

Universidade Federal do Rio Grande do Sul –UFRGS
Departamento de Genética
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS

VARIAÇÃO GENÉTICA DO ÉXON 8 DE HLA-G EM PACIENTES CRÍTICOS

PIETRA GRAEBIN

Orientador: Dr. José Artur Bogo Chies (UFRGS)
Co-Orientadora: Dra. Clarice Sampaio Alho (PUCRS)

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Porto Alegre, março de 2012.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Agências Financiadoras:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul – FAPERGS.

Instituição de Origem:

Laboratório de Imunogenética

Departamento de Genética

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Instituições Colaboradoras:

- Laboratório de Biologia Humana e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
- Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – HSL-PUCRS.



Ao meu marido Nano e aos meus pais
Walter e Renata Graebin e às minhas
irmãs Dafne, Georgia e Maide.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu orientador José Artur Bogo Chies pela oportunidade do mestrado e pelas críticas construtivas.

À Clarice Sampaio Alho, minha co-orientadora, que tornou possível a realização desse trabalho e por sempre estar disposta a ajudar, desde os meus tempos de Iniciação Científica. Muito obrigada!

Ao Elmo, que sempre foi um grande solucionador de problemas burocráticos.

Aos professores do PPGBM-UFRGS, por suas aulas e ensinamentos.

A todos os pacientes internados na UTI do São Lucas-PUCRS e seus familiares, que aceitaram/autorizaram doar amostra. Certamente, se não fossem por eles esse estudo não seria possível.

Ao colega, e principalmente amigo, Eduardo Guerra, o Dudu, pela solidariedade e paciência em me ajudar com o PHASE e o Arlequin. Obrigada pela amizade, pelo carinho e pelas muitas gargalhadas!

Ao colega Tiago Veit, com quem melhor me comuniquei em “Hagaeleagênês”.

Aos colegas e amigos Francis, Tiago Dalberto e Jacque. Francis pelas risadas, pela lealdade e pela sinceridade. Tiago por me receber no Laboratório de Imunogenética e sempre ser atencioso. Jacque pela pessoa bacana que descobri que és!

A todos os colegas do Laboratório de Imunogenética da UFRGS, e é claro, ao pessoal da Bioinformática, principalmente o Dinler, que a mim apresentou o Mendeley e o Endnote.

Às colegas do Laboratório de Genética Humana e Molecular da PUCRS, Deborah, Elisa, Fernada e Aline, pelo companheirismo.

Ao colega de longa data, Diego Paskulin pelas dicas com o SPSS.

Às amigas Mari G. e Mari V. e ao amigo Rossanix pelos *happy hours*, pelos almoços, pelas conversas divertidas e por compartilharem comigo as suas amizades.

Aos meus pais, Walter e Renata, que mesmo muitas vezes sem entender muito sobre HLA-G e pacientes críticos, estiveram presentes, me apoiaram e acreditaram em mim. Às minhas irmãs, Dafne, Georgia e Maide pelo apoio e amizade. À minha sobrinha Sofia, simplesmente, pela “fofurice”.

Aos meus gatinhos e companheirinhos Django e Goya, que com suas trapalhadas felinas deixaram meus dias mais felizes.

E por fim, gostaria de agradecer a pessoa que mais acompanhou a minha trajetória durante o mestrado, que pacientemente e incondicionalmente escutou os meus dilemas e que sempre me apoiou, aconselhou, acreditou e torceu por mim, Luis Floriano, o Nano. Obrigada por tudo, principalmente pelo teu amor... Afinal, “All you need is Love” (e obrigada John, Paul, George e Ringo por me lembrarem disso)!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
LISTA DE FIGURAS	11
RESUMO	12
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. INFLAMAÇÃO, INFECÇÃO E IMUNIDADE.....	16
1.2. ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO HUMANO G (HLA-G).....	19
1.2.1. O GENE DO HLA-G.....	19
1.2.2. HLA-G E SEUS RECEPTORES	21
1.2.3. HLA-G E AS CÉLULAS SUPRESSORAS	22
1.2.4. REGULAÇÃO DO HLA-G	23
1.2.5. ESTUDOS COM HLA-G	24
1.3. SEPSE, SEPSE SEVERA E CHOQUE SÉPTICO	26
1.4. JUSTIFICATIVA	31
2. OBJETIVOS	32
2.1. OBJETIVO GERAL.....	32
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
3. ARTIGO CIENTÍFICO.....	33
ABSTRACT.....	34
INTRODUCTION.....	36
MATERIAL AND METHODS	37
PATIENTS	37
3' UTR ANALYSIS	38
STATISTICAL ANALYSIS	39
RESULTS AND DISCUSSION.....	40
ALLELIC, GENOTYPE, HAPLOTYPE AND DIPLTYPE FREQUENCIES	40

POLYMORPHIC VARIANTS OF HLA-G AND OUTCOMES OF CRITICALLY ILL PATIENTS	41
CONCLUSIONS	43
REFERENCES	46
TABLES	57
4. DISCUSSÃO DA DISSERTAÇÃO	57
REFERÊNCIAS.....	68
ANEXOS	74

LISTA DE ABREVIATURAS

A- Adenina

ACCP/SCCM- *American College of Chest Physicians/ Society of Critical Care Medicine Consensus Conference*

ANRI- *Anthony Nolan Research Institute*

APC- *Antigen-Presenting Cell* – Célula Apresentadora de Antígeno

APACHE II- *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II*

AU- Adenilato/Uracilato

BASES- *Brazilian Sepsis Epidemiological Study*

bp- *Base pairs*

BCR- *B Cell Receptor*- Receptor de Célula B

bpm- batimentos por minuto

β2m- Beta 2 Microglobina

CARS- *Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome* – Síndrome da Reposta Anti-inflamatória Compensatória

C- Citosina

G- Guanina

DL- Desequilíbrio de Ligação

EHW- Equilíbrio de Hardy-Weinberg

HLA- *Human Leukocyte Antigen* - Antígeno Leucocitário Humano

HLA-G- *Human Leukocyte Antigen G*- Antígeno Leucocitário Humano G

HMGB1- *High Mobility Group Box-1* – Proteína de Alta Mobilidade-1

HWE- *Hardy-Weinberg Equilibrium*

ICU- *Intensive Care Unit*

IFN-γ- Interferon γ

Ig- Imunoglobulina

IL-1- Interleucina 1

IL-1β- Interleucina 1beta

IL-4- Interleucina 4

IL-5- Interleucina 5

IL-6- Interleucina 6

IL-8- Interleucina 8

IL-9- Interleucina 9

IL-10- Interleucina 10

IL-13- Interleucina 13

IL-17- Interleucina 17

IL-22- Interleucina 22

ILAS- Instituto Latino Americano de Sepse

KIR- *Kill Cell Immunoglobulin-like*

LD- *Linkage Disequilibrium*

LILR- *Leukocyte Immunoglobulin-like Receptors*

MHC- *Major Histocompatibility Complex-* Complexo de Histocompatibilidade Principal

MHC I- *Major Histocompatibility Complex I-* Complexo de Histocompatibilidade Principal de Classe I

MHC II- *Major Histocompatibility Complex II-* Complexo de Histocompatibilidade Principal de Classe II

MODS- *Multiple Organ Dysfunction Syndrome* – Síndrome da Disfunção de Múltiplos Órgãos

MOF- *Multiple Organ Failure* – Falência de Múltiplos Órgãos

NK- *Células Natural Killers*

NO- Óxido Nítrico

PaCO₂- Pressão parcial do Gás Carbônico (CO₂) no sangue arterial

pb – Pares de Bases

PPCP- *Phred-Phrap-Consed-Polyphred software*

Região 3' UTR- *3'Untranslated Region* - Região 3' Não Traduzida

sHLA-G- HLA-G solúvel

sIL- 2R- Receptor de IL-2 solúvel

SIRS- *Systemic Inflammatory Response Syndrome* – Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica

SOFA- *Sequential Organ Failure Assesment*

SNPs- *Single Nucleotide Polymorphims*

Tc- Célula T Citotóxica

TCR- *T Cell Receptor*- Receptor de Célula T

TGF- β - *Transforming Growth Factor Beta*- Fator Transformador de Crescimento Beta

Th- *T Helper Lymphocyte* - Linfócito T Auxiliar

Th1- *T Helper Lymphocyte Type I* - Linfócito T Auxiliar do Tipo 1

Th2- *T Helper Lymphocyte Type II* - Linfócito T Auxiliar do Tipo 2

Th9- *T Helper Lymphocyte Type 9* - Linfócito T Auxiliar do Tipo 9

Th17- *T Helper Lymphocyte Type 17* - Linfócito T Auxiliar do Tipo 17

Tregs- *T Regulatory Cells* - Células T Regulatórias

TNF- *Tumor Necrosis Factor* – Fator de Necrose Tumoral

TNF- α - *Tumor Necrosis Factor Alpha* – Fator de Necrose Tumoral Alfa

UTI- Unidade de Terapia Intensiva

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação dos genes de MHC no cromossomo 6.	19
Figura 2: A) Representação esquemática de estruturas não usuais de HLA-G. B) Representação esquemática das isoformas de HLA-G.....	20
Figura 3: Representação da relação entre os receptores de sHLA-G e as suas atividades imunoregulatórias.	21
Figura 4: Representação da inter-relação entre sepse, SIRS e infecção.	27
Figura 5: Patogênese da sepse.	27
Figura 6: SIRS e CARS durante a sepse.	29

RESUMO

Pacientes críticos são indivíduos internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) e se caracterizam por apresentar um quadro patológico crítico e complexo, decorrente de fragilidades fisiológicas graves, podendo evoluir para sepse, sepse severa, choque séptico ou óbito. Muitos recursos financeiros são investidos no controle da sepse em hospitais públicos e privados, e a sepse é a maior causa de morte entre as UTIs brasileiras. O desfecho de um paciente crítico é influenciado por vários fatores, entre eles, os genéticos. A molécula HLA-G apresenta variabilidade proteica limitada e expressão tecidual restrita. A interação entre moléculas de HLA-G e os receptores KIR e LILR desencadeia diversas atividades imunomodulatórias. Na região 3' UTR localizam-se os polimorfismos +2960INDEL, +3142C>G e +3187A>G que podem regular a expressão de HLA-G. Até o momento, apenas um estudo investigou a expressão de sHLA-G5 em pacientes críticos com choque séptico, e se observou que o aumento dos níveis de sHLA-G5 foram preditivos de sobrevivência entre os pacientes que evoluíram para choque séptico. O objetivo do presente trabalho foi determinar as frequências alélicas do polimorfismo +2960INDEL e dos seguintes SNPs: +3003C>T, +3010C>G, +3027A>C, +3142 C>G e +3187A>G, bem como avaliar a influência dessas variantes na evolução para sepse, choque séptico e óbito entre pacientes críticos.

Foram analisadas 698 amostras provenientes de pacientes críticos do Hospital São Lucas – PUCRS. O éxon 8 da região 3' UTR foi amplificado por PCR e encaminhado para sequenciamento direto (ABI 3730 XL DNA Sequencer). A inferência haplotípica foi determinada pelo *software* PHASE versão 2.1. A frequência haplotípica, desequilíbrio de ligação (DL), Equilíbrio De Hardy-Weinberg (EHW) e teste de heterozigosidade foram estimados pelo *software* ARLEQUIN versão 3.5. Os dados foram submetidos ao pacote estatístico SPSS versão 18.0.

Observaram-se as seguintes frequências alélicas e genotípicas, respectivamente: +2960INDEL, DEL= 0,578 e IN= 0,421, DELDEL= 0,310, DELIN= 0,536 e ININ= 0,152; +3003C>T, C= 0,109 e T= 0,890, CC= 0,012, CT= 0,194 e TT= 0,793; +3010C>G, CC= 0,521 e G= 0,478, CC= 0,250, CG= 0,540 e GG= 0,208; +3027A>C, A= 0,034 e C= 0,965, AA= 0,001, AC= 0,006 e CC= 0,932; +3035C>T, C= 0,861 e T= 0,141, CC= 0,733, CT=

0,255 e TT= 0,010; +3142C>G, C= 0,463 e G= 0,536, CC= 0,180, CG= 0,565 e GG= 0,253 e +3187A>G, A= 0,699 e G= 0,304, AA= 0,448, AG= 0,503 e GG= 0,048. Os polimorfismos +2960INDEL, +3010C>G, +3142C>G e +3187A>G não corresponderam ao EHW e apresentaram heteroziguidade observada maior do que a esperada. Os dois haplótipos mais frequentes foram DTGCCCCG (27,90%) e ITCCCGA (26,65%), confirmando a heterogeneidade da população brasileira. A região 3' UTR está sob seleção balanceadora, em que a seleção dos heterozigotos pode ser vantajosa, permitindo o balanço entre altas e baixas expressões de HLA-G, conforme o contexto biológico. Todos os sítios polimórficos apresentaram forte DL entre si. Entre os pacientes críticos que evoluíram para sepse, observou-se uma associação entre os portadores do alelo +2960IN e choque séptico (*Chi-Square*, $p= 0,036$). Entre os pacientes críticos, observou-se uma associação entre os portadores do haplótipo +2960IN_+3142G_+3187A e choque séptico (*Chi-Square*, $p=0,038$). E os pacientes críticos com sepse e portadores do haplótipo +2960IN_+3142G_+3187A (*Chi-Square*, $p=0,023$) também foram mais suscetíveis a evoluírem para choque séptico.

Observou-se, pela primeira vez, uma associação entre o haplótipo +2960IN_+3142G_+3187A e os desfechos de pacientes críticos. Mais estudos são necessários para confirmação desses resultados e outros parâmetros poderiam ser considerados, como níveis de IL-10 e glicocorticóides endógenos, além do perfil de citocinas liberado por pacientes críticos. Devido às propriedades imunomodulatórias descritas para a molécula de HLA-G, futuramente os seus polimorfismos e sua expressão poderiam ser empregadas em abordagens clínicas nos mais variados contextos imunológicos. A amostra estudada está de acordo com as frequências alélicas, genótípicas e haplotípicas observadas na população brasileira e novos polimorfismos poderiam ser investigados no éxon 8 da região 3' UTR do *HLA-G*.

Palavras-chave: HLA-G, pacientes críticos, choque séptico.

ABSTRACT

Critically ill patients are individuals hospitalized in Intensive Care Units (ICU) and are characterized by presenting pathologic complex conditions due to serious physiological weaknesses that may evolve to sepsis, septic shock or even death. Massive resources have been invested in sepsis control both in public and private sectors, although sepsis is still the major cause of death in Brazilians ICUs. Several factors influence the outcome of a critically ill patient, including genetic factors. HLA-G molecule is characterized by limited protein variability and restricted tissue expression. HLA-G binding to KIR and LILR receptors triggers various immunoregulatory activities. The *HLA-G* gene 3' UTR presents a 14 bp insertion/deletion at +2960, a SNP at +3142C>G and a SNP at +3187A>G that may regulate HLA-G expression. So far, only one study has investigated HLA-G expression in critically ill patients with septic shock, observing that increased sHLA-G5 levels were predictive of survival among septic shock patients. The aim of this study was to assess the frequencies of 14 pb insertion/deletion polymorphism at +2960INDEL, and the followings SNPs: +3003C>T, +3010C>G, +3027A>C, +3035C>T, +3142C>G and +3187A>G in exon 8 at the 3' UTR of the *HLA-G* gene and correlate these variants with different clinical outcomes in critically ill patients.

698 samples were obtained from ICU patients from São Lucas-PUCRS Hospital and the exon 8 at the 3' UTR of the *HLA-G* gene was sequenced. The haplotype inference was determined by PHASE version 2.1 software. Haplotype frequency, linkage disequilibrium (LD), Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) and heterozygosity test were estimated by ARLEQUIN version 3.5 software. The data were submitted to the package SPSS version 18.0 software.

The followings allelic and genotypic frequencies were observed, respectively: +2960INDEL, DEL= 0.578 and IN= 0.421, DELDEL= 0.310, DELIN= 0.536 and ININ= 0.152; +3003C>T, C= 0.109 and T= 0.890, CC= 0.012, CT= 0.194 and TT= 0.793; +3010C>G, CC= 0.521 and G= 0.478, CC= 0.250, CG= 0.540 and GG= 0.208; +3027A>C, A= 0.034 and C= 0.965, AA= 0.001, AC= 0.006 and CC= 0.932; +3035C>T, C= 0.861 and T= 0.141, CC= 0.733, CT= 0.255 and TT= 0.010; +3142C>G, C= 0.463 and G= 0.536, CC= 0.180, CG= 0.565 and GG= 0.253 and +3187A>G, A= 0.699 and G= 0.304, AA=

0.448, AG= 0.503 and GG= 0.048. The +2960INDEL, +3010C>G, +3142C>G and +3187A>G polymorphisms were not on HWE and had higher observed heterozygosity than expected. The two most frequent haplotypes were DTGCCCCG (27.90%) and ITCCCCGA (26.65%). The Brazilian population is a heterogeneous population, and these data agree with this statement. The 3' UTR is under balancing selection and heterozygote selection is advantageous, allowing the balance between high and low expression of HLA-G, according to the biological context. All polymorphic sites showed strong LD between them. Among critically ill patients who developed sepsis, there was an association between the allele +2960IN and septic shock (Chi-Square, $p = 0.036$). Among all critically ill patients, there was an association between carriers of the haplotype +2960IN_+3142 G_+3187A and septic shock (Chi-Square, $p = 0.038$). Critically ill patients with sepsis who carrier the haplotype +2960IN_+3142 G_+3187A were also more susceptible to progression to septic shock (Chi-Square, $p = 0.023$).

For the first time, an association between +2960IN_+3142G_+3187A haplotype and outcomes of critically ill patients was observed. More studies are needed to confirm these results and other parameters could be considered, as IL-10 and endogenous glucocorticoids levels and cytokine profile released by critically ill patients. Because of the immunomodulatory properties described for the HLA-G molecule, in future its polymorphisms and its expression could be used in clinical approaches in various immune contexts. These results are according to allelic, genotypic and haplotypic frequencies observed in Brazilian population, and new polymorphisms could be investigated in exon 8 at the 3' UTR of *HLA-G* gene.

