2003, **31**(4):1250-1256.
39. Miller SA DD, Polesky HF.: **A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.** *Nucleic Acids Res* 1988, **16**(3):1215.
40. Cordero EA, Veit TD, da Silva MA, Jacques SM, Silla LM, Chies JA: **HLA-G polymorphism influences the susceptibility to HCV infection in sickle cell disease patients.** *Tissue Antigens* 2009, **74**(4):308-313.
41. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ: **Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps.** *Bioinformatics* 2005, **21**(2):263-265.
42. **Instituto Latino Americano da Sepse** [<http://www.ilas.org.br/pg.php?v=dados-brasileiros>].
43. João Andrade L, Sales Júnior CMD, Rodrigo Hatum, Paulo César S. P. Souza, André Japiassú, Cleovaldo T. S. Pinheiro, Gilberto Friedman, Odin Barbosa da Silva, Mariza D'Agostino Dias, Edwin Koterba, Fernando Suparregui Dias, Cláudio Piras, Raggio Luiz: **Sepse Brasil: Estudo Epidemiológico da Sepse em Unidades de terapia intensiva Brasileiras.** *Revista Brasileira Terapia Intensiva* 2006, **18** (1).
44. Lucena-Silva N, Monteiro AR, de Albuquerque RS, Gomes RG, Mendes-Junior CT, Castelli EC, Donadi EA: **Haplotype frequencies based on eight polymorphic sites at the 3' untranslated region of the HLA-G gene in individuals from two different geographical regions of Brazil.** *Tissue Antigens* 2012, **79**(4):272-278.
45. Martelli-Palomino G1 PJ, Muniz YC, Mendes-Junior CT, Castelli EC, Massaro JD, Krawice-Radanne I, Poras I, Rebmann V, Carosella ED, Rouas-Freiss N, Moreau P, Donadi EA.: **Polymorphic sites at the 3' untranslated region of the HLA-G gene are associated with differential hla-g soluble levels in the Brazilian and French population.** *PLoS One* 2013, **8**(10).
46. Lucena-Silva N, de Souza VS, Gomes RG, Fantinatti A, Muniz YC, de Albuquerque RS, Monteiro AL, Diniz GT, Coelho MR, Mendes-Junior CT *et al*: **HLA-G 3' untranslated region polymorphisms are associated with systemic lupus erythematosus in 2 Brazilian populations.** *J Rheumatol* 2013, **40**(7):1104-1113.
47. Namath A PA: **Genetic polymorphisms in sepsis.** *Crit Care Nurs Clin North Am* 2011, **23**(1):181-202.

**Figura 1.** Desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos estudados.



A parte superior da figura contém as posições dos polimorfismos ao longo da região 3'UTR do gene *HLA-G*, acompanhada dos números de acessos dos polimorfismos (rs66554220, rs1707, rs1710, rs17179101, rs17179108, rs1063320, rs9380142 e rs1610696). Dentro dos losangos estão informados os valores de  $D'$ , medida do desequilíbrio de ligação entre dois *loci*, para o bloco considerado. \*LOD: "Log of the Odds" - logaritmo da chance de dois *loci* estarem em desequilíbrio de ligação.

**Tabela 1.** Dados demográficos dos participantes do estudo.

Grupo	Total (n)	Média de Idade	Proporção de homens
Controles	191	37,9 anos (+/- 11 anos)	55,6%
Pacientes (casos)*	64	61,8 anos (+/- 18,5 anos)	55,7%

\* Indivíduos com diagnóstico confirmado de sepse grave ou choque séptico.

**Tabela 2.** Frequências alélicas e genóticas observadas entre os grupos de pacientes sépticos e controles.

Fragmento de 14pb		+3003T/C		+3010C/G		+3027C/A						
		Pacientes	Controles	Pacientes	Controles	Pacientes	Controles	Pacientes	Controles			
Alelos	Ins <sup>1</sup>	0,539	0,416	T	0,937	0,939	C <sup>1</sup>	0,722	0,585	C	0,898	0,958
	Del	0,461	0,584	C	0,063	0,061	G	0,278	0,415	A <sup>1</sup>	0,102	0,042
		p=0,020*		p=1,000		p=0,008*		p=0,022*				
Genótipos	Ins/Ins	0,266	0,158	TT	0,889	0,879	CC	0,492	0,328	CC	0,797	0,921
	Ins/Del	0,547	0,516	CT	0,095	0,121	CG	0,460	0,513	CA	0,203	0,074
	Del/Del	0,187	0,326	CC	0,016	0	GG	0,048	0,159	AA	0	0,005
		p=0,044*		p=0,286		p=0,014*		p=0,011*				
+3035C/T		+3142G/C		+3187A/G		+3196C/G						
		Pacientes	Controles	Pacientes	Controles	Pacientes	Controles	Pacientes	Controles			
Alelos	C	0,820	0,871	G <sup>1</sup>	0,719	0,587	A <sup>1</sup>	0,820	0,718	C	0,625	0,713
	T	0,180	0,129	C	0,281	0,413	G	0,180	0,282	G	0,375	0,287
		p=0,202		p=0,011*		p=0,030*		p=0,079				
Genótipos	CC	0,641	0,747	GG	0,484	0,326	AA	0,614	0,510	CC	0,375	0,516
	CT	0,359	0,247	GC	0,469	0,521	AG	0,359	0,416	CG	0,500	0,395
	TT	0	0,006	CC	0,047	0,153	GG	0	0,074	GG	0,125	0,089
		p=0,162		p=0,020*		p=0,025*		p=0,146				

\* Frequências significativamente distintas entre os dois grupos estudados ( $p < 0,05$ ).

<sup>1</sup> Alelos de risco para o desenvolvimento de sepse (OR"14pb-Ins"= 1,64 - 95%IC: 1,076-2,510; OR"+3010C"= 1,85 - 99%IC: 1,023-3,426; OR"+3027A"= 2,57 - 95%IC: 1,100-5,884;; OR"+3142G"= 1,8 - 99%IC: 1,002-3,315; OR"+3187A"= 1,79 - 95%IC:1,062-3,105).

**Tabela 3.** Haplótipos inferidos para os dois grupos estudados.

Descrição do Haplótipo <sup>1</sup>	Frequência do Haplótipo (2n=510)	Haplótipos da região 3'UTR do <i>HLA-G</i>								Frequência em Pacientes (2n=128)	Frequência em Controles (2n=382)	Valor de <i>p</i>
		14pb	+3003	+3010	+3027	+3035	+3142	+3187	+3196			
UTR-2	0,307	Ins	T	C	C	C	G	A	G	0,375	0,284	0,0543
UTR-1	0,256	Del	T	G	C	C	C	G	C	0,180	0,282	0,0223*
UTR-3	0,171	Del	T	C	C	C	G	A	C	0,172	0,171	0,9830
UTR-5	0,081	In	T	C	C	T	G	A	C	0,062	0,087	0,3819
UTR-6	0,065	Del	T	G	C	C	C	A	C	0,039	0,074	0,1700
UTR-7	0,057	In	T	C	A	T	G	A	C	0,102	0,042	0,0122**
UTR-4	0,057	Del	C	G	C	C	C	A	C	0,055	0,058	0,8905
Outros	0,006	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>1</sup> Nomenclatura segundo Castelli *et al* 2011 [28].

\* Haplótipo UTR-1 significativamente associado ao grupo de controles.

\*\*Haplótipo UTR-7 significativamente associado aos desfechos graves de sepse (sepse grave e choque séptico).