

RENATA SLOWIK

MECANISMOS EPIGENÉTICOS E CONTROLE DA EXPRESSÃO DO GENE  
*HLA-G*

*Uma pesquisa in silico para identificar as Ilhas CpG na região promotora do  
gene HLA-G*

CURITIBA

2009

RENATA SLOWIK



MECANISMOS EPIGENÉTICOS E CONTROLE DA EXPRESSÃO DO GENE  
*HLA-G*

*Uma pesquisa in silico para identificar as Ilhas CpG na região promotora do  
gene HLA-G.*

Monografia apresentada para  
obtenção do título de Bacharel em  
Ciências Biológicas pela  
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria da  
Graça Bicalho

CURITIBA

2009

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço primeiramente aos meus pais, Fernando Slowik e Thelma Ap. Fernandes Slowik, por todo o amor, carinho e apoio de sempre.*

*Agradeço ao meu namorado, Samuel. Sem você para me ajudar, acalmar e fazer rir quando eu me sentia perdida essa jornada teria sido muito triste. Te amo muito!*

*A todos os amigos e colegas da Graduação, por tantos momentos memoráveis.*

*Agradeço à minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria da Graça Bicalho, por me dar essa oportunidade em um momento em que tudo parecia estar dando errado.*

*Por fim, agradeço à UFPR por uma excelente educação.*

## RESUMO

O gene *HLA-G* faz parte do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) e encontra-se no cromossomo 6, na posição 6p21.3. Ele apresenta uma distribuição tecidual restrita e possui funções relacionadas à supressão da resposta imune através da interação da proteína HLA-G com receptores inibitórios presentes nas células *Natural Killer* (NK) e linfócitos T. Um dos principais papéis atribuídos à HLA-G tem sido a indução da tolerância imunológica materna ao feto semi-alogênico no processo gestacional. Além disso, em situações patológicas tais como, células neoplásicas, transformadas ou infectadas por vírus, sua expressão tem sido considerada uma estratégia, ou mecanismo de escape ao sistema imune do hospedeiro.

O controle da expressão de *HLA-G* ocorre via elementos em *cis* presentes em sua região promotora/reguladora quando interagem com fatores transcricionais e proteínas ativadoras/inibidoras de reguladores (*elementos de ação trans*) e acontece tanto em nível transcricional como traducional. Além disso, eventos epigenéticos podem ocorrer em ambos os níveis. Epigenética envolve o estudo de mudanças na expressão gênica sem que ocorram mudanças na sequência de DNA. Os principais eventos epigenéticos são: a metilação das citosinas (C) adjacentes às guaninas (G) na fita do DNA; modificações pós-traducionais da cauda das histonas e, controle da expressão do gene por associação do RNAm a *microRNAs*. O gene *HLA-G* está sujeito a todas essas formas de controle da expressão gênica de forma interativa. Neste trabalho ilustramos algumas influências dos eventos epigenéticos na expressão do *HLA-G* e, mostramos que variações nucleotídicas presentes nos alelos de *HLA-G* podem exercer grande influência no controle da sua expressão, quaisquer que sejam os mecanismos atuantes.

## ABSTRACT

The HLA-G is part of the Major Histocompatibility Complex (MHC) and is located on chromosome 6 at position 6p21.3. It presents a restricted tissue distribution and has functions related to the suppression of the immune response through the interaction of protein with HLA-G inhibitory receptors in cells Natural Killer (NK) and T lymphocytes. One of the main roles of the HLA-G has been the induction of maternal immune tolerance to the semi-allogeneic fetus in the gestation process. Moreover, in pathological conditions such as cancer cells, transformed or infected by virus, its expression has been considered a strategy or mechanism to escape the host immune system. The control of expression of HLA-G occurs via cis elements present in its promoter region / regulatory when they interact with transcriptional factors and proteins activating / inhibitory controls (action elements trans) and occurs at both translational and trascricional. Furthermore, epigenetic events can occur at both levels. Epigenetics involves the study of changes in gene expression that occur without changes in DNA sequence. The main epigenetic events are the methylation of cytosine (C) adjacent to guanine (G) in the strand of DNA, post-translational modifications of histone tails, and control of gene expression by association of the mRNA microRNAs. The gene HLA-G is subject to all these forms of control of gene expression interactively. In this paper we illustrate some influences of epigenetic events in the expression of HLA-G and we show that nucleotide variations present in the alleles of HLA-G may exert great influence in controlling their expression, whatever the operating mechanisms.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	7
2. OBJETIVO GERAL .....	8
2.1. Objetivo Específico .....	8
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	8
3.1. Epigenética .....	8
3.1.1. Modificações covalentes das histonas .....	9
3.1.2. Modificação do DNA: metilação .....	11
3.1.3. Controle da expressão mediado por RNA .....	14
3.2. MHC .....	16
3.3. HLA-G .....	19
3.3.1. O gene, a proteína e as isoformas do HLA-G .....	20
3.3.2. HLA-G e a evasão da resposta imune .....	22
3.3.3. Mecanismos de controle da expressão do HLA-G .....	23
3.3.4. Polimorfismos no HLA-G .....	26
3.3.5. Epigenética e <i>HLA-G</i> .....	28
4. METODOLOGIA .....	32
4.1. Identificação das Ilhas de CpG do gene <i>HLA-G</i> .....	32
5. RESULTADOS .....	33
5.1. Análise <i>In Silico</i> do gene <i>HLA-G</i> .....	33
6. DISCUSSÃO .....	36
7. CONCLUSÕES .....	39
8. REFERÊNCIAS .....	40

## 1. INTRODUÇÃO

O gene *HLA-G* faz parte do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*), situado no cromossomo 6, na região 6p21.3. É um gene de classe Ib, possui oito exons e sete introns e seu transcrito primário pode sofrer processamento (*splicing*) alternativo e gerar sete isoformas protéicas sendo quatro ligadas à membrana (HLA-G1, -G2, -G3 e -G4) e três solúveis (HLA-G5, -G6 e -G7). Apresenta 45 alelos identificados atualmente e, quando comparado com os genes *HLA* clássicos, possui um polimorfismo discreto.

Sua expressão apresenta uma restrição tecidual; está presente em trofoblastos, na interface materno-fetal; tecidos como o timo, córnea, coração e pulmão; além de ser encontrado em tumores malignos e estar relacionado a doenças inflamatórias. Suas funções incluem uma variedade de ações supressoras do sistema imune, como a capacidade de inibir a citotoxicidade das células NK e dos linfócitos T, além da resposta proliferativa dos linfócitos T. Na placenta, a expressão de HLA-G parece ser de crucial importância para o sucesso da simbiose materno-fetal e a tolerância materna ao embrião; e sua expressão em tumores e doenças auto-imunes indica um mecanismo de escape da vigilância imune desenvolvido nessas, e outras, patologias.

Os elementos reguladores em *cis* de controle da transcrição do *HLA-G* são bem conhecidos, este gene possui um intensificador A, a seqüência consenso interferon (ISRE) e o módulo SXY em sua região promotora, esses elementos formam um módulo ligante para proteínas que atuam na ativação da transcrição. No entanto a expressão da molécula HLA-G não é explicada apenas pela ação desses elementos.

Epigenética é o ramo do conhecimento que tenta entender mecanismos e mudanças que atuam sobre o DNA e que influenciam na expressão gênica sem ocorrência de mudanças na seqüência de nucleotídeos. Ou seja, são eventos que envolvem mudanças fenotípicas, mas não genotípicas.

A expressão do gene *HLA-G* é controlada tanto no nível transcricional como traducional e ambas as formas de controle são influenciadas por eventos epigenéticos. As variações nucleotídicas existentes no gene *HLA-G* podem agir

na expressão do mesmo por influenciar diretamente em mecanismos de controle epigenéticos, estimulando ou reprimindo a expressão gênica.

## 2. OBJETIVO GERAL

Buscar na literatura específica os mecanismos epigenéticos já descritos que influenciam no controle da expressão do gene *HLA-G*.

### 2.1. Objetivo Específico

Pesquisa *in silico* das ilhas de CpG presentes na região promotora do gene *HLA-G* que poderiam influenciar na sua expressão visando otimizar futuros procedimentos e rotina laboratorial associados ao estudo do controle epigenético de *HLA-G* (metilação, acetilação, miRNAs).

## 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1. Epigenética

O termo epigenética foi inicialmente introduzido na década de 1940 por Conrad Waddington para descrever “as interações dos genes com seu ambiente, que resultam na expressão do fenótipo” (MURRELL et al, 2005). Uma definição atual de epigenética é: o estudo de mudanças na expressão gênica, mitóticas e/ou meióticas, herdáveis e que não podem ser explicadas por mudanças na sequência de DNA (BIRD, 2002).

Os três principais mecanismos epigenéticos de controle da expressão gênica compreendem a modificação covalente do DNA e/ou das histonas (FIGURA 1), e o controle da expressão gênica mediado por microRNAs (miRNA) (MORRIS, 2005).



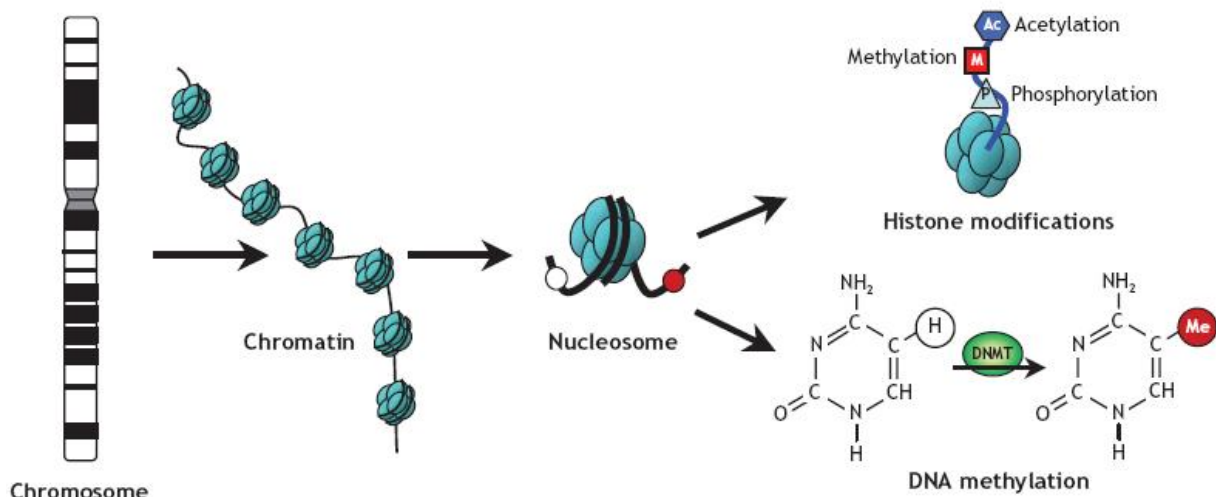


FIGURA 1- ESQUEMA DAS PRINCIPAIS MODIFICAÇÕES EPIGENÉTICAS.

Fonte: RODENHISER; MANN, 2006.

Nota: Em eucariotos, 146 pb de DNA genômico envolvem um octâmero de histonas (composto de duas cópias das histonas H2A, H2B, H3 e H4) para formar a unidade básica da cromatina, os nucleossomos. A cromatina, por sua vez, é condensada para formar uma estrutura ainda mais compacta, o cromossomo. As modificações epigenéticas, embora herdáveis, são reversíveis, podem ocorrer ao nível de DNA e/ou de histonas e afetam a organização da cromatina, bem como a expressão de genes.

### 3.1.1. Modificações covalentes das histonas

As modificações pós-traducionais das histonas incluem a acetilação, metilação, fosforilação, poli-ADP ribosilação, ubiquitinação, entre outros. Tais alterações covalentes ocorrem nas extremidades amino-terminais destas proteínas que emergem dos nucleossomos. Histonas modificadas por essas alterações são reconhecidas por complexos de remodelamento da cromatina que as modificam, tornando-as acessíveis ou não aos fatores de transcrição (FIGURA 2) (MATOUK ; MARSDEN, 2008).