Key-words: HLA-G, critically ill patients, septic shock.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Inflamação, Infecção e Imunidade

A inflamação caracteriza-se por envolver um conjunto de interações entre diversos tipos celulares e diversas moléculas em resposta a um dano tecidual, a uma infecção, ou a qualquer outro estímulo que inclua a ativação de leucócitos e ativação do endotélio vascular, transudação de fluido para dentro de tecidos, e diapedese de leucócitos (inicialmente de neutrófilos, seguidos por macrófagos) ao local afetado (Munford & Pugin, 2001). O dano tecidual pode ser causado por um trauma físico, um evento pós-isquêmico ou pode ser provocado por uma resposta autoimune (Nathan, 2002). Portanto, a inflamação é o processo desencadeado para a restauração da homeostase (Sirisinha, 2011), sendo um processo que leva à recuperação de uma infecção ou à cicatrização tecidual (Nathan, 2002). Os marcadores iniciais da resposta inflamatória localizada são hiperemia, vermelhidão, edema e dor, e quando há infecção, ocorre uma resposta defensiva direcionada ao patógeno (Munford & Pugin, 2001).

A inflamação, quando persiste, pode provocar uma oxidação do DNA a ponto de promover transformações neoplásicas (Nathan, 2002). A resposta inflamatória exacerbada pode induzir a um considerável dano tecidual (Sirisinha, 2011) e está associada à mortalidade e morbidade em doenças como artrite reumatóide, doença de Crohn, aterosclerose, diabetes, Alzheimer, esclerose múltipla e isquemia cerebral e miocárdica (Oke & Tracey, 2009). Nos casos em que há infecção, a inflamação exacerbada pode ser mais prejudicial do que o próprio estímulo inicial da infecção (Nathan, 2002; Oke & Tracey, 2009). Portanto, a magnitude da resposta inflamatória durante uma infecção é crucial para o organismo (Nathan, 2002).

Conforme o tempo e o estímulo da resposta inflamatória definem-se a resposta inflamatória aguda e a resposta inflamatória crônica. A inflamação aguda é de rápido início, é acompanhada por uma reação sistêmica conhecida como resposta de fase aguda e se desenvolve no instante da ação do agente lesivo, podendo durar poucas semanas (Corrêa, 2010). A resposta de fase aguda sistêmica é de ativação inespecífica (Straub, 2011), é induzida por citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina 1 (IL-1), TNF α (*Tumor Necrosis Factor Alpha* - Fator de Necrose Tumoral Alfa) e interleucina 6 (IL-6), e é

marcada pela indução de febre, aumento da síntese endógena de glicocorticóide, leucocitose e produção de proteínas de fase aguda no fígado (Cray *et al.*, 2009), como a proteína C reativa e a amilóide A sérica (Straub, 2011). A inflamação crônica é sempre precedida pela inflamação aguda, podendo durar meses, e se desenvolve quando a ativação imune persiste, podendo ocorrer em doenças autoimunes. Caracteriza-se por um grande acúmulo e ativação de macrófagos, que por sua vez liberam citocinas que promovem a proliferação de fibroblastos e maior síntese de colágeno (Corrêa, 2010).

O processo inflamatório é iniciado pelas células e moléculas da imunidade inata do organismo (Cray *et al.*, 2009). Nos casos de infecção, a imunidade inata é a primeira linha de defesa, desencadeando uma resposta via receptores de reconhecimento de padrões, que se caracteriza por ser de rápida ação (Fallavena *et al.*, 2009; Russell, 2006; Thurow *et al.*, 2010). É a partir da resposta imune inata que se inicia a resposta imune adaptativa (Cray *et al.*, 2009), sendo que a interação entre elas aumenta a efetividade da resposta imune.

A imunidade adaptativa, quando desencadeada em resposta a infecções, é altamente sofisticada com alta especificidade antigênica, alta diversidade e memória imunológica, tendo os linfócitos B e T responsáveis pelo reconhecimento de patógenos. O processo de ação celular da resposta imune adaptativa pode ser caracterizado pela: i) produção de anticorpos (resposta humoral) e ii) ação de linfócitos T, que também atuam na resposta humoral (Moser & Leo, 2010).

Os anticorpos ou imunoglobulinas (Ig) representam um grupo de proteínas produzido pelos linfócitos B, havendo cinco classes de anticorpos em humanos: IgA, IgG, IgE, IgD e IgM. Durante o desenvolvimento dos linfócitos B, na medula óssea, há a expressão de numerosas cópias de um único anticorpo em forma de receptor celular (BCR, *B cell receptor*), de modo que cada linfócito B maduro seja monoespecífico. Quando os BCRs de linfócitos B virgens reconhecem um antígeno associado a um segundo sinal de ativação, há uma rápida divisão dessas células, que resultam em células B de memória e em células B efetoras (células plasmáticas, que secretam anticorpos). Os anticorpos podem neutralizar as toxinas de bactérias, impedir a infectividade de vírus (inibindo a interação entre partículas virais e receptores celulares do hospedeiro) ou promover a defesa contra o patógeno pelo processo de opsonização.

Os linfócitos T desencadeiam uma resposta imune ao reconhecer peptídeos

antigênicos apresentados por células apresentadoras de antígenos (APC, *Antigen-Presenting Cell*). As APCs expressam moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, *Major Histocompatibility Complex*), que em humanos é referido como o complexo HLA (*Human Leukocyte Antigen*- Antígeno Leucocitário Humano). Os receptores de células T (TCR, *T Cell Receptor*) não são secretados e não interagem com antígenos solúveis. As células T que reconhecem peptídeos processados de origem extracelular, apresentados por MHC II (*Major Histocompatibility Complex II* - Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe II), expressam o marcador CD4, presente em células T auxiliares (Th, *T helper cell*). Essas células podem se diferenciar em muitos subtipos, entre eles Th1, Th2, Th17 e Th9.

O subtipo celular Th1 secreta interferon- γ (IFN- γ) citocina que promove o aumento da expressão de moléculas de MHC e exerce efeito antiviral. O INF- γ também promove a diferenciação de células T CD8⁺. O subgrupo celular Th2 produz interleucinas 4, 5 e 13 (IL-4, IL-5 e IL-13) e promove a ativação de eosinófilos e mastócitos, que geralmente, respondem à infecção por parasitas extracelulares. Um novo grupo de células foi identificado e denominado Th17 (Laurence & Shea, 2007). As células Th17 são uma subpopulação de células T CD4⁺ efectoras, sendo diferentes das células Th1 e Th2. Essa subpopulação celular secreta interleucina 17 e 22 (IL-17 e IL-22) em resposta à infecção por bactérias e fungos, além de estar associada à regulação imune local do intestino e do pulmão (Zhao *et al.*, 2011). A proliferação excessiva e disfunção de células Th17 pode aumentar a inflamação local, intensificando o dano no tecido. Estudos indicaram o envolvimento de células Th17 na patogênese de muitas doenças autoimunes e em condições inflamatórias, como a artrite reumatóide e lúpus eritematoso sistêmico (Abraham & Cho, 2009; Shahrara *et al.*, 2008). O subgrupo de células T efectoras mais recentemente descrito é o Th9 que secreta interleucina 9 (IL-9), estando associado aos processos de inflamações alérgicas e à resposta imune contra parasitas intestinais (Chang *et al.*, 2010; Veldhoen *et al.*, 2008). Outro subtipo distinto de células T CD4⁺ são as células Tregs (*T Regulatory Cells*- Células T Regulatórias), caracterizadas por expressarem os marcadores CD25 e Foxp3 (Sakaguchi *et al.*, 2007) e por desempenharem papel anti-inflamatório, mantendo a tolerância a componentes próprios do organismo (Zhao *et al.*, 2011).

As células T CD8⁺ são denominadas citotóxicas (Tc) e interagem com peptídeos antigênicos de origem intracelular apresentados por MHC I (*Major Histocompatibility Complex I*- Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe I). As moléculas de MHC classe I podem ser clássicas e não-clássicas. A molécula HLA-G (*Human Leukocyte Antigen G*- Antígeno Leucocitário Humano G) é considerada como pertencente às moléculas MHC classe I não clássicas.

1.2. Antígeno Leucocitário Humano G (HLA-G)

1.2.1. O Gene do HLA-G

O gene que codifica o HLA-G foi descrito pela primeira vez em 1987 (Geraghty *et al.*, 1987). Esse gene localiza-se no braço curto do cromossomo 6 (6p21.3), no locus do MHC I, o qual contém mais de 200 genes, representando cerca de 2,5% do cromossomo (NCBI, 2012) (**FIGURA 1**).

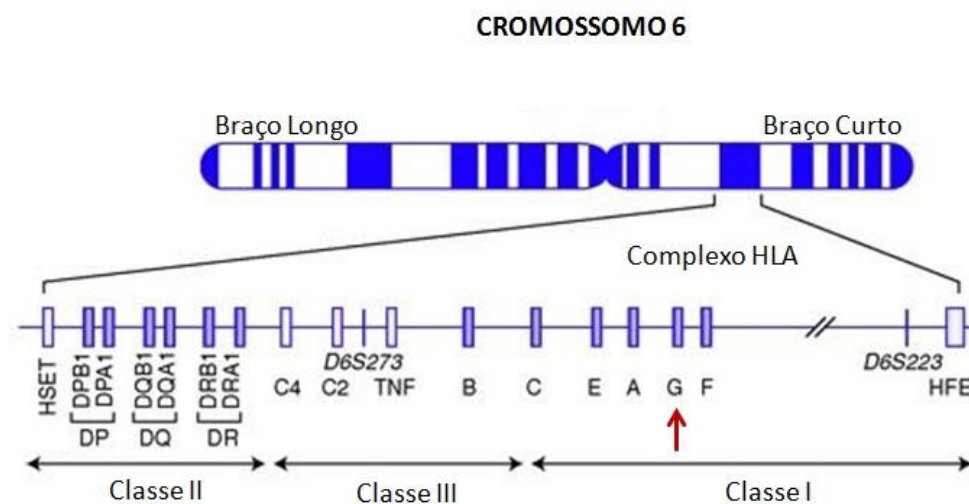


Figura 1: Representação esquemática da localização dos genes de MHC no cromossomo 6, com destaque para o HLA-G. Os genes de HLA-A, HLA-B e HLA-C são de moléculas clássicas, enquanto que os genes de HLA-E, HLA-F e HLA-G são de moléculas não-clássicas. Adaptado de Korf, 2006.

Até o momento, foram descritos para o HLA-G 47 alelos que codificam 15 proteínas, enquanto que HLA-A, -B, -C correspondem a 1.757 alelos e 1.290 proteínas,

2.338 alelos e 1.795 proteínas e 1.304 alelos e 904 proteínas, respectivamente, de acordo com *Anthony Nolan Research Institute* (ANRI, 2012). O polimorfismo do *HLA-G* está distribuído entre os três domínios alfa, ao longo da cadeia pesada, enquanto que nas outras moléculas de HLA os polimorfismos estão concentrados ao redor da fenda de ligação peptídica (Kamishikiryo & Maenaka, 2009). A molécula de HLA-G apresenta um arranjo estrutural que se assemelha às moléculas de HLA clássico de classe I, sendo que os três domínios alfa não estão covalentemente associados à cadeia β 2-microglobina (β 2-m) (Kamishikiryo & Maenaka, 2009). O *HLA-G* exibe baixo grau de polimorfismo na região codificadora, apresentando um padrão de expressão restrito em condições saudáveis, e possui uma característica única entre as moléculas de HLA, que é a formação de multímeros (Kamishikiryo & Maenaka, 2009; Veit *et al.*, 2010). O HLA-G pode formar os seguintes tipos de estruturas não usuais: i) dímero associado à ligação dissulfídica β 2m; ii) monômero de cadeia pesada livre de β 2m e iii) dímero em ligação dissulfídica livre de β 2m (**FIGURA 2A**). Os dímeros de HLA-G podem exibir um sinal de transdução cem vezes mais eficiente que monômeros de HLA-G (Kamishikiryo & Maenaka, 2009).

Sete diferentes isoformas protéicas de HLA-G foram descritas, que devido ao processo de *splicing* alternativo resultam em quatro ligantes de membrana (G1, G2, G3 e G4) e três isoformas solúveis (G5, G6 e G7) (**FIGURA 2B**) (Le Bouteiller, 1999; Moreau *et al.*, 1995; Paul *et al.*, 2000).

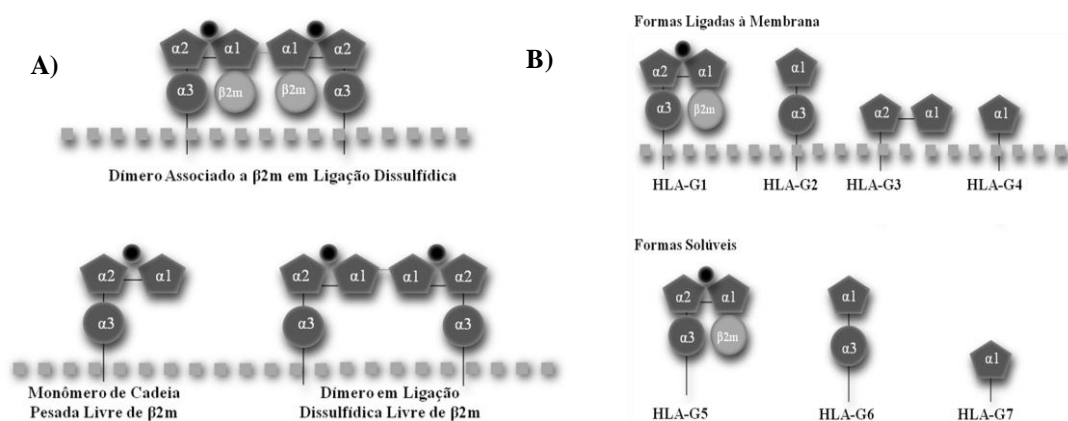


Figura 2: A) Representação esquemática de estruturas não usuais de HLA-G. B) Representação esquemática das isoformas de HLA-G.

Adaptado de Kamishikiryo & Maenaka, 2009.

Todas as isoformas apresentam, no mínimo, um domínio alfa e a isoforma G1 é a isoforma completa. Nas isoformas G5, G6 e G7 o íntron 4 não sofre *splicing* o que introduz um códon de término, e os domínios transmembrana e citoplasmático não são traduzidos, resultando na forma secretada (Fujii *et al.*, 1994; Ishitani & Geraghty, 1992; Kirszenbaum *et al.*, 1994).

A expressão de HLA-G é altamente tecido-específica, podendo ser expresso em tecidos fetais, como as células trofoblásticas e em células da medula do timo, córnea, ilhotas pancreáticas e precursores de células endoteliais de adultos (Veit *et al.*, 2010). As atividades imunoregulatórias mediadas por moléculas de HLA-G dependem da interação com receptores específicos.

1.2.2. HLA-G e seus Receptores

Os receptores que interagem com moléculas de HLA-G são os do tipo imunoglobulina leucocitário (LILR, *Leukocyte Immunoglobulin-like Receptors*) e os do tipo imunoglobulina de células *Natural Killer* (NK) (KIR, *Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors*) (Borges & Cosman, 2000; Gonen-Gross *et al.*, 2010; Selmani *et al.*, 2008; Veit *et al.*, 2010), desencadeando diferentes ações imunoregulatórias (**FIGURA 3**).

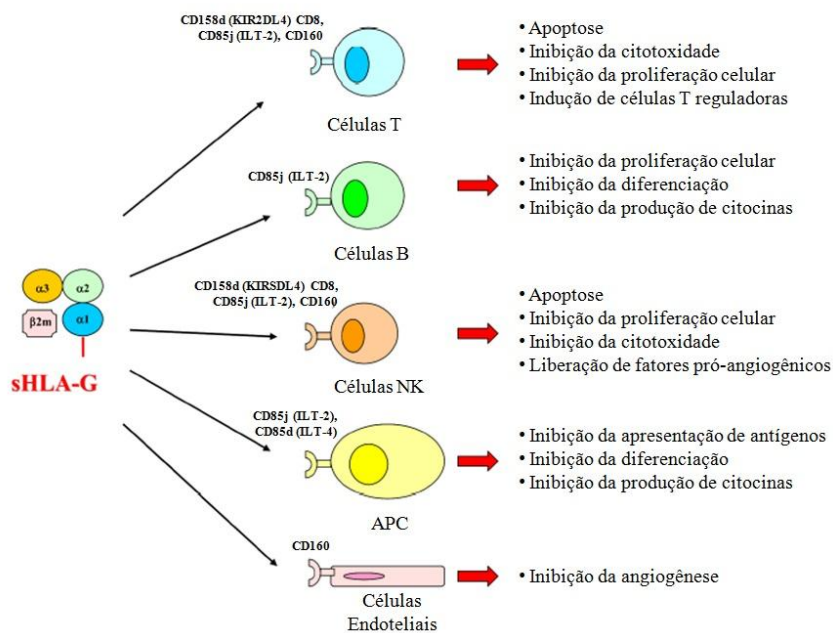


Figura 3: Representação da relação entre os receptores de sHLA-G e as suas atividades imunoregulatórias. Adaptado de Pistoia *et al.*, 2007.

Entre os receptores LILR estão LILR1 (ILT-2/CD85j) e LILR2 (ILT4/CD85d) classificados como inibidores. LILR1 é expresso por células B, algumas células T e células NK, macrófagos e monócitos (Gonen-Gross *et al.*, 2010; Kamishikiryo & Maenaka, 2009). LILR2 é específico de linhagens mielóides (Borges & Cosman, 2000).

O receptor KIR2DL4 (CD158d) pertence à família gênica KIR. Os genes de KIR codificam receptores baseados em tirosina (*receptor-ITIM*). O *receptor-ITIM* de “cauda” longa é um receptor inibidor, enquanto que o de “cauda” curta é um receptor ativador. Em quase todas as células NK e macrófagos há uma organização de receptores ativadores e inibidores que são expressos em suas superfícies, e o efeito funcional final dependerá do balanço entre esses dois tipos de receptores (Hsu *et al.*, 2002).

Outro tipo de receptor, o CD160, é expresso por células endoteliais, células T e células NK. Em experimentos *in vitro* e *in vivo* observou-se que sHLA-G1 inibiu a angiogênese pela indução de apoptose de células endoteliais, quando ligado ao receptor CD160 (Fons *et al.*, 2006).

1.2.3. HLA-G e as Células Supressoras

Moléculas de HLA-G podem exercer efeitos imunotolerogênicos a longo-prazo, quando associadas a células supressoras (Veit *et al.*, 2010).

O *HLA-G*, quando expresso em células alvo (trofoblasto, tecido transplantado, células tumorais) é capaz de inibir: i) a atividade citotóxica e mediar a apoptose de células T CD8⁺ e de células NK, ii) a resposta proliferativa de células T CD4⁺ e de orientá-las para um perfil imunossupressor e iii) a diferenciação de células apresentadoras de antígenos e células B (Carosella *et al.*, 2008b), além de participar do balanço entre Th1/Th2 através da polarização de resposta Th2 (Kanai *et al.*, 2001; Kapasi *et al.*, 2000).