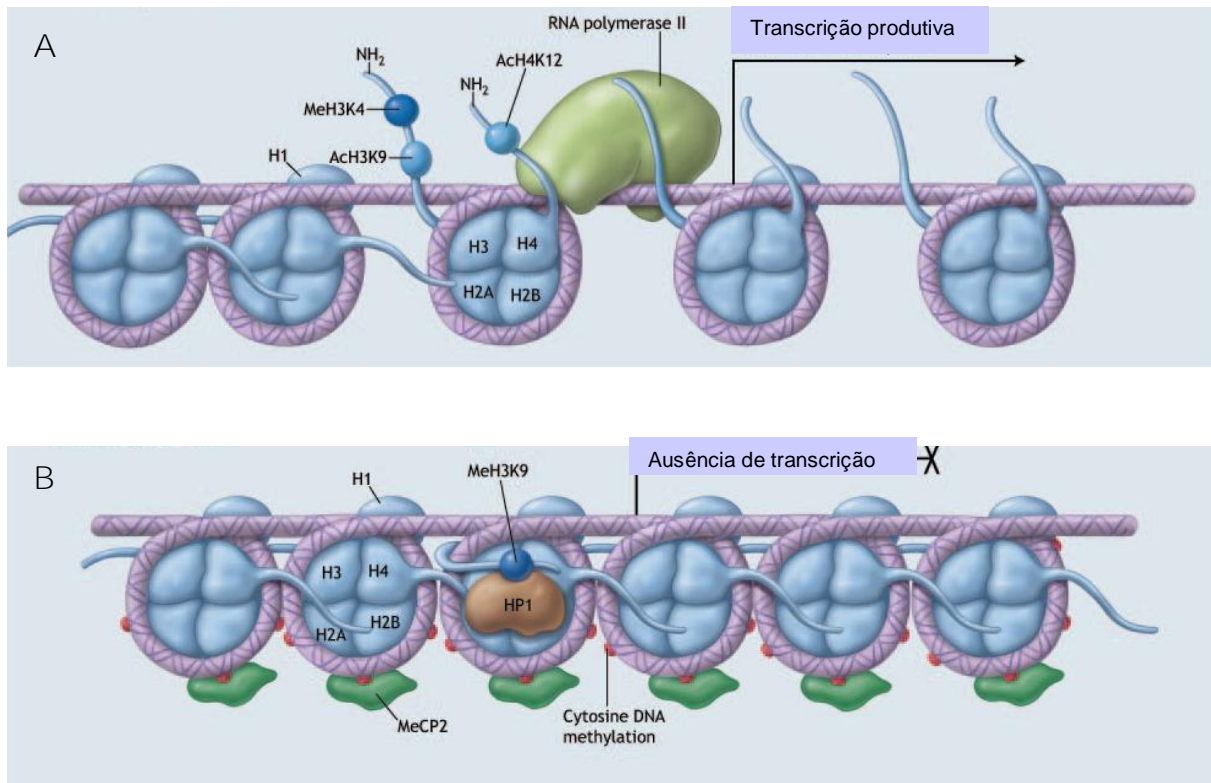


FIGURA 2: MECANISMOS EPIGENÉTICOS IMPLICADOS NA ATIVAÇÃO OU REPRESSÃO DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA.

Fonte: MATOUK; MARSDEN, 2008.

Nota: A figura superior (2A) mostra o DNA desmetilado (ausência de esferas vermelhas), e as modificações pós-traducionais das histonas que são: histona H3 com a lisina 4 metilada (MeH3K4), histona H3 com a lisina 9 acetilada (AcH3K9) e histona 4 com a lisina 12 acetilada (AcH4K12). Essas modificações proporcionam uma estrutura conformacional acessível para a RNA polimerase II e transcrição ativa. A figura abaixo (2B) mostra a metilação do DNA (esferas vermelhas) interagindo com as proteínas MeCP2, ausências das modificações das histonas anteriormente descritas na figura 2A e metilação da histona 3 na lisina 9. Essas alterações promovem a compactação da cromatina e ausência de transcrição.

Dentre os processos de modificação das histonas o melhor caracterizado é o de acetilação/desacetilação, o qual é regulado pelas enzimas acetiltransferases (HATs) e desacetilases (HDACs). As HATs catalisam a adição do grupo acetil da molécula doadora acetil-coenzima A (acetil-CoA) aos resíduos de lisina das histonas, o que neutraliza a carga positiva das extremidades destas proteínas, enfraquecendo as interações eletrostáticas entre os nucleossomos, bem como entre as histonas e o DNA (WAGGONER, 2007; YOO e JONES, 2006; STERNER e BERGER, 2000). Dessa forma, a cromatina adota uma configuração mais aberta e, conseqüentemente, torna-se acessível à maquinaria de transcrição celular (WAGGONER, 2007). Embora a acetilação das histonas promova uma descondensação parcial dos domínios cromossômicos, tal configuração apenas denota uma região

transcricionalmente competente, sem estar, necessariamente, correlacionada com a ativação da transcrição *per se* (MATOUK e MARSDEN, 2008). As HDACs, por sua vez, desacetilam as histonas que, então, ligam-se fortemente ao DNA, tornando a cromatina condensada e transcricionalmente inativa (VERMA e SRIVASTAVA, 2002; YOO e JONES, 2006). Em função de sua ação, as HATs são consideradas co-ativadoras da transcrição, enquanto as HDACs são consideradas co-repressoras da transcrição (ROUNTREE et al, 2001).

### 3.1.2. Modificação do DNA: metilação

A metilação do DNA envolve a adição covalente do grupo metil ( $\text{CH}_3$ ), que advém do doador S-adenosilmetionina, ao carbono 5' da citosina, formando a quinta base do DNA humano, a 5-metilcitosina, identificada em 1948 (SINGAL e GINDER, 1999). As citosinas metiladas correspondem a 0,75-1% do total de bases do DNA (WORM e GULDBERG, 2002).

Em geral, as citosinas adjacentes a uma guanina (no contexto 5' CG 3'), portanto, pertencentes aos dinucleotídeos CpGs (a letra *p* entre as bases C e G denota o grupo fosfato), são passíveis de serem metiladas (BIRD, 2002). A maioria dos dinucleotídeos CpGs foram progressivamente eliminados do genoma de eucariotos superiores durante a evolução em função do processo de deaminação espontânea que converte 5-metil-citosina em timina (T) (SINGAL e GINDER, 1999; ANTEQUERA e BIRD, 1999). Grande parte dos dinucleotídeos CpGs remanescentes (cerca de 70% a 90%), que não estão presentes em ilhas de CpGs, encontram-se metilados no homem e na maioria dos vertebrados (SINGAL e GINDER, 1999; ANTEQUERA e BIRD, 1999; WILSON et al, 2007). Os dinucleotídeos são encontrados em maiores concentrações nas ilhas de CpG, as quais estão geralmente presentes na região 5'UTR dos genes, especialmente no promotor e no primeiro exon. As ilhas são regiões com cerca de 1 kb de tamanho, que ocorrem em média a cada 100 kb e possuem frequência de dinucleotídeos CpG aproximadamente 10 vezes maior que o restante do genoma. Estas possuem uma razão de CpG para GpC de pelo menos 60% e ocorrem em mais da metade dos genes em

humanos (SINGAL e GINDER, 1999; ANTEQUERA e BIRD, 1999; BIRD, 2002). Elas foram definidas em 1987 como regiões com mais de 200 pares de bases que contenham pelo menos 50% de G+C e uma razão entre o observado e esperado igual ou superior a 0,6 (GARDINER-GARDEN e FROMMER, 1987).

Tem sido proposto duas hipóteses para o papel evolucionário da metilação. Em primeiro lugar, em virtude da quantidade de genes e o aumento da complexidade biológica dos organismos ao longo da evolução, a eficiência do controle transcricional teve que ser aprimorada. Ou seja, um possível mecanismo adicional deste controle seria desempenhado pela metilação do DNA, que, permitiria aos vertebrados acumular e utilizar genes extras, importantes para seu desenvolvimento (BIRD, 2002). A outra teoria admite que a metilação poderia silenciar elementos genéticos parasíticos, como o genoma de vírus; e móveis, como os transposons, atuando como um mecanismo de defesa celular contra DNAs estranhos (SINGAL e GINDER, 1999). A metilação é catalisada por um grupo de enzimas, denominadas de DNA metilases, ou DNA metiltransferases (DNMTs). Dentre elas citam-se: DNMT1, DNMT2 e DNMT3, com suas isoformas. A DNMT1 reconhece preferencialmente substratos de DNA que se apresentam metilados em apenas uma fita (o que se denomina de DNA hemi-metilado), possibilitando que, durante a replicação, ocorra a propagação do padrão de metilação às fitas recém sintetizadas (BIRD, 2002; PRADHAN e ESTEVE, 2003). Assim, esta enzima garante a manutenção da metilação pós-replicação por produzir dinucleotídeos CpGs simetricamente metilados na dupla fita de DNA (TYCKO, 2000).

A DNMT2 possui um domínio catalítico sem atividade de DNMT em humano e, conseqüentemente, não apresenta capacidade de metilação (YANG, 2001; ROBERTSON e JONES, 2000).

A DNMT3a e DNMT3b metilam com igual eficiência o DNA hemi-metilado e não metilado, *in vitro* e *in vivo*, são altamente expressas em células tronco-embrionárias e, são encontrados em níveis relativamente baixos nos tecidos somáticos adultos (YANG, 2001; ROBERTSON e JONES, 2000).

Estas enzimas atuam no processo de metilação *de novo*, adicionando grupos metil em locais do DNA em que não existe metilação, mesmo na fita oposta (SINGHAL e THOMSON, 2004). O padrão de metilação resultante da

ação da DNMT3 é estabelecido durante a embriogênese (ROUNTREE et al, 2001).

Ao contrário das DNMTs, as desmetilases atuam ativamente promovendo a desmetilação do DNA. A 5-metilcitosina glicosilase, por exemplo, remove a citosina metilada do DNA e, através do mecanismo de reparo do DNA o resíduo de citosina não metilado é novamente adicionado (GROBAEK et al, 2007).

A metilação do DNA está vinculada ao mecanismo de silenciamento gênico. Geralmente, nas células normais, os dinucleotídeos CpGs presentes nas ilhas de CpG são desmetilados e a maioria da metilação ocorre nos dinucleotídeos presentes em DNA não-codificante (SINGAL e GINDER, 1999). Exceções a esta regra envolvem os genes presentes no cromossomo X inativo das mulheres, que possuem as ilhas de CpG metiladas; e em genes imprintados, em que apenas o alelo materno ou paterno é expresso (BIRD, 2002; ROBERTSON e JONES, 2000). A metilação da citosina pode afetar a expressão dos genes por impedir estericamente a ligação de fatores de transcrição a seus sítios de reconhecimento presentes na região reguladora de seus respectivos genes. A inativação gênica também pode decorrer do recrutamento de complexos contendo repressores transcricionais e HDACs ao DNA metilado (SINGHAL e THOMSON, 2004). Tem sido verificado, inclusive, que as DNMTs podem suprimir a atividade transcricional dos genes por recrutar diretamente histonas desacetilases (ROUNTREE et al, 2001).

O padrão de metilação em mamíferos é estabelecido no início do desenvolvimento pelas DNMT3a e 3b, responsáveis por novas metilações, e é copiado para células somáticas pela DNMT1, responsável pela manutenção da metilação existente (BIRD, 2002; YOO e JONES, 2006). Após ocorrer a fertilização, inicia-se uma onda de desmetilação durante a clivagem, seguido pela metilação *de novo* do genoma principalmente após a implantação do blastocisto e, esse processo pode continuar lentamente durante o restante do desenvolvimento (JAENISH e BIRD, 2003). Acredita-se que esse processo de desmetilação-remetilação converte os padrões de metilação específicos dos gametas para os específicos de tecidos somáticos (BIRD, 2002). Assim, com a diferenciação do embrioblasto, genes tecidos específicos são desmetilados de

maneira tecido-específica, enquanto os genes constitutivos permanecem desmetilados (YANG et al, 2001; TURKER, 2002).

### 3.1.3. Controle da expressão mediado por RNA

MicroRNAs (miRNA) são RNAs pequenos, endógenos e não codificantes, com aproximadamente 22 nucleotídeos de comprimento que atuam na regulação da expressão gênica através da interação com o RNA mensageiro (RNAm). É importante diferenciar os termos RNA de interferência (siRNA, do inglês *small interfering RNA*), e microRNA: miRNAs são sempre codificados a partir do genoma; enquanto siRNA pode tanto ser endógeno como exógeno; no entanto, ambos atuam regulando a expressão gênica a partir de um RNA dupla fita (dsRNA, do inglês *double-stranded RNA*) e são processados de formas semelhantes. A sigla iRNA, que também é lida como RNA de interferência descreve o fenômeno de silenciamento gênico mediado tanto pelo siRNA como pelo miRNA a partir de um dsRNA. Via de regra siRNA leva a degradação do RNAm e miRNA pode tanto levar a degradação, como apenas a inativação do RNAm alvo (KETTING e PLASTERK, 2004). Acredita-se que >60% dos RNAm humanos são alvos de miRNAs, e atualmente já foram identificados mais de 1000 genes codificando miRNAs em humanos (VOLINIA et al, 2009).