Existem células Tregs que podem ser induzidas por HLA-G e células Tregs HLA-G⁺, que expressam em sua superfície HLA-G1 e secretam HLA-G5, mas não expressam CD25 e FoxP3 (específicos de Tregs). Essas células possuem um perfil de expressão de citocinas diferente de outras células Tregs, com expressão não aumentada de citocinas imunossupressoras, como IL-10 ou TGF- β (*Transforming Growth Factor Beta*- Fator de Crescimento Transformante Beta) e expressão reduzida de IFN- γ (Carosella *et al.*, 2008a).

Recentemente, foi demonstrado que as moléculas de HLA-G contribuem fortemente nas funções imunossupressoras de células-tronco mesenquimais de medula óssea adulta (Selmani *et al.*, 2008). As células-tronco mesenquimais foram descritas como secretoras da isoforma sHLA-G5. Bloqueando as moléculas de HLA-G5 há uma reversão na habilidade de células-tronco mesenquimais em: i) auxiliar a expansão, *in vitro*, de células Tregs CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, ii) inibir a proliferação de células T aloproliferativas e iii) suprimir a citólise por células NK (Carosella *et al.*, 2008c).

1.2.4. Regulação do HLA-G

A região promotora do *HLA-G* apresenta mais de 47 SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) identificados até o momento (NCBI, 2012), que potencialmente influenciam na regulação da expressão de HLA-G.

A região 3' UTR (*3' Untranslated Region*) também é de grande importância para a expressão de HLA-G por meio de mecanismos regulatórios pós-transcricionais. O polimorfismo de inserção de 14 pb (pares de bases) localizado na posição +2960 do éxon 8 tem sido bastante estudado devido a sua possível relação com o processo de *splicing* alternativo e estabilidade do mRNA. O transcrito que possui a inserção de 14 nucleotídeos sofre um passo adicional de *splicing* e há a remoção de 92 bases do mRNA. Essa remoção resulta em um mRNA mais estável *in vitro* (Rosseau, 2003). No entanto, mesmo sendo um transcrito mais estável *in vitro*, o genótipo IN/IN pode estar associado a uma menor expressão de HLA-G (Veit & Chies, 2009).

Ainda na região 3' UTR há 20 nucleotídeos que podem servir de sítio de ligação para microRNAs (miR-148a, miR-148b e miR-152). Essa região alvo apresenta um polimorfismo de substituição de uma C (citosina) por uma G (guanina) na posição +3142, o que poderia aumentar a afinidade de ligação de microRNAs, potencialmente reduzindo a expressão de HLA-G, pois o mRNA é degradado ou reprimido (Tan *et al.*, 2007).

Veit e Chies (2009) sugerem que existe uma divergência entre a estabilidade dos transcritos gerados pelos alelos que possuem a inserção de 14 pb e a baixa expressão de HLA-G *in vivo* associados a essa variante. “O Paradoxo do Polimorfismo de 14 pb” poderia ser explicado pela hipótese de que o polimorfismo +3142C>G é mais diretamente responsável por regular a expressão de HLA-G do que o polimorfismo de 14pb. Nesse

contexto, mesmo que um transcrito com inserção de 14 pb seja mais estável *in vitro*, se ele apresentar o alelo G do polimorfismo +3142 sua tradução não será eficiente, resultando em uma menor expressão de HLA-G devido à degradação ou repressão do mRNA.

O SNP +3187A>G também parece regular o controle pós-transcricional da expressão de HLA-G. Este polimorfismo localiza-se em uma região próxima aos motivos ricos em AU (adenilato/uracilato) e é um SNP com uma substituição de uma A (adenina) por uma G. O alelo A está associado a uma menor expressão de HLA-G, devido a uma maior degradação do mRNA (Yie *et al.*, 2008). Geralmente, o alelo +2960IN está acompanhado dos alelos +3142G e +3187A, previamente associados à baixa disponibilidade de mRNA (Castelli *et al.*, 2010; Hviid *et al.*, 2003).

Fatores epigenéticos também podem interferir a regulação transcricional do *HLA-G*. A transcrição do gene pode ser inibida pela metilação do DNA (Moreau *et al.*, 2003).

1.2.5. Estudos com HLA-G

O HLA-G é uma molécula que tem se destacado em muitas linhas de pesquisas em diferentes áreas que envolvem o processo inflamatório.

Acredita-se que o HLA-G seja uma peça fundamental para que a gravidez seja bem-sucedida (Gonzalez *et al.*, 2010; Ober *et al.*, 2003; Vianna *et al.*, 2007). Há evidências que sugerem que moléculas de HLA-G interagem com os receptores inibidores KIR de células NK maternas (Rouas-Freiss *et al.*, 1997), e são capazes de induzir células Tregs pela diferenciação de células T virgens, ou pela conversão temporária de células T em células T HLA-G⁺ supressoras (Carosella *et al.*, 2008c), auxiliando o sucesso de implantação e desenvolvimento do embrião. A interação HLA-G-KIR também regula a secreção de citocinas e fatores angiogênicos, o que favorece a vascularização (Shakhawat *et al.*, 2010). O HLA-G está envolvido na indução da expressão de citocinas Th2 com perfil anti-inflamatório (IL-4, IL10 e IL-13), diminuindo a expressão de citocinas Th1 com perfil pró-inflamatório (IL-2, TNF- α e IFN- γ) (Le Bouteiller, 1999). Falhas na interação entre as moléculas de HLA-G do trofoblasto e monócitos/macrófagos ativados presentes na interface materno-fetal, podem aumentar a citólise, causando injúria celular e aumentando a produção de citocinas pró-inflamatórias (Shakhawat *et al.*, 2010), resultando em complicações na gestação.

Em transplantes, o HLA-G foi associado a um menor risco de desenvolver rejeição crônica e aguda do enxerto. Sugere-se que o HLA-G poderia interferir na atividade de células T CD8⁺ e células NK, aumentando a sobrevida do transplantado (Deschaseaux *et al.*, 2011). Concentrações aumentadas de HLA-G no plasma de pacientes transplantados com coração e transplante combinado de rim e fígado foram associadas a uma menor incidência de rejeição aguda ou crônica (Lila *et al.*, 2007; Naji *et al.*, 2007).

O HLA-G já foi correlacionado a diversos tipos de neoplasias (Amiot, 2003; Gros *et al.*, 2006; Leleu, 2005; Morandi *et al.*, 2007; Pistoia *et al.*, 2007; Schütt *et al.*, 2010; Ugurel *et al.*, 2001; Ye *et al.*, 2007). Sugeriu-se que o HLA-G auxilia os tumores a escaparem da resposta imune do hospedeiro, também através da inibição da citólise mediada por células NK e células T (Donadi *et al.*, 2011).

Em infecções virais, a expressão de HLA-G é um processo modulado por muitos fatores, tais como: polimorfismos do *HLA-G*, estágio da infecção, terapia medicamentosa, e padrão de expressão de citocinas, o qual pode contribuir com o contexto imunológico, afetando o desfecho da infecção (Donadi *et al.*, 2011). As investigações que foram conduzidas sobre o papel do *HLA-G*, após infecção por vírus, apontam que há indução da expressão de HLA-G pelas células infectadas, o qual poderia ser um mecanismo adicional que auxiliaria o vírus a subverter as defesas do hospedeiro (Aikhionbare *et al.*, 2006; Carosella *et al.*, 2008c; Chen *et al.*, 2011; Cordero *et al.*, 2009; Fabris *et al.*, 2009; Lajoie *et al.*, 2006; Matte *et al.*, 2004; Souto *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2009).

Diversos estudos foram conduzidos em doenças inflamatórias, sugerindo um representativo envolvimento do *HLA-G*. Estudos com polimorfismos do *HLA-G* demonstraram ter associação nas seguintes doenças inflamatórias: colite ulcerosa e ressecção ileocecal em doença de Crohn (Glas *et al.*, 2007), artrite idiopática juvenil (Veit *et al.*, 2008), asma (Tan *et al.*, 2007), sarcoidose (Hviid *et al.*, 2003), doença de Behcet (Park *et al.*, 2007), cardiopatia dilatada idiopática (Lin *et al.*, 2007), pemphigus vulgaris (Gazit, 2004) e lúpus eritematoso sistêmico (Veit *et al.*, 2009). A expressão de HLA-G também foi associada à doença celíaca (Torres *et al.*, 2006), rinite alérgica sazonal e perene (Ciprandi *et al.*, 2009), esclerose múltipla (Mitsdoerffer *et al.*, 2005), artrite reumatóide (Verbruggen *et al.*, 2006), esclerose sistêmica (Wastowski *et al.*, 2009), asma (Nicolae *et al.*, 2005), lúpus eritematoso sistêmico (embora haja controvérsia na associação) (Rizzo *et al.*, 2005).

al., 2008; Rosado *et al.*, 2008), Doença de Huntington (Forrest *et al.*, 2010) e psoríase (Cardili *et al.*, 2010).

Recentemente, Fainardi e colaboradores (2010) sugeriram que sHLA-G desempenha um papel imunoregulatório em pacientes que tiveram hemorragia intracerebral espontânea.

Até o momento, existe apenas um artigo publicado que relaciona HLA-G e choque séptico. Monneret e colaboradores (2007) demonstraram a associação entre as concentrações de sHLA-G5 e sobrevida de pacientes sépticos. A expressão de sHLA-G5 em pacientes que sofreram choque séptico pode ser considerada um preditivo de sobrevivência, hipótese sustentada pelas propriedades imunossupressoras do HLA-G. Portanto, mais estudos nessa área são necessários.

Considerando que a inflamação exacerbada é uma das condições que caracteriza a sepse, a sepse severa e o choque séptico, e que o HLA-G é descrito como um agente imunomodulatório, estudar o seu papel em pacientes críticos poderia contribuir para uma melhor compreensão da inflamação em um contexto orgânico, cuja homeostase está severamente alterada.

1.3. Sepse, Sepse Severa e Choque Séptico

Os pacientes críticos são indivíduos internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) e caracterizam-se por apresentar um quadro patológico crítico e complexo, decorrente de fragilidades fisiológicas graves (Vincent, 2002), podendo evoluir para sepse, sepse severa, choque séptico ou óbito. Os diagnósticos da sepse, sepse severa e choque séptico são baseados nos critérios do *American College of Chest Physicians/ Society of Critical Care Medicine Consensus Conference* (ACCP/SCCM) (Bone *et al.*, 1992).

A sepse é a ocorrência de uma inflamação sistêmica causada pela presença de uma infecção ou pela evidência clínica de uma infecção (**FIGURA 4**). A síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS, *Systemic Inflammatory Response Syndrome*) é definida pela presença de, no mínimo, dois dos seguintes parâmetros: i) febre ou hipotermia (temperatura corporal $> 38^{\circ}\text{C}$ ou $< 36^{\circ}\text{C}$), ii) taquicardia (ritmo ventricular > 90 batimentos por minuto (bpm)), iii) taquipneia ou hiperventilação (> 20 respirações/min ou PaCO_2 (pressão parcial

de CO₂ no sangue arterial) < 32 mmHg), iv) leucocitose ou leucopenia. A patogênese da sepse pode ser melhor compreendida pelo fluxograma da **FIGURA 5**.

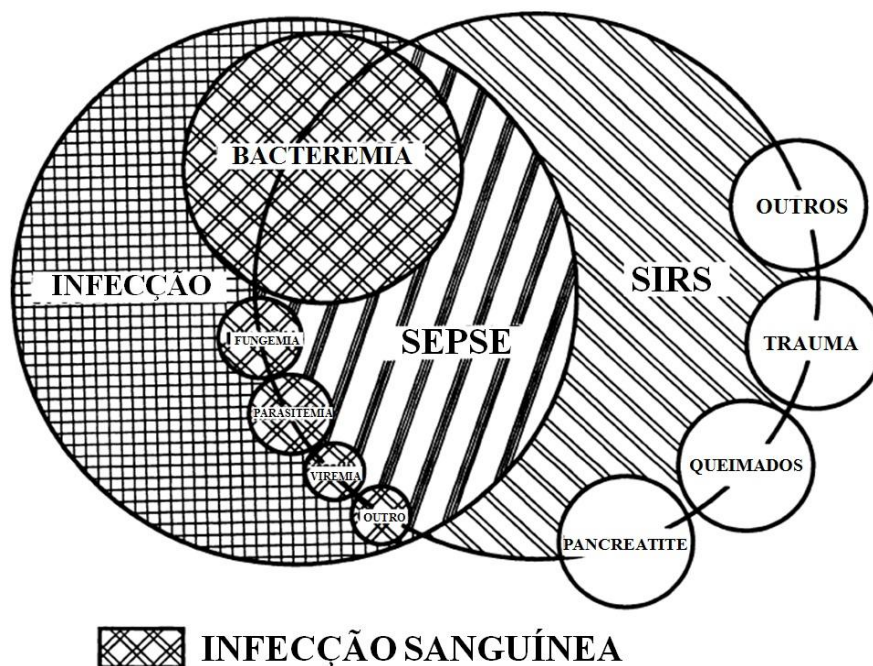


Figura 4: Representação da inter-relação entre sepse, SIRS e infecção. Adaptado de Bone *et al.*, 1992.



Figura 5: Patogênese da sepse. Adaptado de Buras *et al.*, 2005.

A sepse severa é definida como a ocorrência conjunta de sepse e disfunção de órgãos e hipotensão, ou pela ocorrência conjunta de sepse e disfunção de órgãos e hipoperfusão tecidual sistêmica. A hipotensão e anormalidades na perfusão podem acarretar acidose láctica, oligúria e distúrbios neuro-comportamentais ocasionados pela alteração aguda do nível mental (delírios). O choque séptico é caracterizado como a ocorrência

conjunta de sepse ou sepse severa e hipotensão e hipoperfusão. A hipotensão ou hipoperfusão induzidas pela sepse podem resultar em complicações circulatórias e o desenvolvimento da falência de múltiplos órgãos (MOF, *Multiple Organ Failure*) ou em síndrome de disfunção de múltiplos órgãos (MODS, *Multiple Organ Dysfunction Syndrome*).

A definição de sepse já foi considerada como muito ampla por englobar grupos heterogêneos de pacientes com sintomatologias semelhantes, mas que não necessariamente sofrem das mesmas desordens (Ulloa & Tracey, 2005). A proposta de uma definição diferente baseia-se no perfil de citocinas secretadas para se definir choque séptico e sepse severa. Os autores apontaram o TNF como mediador principal de choque séptico, e a proteína HMGB1 (*High Mobility Group Box-1* – Proteína de Alta Mobilidade-1) como mediadora principal de sepse severa.

A MOF é caracterizada pela deteriorização aguda da função de dois ou mais órgãos. Geralmente, os órgãos envolvidos são os rins, o coração, os pulmões e o fígado (Silva *et al.*, 2004). O score SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*) é realizado diariamente em pacientes críticos e consiste em um sistema de pontuação baseado na avaliação de seis sistemas orgânicos (respiratório, renal, hepático, hematopoiético, cardiovascular e neurológico) (Vincent *et al.*, 1998). A severidade do comprometimento fisiológico de pacientes críticos é avaliada pelo APACHE II (*Acute Physiology And Chronic Healthy Evaluation II*) (Knaus *et al.*, 1985) no momento de admissão na UTI.

O estágio inicial da sepse (Fase Hiperdinâmica) caracteriza-se pela ativação intensa de citocinas pró- e anti-inflamatórias, que nesse momento, encontram-se em maior concentração *in situ* do que na circulação sistêmica (Boontham *et al.*, 2003). Também há um aumento nos níveis séricos de proteína C-reativa que se acredita ser a responsável pela ativação das espécies reativas de oxigênio e da produção de óxido nítrico (NO) (Akira, 2004).

O estágio tardio da sepse (Fase Hipodinâmica) é marcado pela liberação de citocinas que reprimem o efeito pró-inflamatório da Fase Hiperdinâmica. No final desse estágio, há diminuição da fagocitose pelos macrófagos, diminuição da quimiotaxia, diminuição da produção de citocinas e diminuição de radicais livres. Se a resposta inflamatória não for contida, a concentração de mediadores pró e anti-inflamatórios passa a ser alta na circulação sistêmica (Boontham *et al.*, 2003).

A sepse depende do equilíbrio entre a SIRS e a síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória (CARS, *Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome*) (**FIGURA 6**). A produção excessiva e desregulada de citocinas pró-inflamatórias gera um efeito deletério, resultando em: i) permeabilidade microvascular aumentada, ii) formação de grumos plaquetários causadores da má distribuição sanguínea, podendo resultar em isquemia tecidual e hipóxia celular, iii) profunda vasodilatação, iv) transudação de fluidos, que resulta em mau funcionamento circulatório e choque. Se a homeostase não for rapidamente restaurada pode ocorrer significativa disfunção e eventual falha orgânica (Boontham *et al.*, 2003).

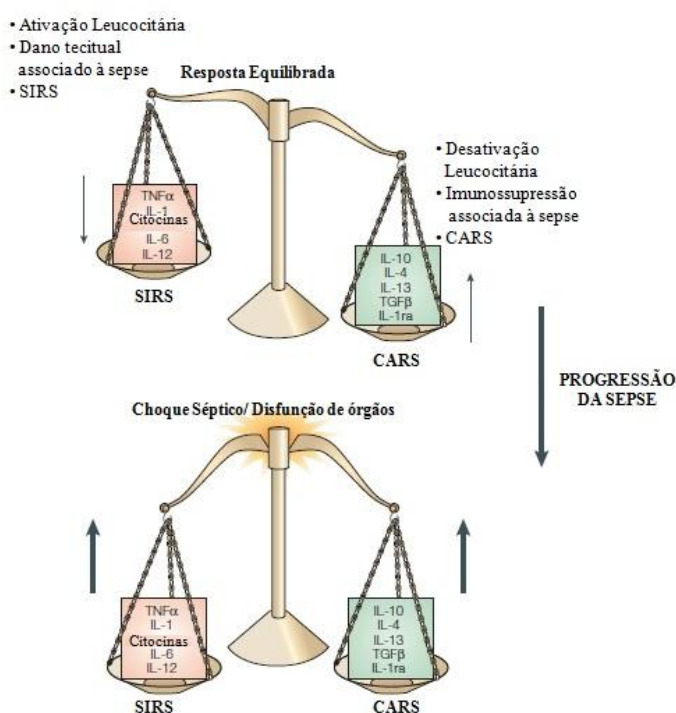


Figura 6: SIRS e CARS durante a sepse.
Adaptado de Buras *et al.*, 2005.

As citocinas anti-inflamatórias regulam a resposta inflamatória inibindo o sistema imune, entretanto, se a CARS também for inapropriada ou excessiva, poderá haver uma persistência da imunossupressão, prolongando a sepse e a disfunção orgânica (Boontham *et al.*, 2003).

A liberação da cascata de citocinas na sepse inicia com a produção de TNF- α e IL-1 β (interleucina 1 beta) em resposta a dano tecidual ou à presença de infecção. Essas

citocinas são as principais responsáveis por mediar grande parte dos distúrbios patofisiológicos da sepse, pois atuam sinergicamente tanto na indução de produção das citocinas IL-6 e IL-8, bem como das citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10 e IL-13) (Blackwell & Christman, 1996).

Nos Estados Unidos foi realizado um estudo de coorte multicêntrico, envolvendo aproximadamente 500 hospitais, totalizando 12.505.082 casos de sepse e 3.831.394 casos de sepse severa entre os anos de 1979 e 2003. Observou-se uma variabilidade sazonal na incidência e na fatalidade para os casos de sepse e sepse severa, com uma maior incidência de casos durante o inverno. Paralelamente, durante o inverno houve um aumento significativo de infecções respiratórias de origem viral. O aumento da incidência de sepse no inverno poderia ser explicado, em parte, pela maior suscetibilidade em se contrair infecções respiratórias de origem viral (Danai *et al.*, 2007).

Outro estudo multicêntrico realizado na França, com 3.738 pacientes críticos, demonstrou uma incidência de sepse severa e de choque séptico de 14,6% e taxa de mortalidade de 35% em até 30 dias (Brun-Buisson *et al.*, 2004). Na Europa um estudo multicêntrico envolvendo 24 países indicou, entre pacientes críticos, a incidência de sepse em 37% e uma taxa de 24,1% de mortalidade hospitalar geral. Entre os pacientes com sepse severa a mortalidade foi de 32,2% e entre os pacientes com choque séptico a mortalidade foi de 54,1% (Vincent *et al.*, 2006). Um estudo nos Estados Unidos estimou a incidência de sepse em 751.000 casos por ano, correlacionando a idade do paciente à incidência e à mortalidade (Angus *et al.*, 2001).

No Brasil, em 2004, foi realizado o estudo BASES (*Brazilian Sepsis Epidemiological Study*) envolvendo cinco UTIs dos estados de São Paulo e Santa Catarina. A incidência de sepse foi de 46,9%, de sepse severa de 27,3 % e de choque séptico de 23%. As taxas de mortalidade foram de 33,9%, 46,9% e 52,2%, respectivamente (Silva *et al.*, 2004). Outro estudo realizado no sul do Brasil, entre os anos de 2003 e 2004, em pacientes admitidos na UTI do Hospital São Lucas-PUCRS, demonstrou a incidência de 30% de choque séptico e uma taxa de mortalidade de 66,5% entre esses pacientes (Dias *et al.*, 2007).

A sepse é a doença que mais gera custos, tanto em setores públicos como em setores privados, e é a principal causa de morte nas UTIs brasileiras e uma das principais causas de

mortalidade hospitalar tardia, superando o infarto agudo do miocárdio e o câncer, segundo o Instituto Latino Americano de Sepse (ILAS, 2012). Há uma enorme necessidade de utilização de equipamentos sofisticados, medicamentos caros e existe uma grande demanda de equipes médicas. No Brasil, em 2003, foram gastos cerca de R\$ 17,34 bilhões em tratamentos, sendo que foram registrados 398.000 casos de sepse e 227.000 óbitos decorrentes de choque séptico (ILAS, 2012). Em conjunto, a MOF e a MODS são responsáveis por 25% da ocupação de leitos nas UTIs deste país. A cada 100 pacientes que desenvolvem sepse no Brasil, 65 evoluem para óbito, enquanto que em outros países este número está entre 30 e 40 óbitos (ILAS, 2012).

1.4. Justificativa

Visto que diversos estudos demonstraram o caráter imunomodulatório do *HLA-G* em diversos contextos, e que a regulação da sua expressão está também relacionada às suas variantes polimórficas, o estudo de polimorfismos do éxon 8 da região 3' UTR do *HLA-G* poderia auxiliar no entendimento dos diferentes desfechos em pacientes críticos.

Nossa hipótese biológica é que indivíduos portadores de haplótipos associados a uma menor produção de *HLA-G*, em condições fisiológicas críticas, teriam uma maior probabilidade de evoluir para um desfecho negativo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar as variantes polimórficas do éxon 8 da região 3' UTR do gene que codifica o HLA-G para os diferentes desfechos clínicos em pacientes críticos.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Descrever as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas do polimorfismo de inserção de 14 pb na posição +2960 (rs1704), bem como dos SNPs localizados nas regiões +3003C>T (rs1707), +3010C>G (rs1710), +3027A>C (rs17179101), +3035C>T (rs17179108), +3142C>G (rs1063320) e +3187A>G (rs9380142) do éxon 8 da região 3' UTR do gene que codifica o HLA-G em pacientes críticos.

2.2.2. Analisar se essas variantes polimórficas influenciam a suscetibilidade à sepse em pacientes críticos.

2.2.3. Analisar se essas variantes polimórficas influenciam a suscetibilidade ao choque séptico em pacientes críticos.

2.2.4. Analisar se essas variantes polimórficas influenciam a suscetibilidade às disfunções orgânicas em pacientes críticos.

2.2.5. Analisar se essas variantes polimórficas influenciam no óbito de pacientes críticos.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo em fase de preparação para ser submetido à revista *Critical Care*.

POLYMORPHIC VARIANTS IN EXON 8 AT THE 3' UTR OF *HLA-G* GENE ARE ASSOCIATED WITH SEPTIC SHOCK IN CRITICALLY ILL PATIENTS

Pietra Graebin^{1,2}, Tiago Degani Veit¹, Clarice Sampaio Alho² and José Artur Bogo Chies^{1*}

1. Laboratory of Immunogenetics of Federal University of Rio Grande do Sul - 9500, Bento Gonçalves Av., - Building 43323 // Room 212, Porto Alegre, RS, Brazil
2. Laboratory of Human and Molecular Genetics of Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, 6681, Ipiranga Av., Building 12C, Porto Alegre, RS, Brazil

*Correspondence: jabchies@terra.com.br

Abstract

Introduction: Critically ill patients are characterized as individuals hospitalized in Intensive Care Unit and can evolve to sepsis, septic shock or even death. Among others, genetic factors can influence the outcome of critically ill patients. HLA-G is a non-classical class Ib molecule that has limited protein variability, presenting seven isoforms generated by alternative splicing, and presents immunomodulatory properties. Polymorphisms at the 3'UTR are thought to influence *HLA-G* gene expression. It was previously observed that increased sHLA-G5 levels were predictive of survival among septic shock patients. We assessed the frequencies of 7 polymorphisms in exon 8 at the 3' UTR of *HLA-G* and associated these variants with different clinical outcomes in critically ill patients.

Methods: Exon 8 at the 3' UTR of the *HLA-G* gene from 698 critically ill subjects was amplified by PCR and sequenced. Genotypes were identified using FinchTV software v.1.4.0 and the most probable haplotype constitution of each sample was determined by PHASE software v.2.1. Haplotype frequencies, linkage disequilibrium, heterozygosity test and Hardy-Weinberg Equilibrium were estimated using ARLEQUIN software v.3.5.

Results: Among all critically ill patients, an association between carriers of the +2960IN_+3142 G_+3187A haplotype and septic shock ($p = 0.038$) was observed. We also observed a significantly higher frequency of +2960IN allele in septic patients who developed septic shock ($p = 0.036$). Septic patients who carried the +2960IN_+3142 G_+3187A haplotype presented an increased risk for septic shock ($p = 0.023$).

Conclusions: The present study showed, for the first time, a relationship between polymorphisms in exon 8 at the 3' UTR of *HLA-G* gene and outcomes of critically ill patients. These results may be important for understanding the mechanisms evolved on evolution to septic shock in critically ill patients.

Key-words: 3' UTR of *HLA-G* polymorphisms, critically ill patients, septic shock.

Introduction

Critically ill patients are individuals hospitalized in Intensive Care Unit (ICU) and can evolve to sepsis, septic shock, death or even survive [1]. Massive resources have been invested in sepsis control, either in public or private sectors, and sepsis is the major cause of death in Brazilians ICUs according to ILAS (Instituto Latino Americano de Sepse) [2]. Several factors influence the outcome of critically ill patients, including different degrees of inflammatory response to infections and genetic factors [3]. HLA-G is a non-classical class Ib molecule and differs from classical class I molecules mainly due to a limited protein variability, presence of seven isoforms (HLA-G1-4 membrane bound-forms and HLA-G5-7 soluble forms) generated by alternative splicing [4] and by its immunomodulatory properties [5]. HLA-G molecules through binding to specific receptors (ILT-2 (LILRB1 and CD85j) [6], ILT-4 (LILRB2 and CD85d) [7] and KIR2DL4 (CD158d) [8]) can inhibit the cytotoxic activity and mediate apoptosis of CD8 + T cells and NK cells, the proliferative response of CD4 + T cells and target them for an immunosuppressive profile and the differentiation of antigen-presenting cells and B cells [9], besides to be involved in Th1/Th2 balance [10, 11].

In non-pathological conditions, HLA-G expression is highly tissue-specific and can be detected in trophoblast cells, medullary cells of the thymus, cornea, pancreatic islets and adult endothelial cells precursors [12]. HLA-G molecule has been implicated in several conditions, such as pregnancy [13-15], acceptance of allograft [16-18], evasion of tumors [19-24] or viral infections [25-32] from immune response, inflammatory autoimmune diseases [33-47] and spontaneous intracerebral hemorrhage [48]. So far, only one study has

investigated HLA-G expression in critically ill patients with septic shock, observing that increased HLA-G5 levels were predictive of survival among septic shock patients [49].

The *HLA-G* (Human Leukocyte Antigen G) gene is located in the HLA complex at the 6p21.3 chromosome region, encompassing more than 200 genes [50, 51]. *HLA-G* gene expression is regulated by several factors which were not yet completely elucidated, and both its long promoter region as well as its 3' untranslated region (UTR) are supposed to play important roles in this process. Of note, the 3' UTR contains eight polymorphisms, most of which localized at putative miRNA binding sites [52, 53]. In the present study, we assessed the allelic and genotypic frequencies of the 14 pb insertion/deletion (INDEL) polymorphism at +2960 (rs1704), and the followings SNPs: +3003C>T (rs1707), +3010C>G (rs1710), +3027A>C (rs17179101), +3035C>T (rs17179108), +3142C>G (rs1063320) and +3187A>G (rs9380142) and sought to associate these variants with different clinical outcomes in critically ill patients.

Material and Methods

Patients

All blood samples were obtained from 698 ICU patients from Hospital São Lucas of Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) between 2004 and 2010, located in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, the Southernmost state of Brazil. Definition of sepsis and septic shock followed the American College of Chest Physicians/ Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee criteria [54]. Sepsis is defined as the occurrence of systemic inflammatory response syndrome (SIRS) caused by the presence of infection or clinical evidence of infection. SIRS is manifested by two or more of the

following: fever (temperature $> 38.0^{\circ}\text{C}$) or hypothermia (temperature $< 35.5^{\circ}\text{C}$), tachycardia (> 90 beats/min), tachypnea (> 20 breaths/min), leukocytosis or leukopenia (white blood cell count > 12.000 or < 4.000 cells/ μl). Septic shock is defined as the presence of SIRS, documented infection or positive blood culture or organ dysfunction, hypoperfusion abnormality or hypotension. The definition of hypotension is systolic blood pressure < 90 mm Hg or a reduction in systolic blood pressure of 40 mm Hg.

The following criteria were applied to the exclusion of patients in this study: I) HIV-positive patients, II) pregnancy and III) patients receiving immunosuppressive therapy. Also, patients readmitted in ICU and previously collected were not reincluded in the study. Social and demographic data (age, sex, length of stay in ICU and hospital) and clinical data (dysfunction and failure of six organ systems during the first week of ICU admission - SOFA score - and physiological variables on the day of ICU admission - APACHE II score) were obtained from all patients, besides the occurrence of sepsis, septic shock and death.

The protocol of the study was approved by the PUCRS Ethics Committee (CEP-11/05593) and all patients or their surrogates gave written informed consent before blood withdrawal.

3' UTR Analysis

The genomic DNA was extracted according to Lahiri and Nurnberger (1991) [55]. Exon 8 at the 3' UTR of *HLA-G* gene of each sample was amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) (primers HLA-G8F: 5' TGTGAAACAGCTGCCCTGTGT3' and HLA-G8R: 5'GTCTTCCATTTATTTTGTCTCT 3') [56]. Amplification was performed in a final volume of 25 μl containing 0.2 mM of each dNTP; 1.5 mM MgCl_2 ; 10 pmol/ μl of

each primer; 1 unit of Taq Platinum High Fidelity in 1X PCR specific Buffer (Invitrogen-Life Technologies, São Paulo, Brazil) and 10-100 ng of genomic DNA. The initial denaturation cycle was carried out at 94°C for 5 min; followed by 35 cycles at 95°C for 45 s; 56°C for 45 s; 72°C for 1 min and by final extension step at 72°C for 7 min. The amplification product was quantified (10-50 ng/ μ l) by Low Mass (Invitrogen-Life Technologies, São Paulo, Brazil) in 1% agarose gel. Fragments with 14 bp insertion presents 361 pb. PCR products were directly sequenced using the primer HLA-G8R: 5'GTCTTCCATTTATTTGTCTCT 3' by ABI 3730 XL DNA Sequencer according to the manufacturer's manual. Genotyping was performed by interpretation of chromatogram peaks by sequencing FinchTV software version 1.4.0. The

PHASE software version 2.1 [57, 58] was used to determinate the most probable haplotype constitution of each sample. Six independents runs with different seed values provided the same results by PHASE methods. The lowest probability value was between 0.9650 and 1.0000. Haplotype frequencies, linkage disequilibrium (LD), heterozygosity test and Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) were defined using ARLEQUIN software version 3.5 [59].

Statistical Analysis

Statistical calculations were performed using statistical package SPSS 18 (SPSS 18.0 for Windows, Chicago, Illinois, USA). Unless otherwise stated, continuous variable results were expressed as mean \pm standard deviation (SD), and categorical variables as frequencies and percents. Means were compared using one-way analysis of variance, and non-normally distributed variables were analyzed as non-parametric using Mann-Whitney

test. For the categorical data we used Pearson Chi-Square test. All reported p-values are two-tailed and considered statistically significant when 0.05 or less.

Results and Discussion

The median age among all critically ill 698 patients (52.7% male and 47.3% female) was 57 years (13_{min}/97_{max}). 73.5% (n= 469) of all critically ill patients developed sepsis, 51.6% (n= 329) progressed to septic shock, 32.9% (n= 210) died in the ICU and 45.7% (n=290) was the mortality rate in ICU+Hospital (ICU plus hospital).

Allelic, Genotype, Haplotype and Diplotype Frequencies

Table 1 presents allelic and genotypic frequencies of polymorphisms in critically ill patients. These frequencies are in agreement with others studies in similar Brazilian populations [60, 61]. Therefore, our sample is representative of the southern Brazil population, with a major contribution of European ancestry [61, 62].

The heterozygosity test indicated an observed heterozygosity higher than expected at the +2960INDEL, +3010C>G, +3142C>G and +3187A>G (**TABLE 1**) polymorphisms. These polymorphisms were not on HWE. Castelli et al. (2011) also reported disagreement on HWE for +2960INDEL polymorphism in a Brazilian population. It is interesting to point out that the diversity of the *HLA-G* locus is eight times higher than the average of the diversity of the human genome [63]. Moreover, among the regions of *HLA-G*, the 3' UTR region shows more diversity than the promoter and the 5' upstream regulatory regions (5'URR) [60].

A strong LD was observed between all polymorphic sites (p<0.01, data not shown), which is consistent with the literature [56], except between the +3027A>C and +3003C>T

SNPs. According to the PHASE software, there were 22 different inferred haplotypes among critically ill patients. The most frequent haplotypes were UTR-1 (27.90%), UTR-2 (26.65%), UTR-3 (10.42%), UTR-5 (10.03%) and UTR-4 (8.93%) (haplotypic nomenclature according to [56]). The two most frequent haplotypes observed among critically ill patients were also the most frequent in populational studies with Southern Brazilian healthy populations [56, 60, 61]. Also, we observed 64 different diplotypes, with the DTGCCCG/ITCCCGA (UTR-1/UTR-2) diplotype being the most frequent among critically ill patients (15.8%). Assuming that Brazilian population is a heterogeneous population [60], due to its colonization history [61, 62], this diversity was expected. Furthermore, it was already suggested, and our data also support this view, that this region is under balancing selection, in which there is a selection of heterozygote [60, 63]. The selection of heterozygote could be evolutionarily advantageous since it could promote a balance between high and low HLA-G expression, according to the biological context.

Polymorphic Variants of HLA-G and Outcomes of Critically Ill Patients

Possible outcomes considered were sepsis, septic shock, ICU mortality and ICU+Hospital mortality. The genotypes of each SNP were tested separately for progression to sepsis, septic shock, organ dysfunction (SOFA 1-7 day score, SOFA 15 day score and SOFA 29 day score), death in the ICU and death in the ICU+Hospital, however no significant differences were observed. Haplotype and diplotype frequencies when subjected to the same tests were not associated to the considered outcomes (data not shown).

For each polymorphism, individuals were grouped considering presence/absence of a given allele and tested for association between a particular allele carrier and outcomes (progression to sepsis, septic shock, organ dysfunction and ICU mortality and

ICU+Hospital mortality) in the following groups: i) critically ill patients, ii) septic patients and iii) patients with septic shock. Among all critically ill patients there were no significant differences for outcomes, although the p values for the +2960INDEL and +3142C>G polymorphisms were low (data not shown).

Among patients who developed sepsis, +2960IN allele carriers were more susceptible to progression to septic shock ($p= 0.036$) (**Table 2**). Among patients who developed septic shock, no significant differences on mortality rate were associated with presence/absence of a given allele (data not shown).

From all analyzed variants, +2960IN, +3142G and +3187A alleles had already been associated to reduced HLA-G expression [56, 64]. Considering the strong LD observed among these loci, haplotypes encompassing those variants were determined and the presence/absence of a particular haplotype (+2960IN_+3142G_+3187A) was analyzed concerning the studied clinical outcomes.