O miRNA é transcrito pela enzima RNA Polimerase II, gerando um longo miRNA primário (pri-miRNA) que pode conter mais de um miRNA. No núcleo, a enzima Drosha forma um complexo com a proteína ligadora de RNA dupla fita DGCR8 e o pri-miRNA é processado em um miRNA precursor de ~70 nt (pré-miRNA) no formato de um grampo de cabelo (*stem-loop, hairpin*). Drosha é uma RNase III, essencial para o processamento de miRNAs capazes de serem exportados do núcleo. O pré-miRNA é exportado para o citosol pelo complexo Exportina 5 dependente de GTP. No citosol o pré-miRNA é processado pela enzima Dicer gerando um RNA dupla fita (dsRNA) de aproximadamente 22 nucleotídeos. Este RNA é incorporado ao complexo silenciador induzido por RNA (RISC), neste complexo apenas uma fita do dsRNA é considerado o miRNA maduro e se liga ao RNAm alvo regulando a expressão gênica tanto em nível transcricional, traducional ou ambos. (KETTING e PLASTERK, 2004;

HOWELL et al, 2009; MEOLA et al, 2009) (FIGURA 3). A fita restante do dsRNA, que não foi incorporada ao complexo RISC é denominada miRNA\* e é degradada (MEOLA et al, 2009).

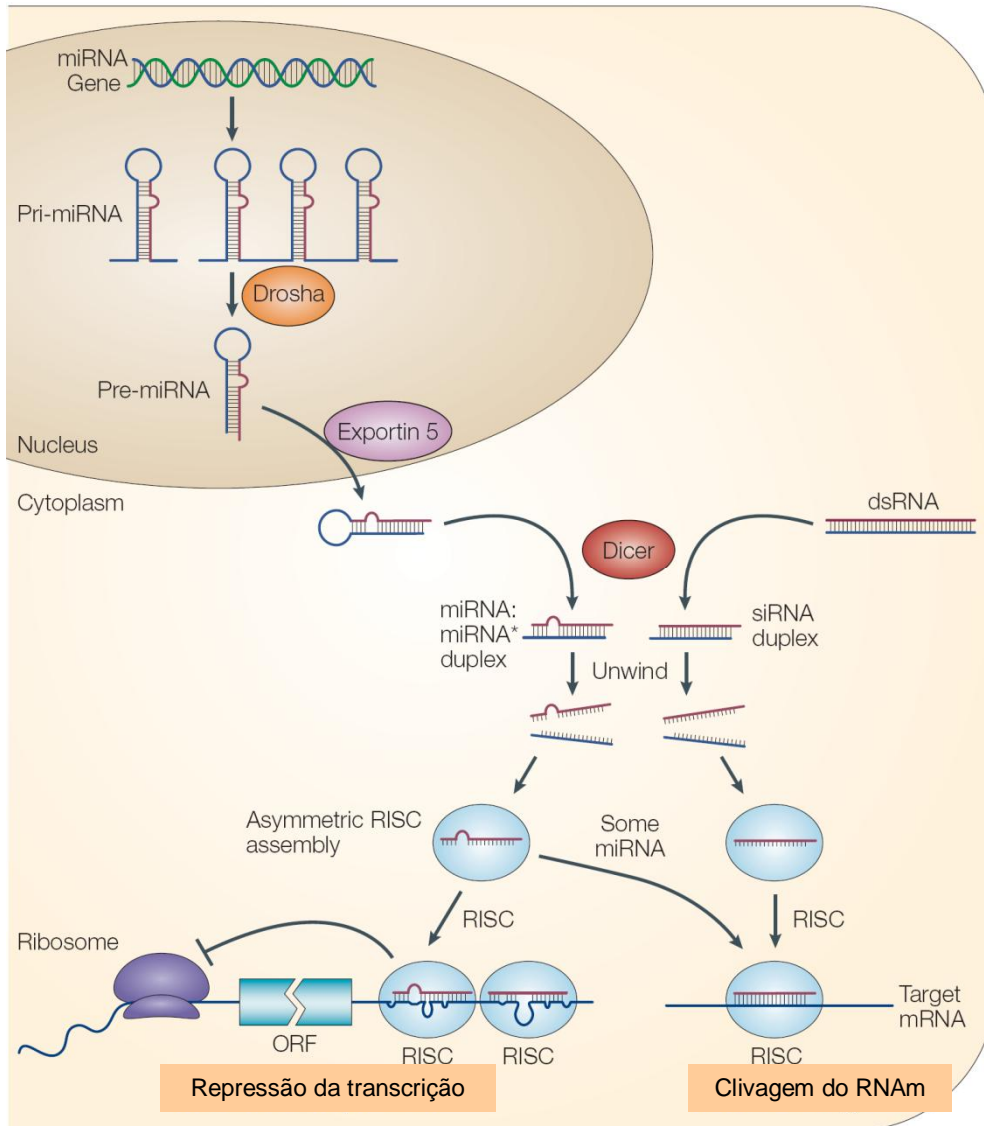


FIGURA 3: EVENTOS RESPONSÁVEIS PELO PROCESSAMENTO E FORMAÇÃO DE microRNAs e siRNAs.

Fonte: He e Hannon, 2004

Nota: O microRNA é transcrito a partir do DNA, o microRNA primário é degradado pela enzima Drosha em microRNA precursor, este é exportado para o citoplasma pela proteína Exportina 5, processado pela enzima Dicer e incorporado no complexo protéico RISC, juntamente com o RNAm, onde atuará reprimindo a transcrição, ou degradando o RNAm. O RNA de interferência (siRNA) sofre o mesmo processamento, exceto que é inserido na célula na forma de RNA dupla fita e não passa pela fase nuclear.

No centro do Complexo RISC esta a proteína Argonaute (Ago), em *Drosophila* miRNA e siRNA adaptam-se respectivamente as proteínas Argo1 e Argo2. Tomari em 2009 mostrou, em *Drosophila*, que o duplex miRNA/miRNA\*

liga-se a Argo1 na forma de dupla fita; o carregamento de Argo1-RISC é dependente de ATP, no entanto o processamento na forma madura de Argo1-RISC não requer nem ATP, nem a atividade cortadora da Argo1 (TOMARI, 2009).

miRNAs se ligam aos seus sítios-alvo com complementariedade não perfeita, geralmente na região 3' UTR do RNAm. O principal fator responsável pelo reconhecimento do RNAm alvo pelo miRNA é a região semente (*seed region*) do miRNA que consiste em ~7 nt na região 5' do miRNA e apresenta pareamento perfeito com o RNAm alvo (ROBINS et al, 2005; SETHUPATHY E COLLINS, 2008; MEOLA et al, 2009).

Li et al. (2006) demonstraram que miRNAs não são apenas fatores que inativam a tradução. Eles planejaram quatro dsRNAs que ativaram a expressão dos genes-alvo *E-caderina*, *p21* e *VEGF*. A indução da expressão de mRNA foi rotineiramente detectável entre 2 a 10 vezes mais que o normal, inclusive, a linhagem celular de câncer de próstata DU-145, que expressa a proteína E-caderina, mostrou aumento na expressão após tratamento com os dsRNAs. A linhagem celular HeLa não expressa a proteína E-caderina devido a metilação do promotor desse gene, nessa linhagem a expressão de E-caderina só foi induzida por dsRNA após tratamento com o agente desmetilante 5-azacitidina, indicando que a metilação pré-estabelecida do promotor impedia a ativação do gene por dsRNA. O controle da expressão do gene *E-caderina* também foi testado desenhando-se dsRNA cujo alvo correspondia a Ilhas de CpG desse gene. O resultado foi o declínio da produção da proteína correspondente, mostrando que a ativação gênica induzida por dsRNA é dependente da região alvo (LI et al, 2006).

### 3.2. MHC

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*) foi primeiramente descrito em camundongos, no ano de 1936, e recebeu esse nome por ter sido relacionado com o resultado de transplantes realizados nesses animais. As primeiras moléculas foram



descritas como antígenos polimórficos da superfície celular e eram codificadas por um *locus* gênico denominado H-2. Os produtos desse sistema gênico constituiriam a principal barreira imunológica e o sucesso dos transplantes dependeria do grau de similaridade H-2 entre doador e receptor para antígenos então denominados de antígenos de histocompatibilidade. Posteriormente, complexos gênicos homólogos, envolvidos na resposta imune de forma semelhante, foram sendo descritos em várias espécies de mamíferos (DUNHAM et al,1987)

O Complexo de Histocompatibilidade Humano (HLA, do inglês *Human Leucocyte Antigen*) foi descoberto na década de 50, por Dausset, Payne e van Rood quando, ao realizarem estudos sorológicos em pacientes politransfundidos, identificaram a presença de anticorpos leucoaglutinantes. O primeiro antígeno foi descrito por Dausset e denominado Mac (atual HLA-A2) (LAMM e OLAISEN, 1985; BELL, 1989).

O sistema gênico HLA encontra-se no cromossomo 6 na banda 6p21.31 e abrange 4 megabases de extensão. Essa região possui diversos genes associados ao sistema imune, sendo vários não pertencentes ao sistema *HLA* (PARHAM, 2001). Essa região do genoma, de acordo com a estrutura e função das proteínas codificadas a partir dos genes nela existentes, foi subdividida em regiões de classe I, II e III (FIGURA 4) (CHRISTIANSEN et al., 1994).

A região de classe I codifica os seguintes genes: *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C*; conhecidos como HLA clássicos, ou de classe Ia; e *HLA-E*, *HLA-F* e *HLA-G*; conhecidos como HLA não clássicos ou de classe Ib. Os genes clássicos codificam para a cadeia  $\alpha$  das moléculas HLA de classe I cuja estrutura se completa com uma cadeia leve de  $\beta$ 2-microglobulina, codificada por um gene de mesmo nome localizado no cromossomo 15 e são expressos em todas as células nucleadas. Os genes não clássicos apresentam distribuição tecidual restrita, são pouco polimórficos e podem apresentar diferentes isoformas, devido ao processamento alternativo do RNAm. *HLA-C*, *E* e *G* são os únicos genes HLA expressos pelas células trofoblásticas na zona de contato entre a mãe e o feto (LEWIN, 2001; FAINARDI et al., 2003).

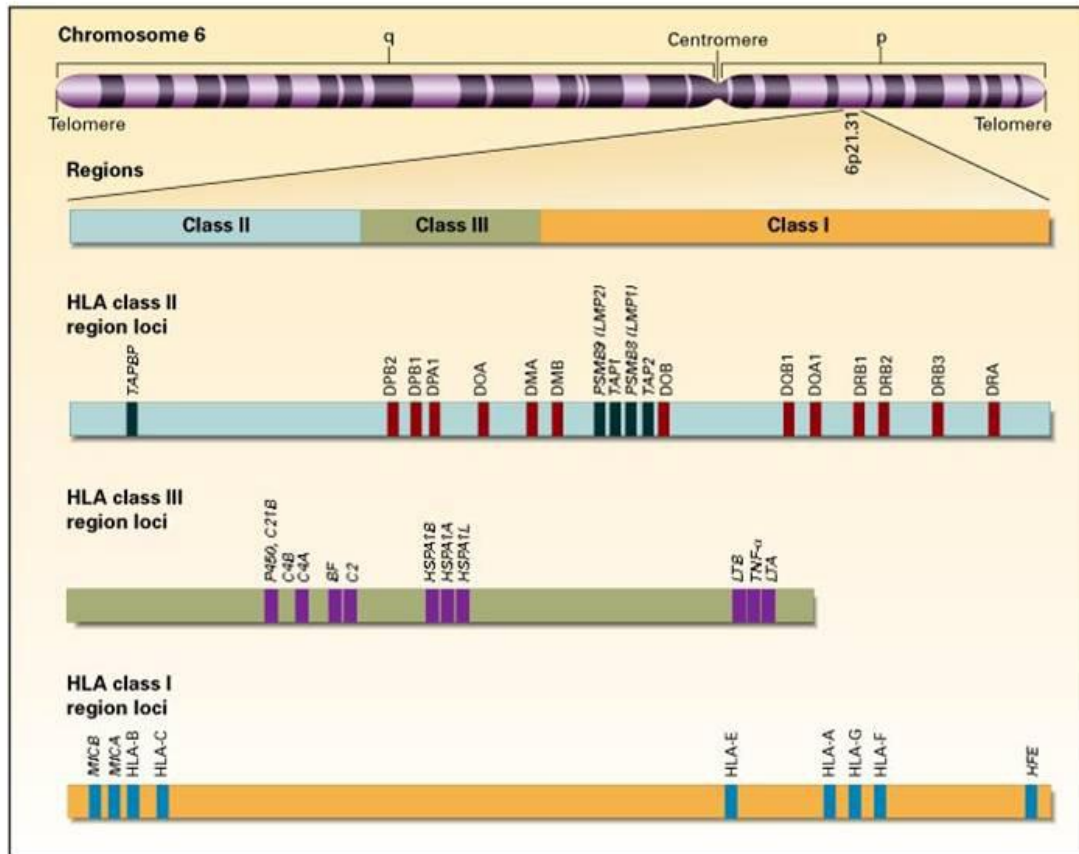


FIGURA 4 – MAPA GENÉTICO SIMPLIFICADO DO CPH COM ÊNFASE NO SISTEMA HLA (6p21.3)  
 Fonte: NEJM, 2004.