As it can be observed on **Table 3**, among all critically ill patients, carriers of the +2960IN_+3142G_+3187A haplotype were more likely to develop septic shock ($p= 0.038$). When considering only patients who developed sepsis, carriers of this haplotype were more likely to develop septic shock ($p= 0.023$) (**TABLE 4**). When analyzing mortality alone, no significant differences were observed (data not shown). Interestingly, from the 71 patients with sepsis and carrying the +2960IN_+3142G_+3187A diplotype, 69% progressed to septic shock.

The +2960IN allele was previously described as associated to a more stable mRNA *in vitro*, although no data so far corroborates this observation *in vivo* [65, 66]. It was suggested the substitution of a C by a G base at position +3142 could increase the binding

affinity of microRNAs, potentially reducing the HLA-G expression [63]. Furthermore, the +3187A>G polymorphism is located in a region close to AU-rich motifs and the A allele is associated with a lower HLA-G expression, probably due to a higher degradation of mRNA [67]. The net effect of these three polymorphisms could result in a lower HLA-G expression.

The present study showed a relationship between polymorphisms in exon 8 at 3' UTR of *HLA-G* gene and outcomes of critically ill patients. These results may be important for understanding the mechanisms involved on evolution to septic shock in critically ill patients. So far, there is only one study with HLA-G and critically ill patients. A higher concentration of soluble HLA-G5 was observed in critically ill patients and it was predictive of survival after progression to septic shock [49]. Our results demonstrated that critically ill patients carriers of +2960IN_+3142G_+3187A haplotype associated with a reduced HLA-G expression were more likely to develop septic shock. Therefore, the idea that decreased production of HLA-G in ICU patients could have a negative outcome is reasonable.

Conclusions

The present study shows, for the first time, an association between the +2960IN_3142G_3187A haplotype and septic shock among critically ill patients. Given the immunomodulatory properties of HLA-G, we can propose an important role for HLA-G in the mechanisms that define the outcome of critically ill patients.

Opportunely, should be interesting to analyze other parameter to confirm this association, such as Il-10 and glucocorticoids levels and citokyne profile in critically ill patients. All these results will provide insights for the understanding of critical illness.

Key messages

- Critically ill patients who developed sepsis and carriers of the +2960IN allele were more susceptible to progress to septic shock.
- Critically ill patients and critically ill patients who evolve to sepsis carriers of the +2960IN_+3142G_+3187A haplotype were more likely to developed septic shock

Abbreviations

APACHE: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation; HLA-G: Human Leukocyte Antigen G; HWE: Hardy-Weinberg Equilibrium; ICU: Intensive Care Unit; ILAS: Instituto Latino Americano de Sepse; LD: Linkage disequilibrium; PCR: Polymerase chain reaction; PUCRS: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; SOFA: Sequential Organ Failure Assessment; SNP: Single Nucleotide Polymorphism; SIRS: Systemic Inflammatory Response Syndrome; 3' UTR: Untranslated region 3'.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Authors' contribution

All authors contributed to study conception and design, acquisition of data, statistical analysis, interpretation of data and drafting the manuscript. All the authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

No potential conflicts of interest to disclose.

References

1. **Vincent JL: Sepsis: The magnitude of the problem. In. The Sepsis Text 2002. Kluwer Academy Publisher.; 2002.**
2. <http://www.sepsisnet.org>.
3. **Holmes CL: Genetic Polymorphisms in Sepsis and Septic Shock: Role in Prognosis and Potential for Therapy. *Chest* 2003, 124:1103-1115.**
4. **Geraghty DE, Koller BH, Orr HT: A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987, 84:9145-9149.**
5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3135>.
6. **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. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 2011, 68:369-395.**
7. **Carosella ED, Dausset J, Rouas-Freiss N: Immunotolerant functions of HLA-G. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 1999, 55:327-333.**
8. **Gonen-Gross T, Goldman-Wohl D, Huppertz B, Lankry D, Greenfield C, Natanson-Yaron S, Hamani Y, Gilad R, Yagel S, Mandelboim O: Inhibitory NK receptor recognition of HLA-G: regulation by contact residues and by cell specific expression at the fetal-maternal interface. *PloS One* 2010, 5:e8941.**

9. Borges L, Cosman D: **LIRs/ILTs/MIRs, inhibitory and stimulatory Ig-superfamily receptors expressed in myeloid and lymphoid cells.** *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2000, **11**:209-217.
10. Hsu KC, Chida S, Geraghty DE, Dupont B: **The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism.** *Immunological Reviews* 2002, **190**:40-52.
11. Carosella ED, HoWangYin K-Y, Favier B, LeMaoult J: **HLA-G-dependent suppressor cells: Diverse by nature, function, and significance.** *Human Immunology* 2008, **69**:700-707.
12. Kapasi K, Albert SE, Yie S, Zavazava N, Librach CL: **HLA-G has a concentration-dependent effect on the generation of an allo-CTL response.** *Immunology* 2000, **101**:191-200.
13. Kanai T, Fujii T, Kozuma S, Yamashita T, Miki A, Kikuchi A, Taketani Y: **Soluble HLA-G influences the release of cytokines from allogeneic peripheral blood mononuclear cells in culture.** *Molecular Human Reproduction* 2001, **7**:195-200.
14. Rosseau P LDM, Mouillot G et al.: **The 14 pb deletion-insertion polymorphism in the 3'UTR region on the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability.** *Human Immunology* 2003, **64**:1005-1010.
15. 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.** *American Journal of Human Genetics* 2007, **81**:829-834.

16. Yie S-m, Li L-h, Xiao R, Librach CL: **A single base-pair mutation in the 3'-untranslated region of HLA-G mRNA is associated with pre-eclampsia.** *Molecular Human Reproduction* 2008, **14**:649-653.
17. Veit TD, Vianna P, Chies JAB: **HLA-G - From Fetal Tolerance to a Regulatory Molecule in Inflammatory Diseases.** *Current Immunology Reviews* 2010, **6**:1-15.
18. Ober C, Aldrich CL, Chervoneva I, Billstrand C, Rahimov F, Gray HL, Hyslop T: **Variation in the HLA-G promoter region influences miscarriage rates.** *American Journal of Human Genetics* 2003, **72**:1425-1435.
19. Vianna P, Dalmáz CA, Veit TD, Tedoldi C, Roisenberg I, Chies JAB: **Immunogenetics of pregnancy: role of a 14-bp deletion in the maternal HLA-G gene in primiparous pre-eclamptic Brazilian women.** *Human Immunology* 2007, **68**:668-674.
20. Gonzalez A, Alegre E, Torres MI, Díaz-Lagares A, Lorite P, Palomeque T, Arroyo A: **Evaluation of HLA-G5 plasmatic levels during pregnancy and relationship with the 14-bp polymorphism.** *American Journal of Reproductive Immunology (New York, NY : 1989)* 2010, **64**:367-374.
21. Deschaseaux F, Delgado D, Pistoia V, Giuliani M, Morandi F, Durrbach A: **HLA-G in organ transplantation: towards clinical applications.** *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 2011, **68**:397-404.
22. Lila N, Amrein C, Guillemain R, Chevalier P, Fabiani J, Carpentier a: **Soluble Human Leukocyte Antigen-G: A New Strategy for Monitoring Acute and Chronic Rejections After Heart Transplantation.** *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 2007, **26**:421-422.

23. Naji A, Le Rond S, Durrbach A, Krawice-Radanne I, Creput C, Daouya M, Caumartin J, LeMaoult J, Carosella ED, Rouas-Freiss N: **CD3+CD4^{low} and CD3+CD8^{low} are induced by HLA-G: novel human peripheral blood suppressor T-cell subsets involved in transplant acceptance.** *Blood* 2007, **110**:3936-3948.
24. Ugurel S, Rebmann V, Ferrone S, Tilgen W, Grosse-Wilde H, Reinhold U: **Soluble human leukocyte antigen--G serum level is elevated in melanoma patients and is further increased by interferon-alpha immunotherapy.** In: *Cancer*. vol. 92; 2001: 369-376.
25. Amiot L: **HLA-G and lymphoproliferative disorders.** *Seminars in Cancer Biology* 2003, **13**:379-385.
26. Leleu X: **Total Soluble HLA Class I and Soluble HLA-G in Multiple Myeloma and Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance.** *Clinical Cancer Research* 2005, **11**:7297-7303.
27. Gros F, Sebti Y, de Guibert S, Branger B, Bernard M, Fauchet R, Amiot L: **Soluble HLA-G molecules increase during acute leukemia, especially in subtypes affecting monocytic and lymphoid lineages.** *Neoplasia (New York, NY)* 2006, **8**:223-230.
28. Ye S-R, Yang H, Li K, Dong D-D, Lin X-M, Yie S-M: **Human leukocyte antigen G expression: as a significant prognostic indicator for patients with colorectal cancer.** *Modern Pathology : an Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2007, **20**:375-383.

29. Schütt P, Schütt B, Switala M, Bauer S, Stamatis G, Opalka B, Eberhardt W, Schuler M, Horn Pa, Rebmann V: **Prognostic relevance of soluble human leukocyte antigen-G and total human leukocyte antigen class I molecules in lung cancer patients.** *Human Immunology* 2010, **71**:489-495.
30. Matte C, Lajoie J, Lacaille J, Zijenah LS, Ward BJ, Roger M: **Functionally active HLA-G polymorphisms are associated with the risk of heterosexual HIV-1 infection in African women.** *Aids* 2004:427-431.
31. Aikhionbare FO, Kumaresan K, Shamsa F, Bond VC: **HLA-G DNA sequence variants and risk of perinatal HIV-1 transmission.** *AIDS Research and Therapy* 2006, **3**:28.
32. Lajoie J, Hargrove J, Zijenah LS, Humphrey JH, Ward BJ, Roger M: **Genetic variants in nonclassical major histocompatibility complex class I human leukocyte antigen (HLA)-E and HLA-G molecules are associated with susceptibility to heterosexual acquisition of HIV-1.** *The Journal of Infectious Diseases* 2006, **193**:298-301.
33. Cordero Eaa, Veit TD, da Silva MaL, Jacques SMC, Silla LMDR, Chies JaB: **HLA-G polymorphism influences the susceptibility to HCV infection in sickle cell disease patients.** *Tissue Antigens* 2009, **74**:308-313.
34. Fabris A, Catamo E, Segat L, Morgutti M, Arraes LC, de Lima-Filho JL, Crovella S: **Association between HLA-G 3'UTR 14-bp polymorphism and HIV vertical transmission in Brazilian children.** *AIDS (London, England)* 2009, **23**:177-182.
35. Chen H-X, Chen B-G, Shi W-W, Zhen R, Xu D-P, Lin A, Yan W-H: **Induction of cell surface human leukocyte antigen-G expression in pandemic H1N1 2009**

- and seasonal H1N1 influenza virus-infected patients.** *Human Immunology* 2011, **72**:159-165.
36. Yan W-H, Lin A, Chen B-G, Chen S-Y: **Induction of both membrane-bound and soluble HLA-G expression in active human cytomegalovirus infection.** *The Journal of Infectious Diseases* 2009, **200**:820-826.
37. Souto FJD, Crispim JCO, Ferreira SC, da Silva aSM, Bassi CL, Soares CP, Zucoloto S, Rouas-Freiss N, Moreau P, Martinelli aLC *et al*: **Liver HLA-G expression is associated with multiple clinical and histopathological forms of chronic hepatitis B virus infection.** *Journal of Viral Hepatitis* 2011, **18**:102-105.
38. Gazit E: **HLA-G is associated with pemphigus vulgaris in jewish patients.** *Human Immunology* 2004, **65**:39-46.
39. Nicolae D, Cox NJ, Lester La, Schneider D, Tan Z, Billstrand C, Kuldaneck S, Donfack J, Kogut P, Patel NM *et al*: **Fine mapping and positional candidate studies identify HLA-G as an asthma susceptibility gene on chromosome 6p21.** *American Journal of Human Genetics* 2005, **76**:349-357.
40. Mitsdoerffer M, Schreiner B, Kieseier BC, Neuhaus O, Dichgans J, Hartung H-P, Weller M, Wiendl H: **Monocyte-derived HLA-G acts as a strong inhibitor of autologous CD4 T cell activation and is upregulated by interferon-beta in vitro and in vivo: rationale for the therapy of multiple sclerosis.** *Journal of Neuroimmunology* 2005, **159**:155-164.
41. Verbruggen La, Rebmann V, Demanet C, De Cock S, Grosse-Wilde H: **Soluble HLA-G in rheumatoid arthritis.** *Human Immunology* 2006, **67**:561-567.

42. Rizzo R, Hviid TVF, Govoni M, Padovan M, Rubini M, Melchiorri L, Stignani M, Carturan S, Grappa MT, Fotinidi M *et al*: **HLA-G genotype and HLA-G expression in systemic lupus erythematosus: HLA-G as a putative susceptibility gene in systemic lupus erythematosus.** *Tissue Antigens* 2008, **71**:520-529.
43. Torres MI, López-Casado Ma, Luque J, Peña J, Ríos A: **New advances in coeliac disease: serum and intestinal expression of HLA-G.** *International Immunology* 2006, **18**:713-718.
44. Glas J, Török H-P, Tonenchi L, Wetzke M, Beynon V, Teshome MY, Cotofana S, Schiemann U, Griga T, Klein W *et al*: **The 14-bp deletion polymorphism in the HLA-G gene displays significant differences between ulcerative colitis and Crohn's disease and is associated with ileocecal resection in Crohn's disease.** *International Immunology* 2007, **19**:621-626.
45. Park KS, Park JS, Nam JH, Bang D, Sohn S, Lee ES: **HLA-E*0101 and HLA-G*010101 reduce the risk of Behcet's disease.** *Tissue Antigens* 2007, **69**:139-144.
46. Lin a, Yan WH, Xu HH, Tang LJ, Chen XF, Zhu M, Zhou MY: **14 bp deletion polymorphism in the HLA-G gene is a risk factor for idiopathic dilated cardiomyopathy in a Chinese Han population.** *Tissue Antigens* 2007, **70**:427-431.
47. Rosado S, Perez-Chacon G, Mellor-Pita S, Sanchez-Vegazo I, Bellas-Menendez C, Citores MJ, Losada-Fernandez I, Martin-Donaire T, Rebolleda N, Perez-Aciego P: **Expression of human leukocyte antigen-G in systemic lupus erythematosus.** *Human Immunology* 2008, **69**:9-15.

48. Veit TD, Cordero Eaa, Mucenic T, Monticielo Oa, Brenol JCT, Xavier RM, Delgado-Cañedo a, Chies JaB: **Association of the HLA-G 14 bp polymorphism with systemic lupus erythematosus.** *Lupus* 2009, **18**:424-430.
49. Ciprandi G, Contini P, Murdaca G, DeAmici M, Gallina AM, Puppo F: **Soluble serum HLA-G and HLA-A, -B, -C molecules in patients with seasonal allergic rhinitis exposed to pollens.** *International Immunopharmacology* 2009, **9**:1058-1062.
50. Wastowski IJ, Sampaio-Barros PD, Amstalden EMI, Palomino GM, Marques-Neto JF, Crispim JCO, Biral AC, Rassi DM, Carosella ED, Moreau P *et al*: **HLA-G expression in the skin of patients with systemic sclerosis.** *The Journal of Rheumatology* 2009, **36**:1230-1234.
51. Forrest CM, Mackay GM, Stoy N, Spiden SL, Taylor R, Stone TW, Darlington LG: **Blood levels of kynurenines, interleukin-23 and soluble human leucocyte antigen-G at different stages of Huntington's disease.** *Journal of Neurochemistry* 2010, **112**:112-122.
52. Cardili RN, Alves TG, Freitas JCOC, Soares CP, Mendes-Junior CT, Soares EG, Donadi Ea, Silva-Souza C: **Expression of human leucocyte antigen-G primarily targets affected skin of patients with psoriasis.** *The British Journal of Dermatology* 2010, **163**:769-775.
53. Fainardi E, Rizzo R, Lupato A, Ramponi V, Santis GD, Garofano F, Stignani M, Tamborino C, Castellazzi M, Casetta I *et al*: **Brain Edema XIV.** *Acta Neurochirurgica* 2009, **106**:141-145.

54. Monneret G, Voirin N, Krawice-Radanne I, Bohé 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.** *Critical Care Medicine* 2007, **35**:1942-1947.
55. Bone R, Balk R, Cerra F, Dellinger R, Fein a, Knaus W, Schein R, Sibbald W: **Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine.** *Chest* 1992, **101**:1644-1655.
56. Lahiri DK, Nurnberger JI: **A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies.** *Nucleic Acids Research* 1991, **19**:5444.
57. Bermingham J, Jenkins D, McCarthy T, O'Brien M: **Genetic analysis of insulin-like growth factor II and HLA-G in pre-eclampsia.** *Biochemical Society Transactions* 2000, **28**:215-219.
58. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P: **A new statistical method for haplotype reconstruction from population data.** *American Journal of Human Genetics* 2001, **68**:978-989.
59. Stephens M, Scheet P: **Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation.** *American journal of human genetics* 2005, **76**:449-462.

60. Excoffier L, Lischer HEL: **Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows.** *Molecular Ecology Resources* 2010, **10**:564-567.
61. Castelli EC, Mendes-Junior CT, Veiga-Castelli LC, Roger M, Moreau P, Donadi Ea: **A Comprehensive Study of Polymorphic Sites along the HLA-G Gene: Implication for Gene Regulation and Evolution.** *Molecular Biology and Evolution* 2011:1-18.
62. 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* 2012:1-7.
63. Pena SDJ, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy FDSG, Kohlrausch F, Magno LAV, Montenegro RC, Moraes MO *et al*: **The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected.** *PloS One* 2011, **6**:e17063.
64. Tan Z, Shon AM, Ober C: **Evidence of balancing selection at the HLA-G promoter region.** *Human Molecular Genetics* 2005, **14**:3619-3628.
65. Castelli EC, Mendes-Junior CT, Deghaide NHS, de Albuquerque RS, Muniz YCN, Simões RT, Carosella ED, Moreau P, Donadi Ea: **The genetic structure of 3'untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes.** *Genes and Immunity* 2010, **11**:134-141.

66. Hviid TVF, Hylenius S, Rørbye C, Nielsen LG: **HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels.** *Immunogenetics* 2003, **55**:63-79.
67. Veit TD, Chies JaB: **Tolerance versus immune response -- microRNAs as important elements in the regulation of the HLA-G gene expression.** *Transplant Immunology* 2009, **20**:229-231.