A região de classe II codifica para os genes *HLA-DR*, *HLA-DQ* e *HLA-DP*. As moléculas codificadas por esses genes estão presentes apenas em células do sistema imune que atuam como células apresentadoras de antígenos (APCs) tais como, células dendríticas, linfócitos B e macrófagos. Nesta região também se encontram os genes *TAP1*, *TAP2* e *LMP2*, entre outros, que codificam para produtos moleculares que não fazem parte do grupo de antígenos principais de histocompatibilidade (LEWIN, 2001).

A região de Classe III, localizada entre as regiões de classe I e II contém pelo menos 59 genes e possui a maior densidade gênica das três regiões HLA. Entretanto, não é conhecido se todos os genes identificados na Região III são funcionais ou pseudogenes. Foram definidos genes que atuam no processo de ativação do sistema complemento (*Bf*, *C2*, *C4A*, *C4B*) e genes da 21-hidroxilase, *TNF* e *LTA*, que codificam as citocinas TNF- $\alpha$  e LT- $\alpha$  (antigo TNF- $\alpha$ ) respectivamente, além de genes para susceptibilidade a doenças como a Doença de Graves, Doença de Crohn, entre outros (MATSUZAKA et al., 2001).

A função das proteínas HLA é apresentar peptídeos estranhos aos linfócitos T, participando da implementação da resposta imune. Particularmente, as proteínas HLA participam da ativação de linfócitos T (PARHAM, 2001).

### 3.3. *HLA-G*

*HLA-G* foi primeiramente descrito por GERAGHTY et al., em 1987 (HUNT et al, 2000). Inicialmente acreditava-se que o *HLA-G* fosse polimórfico somente em algumas populações (afro-americanas), mas posteriormente observou-se que ele é polimórfico nas outras populações também (BAINBRIDGE et al, 2001).

*HLA-G* possui uma limitada distribuição tecidual (HVIID et al. 1997). Inicialmente, foi detectado no fluido amniótico e soro de mulheres grávidas, e pensava-se que estivesse restrito somente a estes, mas, posteriormente, detectou-se o *HLA-G* em outros tecidos, fetais (como timo, olhos, pulmão, coração e rim) e adultos, como na região anterior do olho, pele, pulmão, rim, ovário, cólon, intestino, timo (sugerindo que o *HLA-G* possa participar da “educação” das células T), além de células em tumores malignos e monócitos do sangue periférico e, recentemente, em inflamações musculares e culturas de mioblastos (CAROSELLA et al,1996; CAROSELLA et al., 1998; LILA et al., 2002; WIENDL et al., 2003).

#### 3.3.1. O gene, a proteína e as isoformas do *HLA-G*

O gene *HLA-G* é composto por 8 exons, sete íntrons e uma região 3' não traduzida (3' UTR) pertencente ao exon 8. O exon 1 codifica o peptídeo sinal; os exons 2, 3 e 4 codificam os domínios  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$  respectivamente; o exon 5 codifica a região transmembrana; os exons 6, 7 e 8 codificam o domínio citoplasmático. O exon 6 apresenta um códon de término de leitura (UGA) que

leva à produção de uma proteína truncada com a perda de 19 resíduos de aminoácidos, que nas moléculas HLA clássicas são altamente conservados. Essa alteração na seqüência nucleotídica do gene *HLA-G*, resulta na proteína correspondente, a uma cauda citoplasmática de apenas 6 aminoácidos, enquanto nas moléculas de classe Ia essa cauda possui 30 aminoácidos. (CAROSELLA et al, 1996; O'CALLAGHAN e BELL, 1998; CAROSELLA et al., 1999 ; VAN DER VEM et al., 2000).

O *HLA-G* pode sofrer processamento alternativo de seu RNAm, gerando sete isoformas de proteínas distintas HLA-G1, -G2, -G3 e -G4 ligadas à membrana e HLA-G5, -G6 e -G7 em formas solúveis (FIGURA 5) (PAUL et al., 2000; RITEAU, B. et al., 2001).

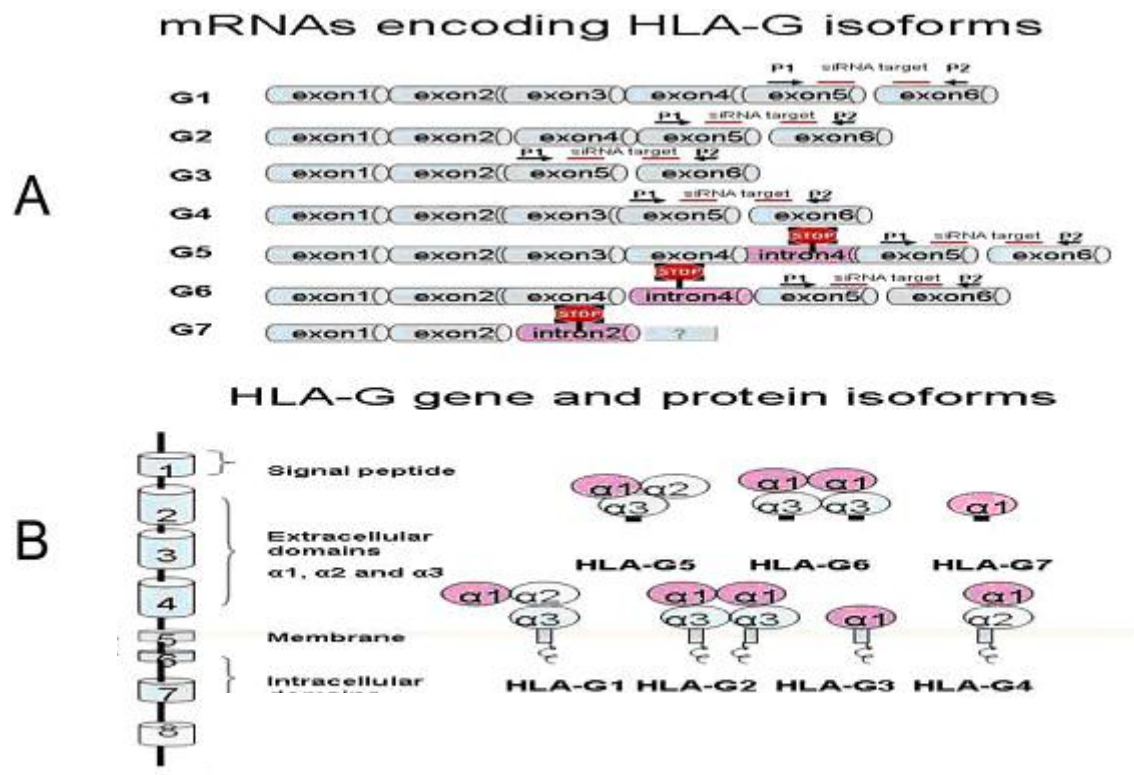


FIGURA 5: ESQUEMA DA CONSTITUIÇÃO DO GENE *HLA-G* E SUAS ISOFORMAS

Fonte: Adaptado de Sun, 2008.

Nota: Estrutura dos RNAm que codificam as diferentes isoformas do gene *HLA-G* (A). Estrutura do gene *HLA-G* e domínios apresentados por cada isoforma (B).

HLA-G-1 possui os três domínios extracelulares, um domínio transmembrana e uma cauda citoplasmática curta. O processamento alternativo do mRNA de *HLA-G* e que resultou nas isoformas HLA-G2, -G3, e -G4 e que exclui respectivamente o éxon 3, os éxon 3 e 4, ou o éxon 4 geram isoformas que retêm somente o domínio  $\alpha_1$  para -G3, os domínios  $\alpha_1$  e  $\alpha_3$  para -G2 e os domínios  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  para -G4 unidos a região transmembrana.

As formas solúveis HLA-G5 e HLA-G6 são devidas à tradução do intron 4, o qual contém um códon de parada, impedindo a tradução das seqüências transmembrana e citoplasmática. Já a isoforma solúvel HLA-G7 é decorrente da retenção do intron 2 ao RNAm, produzindo uma molécula com 117 aminoácidos que contém apenas o domínio  $\alpha_1$  da molécula ligado a 2 aminoácidos no terminal carboxila codificado pelo intron 2 (PAUL et al., 2000).

As isoformas vinculadas à membrana atuam no local onde são expressas. No entanto, as isoformas solúveis, como por exemplo, HLA-G5, podem exercer suas funções em locais distantes de distribuição, através do sistema circulatório (ROUAS-FREISS et al., 2005).

### 3.3.2. HLA-G e a evasão da resposta imune

Alguns tecidos e tipos celulares expressam HLA-G na tentativa de subverter a resposta imune que favoreça o escape imunológico e o ataque mediado por células *Natural Killer* (NK) e linfócitos T citotóxicos, sendo que o grau de expressão da molécula varia de acordo com o tecido (ROUAS-FREISS, N. et al., 2005)

Esta inibição ocorre através da ligação direta entre epítomos presentes na molécula HLA-G e receptores inibitórios referidos como Transcritos Semelhantes à Imunoglobulina-ILTs (*Immunoglobulin-Like Transcrip*), ILT-2 (LILRB1/CD85j), ILT-4 (LILRB2/CD85d) e também ao receptor KIR2DL4 (CD158d) (*Killer-cell immunoglobulin-like receptor, 2 domains, long cytoplasmic tail, 4*) (CAROSELLA et al., 2003; LE MAOULT et al., 2005), ambos receptores específicos para HLA-G (SHIROISHI et al., 2003).

A presença das isoformas protéicas de HLA-G1 e de HLA-G5 são capazes de induzir o aumento da expressão de seus próprios receptores, ILT2 e ILT4 na APC, ILT2 e KIR2DL4 em células NK, e ILT2 e KIR2DL4 em linfócitos T CD4+, mas não em linfócitos T CD8+ (LE MAOULT et al., 2005). Estes dados mostram que a molécula HLA-G é capaz de alterar o equilíbrio do balanço de sinais de inibição *versus* estímulo, favorecendo assim a inibição de sinais, e aumentando os limiares de ativação para estas células (ROUAS-FREISS et al., 2007).

A proteína HLA-G parece estar envolvida na indução e manutenção da tolerância entre a mãe e o feto semi-alogênico, na interface fetoplacentária, e parece ser importante inclusive na implantação do embrião (FUZZI et al. 2002). Sua expressão aberrante foi reportada nos casos de abortos espontâneos recorrentes. Ele também pode ser expresso nas células tumorais ou nos exossomas derivados do tumor, tanto na sua forma solúvel como ligado à membrana (RITEAU et al., 2003; ROUAS-FREISS et al., 2005). Essa expressão de HLA-G por células malignas pode impedir a rejeição imune ao tumor. Donaghy et al. verificaram que os níveis de HLA-G solúvel são maiores em indivíduos portadores do HIV, indicando que a indução da expressão da molécula de HLA-G por células infectadas por vírus pode ser um mecanismo adicional que o ajude a subverter as defesas do hospedeiro (DONAGHY et al., 2007). A presença de HLA-G também já foi observada em algumas doenças auto-imunes e inflamatórias, mostrando que a molécula pode contribuir para a diminuição da antigenicidade das células envolvidas nestas patologias (WIENDL et al., 2005; DIEPSTRA et al., 2008).

Várias citocinas podem induzir a expressão de HLA-G, tais como GM-CSF (fator estimulante de colônia de granulócitos-macrófagos), interleucina (IL)- 10, IFNs (*Interferons*), e LIF (fator inibitório de leucócitos) (CAROSELLA et al., 2003; ROUAS-FREISS et al., 2007). Tanto IFN- $\alpha$  como IFN- $\beta$ , parecem reforçar a expressão de HLA-G na superfície celular *in vitro* e mais recentemente *in vivo* (CAROSELLA et al., 2003; MITSDOERFFER et al. 2005). Esta mudança fenotípica pode conferir imunoproteção às células tumorais, facilitando a propagação tumoral no hospedeiro. Assim sendo, a administração de IFNs para imunoterapia de doenças malignas apresenta um potencial efeito colateral

para o aumento da regulação positiva da expressão de HLA-G no local do tumor (ROUAS-FREISS et al., 2007; CAROSELLA et al., 2008).