Tables

Table 1: Allelic and genotypic frequencies and heterozygosity test.

		+2960INDEL	+3003C>T	+3010C>G	+3027A>C	+3035C>T	+3142C>G	+3187A>C						
Allelic	DEL	0.578	C	0.109	C	0.521	A	0.034	C	0.861	C	0.463	A	0.699
	IN	0.421	T	0.890	G	0.478	C	0.965	T	0.141	G	0.536	C	0.304
Genotypic	DEL/DEL	0.310	C/C	0.012	C/C	0.250	A/A	0.001	C/C	0.733	C/C	0.180	A/A	0.448
	DEL/IN	0.536	C/T	0.194	C/G	0.540	A/C	0.006	C/T	0.255	C/G	0.565	A/C	0.503
	IN/IN	0.152	T/T	0.793	G/G	0.208	C/C	0.932	T/T	0.010	G/G	0.253	C/C	0.048
<i>p</i>HWE		<0.05	>0.05	<0.05	>0.05	>0.05	<0.05	<0.05						
Heterozygosity														
Observed		0.53605*	0.19436	0.54075*	0.06583	0.25549	0.56583*	0.5047*						
Expected		0.4881	0.19551	0.4995	0.06664	0.23913	0.49768	0.42108						

* Highlight for polymorphisms that had heterozygosity values observed greater than expected.

Table 2: Progression to septic shock (SS) and mortality among patients with sepsis.

Polymorphism	Outcome	Total n (%)	With IN n (%)	Without IN n (%)	p X²
+2960INDEL	With Sepsis	516 (73.9)	363 (74.4)	153 (72.9)	-
	Progression to SS	364 (70.5)	266 (73.3)	98 (64.1)	0.036*
	ICU Mortality	211 (40.9)	152 (41.9)	59 (38.6)	0.928
	ICU+Hospital Mortality	272 (53.0)	192 (52.9)	80 (53.3)	0.485
Polymorphism	Outcome	Total n (%)	With +3003C n (%)	Without +3003C n (%)	p X²
+3003C>T	With Sepsis	469 (100)	98 (20.9)	371 (79.1)	-
	Progression to SS	329 (51.6)	71 (72.4)	258 (69.5)	0.576
	ICU Mortality	192 (40.9)	48 (49.0)	144 (38.8)	0.069
	ICU+Hospital Mortality	249 (53.4)	57 (58.2)	192 (52.2)	0.291
Polymorphism	Outcome	Total n (%)	With +3010C n (%)	Without +3010C n (%)	p X²
+3010C>G	With Sepsis	469 (100)	373 (79.5)	96 (20.5)	-
	Progression to SS	329 (70.1)	267 (71.6)	62 (64.6)	0.181
	ICU Mortality	192 (40.9)	152 (40.8)	40 (41.7)	0.871
	ICU+Hospital Mortality	249 (53.4)	196 (53.0)	53 (55.2)	0.696
Polymorphism	Outcome	Total n (%)	With +3027A n (%)	Without +3027A n (%)	p X²
+3027 A>C	With Sepsis	469 (100)	36 (7.7)	433 (92.3)	-
	Progression to SS	329 (70.1)	25 (69.4)	304 (70.2)	0.923
	ICU Mortality	192 (40.9)	16 (44.4)	176 (40.6)	0.656
	ICU+Hospital Mortality	249 (53.4)	18 (50)	231 (53.7)	0.667
Polymorphism	Outcome	Total n (%)	With +3035T n (%)	Without +3035T n (%)	p X²
+3035C>T	With Sepsis	469 (100)	125 (26.7)	344 (73.3)	-
	Progression to SS	329 (70.1)	96 (76.8)	233 (67.7)	0.058
	ICU Mortality	192 (40.9)	55 (44.0)	137 (39.8)	0.416
	ICU+Hospital Mortality	249 (53.4)	71 (56.8)	178 (52.2)	0.378
Polymorphism	Outcome	Total n (%)	With +3142G n (%)	Without +3142G n (%)	p X²
+3142C>G	With Sepsis	516 (100)	431 (83.5)	85 (16.5)	-
	Progression to SS	364 (70.5)	309 (71.7)	55 (64.7)	0.196
	ICU Mortality	211 (40.9)	178 (41.3)	33 (38.8)	0.671
	ICU+Hospital Mortality	272 (53.0)	223 (52.1)	49 (57.6)	0.350
Polymorphism	Outcome	Total n (%)	With +3187A n (%)	Without +3187A n (%)	p X²
+3187A>G	With Sepsis	469 (100)	447 (95.3)	22 (4.7)	-
	Progression to SS	329 (70.1)	316 (70.7)	13 (59.1)	0.246
	ICU Mortality	192 (40.9)	184 (41.2)	8 (36.4)	0.655
	ICU+Hospital Mortality	249 (53.4)	237 (53.4)	12 (54.5)	0.915

SS= Septic shock

p χ^2 = p Value of Chi-Square.

*Chi-Square significant ($p < 0.05$).

Table 3: **Clinical and demographic data of critically ill patients. Carriers and noncarriers of the +2960IN_+3142G_+3187A haplotype.**

Variables	All Critically Ill Patients n (%)	With +2960IN_+3142G_+3187A n (%)	Without +2960IN_+3142G_+3187A n (%)	P (<0.05)
Frequency [†]	638 (100)	436 (68.3)	202 (31.7)	-
Age (years) [‡]	57 (13/97)	57.5 (13/97)	56 (14/90)	0.264 ^{MW}
Male [†]	338 (53.0)	225 (51.6)	113 (55.9)	0.307 ^{X2}
APACHE II Score [§]	19.32 (7.73)	19.69 (7.77)	18.52 (7.61)	0.852 ST
SOFA-1 Score [†]	6 (0/18)	7 (0/18)	6 (0/16)	0.422 ^{MW}
SOFA-2 Score [†]	6 (0/17)	6 (0/17)	6 (0/17)	0.258 ^{MW}
SOFA-3 Score [†]	6 (0/18)	6 (0/18)	5.5 (0/15)	0.086 ^{MW}
SOFA-4 Score [†]	6 (0/22)	6 (0/22)	6 (0/15)	0.153 ^{MW}
SOFA-5 Score [†]	5 (0/20)	5 (0/20)	5 (0/19)	0.222 ^{MW}
SOFA-6 Score [†]	5 (0/21)	5 (0/21)	5 (0/16)	0.280 ^{MW}
SOFA-7 Score [†]	5 (0/24)	5 (0/24)	5 (0/16)	0.657 ^{MW}
SOFA-15 Score [†]	5 (0/19)	5 (0/19)	5 (0/12)	0.767 ^{MW}
SOFA-29 Score [†]	5 (0/16)	5 (0/16)	6 (0/16)	0.801 ^{MW}
ICU LOS (days) [‡]	13 (0/173)	13 (1/125)	12 (0/173)	0.678 ^{MW}
ICU+Hospital LOS (days) [‡]	35 (1/242)	35 (0/242)	33 (4/167)	0.520 ^{MW}
With Sepsis [†]	469 (73.5)	323 (74.1)	146 (72.3)	0.631 ^{X2}
With Septic Shock[†]	329 (51.6)	237 (54.4)	92 (45.5)	0.038^{X2*}
ICU Mortality [†]	210 (32.9)	149 (34.2)	61 (30.2)	0.320 ^{X2}
ICU+Hospital Mortality [†]	290 (45.7)	201 (46.2)	89 (44.7)	0.728 ^{X2}

APACHE-II: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II;

SOFA: Sequential Organ Failure Assessment;

ICU: Intensive Care Unit;

ICU+H: ICU plus hospital;

LOS: Length of stay;

n: sample number;

SD: Standard Deviation of the mean;

ST: Student's *t*-test;

MW: Mann-Whitney U -test;

χ^2 - Pearson Chi-Square test *: P value describes a comparison between carriers and noncarriers of haplotype +2960IN_+3142G_+3187A groups;

†: n (%);

‡: median (min/max);

§: mean (SD).

Table 4: **Presence/absence of the +2960IN_₋+3142G_₋+3187A haplotype in patients with sepsis and patients with septic shock.**

	Total Critically Ill Patients n(%)	With +2960IN_₋+3142G_₋+3187A n (%)	Without +2960IN_₋+3142G_₋+3187A n (%)	P^{X²}
With Sepsis	469 (100)	323 (68.9)	146 (31.1)	-
Progression to SS	329 (70.1)	237 (73.4)	92 (63.0)	0.023*
ICU Mortality	192 (40.9)	136 (42.1)	56 (38.4)	0.445
ICU+Hospital Mortality	249 (53.4)	175 (54.2)	74 (51.7)	0.627
With Septic Shock	329 (100)	237(72.0)	92 (28.0)	-
ICU Mortality	170 (51.7)	122 (51.5)	48 (52.2)	0.910
ICU+Hospital Mortality	210 (64)	149 (62.9)	61 (67)	0.482

SS= Septic shock

p X²= p value of Chi-Square.

* Chi-Square significant (p<0.05).

4. DISCUSSÃO DA DISSERTAÇÃO

Estudos realizados em UTIs de diversos países relataram altas taxas de evolução de pacientes críticos para sepse, sepse severa, choque séptico e óbito (Angus *et al.*, 2001; Brun-Buisson *et al.*, 2004; Danai *et al.*, 2007; Dias *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2004; Vincent *et al.*, 2006). O presente estudo demonstrou, pela primeira vez, uma associação entre polimorfismos do éxon 8 da região 3' UTR do *HLA-G* e o desfecho de pacientes críticos. Até o momento, o único estudo que relacionou *HLA-G* e pacientes críticos demonstrou que altas concentrações de sHLA-G5 foi preditivo de sobrevivência, após evolução para choque séptico (Monneret *et al.*, 2007). No presente estudo, observou-se que pacientes críticos, bem como pacientes críticos que desenvolveram sepse e portadores do haplótipo +2960IN_+3142G_+3187A, que já foi associado a uma expressão reduzida de *HLA-G* (Rosseau, 2003), foram mais suscetíveis a evoluírem para choque séptico. Portanto, a idéia de que indivíduos portadores do haplótipo associado a uma menor expressão de *HLA-G*, em condições fisiológicas críticas, teriam uma maior probabilidade de evoluir para um desfecho negativo pode ser apoiada pelos dados deste estudo e é bastante relevante.

Durante o choque séptico ocorre a liberação de diversos mediadores inflamatórios em resposta à disfunção de órgãos e à hipoperfusão (Hotchkiss & Karl, 2003; Monneret *et al.*, 2007). Paralelamente, iniciam-se mecanismos compensatórios a fim de evitar a inflamação exacerbada e a IL-10 está entre as citocinas anti-inflamatórias liberadas (Sfeir *et al.*, 2001). Recentemente, um estudo demonstrou que a expressão de IL-10 pode proporcionar um ambiente imunossupressivo pela potencialização da expressão de *HLA-G* (Rodríguez *et al.*, 2011). Portanto, a regulação *HLA-G*/IL-10 poderia estar envolvida na suscetibilidade de pacientes críticos a evoluírem para choque séptico.

Outra questão a ser considerada é a relação entre a produção de glicocorticóides, durante a sepse e o choque séptico, e a regulação da expressão de *HLA-G*. Os glicocorticóides desempenham um amplo papel anti-inflamatório por inibirem a produção de citocinas pró-inflamatórias, inibirem a liberação de radicais livres, inibirem prostaglandinas e inibirem a expressão de moléculas de adesão (Annane & Cavillon, 2003). Devido a suas propriedades imunossupressoras, os glicocorticóides sintéticos (hidrocortisona) têm sido utilizados em baixas doses em terapias com pacientes críticos e

podem aumentar a sobrevivência de pacientes com choque séptico (Allary & Annane, 2005). Um estudo *in vitro* demonstrou que a transcrição de HLA-G em trofoblastos tratados com hidrocortisona é potencializada, incluindo HLA-G5 e HLA-G6, que são as isoformas solúveis (Moreau *et al.*, 2001). Embora, o mecanismo envolvido na potencialização da transcrição de HLA-G pelos glicocorticóides não tenha sido elucidado, o efeito de glicocorticóides na expressão de HLA-G pode ser relevante. Já foi sugerido que a regulação glicocorticóide/HLA-G desempenha um efeito modulatório no sistema imune, na tolerância a enxertos (Moreau *et al.*, 2001) e talvez em pacientes críticos que evoluem para choque séptico (Monneret *et al.*, 2007).

Por isso, o papel das moléculas de HLA-G na fisiologia de pacientes críticos deve continuar a ser investigado, considerando outros aspectos, tais como: i) confirmação desses resultados em outros estudos, ii) correlação entre polimorfismos do éxon 8 da região 3' UTR e expressão de HLA-G (Hviid *et al.*, 2003), iii) análise da formação, estabilidade e funcionalidade de dímeros de HLA-G (Kamishikiryo & Maenaka, 2009), iv) polimorfismos dos receptores com os quais as moléculas de HLA-G interagem, v) polimorfismos de IL-10 e níveis liberados de IL-10 (Lowe *et al.*, 2003; Sfeir *et al.*, 2001), vi) níveis de glicocorticóides endógenos liberados e vii) perfil de citocinas liberadas, como sIL-2R (receptor de IL-2 solúvel), IL-1 β , IL-8 (Lvovschi *et al.*, 2011), TNF e proteína HMGB1 (Ulloa & Tracey, 2005), bem como os polimorfismos que poderiam regular a expressão dessas moléculas.

Também, deve-se considerar que as moléculas de HLA-G relacionam-se ao balanço Th1/Th2, por estarem associadas à expressão de citocinas anti-inflamatórias (Le Bouteiller, 1999). Pacientes críticos que sofreram queimaduras ou traumas graves apresentaram um perfil de expressão reduzida de citocinas Th1 e expressão aumentada de citocinas Th2. Entre esses pacientes, aqueles que evoluíram para sepse apresentaram uma maior sobrevivência, a qual foi relacionada à resposta Th2 (Hotchkiss & Karl, 2003). Já foram descritas evidências de que essa molécula participa da modulação do sistema imune, então, poderiam as moléculas de HLA-G estar envolvidas na polarização de resposta Th2 em pacientes críticos, que desenvolvem sepse e evoluem para choque séptico?

Devido às propriedades imunoreguladoras atribuídas às moléculas de HLA-G (Carosella *et al.*, 1999), diversos estudos as relacionaram ao sucesso gestacional e à

aceitação de enxertos, embora sua expressão em tumores e em infecções virais possa prejudicar a resposta imune antitumoral e antiviral do hospedeiro (Veit *et al.*, 2010). Por esses motivos, e pelo amplo espectro em que as moléculas de HLA-G poderiam estar envolvidas, é razoável considerar que o HLA-G possa representar uma ferramenta útil em abordagens clínicas. Futuramente, polimorfismos de HLA-G e concentrações de sHLA-G poderiam ser empregados como biomarcadores ou preditores de diagnósticos e prognósticos em casos de câncer, transplante de órgãos, infecções virais, doenças inflamatórias, suscetibilidade de pacientes crítico a evoluírem para choque séptico e sobrevida de pacientes críticos com choque séptico. Além disso, a utilização de HLA-G exógeno poderia ser eficaz como agente terapêutico, bem como uma ferramenta para controlar a sua expressão endógena, conforme o contexto imunológico. Entretanto, o conhecimento sobre HLA-G gerado atualmente ainda é insuficiente para a sua aplicação clínica, uma vez que a influência dessa molécula, nos mais variados contextos biológicos, foi apenas evidenciada (Veit *et al.*, 2010). Conseqüentemente, mais estudos devem ser realizados para melhor compreender as diversas facetas do *HLA-G*, ressaltando também, que devem ser considerados os componentes étnicos da população estudada.

Neste estudo, pode-se assumir que a amostra de pacientes críticos é representativa da população brasileira, mais especificamente do sul do Brasil. De forma geral, a população do Brasil pode ser caracterizada como uma mistura de ameríndios, colonos portugueses, colonos alemães, colonos italianos e africanos escravos, que foram trazidos no século XVI. Durante o século XIX, o Brasil recebeu a chegada de muitos colonos portugueses, italianos e alemães, e durante o século XX ocorreu uma segunda onda de imigração de alemães, italianos, portugueses e japoneses, que deixaram seus países devido à Segunda Guerra Mundial (Pena *et al.*, 2011). Essas informações refletem nas frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas observadas no presente estudo. Recentemente, as frequências alélicas e genotípicas dos mesmos polimorfismos avaliados nos pacientes críticos foram determinadas e comparadas, a partir de amostras de indivíduos saudáveis provenientes das regiões sudeste e nordeste do Brasil (Lucena-Silva *et al.*, 2012). As frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos +2960INDEL, +3010C>G, +3027A>C, +3035C>T, +3142C>G e +3187A>G observadas por Lucena-Silva e colaboradores foram muito semelhantes às descritas neste estudo. Exceto pela frequência do alelo +3003C, que no

estudo de Lucena-Silva e colaboradores esteve significativamente diminuído na população do nordeste brasileiro, e que poderia ser explicado pelas diferenças genéticas dos ancestrais dessas duas populações. Os dois haplótipos mais frequentes entre os pacientes críticos, também foram os dois haplótipos mais frequentes nas populações do nordeste e sudeste brasileiro. Outro aspecto interessante do estudo de Lucena-Silva e colaboradores é a constatação, em um indivíduo da população do nordeste, de duas variantes incomuns localizadas nas regiões +3001C>T e +3033C>G do éxon 8 da região 3' UTR do *HLA-G*. Esses supostos “polimorfismos” poderiam representar artefatos do processo de sequenciamento ou poderiam, de fato, representar novos SNPs. Uma análise mais específica poderia ser realizada para investigar o que essa informação poderia representar. Portanto, a busca de novos polimorfismos no éxon 8 da região 3' UTR do *HLA-G* poderia ser desenvolvida.

Visto que a amostra de pacientes críticos utilizada nesse estudo corresponde a um número amostral relativamente alto, cerca de 700 indivíduos, e que todas as amostras estão com a fita *reverse* do éxon 8 da região 3' UTR do *HLA-G* sequenciadas, propõe-se uma investigação por novos polimorfismos nessa região. Uma busca feita no ano de 2008 no *Anthony Nolan Research Institute* (ANRI) publicado por Veit e colaboradores (2010) informou um registro de 36 alelos do *HLA-G*, que codificavam 14 proteínas. Uma busca mais recente informou um novo registro de 47 alelos do *HLA-G*, que codificam 15 proteínas (ANRI, 2012). Em quase quatro anos, onze novos alelos foram descritos.