### 3.3.3. Mecanismos de controle da expressão do *HLA-G*

O controle da transcrição do *HLA-G* ocorre via elementos reguladores em *cis*, conhecidos por sua importância no controle da transcrição dos genes *HLA* clássicos: intensificador A, a sequência consenso interferon (ISRE) e o módulo SXY (FIGURA 6). O intensificador A, o ISRE e o módulo SXY localizam-se na região promotora do gene e formam um módulo de indução com sítios ligantes para membros da família NF- $\kappa$ B p50, p65 e c-Rel, IRF1 e IRF2, ISF1 e ISF2, e Sp1 (fator transcricional das rotas de transativação constitutiva e induzida por citocinas). O módulo SXY é composto por sequências S, X (compreendendo os meio-sítios  $X_1$  e  $X_2$ ) e Y ligadas cooperativamente por complexos de multiproteínas reguladoras da transcrição (RFX, CREB/ATF e NFY). Em *HLA-G*, este módulo SXY possui sequências S e  $X_1$  homólogas ao HLA de classe I, mas seqüências Y e  $X_2$  divergentes. Como este segundo bloco é muito importante para maior formação da ordem do complexo no módulo SXY e para a transativação induzida por CIITA (transativador de classe II), o *HLA-G* não é induzido por CIITA nem RFX5 (CAROSELLA et al, 1996; GOBIN E VAN DEN ELSEN, 2000; ROUSSEAU et al., 2004).

Em *HLA-G*, os dois sítios  $\kappa$ B do intensificador A ( $\kappa$ B1 e  $\kappa$ B2) apresentam afinidade somente para a subunidade p50 do NF- $\kappa$ B (fator transcricional  $\kappa$ B), o que não é suficiente para ativar a transcrição, pois não há ligação em níveis significantes com outras porções do NF- $\kappa$ B que possuam propriedades transativadoras. Em adição, o sítio  $\kappa$ B2 do *HLA-G* também se liga ao Sp1 (Fator transcricional mediador das rotas de transativação constitutivas e induzidas por citocinas). A região de supressão do intensificador A, a qual tipicamente contém o ISRE em promotores de MHC de classe I clássicos, p.ex. HLA-B (FIGURA 7B), aparentemente está parcialmente ausente em *HLA-G*. Esta região (a porção 3' do sítio  $\kappa$ B1 e as sequências supressoras) não apresenta qualquer afinidade de ligação com proteínas da família de fatores transcisionais IRF (fator regulador de interferon), mas contém um outro sítio de

ligação com Sp1. Entretanto, este elemento não pode mediar a expressão de HLA-G induzida por IFN- $\alpha$ . Nenhum outro sítio de ligação para o IRF ou STAT1 (tradutor de sinal e ativador da transcrição) foi identificado nesta região promotora de 220 pb, o que demonstra a não-responsividade do *HLA-G* ao IFN- $\alpha$  (FIGURA 7) (GOBIN e VAN DEN ELSEN, 2000).

O controle da expressão de HLA-G por mecanismos epigenéticos é confirmado, no entanto este ponto será discutido em um tópico separadamente.

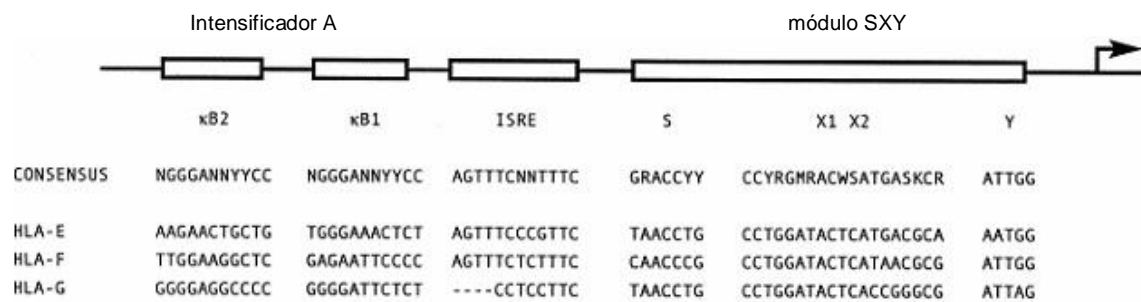


FIGURA 6: A ESTRUTURA DA REGIÃO PROMOTORA DOS GENES HLA-NÃO CLÁSSICOS (*HLA-E*, *HLA-F*, E *HLA-G*).

Fonte: GOBIN e VAN DEN ELSEN, 2000

Nota: A seqüência de nucleotídeos dos elementos reguladores conservados dos módulos de indução e SXY dos promotores de *HLA-E*, *HLA-F*, e *HLA-G*. Seqüências Consenso dos sítios B e ISRE, e dos blocos S, X1X2, e Y são mostrados em comparação



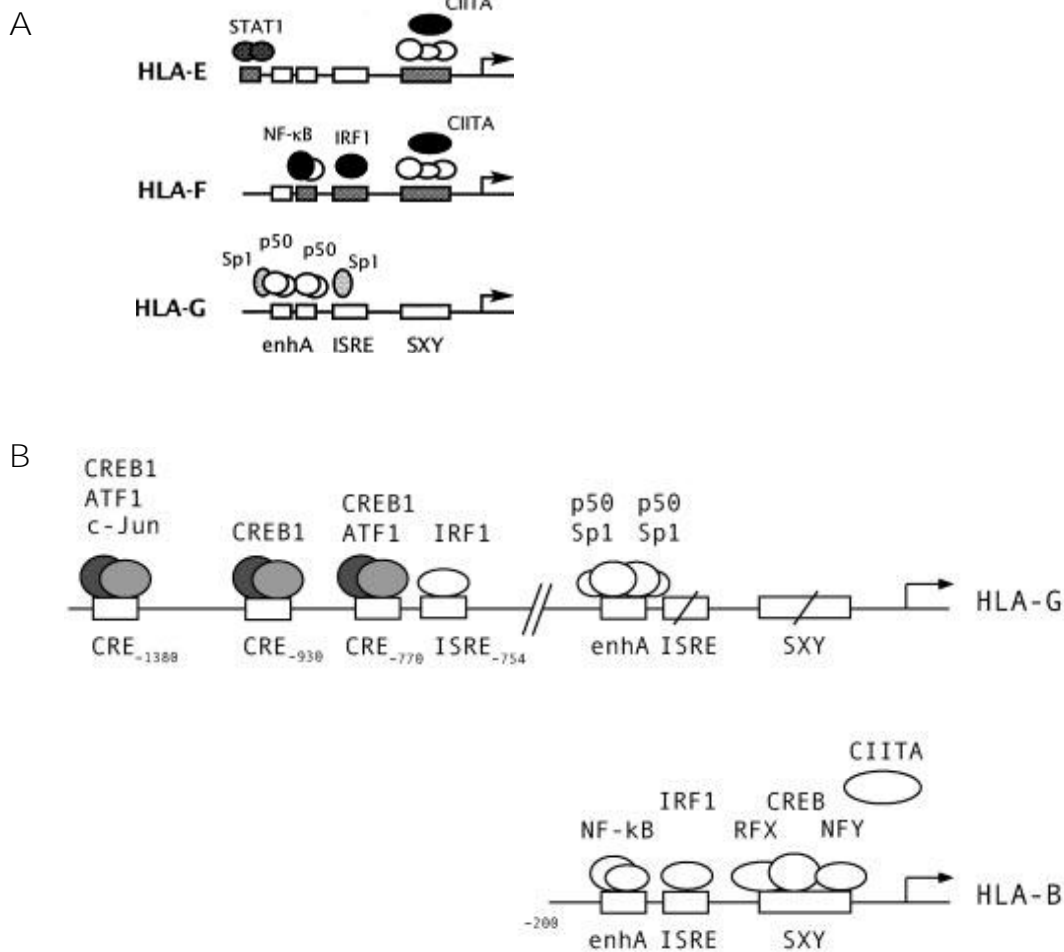


FIGURA 7: REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL DE *HLA-E*, *HLA-F*, E *HLA-G*  
 Fonte: GOBIN e VAN DEN ELSEN, 2000.

Nota: A) Representação esquemática dos elementos reguladores e proteínas ligantes dos sítios promotores de *HLA-E*, *HLA-F*, e *HLA-G*. Os módulos conservados são os módulos de indução contendo sítios ligantes para NF- $\kappa$ B, Sp1, e IRF1. O módulo SXY consiste dos blocos S, X1, X2, e Y que formam a região de ligação para o complexo de multiproteínas consistindo de RFX, CREB/ATF, e NFY os quais mediam a transativação induzida por CIITA

B) Representação esquemática dos elementos reguladores e proteínas ligantes dos sítios promotores de *HLA-E*, *HLA-F*, e *HLA-G* e sua comparação com o promotor de *HLA-B*.

### 3.3.4. Polimorfismos do gene *HLA-G*

Atualmente 45 alelos para o *HLA-G* são reconhecidos pelo Anthony Nolan Research Institute (<http://hla.alleles.org/alleles/class1.html>).

A população brasileira representa uma das mais heterogêneas do mundo, resultado de cinco séculos de mistura étnica entre europeus, africanos e nativos indígenas, principalmente. Por essa razão, essa população apresenta a

maior variabilidade de *HLA-G* já detectada (CASTELLI et al, 2009) até a presente data.

Os alelos são nominados através de uma combinação de letras e números que informam o sistema gênico (*HLA*), o locus (*G*) seguido de dígitos que informam o grupo alélico ou equivalente sorológico (2 dígitos), o alelo (4 dígitos), natureza da substituição sinônima/não sinônima (6 dígitos) e localização em exons/ introns e/ou regiões reguladoras (8 dígitos) na sequência de DNA do gene *HLA-G*.

Dessa forma, referências sobre *HLA-G* com quatro dígitos identificam alelos que diferem em uma ou mais substituições nucleotídicas que mudam a sequência de aminoácidos da proteína codificada. O quinto e sexto dígitos são usados para diferenciar alelos que diferem por substituições silenciosas (que codificam a mesma proteína). O sétimo e oitavo dígitos são utilizados para diferenciar alelos que diferem por polimorfismos em íntrons ou nas regiões 5' e 3' UTR. Alelos nulos, que não expressam a proteína, recebem o sufixo N (<http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>). A tabela 1 representa alelos diferentes, baseados em sua sequência de DNA, e expõe as diferenças correspondentes:

TABELA 1: NOMENCLATURA DOS GENES *HLA* BASEADA EM MUDANÇAS NA SUA SEQUENCIA DE DNA.

Nomenclatura	Indica
HLA	A região HLA e prefixo para um gene <i>HLA</i>
<i>HLA-DRB1</i>	Um locus em particular, neste caso DRB1
<i>HLA-DRB1*13</i>	Um grupo de alelos que codifica o grupo alélico ou antígeno DR13
<i>HLA-DRB1*1301</i>	Um alelo HLA específico
<i>HLA-DRB1*1301N</i>	Um alelo nulo
<i>HLA-DRB1*130102</i>	Um alelo que difere por uma mutação silenciosa
<i>HLA-DRB1*13010102</i>	Um alelo que contém uma mutação fora da região codificadora

Fonte: Adaptado de <http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>

O Comitê da OMS de Nomenclatura para fatores do Sistema HLA, durante o 15º International Histocompatibility and Immunogenetics Workshop, em Búzios discutiu sobre problemas referentes à nomenclatura dos genes HLA em vista do grande número de alelos já descritos, um novo modelo foi proposto e entrará em vigor, oficialmente, em abril de 2010 ([http://hla.alleles.org/nomenclature/nomenclature\\_2009.html](http://hla.alleles.org/nomenclature/nomenclature_2009.html)).

Apesar de uma menor variação nucleotídica observada na região codificadora desse gene, um alto grau de variação é observado tanto na região promotora, como na região 3' UTR, ambas podendo influenciar nos níveis de expressão de HLA-G (CASTELLI et al, 2009).

Em 1991 Harrison et al. descreveram a existência de um polimorfismo de 14 pb (5'-ATTTGTTTCATGCCT-3') no exon 8 do gene *HLA-G* (HARRISON et

al, 1991). A presença da deleção do fragmento de 14pb exerce influência na estabilidade do RNAm de *HLA-G*. Segundo ROUSSEAU et al. (2004), a deleção e a presença da seqüência de 14pb estão presentes em aproximadamente 58% e 42%, respectivamente, da população caucasiana. Segundo os mesmos autores, tal polimorfismo poderia ter conseqüências funcionais, estando associado a baixos níveis de transcrito de *HLA-G*. O grupo de ROUSSEAU observou que alelos *HLA-G* que apresentavam a seqüência de 14pb (exon 8) sofriam um processamento alternativo (*splicing*) que removia os primeiros 92pb do exon 8, o que conferia uma maior estabilidade ao transcrito (ROUSSEAU et al, 2004). No entanto, alelos do *HLA-G* contendo esta sequencia foram associados com baixa produção de mRNA para a maioria das isoformas, tanto solúveis como de membrana em amostras de trofoblastos, o que influencia na função de *HLA-G* e, talvez, em certas complicações gestacionais (CRISPIM et al, 2007). Possíveis explicações para essa discordância de resultados será discutido adiante (ver Epigenética e *HLA-G*).