Uma das metodologias mais popular, poderosa e gratuitamente disponível é o pacote *Phred-Phrap-Consed-Polyphred software* (PPCP) (Ewing *et al.*, 1998; Montgomery *et al.*, 2008), que realiza um amplo conjunto de análises genéticas de populações através de uma interface amigável (Machado *et al.*, 2011). O pacote PPCP é frequentemente empregado com a finalidade de identificar sítios polimórficos (Fuselli *et al.*, 2007; Tarazona-Santos *et al.*, 2008). A busca por novos polimorfismos do *HLA-G* no éxon 8 da região 3' UTR seria feita através do alinhamento múltiplo das sequências da fita *reverse* pelo pacote PPCP e em comparação com uma sequência referência. Os dados produzidos seriam submetidos a filtros de controle de qualidade baseados nos escores do *Phred* (Machado *et al.*, 2011). Caso novos SNPs fossem encontrados, essas amostras seriam submetidas a um novo sequenciamento das fitas *forward* e *reverse*. Por último, para ser

considerada a descrição de um novo polimorfismo, a frequência da variante rara deverá ser igual ou superior 1% na população estudada (Navratilova, 2006; Snustad & Simmons, 2008). Se a existência de novos polimorfismos nessa região for confirmada, novos testes de construção haplotípica mais provável e de desequilíbrio de ligação poderão ser realizados, além de se verificar se há associação no desfecho de pacientes críticos.

De forma geral, espera-se que esse estudo contribua no avanço das investigações com pacientes internados em UTIs, bem como no avanço das análises de polimorfismos do éxon 8 da região 3' UTR do *HLA-G* em termos de diversidade genética e de genética de populações.

REFERÊNCIAS

- Abraham C and Cho J (2009) Interleukin-23/Th17 pathways and inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases* 15:1090-1100.
- Aikhionbare FO, Kumaresan K, Shamsa F and Bond VC (2006) HLA-G DNA sequence variants and risk of perinatal HIV-1 transmission. *AIDS Research and Therapy* 3:28.
- Akira S (2004) Functions of Toll-like receptors: lessons from KO mice. *Comptes Rendus Biologies* 327:581-589.
- Allary J and Annane D (2005) Glucocorticoids and sepsis. *Minerva Anestesiologica* 71:759-768.
- Amiot L (2003) HLA-G and lymphoproliferative disorders. *Seminars in Cancer Biology* 13:379-385.
- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J and Pinsky MR (2001) Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical Care Medicine* 29:1303-1310.
- Annane D and Cavaillon J-M (2003) Corticosteroids in sepsis: from bench to bedside? *Shock* (Augusta, Ga.) 20:197-207.
- ANRI, 2012 <http://www.anthonylan.org/SearchResult.aspx?>
- Blackwell TS and Christman JW (1996) Sepsis and cytokines: current status. *British Journal of Anaesthesia* 77:110-117.
- Bone R, Balk R, Cerra F, Dellinger R, Fein a, Knaus W, Schein R and Sibbald W (1992) Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101:1644-1655.
- Boontham P, Chandran P, Rowlands B and Eremin O (2003) Surgical sepsis: dysregulation of immune function and therapeutic implications. *The Surgeon : Journal of the Royal Colleges of Surgeons of Edinburgh and Ireland* 1:187-206.
- Borges L and Cosman D (2000) LIRs/ILTs/MIRs, inhibitory and stimulatory Ig-superfamily receptors expressed in myeloid and lymphoid cells. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 11:209-217.
- Brun-Buisson C, Meshaka P, Pinton P and Vallet B (2004) EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *Intensive Care Medicine* 30:580-588.
- Buras Ja, Holzmann B and Sitkovsky M (2005) Animal models of sepsis: setting the stage. *Nature Reviews. Drug Discovery* 4:854-865.
- Cardili RN, Alves TG, Freitas JCOC, Soares CP, Mendes-Junior CT, Soares EG, Donadi Ea and Silva-Souza C (2010) Expression of human leucocyte antigen-G primarily targets affected skin of patients with psoriasis. *The British Journal of Dermatology* 163:769-775.
- Carosella ED, Dausset J and Rouas-Freiss N (1999) Immunotolerant functions of HLA-G. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 55:327-333.
- Carosella ED, Favier B, Rouas-Freiss N, Moreau P and LeMaout J (2008a) Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. *Blood* 111:4862-4870.
- Carosella ED, HoWangYin K-Y, Favier B and LeMaout J (2008b) HLA-G-dependent suppressor cells: Diverse by nature, function, and significance. *Human Immunology* 69:700-707.
- Carosella ED, Moreau P, Lemaout J and Rouas-Freiss N (2008c) HLA-G: from biology to clinical benefits. *Trends in immunology* 29:125-132.
- Castelli EC, Mendes-Junior CT, Deghaide NHS, de Albuquerque RS, Muniz YCN, Simões RT, Carosella ED, Moreau P and Donadi Ea (2010) The genetic structure of 3'untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes. *Genes and Immunity* 11:134-141.
- Chang H-C, Sehra S, Goswami R, Yao W, Yu Q, Stritesky GL, Jabeen R, McKinley C, Ahyi A-N, Han L *et al.* (2010) The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nature Immunology* 11:527-534.
- Chen H-X, Chen B-G, Shi W-W, Zhen R, Xu D-P, Lin A and Yan W-H (2011) Induction of cell surface human leukocyte antigen-G expression in pandemic H1N1 2009 and seasonal H1N1 influenza virus-infected patients. *Human Immunology* 72:159-165.
- Ciprandi G, Contini P, Murdaca G, DeAmici M, Gallina AM and Puppo F (2009) Soluble serum HLA-G and HLA-A, -B, -C molecules in patients with seasonal allergic rhinitis exposed to pollens. *International Immunopharmacology* 9:1058-1062.

- Cordero Eaa, Veit TD, da Silva MaL, Jacques SMC, Silla LMDR and Chies JaB (2009) HLA-G polymorphism influences the susceptibility to HCV infection in sickle cell disease patients. *Tissue Antigens* 74:308-313.
- Corrêa L, 2010 <http://www.fo.usp.br/lido/patoartegeral/patoartinfl7.htm>
- Cray C, Zaias J and Altman NH (2009) Acute phase response in animals: a review. *Comparative Medicine* 59:517-526.
- Danai Pa, Sinha S, Moss M, Haber MJ and Martin GS (2007) Seasonal variation in the epidemiology of sepsis. *Critical Care Medicine* 35:410-415.
- Deschaseaux F, Delgado D, Pistoia V, Giuliani M, Morandi F and Durrbach A (2011) HLA-G in organ transplantation: towards clinical applications. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 68:397-404.
- Dias F, Eidt M, Duquia R, Stringhi F, Schwartzman C, Sztiler F, Guerreiro M, Canabarro M and Leonhardt C (2007) Clinical factors associated with mortality in septic shock. *Critical Care* 11:P20.
- Donadi Ea, Castelli EC, Arnaiz-Villena A, Roger M, Rey D and Moreau P (2011) Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 68:369-395.
- Ewing B, Hillier L, Wendl MC and Green P (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research* 8:175-185.
- Fabris A, Catamo E, Segat L, Morgutti M, Arraes LC, de Lima-Filho JL and Crovella S (2009) Association between HLA-G 3'UTR 14-bp polymorphism and HIV vertical transmission in Brazilian children. *AIDS (London, England)* 23:177-182.
- Fainardi E, Rizzo R, Lupato A, Ramponi V, Santis GD, Garofano F, Stignani M, Tamborino C, Castellazzi M, Casetta I *et al.* (2009) Brain Edema XIV. *Acta Neurochirurgica* 106:141-145.
- Fallavena PRV, Borges TJ, Paskulin DD, Paludo FJO, Goetze TB, de Oliveira JR, Nóbrega OT, Dias FS and Alho CS (2009) The influences of CD14 -260C>T polymorphism on survival in ICU critically ill patients. *Immunological Investigations* 38:797-811.
- Fons P, Chabot S, Cartwright JE, Lenfant F, L'Faqihi F, Giustiniani J, Herault J-P, Gueguen G, Bono F, Savi P *et al.* (2006) Soluble HLA-G1 inhibits angiogenesis through an apoptotic pathway and by direct binding to CD160 receptor expressed by endothelial cells. *Blood* 108:2608-2615.
- Forrest CM, Mackay GM, Stoy N, Spiden SL, Taylor R, Stone TW and Darlington LG (2010) Blood levels of kynurenines, interleukin-23 and soluble human leucocyte antigen-G at different stages of Huntington's disease. *Journal of Neurochemistry* 112:112-122.
- Fujii T, Ishitani A and Geraghty DE (1994) A soluble form of the HLA-G antigen is encoded by a messenger ribonucleic acid containing intron 4. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 153:5516-5524.
- Fuselli S, Gilman RH, Chanock SJ, Bonatto SL, De Stefano G, Evans CA, Labuda D, Luiselli D, Salzano FM, Soto G *et al.* (2007) Analysis of nucleotide diversity of NAT2 coding region reveals homogeneity across Native American populations and high intra-population diversity. *The Pharmacogenomics Journal* 7:144-152.
- Gazit E (2004) HLA-G is associated with pemphigus vulgaris in jewish patients. *Human Immunology* 65:39-46.
- Geraghty DE, Koller BH and Orr HT (1987) A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84:9145-9149.
- Glas J, Török H-P, Tonenchi L, Wetzke M, Beynon V, Teshome MY, Cotofana S, Schiemann U, Griga T, Klein W *et al.* (2007) The 14-bp deletion polymorphism in the HLA-G gene displays significant differences between ulcerative colitis and Crohn's disease and is associated with ileocecal resection in Crohn's disease. *International Immunology* 19:621-626.
- Gonen-Gross T, Goldman-Wohl D, Huppertz B, Lankry D, Greenfield C, Natanson-Yaron S, Hamani Y, Gilad R, Yagel S and Mandelboim O (2010) Inhibitory NK receptor recognition of HLA-G: regulation by contact residues and by cell specific expression at the fetal-maternal interface. *PLoS One* 5:e8941.
- Gonzalez A, Alegre E, Torres MI, Díaz-Lagares A, Lorite P, Palomeque T and Arroyo A (2010) Evaluation of HLA-G5 plasmatic levels during pregnancy and relationship with the 14-bp polymorphism. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y. : 1989)* 64:367-374.

- Gros F, Sebti Y, de Guibert S, Branger B, Bernard M, Fauchet R and Amiot L (2006) Soluble HLA-G molecules increase during acute leukemia, especially in subtypes affecting monocytic and lymphoid lineages. *Neoplasia* (New York, N.Y.) 8:223-230.
- Hotchkiss RS and Karl IE (2003) The pathophysiology and treatment of sepsis. *The New England Journal of Medicine* 348:138-150.
- Hsu KC, Chida S, Geraghty DE and Dupont B (2002) The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunological Reviews* 190:40-52.
- Hviid TVF, Hylenius S, Rørbye C and Nielsen LG (2003) HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels. *Immunogenetics* 55:63-79.
- ILAS, 2012 <http://www.sepsisnet.org>
- Ishitani a and Geraghty DE (1992) Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:3947-3951.
- Kamishikiryo J and Maenaka K (2009) HLA-G molecule. *Current Pharmaceutical Design* 15:3318-3324.
- Kanai T, Fujii T, Kozuma S, Yamashita T, Miki A, Kikuchi A and Taketani Y (2001) Soluble HLA-G influences the release of cytokines from allogeneic peripheral blood mononuclear cells in culture. *Molecular Human Reproduction* 7:195-200.
- Kapasi K, Albert SE, Yie S, Zavazava N and Librach CL (2000) HLA-G has a concentration-dependent effect on the generation of an allo-CTL response. *Immunology* 101:191-200.
- Kirszenbaum M, Moreau P, Gluckman E, Dausset J and Carosella E (1994) An alternatively spliced form of HLA-G mRNA in human trophoblasts and evidence for the presence of HLA-G transcript in adult lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:4209-4213.
- Knaus Wa, Draper Ea, Wagner DP and Zimmerman JE (1985) APACHE II: a severity of disease classification system. *Critical Care Medicine* 13:818-829.
- Korf BR (2006) *Human Genetics and Genomics*. Third edition. John Wiley Professio, 288 pp.
- Lajoie J, Hargrove J, Zijenah LS, Humphrey JH, Ward BJ and Roger M (2006) Genetic variants in nonclassical major histocompatibility complex class I human leukocyte antigen (HLA)-E and HLA-G molecules are associated with susceptibility to heterosexual acquisition of HIV-1. *The Journal of Infectious Diseases* 193:298-301.
- Laurence A and Shea JJO (2007) T H -17 differentiation : of mice and men. *Nature Immunology* 8:903-905.
- Le Bouteiller P (1999) Mini symposium. The major histocompatibility complex in pregnancy: Part II. Placental HLA-G protein expression in vivo: where and what for? *Human Reproduction Update* 5:223-233.
- Leleu X (2005) Total Soluble HLA Class I and Soluble HLA-G in Multiple Myeloma and Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *Clinical Cancer Research* 11:7297-7303.
- Lila N, Amrein C, Guillemain R, Chevalier P, Fabiani J and Carpentier a (2007) Soluble Human Leukocyte Antigen-G: A New Strategy for Monitoring Acute and Chronic Rejections After Heart Transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 26:421-422.
- Lin a, Yan WH, Xu HH, Tang LJ, Chen XF, Zhu M and Zhou MY (2007) 14 bp deletion polymorphism in the HLA-G gene is a risk factor for idiopathic dilated cardiomyopathy in a Chinese Han population. *Tissue Antigens* 70:427-431.
- Lowe PR, Galley HF, Abdel-Fattah A and Webster NR (2003) Influence of interleukin-10 polymorphisms on interleukin-10 expression and survival in critically ill patients. *Critical Care Medicine* 31:34-38.
- Lucena-Silva N, Monteiro aR, de Albuquerque RS, Gomes RG, Mendes-Junior CT, Castelli EC and Donadi Ea (2012) 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*:1-7.
- Lvovschi V, Arnaud L, Parizot C, Freund Y, Juillien G, Ghillani-Dalbin P, Bouberima M, Larsen M, Riou B, Gorochov G *et al.* (2011) Cytokine profiles in sepsis have limited relevance for stratifying patients in the emergency department: a prospective observational study. *PLoS One* 6:e28870.
- Machado M, Magalhães WC, Sene A, Araújo B, Faria-Campos AC, Chanock SJ, Scott L, Oliveira G, Tarazona-Santos E and Rodrigues MR (2011) Phred-Phrap package to analyses tools: a pipeline to facilitate population genetics re-sequencing studies. *Investigative Genetics* 2:3.

- Matte C, Lajoie J, Lacaille J, Zijenah LS, Ward BJ and Roger M (2004) Functionally active HLA-G polymorphisms are associated with the risk of heterosexual HIV-1 infection in African women. *Aids*:427-431.
- Mitsdoerffer M, Schreiner B, Kieseier BC, Neuhaus O, Dichgans J, Hartung H-P, Weller M and Wiendl H (2005) Monocyte-derived HLA-G acts as a strong inhibitor of autologous CD4 T cell activation and is upregulated by interferon-beta in vitro and in vivo: rationale for the therapy of multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* 159:155-164.
- Monneret G, Voirin N, Krawice-Radanne I, Bohé J, Lepape A, Rouas-Freiss N and Carosella ED (2007) Soluble human leukocyte antigen-G5 in septic shock: marked and persisting elevation as a predictor of survival. *Critical Care Medicine* 35:1942-1947.
- Montgomery KT, Iartchouck O, Li L, Loomis S, Obourn V and Kucherlapati R (2008) PolyPhred analysis software for mutation detection from fluorescence-based sequence data. *Current protocols in human genetics / editorial board, Jonathan L. Haines ... [et al.] Chapter 7:Unit 7.16.*
- Morandi F, Levrieri I, Bocca P, Galleni B, Raffaghello L, Ferrone S, Prigione I and Pistoia V (2007) Human neuroblastoma cells trigger an immunosuppressive program in monocytes by stimulating soluble HLA-G release. *Cancer Research* 67:6433-6441.
- Moreau P, Carosella E, Teyssier M, Prost S, Gluckman E, Dausset J and Kirszenbaum M, 1995 Soluble HLA-G molecule. An alternatively spliced HLA-G mRNA form candidate to encode it in peripheral blood mononuclear cells and human trophoblasts., pp. 231-236 in *Human Immunology*.
- Moreau P, Faure O, Lefebvre S, Ibrahim EC, O'Brien M, Gourand L, Dausset J, Carosella ED and Paul P (2001) Glucocorticoid hormones upregulate levels of HLA-G transcripts in trophoblasts. *Transplantation Proceedings* 33:2277-2280.
- Moreau P, Mouillot G, Rousseau P, Marcou C, Dausset J and Carosella ED (2003) HLA-G gene repression is reversed by demethylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:1191-1196.
- Moser M and Leo O (2010) Key concepts in immunology. *Vaccine* 28 Suppl 3:C2-13.
- Munford RS and Pugin J (2001) Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 163:316-321.
- Naji A, Le Rond S, Durrbach A, Krawice-Radanne I, Creput C, Daouya M, Caumartin J, LeMaout J, Carosella ED and Rouas-Freiss N (2007) CD3+CD4low and CD3+CD8low are induced by HLA-G: novel human peripheral blood suppressor T-cell subsets involved in transplant acceptance. *Blood* 110:3936-3948.
- Nathan C (2002) Points of control in inflammation. *Nature* 420:846-852.
- Navratilova Z (2006) Polymorphisms in CCL2&CCL5 chemokines/chemokine receptors genes and their association with diseases. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia* 150:191-204.
- NCBI, 2012 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3135>
- Nicolae D, Cox NJ, Lester La, Schneider D, Tan Z, Billstrand C, Kuldane S, Donfack J, Kogut P, Patel NM *et al.* (2005) Fine mapping and positional candidate studies identify HLA-G as an asthma susceptibility gene on chromosome 6p21. *American Journal of Human Genetics* 76:349-357.
- Ober C, Aldrich CL, Chervoneva I, Billstrand C, Rahimov F, Gray HL and Hyslop T (2003) Variation in the HLA-G promoter region influences miscarriage rates. *American Journal of Human Genetics* 72:1425-1435.
- Oke SL and Tracey KJ (2009) The inflammatory reflex and the role of complementary and alternative medical therapies. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1172:172-180.
- Park KS, Park JS, Nam JH, Bang D, Sohn S and Lee ES (2007) HLA-E*0101 and HLA-G*010101 reduce the risk of Behcet's disease. *Tissue Antigens* 69:139-144.
- Paul P, Cabestre Fa, Ibrahim EC, Lefebvre S, Khalil-Daher I, Vazeux G, Quiles RM, Bermond F, Dausset J and Carosella ED (2000) Identification of HLA-G7 as a new splice variant of the HLA-G mRNA and expression of soluble HLA-G5, -G6, and -G7 transcripts in human transfected cells. *Human Immunology* 61:1138-1149.
- Pena SDJ, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy FDSG, Kohlrausch F, Magno LAV, Montenegro RC, Moraes MO *et al.* (2011) The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PloS One* 6:e17063.