### 3.3.5. Epigenética e *HLA-G*

O estudo de eventos epigenéticos no MHC é importante por alguns motivos: o MHC tem sido associado a um maior número de doenças do que qualquer outra região do genoma humano, e tais estudos são de grande interesse médico; é a região mais polimórfica no genoma, portanto tais estudos podem esclarecer o efeito de ganho ou perda de dinucleotídeos CpG graças aos SNPs (RAKYAN et al, 2004), além desses polimorfismos influenciarem na ligação de *miRNAs* que influenciam na expressão gênica.

Ao contrário de outras moléculas de HLA, a expressão de *HLA-G* é apenas parcialmente entendida (MENENDEZ et al, 2008), no entanto é conhecido que sua regulação ocorre tanto em nível transcricional como traducional (SELIGER e SCHLAF, 2007).

Moreau e colaboradores, em 2003, mostraram que a expressão do gene *HLA-G* pode ser controlada epigeneticamente. Das sete linhagens celulares estudadas por eles, caracterizadas pela não expressão da proteína *HLA-G*, todas passaram a expressar o RNAm para diferentes isoformas de *HLA-G* após

o tratamento com o agente desmetilante 5-aza-dC, sendo que apenas 4 delas passaram a expressar a proteína. Esses resultados são sugestivos de que o controle da expressão de *HLA-G* ocorre tanto em nível transcricional como pós-transcricional, e que a metilação do promotor não seria o único mecanismo de controle da expressão (MOREAU et al, 2003). A expressão de *HLA-G* após tratamento com agentes desmetilantes foi confirmada em diversos outros estudos (CHANG et al, 2003; YAN et al, 2005; DUNKER et al, 2008).

Na região promotora do gene *HLA-G*, mais precisamente entre o sítio de início de transcrição (ATG) e 450 pb a montante do mesmo existem 19 CpGs. A análise do perfil de metilação dessa região estudado em linhagens celulares de melanoma, coriocarcinoma e câncer ovariano mostra correlação entre o grau de metilação da região promotora e a atividade transcricional do *HLA-G*, onde o alto grau de metilação é associado com ausência de expressão (MOUILLOT et al, 2005; MENENDEZ et al, 2008).

Em amostras tumorais ovarianas, a análise dessa mesma região de 450 pb mostrou que na região compreendendo os nucleotídeos -8 ao -188, que abrange os sítios reguladores de ação *cis* do *HLA-G*, os CpGs encontravam-se normalmente não metilados, indicando que a hipometilação desses sítios atuaria de forma a potencializar a expressão de *HLA-G*. Em contraste, a região correspondente a um Elemento Responsivo para Hipoxia (HRE) (-211 a -290), ligante da proteína HIF-1, manteve-se metilada mesmo após a influência de agentes desmetilantes. Isso sugere que a metilação pode agir como um repressor da ligação da proteína HIF-1 que agiria como repressora de em alguns tipos de câncer (MENENDEZ et al, 2008).

Holling et al. (2009) recentemente mostraram que o perfil de metilação de uma porção da região promotora das linhagens celulares de trofoblastos JEG3 e JAR que, respectivamente, expressa e não expressa *HLA-G*, não diferiu, ambas mostrando-se intensamente metiladas. No entanto, ao examinar o nível de acetilação da histonas H3 e H4, observaram que a linhagem celular JEG3, que expressa a molécula *HLA-G*, apresentava alto grau de acetilação nas histonas da região promotora; em contraste, a linhagem JAR apresentou baixo nível de acetilação. Esses dados sugerem que a metilação do DNA não é o único fator responsável pela repressão da expressão gênica de *HLA-G*, mas que as modificações pós-traducionais das histonas podem ser um fator chave

na expressão desse gene (HOLLING et al, 2009). Em contraste, Chang et al. (2003), mostraram que, tanto o agente desmetilante 5-aza-dC como o agente inibidor de desacetilase Tricostatin A (TSA) foram capazes de induzir a transcrição do RNAm de *HLA-G* em uma linhagem celular de melanoma que não expressava a molécula, porém a proteína só foi detectada em células tratadas apenas com 5-aza-dC (CHANG et al, 2003). Isto demonstra que a interação desses dois fatores epigenéticos e seus efeitos não é totalmente entendida, sugerindo a ação de outros fatores na regulação.

Considerando que o reconhecimento da placenta pelo sistema imune materno seria altamente influenciado pelo genótipo do *HLA-G*, surgiram dúvidas se este não seria um gene que sofre *imprinting*. Hiby et al. descartaram a possibilidade do *imprinting* genômico ocorrer ao identificarem a presença do genótipo heterozigoto para o gene *HLA-G* na placenta de mães homozigotas (HIBY et al, 1999).

O SNP -725C/G foi associado com aborto recorrente em casais onde tanto o homem como a mulher apresentavam o genótipo -725G. Esse SNP encontra-se ~10 pb de distância a 3' do Fator Regulatório de Interferon 1 (IRF1) e a mudança de C para G nesse SNP gera um dinucleotídeo CpG com as bases -726 e -725, esse dinucleotídeo encontra-se metilado no genótipo -725G e esses apontamentos levaram a suposição de que isso influenciaria na ligação do fator de transcrição e assim poderia regular a expressão gênica (OBER et al, 2003).

Em 2005, Nicolae et al. identificaram o gene *HLA-G* como um gene de suscetibilidade a asma e mostraram associação entre o genótipo GG no SNP -964G/A em crianças apresentando o quadro de asma, cujas mães apresentavam o mesmo quadro. O genótipo AA foi associado a crianças asmáticas cujas mães não apresentavam o quadro da doença (NICOLAE et al, 2005). O SNP -964G/A encontra-se em alto desequilíbrio de ligação (LD) com o SNP +3142C/G, e, em 2007, o mesmo grupo de pesquisadores identificou que o alelo +3142G estaria envolvido na regulação negativa da expressão de *HLA-G*, influenciando no pareamento estável com três miRNAs: miR-148a, miR-148b e miR-1521. O genótipo GG do SNP +3142C/G foi descrito como tendo um efeito protetor contra a asma, em crianças filhas de mães asmáticas

(provável genótipo -964G), uma vez que a asma materna apresenta o principal fator de risco para este quadro em crianças (TAN et al, 2007).

O SNP +3142C/G também se encontra em forte LD com o polimorfismo de 14 pb presente no exon 8 do gene *HLA-G* (TAN et al, 2007). O genótipo +14 pb foi associado com a produção de um RNAm mais estável, devido a um processamento onde são removidos os primeiros 92 nucleotídeos do exon 8. No entanto, comparando-se a expressão gênica dos alelos +14 pb (Ins) e -14 pb (Del) , associou-se a baixa produção de HLA-G solúvel com a presença da inserção de 14 pb. Inclusive, o genótipo homocigoto +14 pb foi associado com abortos recorrentes e falha na fertilização *in vitro*. Para explicar essa discrepância do esperado, Veit e Chies (2009) discutem que o SNP +3142C/G teria um papel maior no controle da expressão gênica que o polimorfismo de 14 pb, uma vez que de nada adiantaria a presença de um fator que garante estabilidade do transcrito, se o mesmo apresenta um sítio de ligação para miRNAs regulatórios (VEIT e CHIES, 2009).

Considerando os polimorfismos existentes na região 3' UTR do *HLA-G*, Castelli et al. (2009) analisaram oito sítios polimórficos dessa região e identificaram 11 haplótipos diferentes em uma população brasileira. Os sítios analisados foram: +3003 T/C, +3010 C/G, +3027 C/A, +3035 C/T, +3142 C/G, +3187 A/G, +3196 C/G, além do polimorfismo de 14 pb. Os autores identificaram uma série de miRNAs com afinidade pelos haplótipos identificados, mostrando que poderiam agir na regulação do gene *HLA-G*. Os autores discutem que vários dos miRNA identificados pareiam com a inserção de 14 pb, podendo ser responsáveis pela baixa produção de proteína em alelos que apresentam a inserção; também apontam o fato que parte dos transcritos de *HLA-G* que apresentam a inserção sofrem o processamento onde são removidos os primeiros 92 nucleotídeos do exon 8 e, juntamente com esse fragmento de RNAm, são extraídos os SNPs +3003 T/C e +3010 C/G, além da inserção de 14 pb, diminuindo a possibilidade de ligação de miRNAs com pareamento específico nessa região e assim poderia explicar o porque de transcritos menores serem mais estáveis (CASTELLI et al, 2009).

São muitas as evidências de que diversos mecanismos epigenéticos atuam na regulação do gene *HLA-G* de forma interativa, evidenciando a

complexidade por trás dos mecanismos responsáveis pela expressão bem sucedida da molécula de HLA-G e suas isoformas.

#### 4. METODOLOGIA

##### 4.1. Identificação das Ilhas de CpG do gene *HLA-G*

A fim de identificar com precisão as Ilhas de CpG presentes na região promotora do gene *HLA-G* que poderiam influenciar na sua expressão, dependendo do padrão de metilação que se encontram, realizamos uma pesquisa *in silico*.

A localização do gene *HLA-G* no genoma humano foi realizada através do site Unigene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=unigene>) e coletada a sequência de RNAm a partir da sequência referência NM\_002127.4. Ao seguir este *link* foi escolhido novamente e apareceram todas as informações sobre esse gene, inclusive a sequência. Para coletar a sequência do gene foi escolhido o modo FASTA na janela *Display*. A sequência do RNAm do gene *HLA-G* foi então colada na janela principal do site *Blat Search Genome* (<http://genome.ucsc.edu>). Depois da submissão da sequência foi escolhida a opção *browser* onde aparece o cromossomo e todas as informações já existentes sobre o gene. Nessa janela escolhe-se CpG islands *full* (no item *regulation*). Aparecem destacadas em verde, abaixo da sequência gênica, se existirem, as ilhas de CpG do gene. Clicando nesse quadrado tem-se a opção de solicitar a sequência de DNA. Optamos por 1,5 kb a montante e 1 kb à jusante da região TSS. Foi gerada uma sequência de 3541 pb. Com esta sequência, a presença de ilhas de CpG foi verificada através da ferramenta CpGplot disponível na página do grupo *European Bioinformatics Institute* (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot>). Este programa mostra as ilhas de CpG seguindo os parâmetros estipulados por Gardiner-Garden e Fromer (GARDINER-GARDEN e FROMMER, 1987) que define uma Ilha de CpG como uma sequência 200 pb de DNA com 50% de C+G e do que 0,6 de CpG observados/ CpG esperados. Foram identificadas duas regiões ou 2 ilhas de CpG pela análise desse programa (ver posteriormente nos resultados).



A sequência de 3541 pb obtida no site *Blat Search Genome*, também foi submetida a análise no programa *MethPrimer* (<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>). Este programa planeja *primers* para sequências modificadas com Bissulfito de Sódio, agente que promove a deaminação de citosinas (C) não metiladas transformando-as em uracila (U) (que após a reação de PCR são convertidas em timinas (T)), mantendo as citosinas metiladas como citosinas já que o grupamento metil protege contra a primeira etapa da reação de deaminação (JERONIMO et al, 2001). A identificação de ilhas de CpG por esse programa segue os mesmos critérios designados por Gardiner-Garden e Fromer com exceção de apenas um: as ilhas são consideradas como uma sequência 100 pb. Foram identificadas três regiões ou 3 ilhas de CpG pela análise desse programa, sendo duas delas as mesmas ilhas identificadas pelo programa CpGplot (ver posteriormente nos resultados).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Análise *In Silico* do gene *HLA-G*

Para analisar a existência de ilhas de CpG na região promotora do gene *HLA-G*, utilizamos duas ferramentas disponíveis na internet (ver METODOLOGIA) (foram avaliados 1,5 kb à jusante e 1 kb à montante do início da transcrição do gene). Uma sequência contendo 3541 pb foi obtida e foram identificadas duas ilhas de CpG, como mostrado na FIGURA 8, pela análise do programa CpGPlot, exposto em formato de gráfico. Estes dados foram obtidos de acordo com o estipulado por Gardiner e Fromer em 1987. O gráfico superior (A) mostra a razão entre o número observado e o esperado de dinucleotídeos CpG. Este número é dado pela fórmula:

$$\text{Esperado} = \frac{\text{(número de citosinas x número de guaninas)}}{\text{Comprimento da ilha}}$$

No gráfico (B) está exposto em percentagem, o conteúdo de guaninas + citosinas. E, no último gráfico (C), estão representadas as ilhas de CpG pertencentes à região avaliada. O programa CpGPlot (*European Bioinformatics Institute*) define como ilha de CpG a região com mais de 200 pares de bases que contenham pelo menos 50% de G+C e uma razão entre o observado e esperado igual ou superior a 0,6 (GARDINER-GARDEN e FROMMER, 1987)

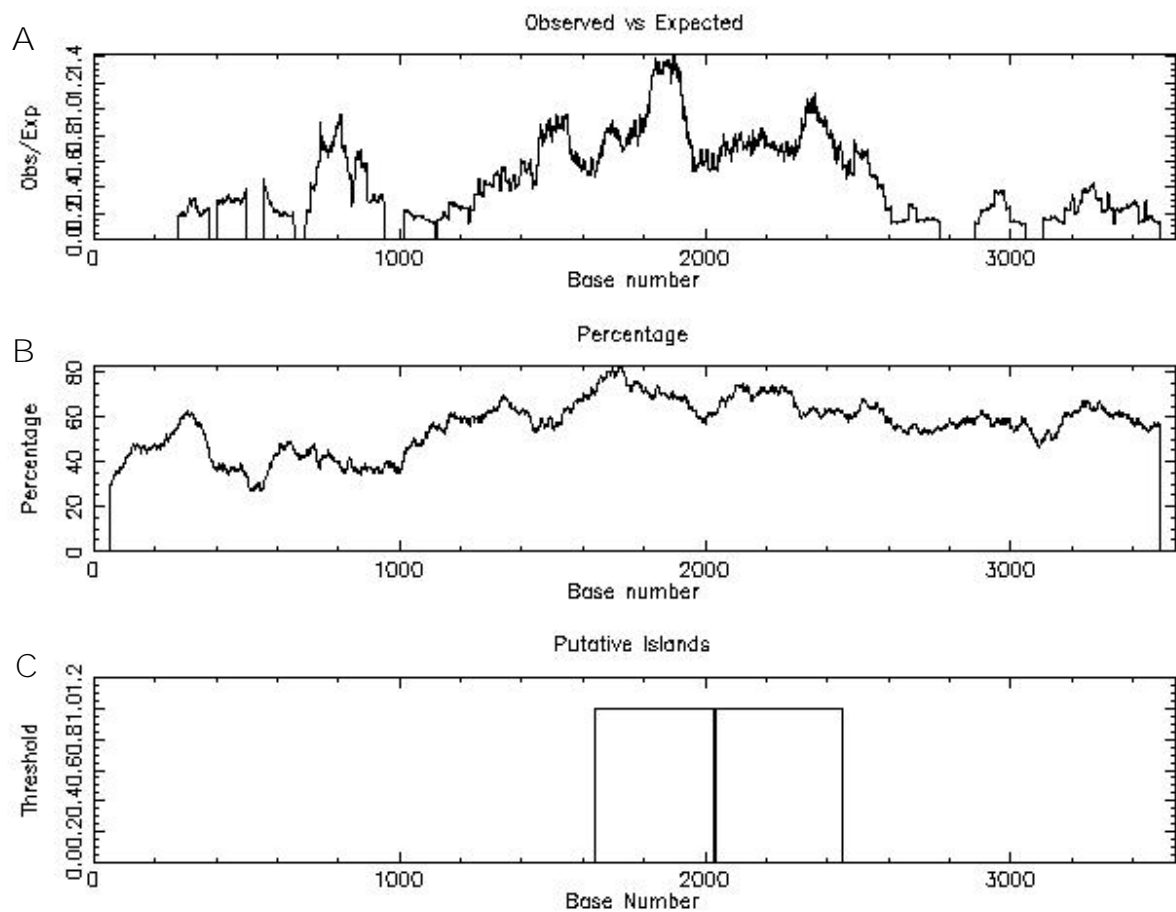


FIGURA 8: RESULTADO OBTIDO PELO PROGRAMA CpGPLOT .

Fonte: *CpGPLOT*.

Nota: (A) Representa a razão entre o Observado/Esperado da frequência de dinucleotídeos CG; (B) mostra a percentagem de CG na região analisada; e (C) denota a localização das ilhas de CpG dentro da região avaliada.

Os gráficos são representativos das ilhas de CpG presentes na região promotora (1,5 kb à montante e 1 kb à jusante da região 5' TSS) do gene *HLA-G*. No terceiro gráfico podemos observar a presença das duas ilhas na região avaliada.

As duas ilhas identificadas encontram-se em uma região de 810 pb dentro da sequência de DNA de 3541 pb. A ilha 1 está localizada nos

nucleotídeos +74 ao +435, contendo 40 dinucleotídeos CpG, ela abrange todo o intron 1 e quase todo o exon 2; a ilha 2 está localizada nos nucleotídeos +465 ao +884, contendo 36 dinucleotídeos, abrange os últimos oito nucleotídeos do exon 2, o intron 2 inteiro e grande parte do exon 3.

A análise pelo programa MethPrimer identificou 3 ilhas, duas sendo as mesmas já descritas, e uma localizada nos nucleotídeos -121 ao +39, contendo 10 dinucleotídeos CpG, abrangendo a região promotora e o primeiro exon. Essas três ilhas abrangem um região de 1005 pb e estão ilustradas na FIGURA 9 obtida da análise do programa MethPrimer.

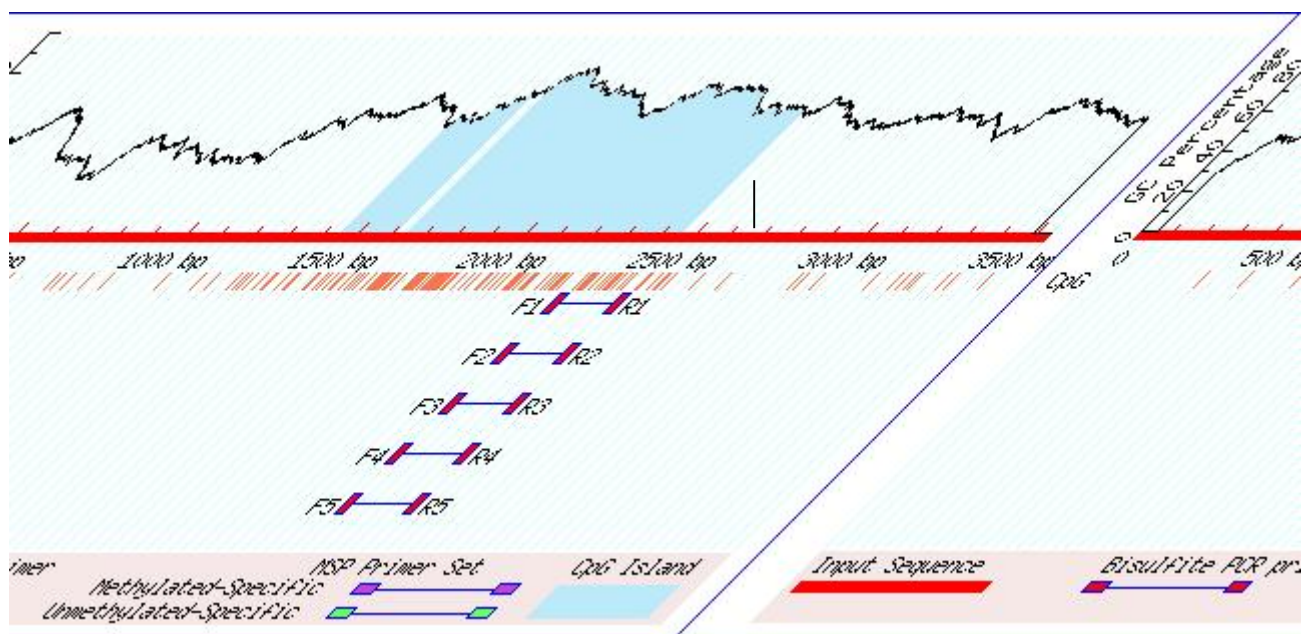


FIGURA 9: RESULTADO OBTIDO PELO PROGRAMA MethPrimer

Fonte: MethPrimer

Nota: O gráfico ilustra a porcentagem de CG na região analisada. As regiões em azul claro identificam as ilhas de CpG. As linhas verticais rosa abaixo do eixo horizontal do gráfico indicam as posições dos CpGs. As linhas azuis flanqueadas por retângulos rosa-escuro indicam a posição de alinhamento dos primers planejados pelo programa.

Após a análise do gene *HLA-G* tanto pelo programa CpG Plot como MethPrimer consideramos a existência de três ilhas no gene *HLA-G*, denominadas Ilhas 1, 2 e 3 no sentido 5' – 3', uma vez que estudos envolvendo a análise da região gênica que abrange a ilha 1, de apenas 160 pb, são comuns.

## 6. DISCUSSÃO

Os principais eventos epigenéticos envolvidos na regulação da expressão gênica são: a metilação do DNA nas citosinas adjacentes a guaninas, nos chamados dinucleotídeos CpG; as modificações pós traducionais da cauda N-terminal da histonas; e a ligação de microRNAs ao RNAm. O gene *HLA-G*, assim como a maioria dos genes do genoma humano, está sujeito a influência da ação desses mecanismos.

Identificamos pela nossa pesquisa *in silico* três ilhas de CpG na região 5' do gene *HLA-G*, abrangendo desde o nucleotídeo -121 da região promotora, até o nucleotídeo +884 do exon 3. Estudos envolvendo o perfil de metilação do gene *HLA-G* e a sua expressão mostram correlação entre o perfil metilado e a ausência de expressão, e do perfil não metilado e a atividade gênica. No entanto, quando esses estudos citam a região específica do DNA que foi estudada, e os CpGs analisados, essa região corresponde a 450 pb amontante do sítio de início de transcrição (MOUILLOT et al, 2005; MENENDEZ et al, 2008). Essa região não foi identificada neste trabalho como uma Ilha de CpG completa, ela abrange grande parte da Ilha 1 por nós identificada (oito dos dez dinucleotídeos CpG presentes). No entanto a maior parte da região estudada, 329 nucleotídeos, não faz parte da Ilha 1 (FIGURA 10). Ainda assim, os resultados obtidos com o estudo dessa região são coerentes com o esperado na relação metilação-atividade gênica. O escape da região referente apenas à primeira Ilha provavelmente não interfere na confiabilidade dos resultados, pois, apesar de não ser considerada como uma Ilha, a região extra ainda apresenta uma grande quantidade de CpGs, quando comparada a outras regiões do genoma, e além disso, a Ilha 1 está sendo analisada quase completamente.

As outras duas Ilhas identificadas, Ilhas 2 e 3, não foram estudadas tão detalhadamente ainda, em nenhum estudo identificado, provavelmente não atraem tanta atenção por se localizarem além da região promotora e do primeiro exon, no entanto nos perguntamos se elas também não teriam grande influência na expressão do gene *HLA-G*, por serem ilhas maiores e muito próximas.

A metilação da região promotora se mostra importante não apenas nas Ilhas. Como mostrado por Menendez e col. (MENENDEZ et al, 2008), em amostras tumorais ovarianas, a região que abrange os sítios de regulação de ação *cis* do *HLA-G* poderia ser influenciado pela metilação, que impediria a ligação das proteínas de ativação aos seus sítios específicos, assim o tumor “adota” a estratégia de manter desmetilada essa região para que a transcrição do gene mantenha-se normalmente. Um exemplo dessa associação é a relação entre a metilação e o SNP -725C/G, associado à ocorrência de abortos recorrente em casais cujo genótipo -725G estava presente em ambos os parceiros. Esse genótipo cria um dinucleotídeo CpG juntamente com o nucleotídeo -726, e neste genótipo ele encontra-se metilado. Acredita-se que a metilação neste CpG influencia a ligação de fatores de transcrição ao Fator Regulatório de Interferon 1 (IRF1), que está a ~10 pb do SNP em questão, impedindo a ligação do fator, resultando na não expressão de HLA-G e assim influenciando no sucesso da gravidez (OBER et al, 2003).

```

-450 ACAGGAGGACAGGCAAGGAGTGGGAGGCAGGGAGTCCAGTTCAGGGACAGGGAT
TCCGGGATGAAAAAGTGAAGGGAGAGGGCCAGGGACCTTGCAGGGGTTTCTCCCTGGTT
1 2
TCTCAGACAGCTCCTGGGC CAAGACTCAGGGAGACACTGAGACAGAAACGCTTGGCACAA
3
GAGTAGCGGGGTCAGGGCGAAGTCCCAGGGCCTCAAGCGTGGCTCTCAGGGTCTCAGGC
4 5 6
CCCACAGGCGGTGTATGGGTTGGGGAGGCCCGCGTTGGGGATTCTCTCCCTCCTTCTCC
7 8 9
TAACCTGTGTGGGTCCTTCTTCTGGATACTCACCGGGCGGCCCCAGTTCCTACTCCC
10 11 12
ATTAGGTGACAGGTTTTTAGAGAAGCCAAATCAGCGTCGCGCGGTCTGGTTCTAAAGT
13 14 15 16
CCTCGCTCACCCACC CGGACTCATTCTCCCCAGACGCAAGGATG GTGGT CATGGCGCC
17 18 19 20
CGGAACCTCTTCTGCTGCTCTCGGGGGCCCTGA +52
21 22

```

FIGURA 10: SEQUENCIA DE DNA REFERENTE A REGIÃO -450 ATÉ +52 DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *HLA-G*.