- Pistoia V, Morandi F, Wang X and Ferrone S (2007) Soluble HLA-G: Are they clinically relevant? *Seminars in Cancer Biology* 17:469-479.
- Rizzo R, Hviid TVF, Govoni M, Padovan M, Rubini M, Melchiorri L, Stignani M, Carturan S, Grappa MT, Fotinidi M *et al.* (2008) HLA-G genotype and HLA-G expression in systemic lupus erythematosus: HLA-G as a putative susceptibility gene in systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 71:520-529.
- Rodríguez JA, Galeano L, Palacios DM, Gómez C, Serrano ML, Bravo MM and Combata AL (2011) Altered HLA Class I and HLA-G Expression Is Associated with IL-10 Expression in Patients with Cervical Cancer. *Pathobiology : Journal of Immunopathology, Molecular and Cellular Biology* 79:72-83.
- Rosado S, Perez-Chacon G, Mellor-Pita S, Sanchez-Vegazo I, Bellas-Menendez C, Citores MJ, Losada-Fernandez I, Martin-Donaire T, Rebolledo N and Perez-Aciego P (2008) Expression of human leukocyte antigen-G in systemic lupus erythematosus. *Human Immunology* 69:9-15.
- Rosseau P LDM, Mouillot G *et al.* (2003) The 14 pb deletion-insertion polymorphism in the 3'UTR region on the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. *Human Immunology* 64:1005-1010.
- Rouas-Freiss N, Gonçalves RM, Menier C, Dausset J and Carosella ED (1997) Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:11520-11525.
- Russell JA (2006) Management of sepsis. *The New England Journal of Medicine* 355:1699-1713.
- Sakaguchi S, Wing K and Miyara M (2007) Regulatory T cells - a brief history and perspective. *European Journal of Immunology* 37 Suppl 1:S116-123.
- Schütt P, Schütt B, Switala M, Bauer S, Stamatis G, Opalka B, Eberhardt W, Schuler M, Horn Pa and Rebmann V (2010) Prognostic relevance of soluble human leukocyte antigen-G and total human leukocyte antigen class I molecules in lung cancer patients. *Human Immunology* 71:489-495.
- Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, Borg C, Saas P, Tiberghien P, Rouas-Freiss N *et al.* (2008) Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 26:212-222.
- Sfeir T, Saha DC, Astiz M and Rackow EC (2001) Role of interleukin-10 in monocyte hyporesponsiveness associated with septic shock. *Critical Care Medicine* 29:129-133.
- Shahrara S, Huang Q, Mandelin AM and Pope RM (2008) TH-17 cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 10:R93.
- Shakhawat A, Shaikly V, Elzatma E, Mavrakos E, Jabeen A and Fernández N (2010) Interaction between HLA-G and monocyte/macrophages in human pregnancy. *Journal of Reproductive Immunology* 85:40-46.
- Silva E, Pedro MDA, Sogayar ACB, Mohovic T, Silva CLDO, Janiszewski M, Cal RGR, de Sousa EF, Abe TP, de Andrade J *et al.* (2004) Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Critical Care (London, England)* 8:R251-260.
- Sirisinha S (2011) Review article Insight into the mechanisms regulating homeostasis in health and disease. *Asian Pacific Journal of Allergy & Immunology*:1-14.
- Snustad DP and Simmons MJ (2008) *Fundamentos de Genética*. 4 edition. GUANABARA-KOOGAN, RIO DE JANEIRO, 778 pp.
- Souto FJD, Crispim JCO, Ferreira SC, da Silva aSM, Bassi CL, Soares CP, Zucoloto S, Rouas-Freiss N, Moreau P, Martinelli aLC *et al.* (2011) Liver HLA-G expression is associated with multiple clinical and histopathological forms of chronic hepatitis B virus infection. *Journal of Viral Hepatitis* 18:102-105.
- Straub RH (2011) Concepts of evolutionary medicine and energy regulation contribute to the etiology of systemic chronic inflammatory diseases. *Brain, Behavior, and Immunity* 25:1-5.
- Tan Z, Randall G, Fan J, Camoretti-Mercado B, Brockman-Schneider R, Pan L, Solway J, Gern JE, Lemanske RF, Nicolae D *et al.* (2007) Allele-specific targeting of microRNAs to HLA-G and risk of asthma. *American Journal of Human Genetics* 81:829-834.
- Tarazona-Santos E, Bernig T, Burdett L, Magalhaes WCS, Fabbri C, Liao J, Redondo RaF, Welch R, Yeager M and Chanock SJ (2008) CYBB, an NADPH-oxidase gene: restricted diversity in humans and evidence for differential long-term purifying selection on transmembrane and cytosolic domains. *Human Mutation* 29:623-632.

- Thurrow HS, Sarturi CR, Fallavena PRV, Paludo FJdO, Picanço JB, Fraga LR, Graebin P, de Souza VC, Dias FS, Nóbrega OdT *et al.* (2010) Very low frequencies of Toll-like receptor 2 supposed-2029T and 2258A (RS5743708) mutant alleles in southern Brazilian critically ill patients: would it be a lack of worldwide-accepted clinical applications of Toll-like receptor 2 variants? *Genetic Testing and Molecular Biomarkers* 14:405-419.
- Torres MI, López-Casado Ma, Luque J, Peña J and Ríos A (2006) New advances in coeliac disease: serum and intestinal expression of HLA-G. *International Immunology* 18:713-718.
- Ugurel S, Rebmann V, Ferrone S, Tilgen W, Grosse-Wilde H and Reinhold U (2001) Soluble human leukocyte antigen-G serum level is elevated in melanoma patients and is further increased by interferon-alpha immunotherapy. *Cancer* 92:369-376.
- Ulloa L and Tracey KJ (2005) The "cytokine profile": a code for sepsis. *Trends in Molecular Medicine* 11:56-63.
- Veit TD and Chies JaB (2009) Tolerance versus immune response -- microRNAs as important elements in the regulation of the HLA-G gene expression. *Transplant Immunology* 20:229-231.
- Veit TD, Cordero Eaa, Mucenic T, Monticciolo Oa, Brenol JCT, Xavier RM, Delgado-Cañedo a and Chies JaB (2009) Association of the HLA-G 14 bp polymorphism with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 18:424-430.
- Veit TD, Vianna P and Chies JAB (2010) HLA-G - From Fetal Tolerance to a Regulatory Molecule in Inflammatory Diseases. *Current Immunology Reviews* 6:1-15.
- Veit TD, Vianna P, Scheibel I, Brenol CV, Brenol C, Brenol JCT, Xavier RM, Delgado-Cañedo A, Gutierrez JE, Brandalize APC *et al.* (2008) Association of the HLA-G 14-bp insertion/deletion polymorphism with juvenile idiopathic arthritis and rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 71:440-446.
- Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, Helmby H, Westendorf A, Buer J, Martin B, Wilhelm C and Stockinger B (2008) Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nature Immunology* 9:1341-1346.
- Verbruggen La, Rebmann V, Demanet C, De Cock S and Grosse-Wilde H (2006) Soluble HLA-G in rheumatoid arthritis. *Human Immunology* 67:561-567.
- Vianna P, Dalmáz CA, Veit TD, Tedoldi C, Roisenberg I and Chies JAB (2007) Immunogenetics of pregnancy: role of a 14-bp deletion in the maternal HLA-G gene in primiparous pre-eclamptic Brazilian women. *Human Immunology* 68:668-674.
- Vincent J-L (2002) Sepsis: The magnitude of the problem. In. *The Sepsis Text 2002*. Kluwer Academy Publisher.
- Vincent J-L, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, Moreno R, Carlet J, Le Gall J-R and Payen D (2006) Sepsis in European intensive care units: Results of the SOAP study*. *Critical Care Medicine* 34:344-353.
- Vincent JL, de Mendonça A, Cantraine F, Moreno R, Takala J, Suter PM, Sprung CL, Colardyn F and Blecher S (1998) Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on "sepsis-related problems" of the European Society of Intensive Care Medicine. *Critical Care Medicine* 26:1793-1800.
- Wastowski IJ, Sampaio-Barros PD, Amstalden EMI, Palomino GM, Marques-Neto JF, Crispim JCO, Biral AC, Rassi DM, Carosella ED, Moreau P *et al.* (2009) HLA-G expression in the skin of patients with systemic sclerosis. *The Journal of Rheumatology* 36:1230-1234.
- Yan W-H, Lin A, Chen B-G and Chen S-Y (2009) Induction of both membrane-bound and soluble HLA-G expression in active human cytomegalovirus infection. *The Journal of Infectious Diseases* 200:820-826.
- Ye S-R, Yang H, Li K, Dong D-D, Lin X-M and Yie S-M (2007) Human leukocyte antigen G expression: as a significant prognostic indicator for patients with colorectal cancer. *Modern Pathology : an Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 20:375-383.
- Yie S-m, Li L-h, Xiao R and Librach CL (2008) A single base-pair mutation in the 3'-untranslated region of HLA-G mRNA is associated with pre-eclampsia. *Molecular Human Reproduction* 14:649-653.
- Zhao L, Zhou Y, Xu Y, Sun Y, Li L and Chen W (2011) Effect of non-surgical periodontal therapy on the levels of Th17/Th1/Th2 cytokines and their transcription factors in Chinese chronic periodontitis patients. *Journal of Clinical Periodontology* 38:509-516.

ANEXOS

Anexo I: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Página 1 de 3.

Título da pesquisa:

Suscetibilidade herdada à infecção e sepse de pacientes criticamente doentes: Estudo simultâneo dos SNPs nos genes CD14, TLR2 e TLR4.

Justificativa e objetivos da pesquisa:

Esta pesquisa tem por objetivo estudar a associação entre os processos inflamatórios e características genéticas. Isso pode contribuir para o conhecimento da evolução da inflamação e identificar algumas características herdadas que seriam responsáveis pelo aumento da chance de uma pessoa ter doenças como a sepse que é uma infecção generalizada.

Um foco de nosso estudo é a ver o risco de sepse entre os pacientes que estiveram internados na Unidade de Tratamento Intensivo Geral do Hospital São Lucas - UTIG / HSL / PUCRS. Para isso, nós analisaremos o material genético (DNA) dos pacientes, que será obtido através de uma amostra do sangue coletado durante os procedimentos de rotina da UTIG / HSL / PUCRS.

Serão estudadas três porções do DNA de cada paciente, isto é, serão estudados três genes, através dos quais será possível se ter um perfil genético de cada pessoa. Os nomes dos genes que serão estudados são os seguintes: 1- gene CD14; 2 - gene TLR4; 3 - gene TLR2.

Após, serão comparados os resultados provenientes do estudo do DNA com os dados que refletem o estado geral de saúde do paciente.

Com este estudo esperamos compreender melhor: (I) o quanto as características genéticas influenciam no sucesso da recuperação de um paciente de UTI; (II) o quanto as características genéticas influenciam no sucesso da recuperação de um paciente com sepse; e (III) o quanto as características genéticas influenciam na suscetibilidade das pessoas às diferentes disfunções orgânicas.

Quando isto for desvendado, a medicina poderá contar com mais um indicador biológico que auxiliará no diagnóstico, na prevenção e no tratamento de diferentes doenças complexas.

Os procedimentos a serem utilizados:

Para realizar este trabalho, vamos usar parte de uma amostra do sangue que é coletado durante os procedimentos de rotina do paciente internado na UTIG / HSL / PUCRS. Também serão consultados os dados bioquímicos, fisiológicos e clínicos presentes no prontuário de cada paciente.

Os desconfortos ou riscos esperados:

O paciente não estará exposto a nenhum desconforto em decorrência da participação neste estudo, pois serão utilizadas amostras de material biológico e dados coletados na rotina da UTIG / HSL / PUCRS.

Garantia de resposta a qualquer pergunta;

O paciente (ou responsável) deve sentir-se à vontade para fazer qualquer pergunta a fim de esclarecer suas dúvidas. Os responsáveis pela pesquisa garantidamente responderão.

Rubrica do Paciente (ou responsável)

Rubrica do Pesquisador

Anexo I: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Página 2 de 3.**Os benefícios que se pode obter:**

Neste momento, o paciente não receberá nenhum benefício direto em decorrência deste estudo. Ainda não são bem conhecidos os efeitos que a herança genética tem sobre as pessoas. No entanto, haverá benefícios para a ciência, pois os dados do paciente estarão contribuindo na descoberta de indicadores genéticos que auxiliarão futuramente o diagnóstico, a prevenção e o tratamento das doenças complexas.

No futuro, caso alguma informação considerada importante seja identificada no material genético analisado em decorrência desta pesquisa, os pesquisadores buscarão o paciente (ou familiares) para oferecer-lhe acesso a tal informação.

Liberdade de abandonar a pesquisa sem prejuízo para si:

Caso o paciente (ou o responsável) tenha vontade de ser retirado da pesquisa, isso poderá ser feito a qualquer momento, sem necessidade de que se apresentem justificativas e sem que se ele sofra qualquer tipo de prejuízo. Unicamente o paciente (ou o responsável) deverá comunicar aos pesquisadores sua decisão de abandonar a pesquisa, retirando-se o consentimento dado.

Compromisso com informação atualizada do estudo;

Toda e qualquer informação atualizada sobre este estudo estará à disposição de todos os que participam do mesmo. Os resultados deste estudo poderão ser comunicados aos pacientes (ou responsáveis), sempre que solicitados.

Garantia de acompanhamento adequado;

A equipe de profissionais de saúde que atende no UTIG / HSL / PUCRS tem uma rotina estabelecida no acompanhamento dos pacientes da UTI. Esta rotina de atendimento ao paciente não será alterada em nada por ocasião deste estudo. Assim, garantimos que a concordância ou não na participação deste estudo não implicará em qualquer modificação na rotina do tratamento já estabelecido para os pacientes. Os resultados destes exames não terão efeito algum sobre o paciente.

Garantia de Privacidade:

A dignidade e a privacidade do paciente, em relação a qualquer dado utilizado nesta pesquisa, serão mantidas. Os dados dos pacientes estarão protegidos pelos pesquisadores responsáveis contra qualquer tipo de uso que não os previstos na investigação. Além disto, os dados receberão um número pelo qual serão identificados, garantindo assim, também, o anonimato dos pacientes. A identidade do paciente será, portanto, totalmente desconhecida pela equipe do trabalho de pesquisa ou por qualquer outra pessoa.

Permissão para uso da amostra de DNA e outros dados em estudos futuros:

A partir da mesma amostra do material genético, poderão ser futuramente estudados outros segmentos de DNA. Para isso, o paciente (ou responsável) poderá permitir que sua amostra de DNA seja usada em novos estudos. Mesmo que esta permissão seja dada, estudos futuros só poderão ser realizados desde que sejam aprovados antes por um Comitê de Ética em Pesquisa.

Rubrica do Paciente (ou responsável)

Rubrica do Pesquisador

Anexo I: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Página 3 de 3.

Eu, _____ (*preencher com nome do paciente ou responsável*) fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada. Recebi informação a respeito dos procedimentos do estudo e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim eu o desejar. A equipe da Dra. Clarice S. Alho e do Dr. Fernando S. Dias certificou-me de que todos os dados referentes ao paciente desta pesquisa serão confidenciais, bem como o seu tratamento não será modificado em razão desta pesquisa e que, ainda, terei a liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa se assim o desejar. Assim, como sujeito de pesquisa ou como responsável pelo paciente _____ (*preencher com nome do paciente*), dou consentimento para participar da pesquisa.

Eu também permito que a amostra de material genético seja armazenada na universidade, sob responsabilidade dos Pesquisadores Coordenadores, para serem estudados novos genes importantes que possam futuramente contribuir no mesmo objetivo deste estudo. Minha permissão vale desde que os novos estudos sejam sempre devidamente aprovados por um Comitê de Ética em Pesquisa e estejam sob responsabilidade dos mesmos Pesquisadores Coordenadores. Fui informado também que, nesta situação, caso alguma informação considerada importante seja identificada no material genético analisado em decorrência da pesquisa, os pesquisadores poderão buscar a mim (paciente ou responsável) para oferecer acesso a tal informação.

Caso eu tenha novas perguntas sobre este estudo, posso telefonar ao Dr. Fernando S. Dias nos telefones (51) 99743803 ou (51) 3320 3000 ramal 3037. Para qualquer pergunta sobre os meus direitos como participante deste estudo, ou se penso que fui prejudicado pela minha participação, posso chamar também à Dra. Clarice S. Alho nos telefones (51) 9113 6334 ou (51) 3320 3545 e os responsáveis pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP-PUCRS no telefone (51) 3320 3000 ramal 3345. As ligações para os celulares poderão ser realizadas a cobrar.

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

**Assinatura do Paciente
(ou responsável)**

**Nome do Paciente
(ou responsável)**

____/____/20____

Data

Assinatura do Pesquisador

Nome do Paciente

____/____/20____

Data

Na impossibilidade de autonomia para a leitura deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, o mesmo foi lido para _____ (*preencher com nome do paciente ou do responsável*) pelo pesquisador _____ (*preencher com nome do pesquisador*) enquanto eu estava presente como testemunha.

Assinatura da Testemunha

Nome da Testemunha

____/____/20____

Data

Anexo II: Protocolo de Pesquisa Aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa-PUCRS.

MESTRADO - PIETRA



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

OF. CEP-1420/11

Porto Alegre, 23 de setembro de 2011.

Senhora Pesquisadora,

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 11/05593 intitulado "**Varição genética do Éxon 8 de HLA-G em pacientes críticos**"

Salientamos que seu estudo pode ser iniciado a partir desta data.

Os relatórios parciais e final deverão ser encaminhados a este CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Rodolfo Herberto Schneider
Coordenador do CEP-PUCRS

Ilma. Sra.
Prof. Clarice Sampaio Alho
FABIO
Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 - 3º andar - CEP: 90610-000
Sala 314 - Fone Fax: (51) 3320-3345
E-mail: cen@pucrs.br