Fonte: O autor.

Nota: Os CpGs estão destacados em vermelho e numerados de 1 a 22; o sítio de início de transcrição está destacado com uma faixa vermelha; O início e final da Ilha 1 está assinalado em azul.

Os fatores que determinam essa “escolha” das regiões, ou genes, que serão metilados, ou mantidos não metilados, em tumores não são conhecidos, mas são importantes focos de estudo para entender as variações no perfil de metilação dos genes em neoplasias.

Além da metilação do DNA, as mudanças pós traducionais nas caudas das histonas também podem influenciar a expressão do gene *HLA-G* (CHANG et al, 2003; HOLLING et al, 2009). Porém tanto a metilação como as mudanças das histonas se revelam insuficientes para explicar as diferenças na expressão gênica. Resultados controversos onde tanto o padrão de metilação positivo, como a desacetilação das histonas são revertidos, pode levar à expressão do RNAm do *HLA-G*, porém não leva à produção da proteína, indicando um forte controle em nível traducional (MOREAU et al, 2003; HOLLING et al, 2009).

Apesar de apresentar um polimorfismo discreto, em relação a sua região codificadora, as regiões promotora e 3' UTR são bastante polimórficas (CASTELLI et al, 2009). Diversos SNPs já foram identificados, além de um polimorfismo de 14 pb no exon 8 do gene, relacionado com a estabilidade do RNAm. Esses polimorfismos possuem um papel importante no pareamento com miRNAs.

O gene *HLA-G* foi identificado como um gene de suscetibilidade a asma e o SNP -964G/A mostrou-se no centro dessa associação. O genótipo GG, para este SNP, foi associado a crianças asmáticas, cujas mães possuíam asma também (NICOLAE et al, 2005). Posteriormente identificou-se que o SNP -964G/A e o SNP +3142C/G apresentam alto desequilíbrio de ligação (LD), e que o genótipo +3142G favorecia a ligação de miRNAs e impedia a tradução da molécula HLA-G, sendo assim, em crianças com mães asmáticas, e que apresentavam o genótipo -964G homocigoto, o genótipo +3142G fornecia um efeito protetor contra a asma, afinal, apesar do genótipo que favorece a doença estar presente, o RNAm do *HLA-G* estaria sujeito a degradação por miRNAs graças a presença do genótipo +3142G (TAN et al, 2007).

O alto LD apresentado por alguns haplótipos podem ser alvos específicos de miRNAs por manterem os sítios de ligação ao miRNA conservados (CASTELLI et al, 2009). O polimorfismo de 14 pb ganha destaque em relação ao LD que apresenta com SNPs, devido a sua influencia na estabilidade do RNAm do *HLA-G*. Sabe-se que transcritos que apresentam a inserção de 14 pb são mais estáveis, no entanto, quando comparada a expressão de HLA-G com transcritos que não apresentam a inserção, a última é mais representativa. Tanto a estabilidade do RNAm, como a falta de expressão da molécula quando a inserção está presente poderiam ser explicados por eventos epigenéticos

pois, o RNAm que apresenta a inserção está sujeito a um processamento onde os primeiros 92 nucleotídeos do exon 8 são retirados, e nesses fragmento, diversos SNPs, além da inserção, são retirados juntos e isso diminui a chance de associação com miRNAs, criando assim um RNAm mais estável. Porém, como não são todos os transcritos que sofrem esse processamento, por apresentar LD com SNPs, inclusive o SNP +3142C/G, entre outros, o RNAm que apresenta a inserção estaria sujeito a degradação, ou repressão, pela associação a *miRNAs* (CASTELLI et al, 2009; VEIT e CHIES, 2009).

## 7. CONCLUSÕES

A regulação da expressão do gene *HLA-G* se mostra amplamente influenciada por fatores epigenéticos exibindo uma intrincada rede de relação entre os mecanismos epigenéticos conhecidos. Isso demonstra a complexidade por trás desse gene e evidencia a necessidade de estudos contínuos para esclarecer cada vez mais os mecanismos e fatores influenciando no controle do gene *HLA-G*.

## 8. REFERÊNCIAS

ANTONY NOLAN INSTITUTE. Disponível em <http://hla.alleles.org/alleles/class1.html>. Acesso em: outubro/2009.

ANTONY NOLAN INSTITUTE. Disponível em <http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>. Acesso em: outubro/2009.

ANTEQUERA, F.; BIRD, A. HLA-G remains a mystery. *Current Biology*, v. 9, n. 17, p. 661-667, 1999

BAINBRIDGE, D.; ELLIS, S.; LE BOUTEILLER, P.; SARGENT, I. HLA-G remains a mystery. *Trends in Immunology, Oxford*, v. 22, p. 548-552, 2001.

BELL, J. Chromosome crawling in the MHC. *Trends in Genetics, Amsterdam*, v. 5, n. 9, p. 289-290, 1989.

BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development*, v. 16, n. 1, p. 6-21, 2002.

CAROSELLA, E.D.; DAUSSET, J.; KIRSZENBAUM, M. HLA-G revised. *Immunology Today, Amsterdam*, v. 17, n. 9, p. 407-409, 1996.

CAROSELLA, E.D.; ROUAS-FREISS, N.; PAUL, P.; DAUSSET, J. HLA-G: a tolerance molecule from the major histocompatibility complex. *Immunology Today, Amsterdam*, v. 20, n. 2, p. 60-62, 1999.

CAROSELLA, E.D.; MOREAU, P.; LE MAOULT, J.; LE DISCORDE, M.; ROUAS-FREISS, N. HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. *Adv. Immunol.*, v. 81, p. 199-252, 2003.

CAROSELLA, E.D.; MOREAU, P.; LE MAOULT, J.; ROUAS-FREISS, N. HLA-G: from biology to clinical benefits. *Trends Immunol.*, v. 29, n. 3, p. 125-32, 2008.

CASTELLI, E.C.; MOREAU, P.; OYA E CHIROMATZO, A.; MENDES-JUNIOR, C.T.; VEIGA-CASTELLI, L.C.; YAGHI, L.; GIULIATTI, S.; CAROSELLA, E.D.; DONADI, E.A. In silico analysis of microRNAs targeting the HLA-G 3' untranslated region alleles and haplotypes. *Hum Immunol.*, v. 70, n. 12, p. 1020-1025, 2009.

CHANG, C.C.; MURPHY, S.P.; FERRONE, S. Differential in vivo and in vitro HLA-G expression in melanoma cells: potential mechanisms. *Hum Immunol*, v. 64, n. 11, p. 1057-1063, 2003.

CHRISTANSEN, O.B.; RASMUSSEN, K.L.; JERSIL, C.; GRUNNET, N. HLA class II alleles confer susceptibility to recurrent fetal losses in Danish women. *Tissue Antigens, Copenhagen*, v. 44, p. 225-233, 1994.

CRISPIM, J.C.; MENDES-JUNIOR, C.T.; WASTOWSKI, I.J.; COSTA, R.; CASTELLI, E.C.; SABER, L.T.; DONADI, E.A. Frequency of insertion/deletion polymorphism in exon 8 of HLA-G and kidney allograft outcome. *Tissue Antigens*, v. 71, n. 1, p. 35-41, 2008.

DIEPSTRA, A.; POPPEMA, S.; BOOT, M.; VISSER, L.; NOLTE, I.M.; NIENS, M.; TEMEERMAN, G.J.; VAN DEN BERG, A. HLA-G protein expression as a potential immune escape mechanism in classical Hodgkin's lymphoma. *Tissue Antigens*, v. 71, n. 3, p. 219-226, 2008.

DONAGHY, L.; GROS, F.; AMIOT, L.; MARY, C.; MAILLARD, A.; GUIGUEN, C.; GANGNEUX, J.P. Elevated levels of soluble non-classical major histocompatibility class I molecule human



leucocyte antigen (HLA)-G in the blood of HIV-infected patients with or without visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol.*, v. 147, n. 2, p. 236-240, 2007.

DUNHAM, I.; SARGENT, C.A.; TROWSDALE, J.; CAMPBELL, R.D. Molecular mapping of the human major histocompatibility complex by pulse-field gel eletroforesis. *Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America, Washington*, v. 84, p.7235, 1987.

DUNKER, K.; SCHLAF, G.; BUKUR, J.; ALTERMANN, W.W.; HANDKE, D.; SELIGER, B. Expression and regulation of non-classical HLA-G in renal cell carcinoma. *Tissue Antigens*, v. 72, n. 2, p. 137-148, 2008.

FAINARDI, E.; RIZZO, R.; MELCHIORRI, L.; VAGHI, L.; CASTELLAZZI, M.; MARZOLA, A.; GOVONI, V.; PAOLINO, E.; TOLA, M.R.; GRANIERI, E.; BARICORDI, O.R. Presence of detectable levels of soluble HLA-G molecules in CSF of relapsing-remitting multiple sclerosis: relationship with CSF soluble HLA-I and IL-10 concentrations and MRI findings, *Journal of Neuroimmunology, Amsterdam*, v. 142, n. 1-2, p. 149-158, 2003.

FUZZI, B.; RIZZO, R.; CRISCUOLI, L.; NOCI, I.; MELCHIORRI, L.; SCARSELLI, B.; BENCINI, E.; MENICUCCI, A.; BARICORDI, O.R. HLA-G expressionin early embryos is a fundamental prerequisite for the obtainment of pregnancy. *Eur J Immunol.*, v. 32, p. 311-315, 2002.

GARDINER-GARDEN, M.; FROMMER, M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol*, v. 196, n. 2, p. 261-282, 1987.

GOBIN, S.J.P.; VAN DEN ELSEN, P.J. Transcriptional regulation of the MHC class Ib genes HLA-E, HLA-F, and HLA-G. *Human Immunology, New York*, v. 61, p. 1102-1107, 2000.

GROBAEK, K.; HOTHER, C.; JONES, P.A. Epogenetic changes in cancer. *APMIS*, V. 115, N. 10, P. 1039-1059, 2007.

HARRISON, G.A.; HUMPHREY K.E.; JAKOBSEN, I.B.; COOPER, D.W. A 14 bp deletion polymorphism in the HLA-G gene. *Human Molecular Genetics, Oxford*, v. 2, p. 2200, 1993.

HE, L.; HANNON, G.J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*, v. 5, n. 7, p. 522-531, 2004.

HIBY, S.E.; KING, A.; SHARKEY, A.; LOKE, Y.W. Molecular studies of trophoblast HLA-G: polymorphism, isoforms, imprinting and expression in preimplantation embryo. *Tissue Antigens*, v. 53, n. 1, p. 1-13, 1999.

HOLLING, T.M.; BERGEVOET, M.W.; WIERDA, R.J.; VAN EGGERMOND, M.C.; VAN DEN ELSEN, P.J. Genetic and epigenetic control of the major histocompatibility complex class Ib gene HLA-G in trophoblast cell lines. *Ann NY Acad Sci*, v. 1173, p. 538-544, 2009.

HOWELL, P.M., Jr; LIU, S.; REN, S.; BEHLEN, C.; FODSTAD, O.; RIKER, A.I. Epigenetics in human melanoma. *Cancer Control*, v. 16, n. 3, p. 200-218, 2009.

HVIID, T. V.; MELDGAARD, M.; SORENSEN, S.; MORLING, N. Polymorphism of exon 3 of the HLA-G gene. *Journal of Reproductive Immunology, Shannon*, v. 35, p. 20-28, 1997.

HUNT, J.S.; PETROFF, M.G.; MORALES, P.; SEDLMAYR, P.; GERAGHTY, D.E.; OBER, C. HLA-G in reproduction: studies on the maternal-fetal interface. *Human Immunology, New York*, v. 61, p. 1113-1117, 2000.

JAENISH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and enviromental signals. *Nat Genet*, v. 33, p. 245-254, 2003.

JERONIMO, C.; USADEL, H.; HENRIQUE, R.; OLIVEIRA, J.; LOPES, C.; NELSON, W.G.; SIDRANSKY, D. Quantitation of GSTP1 methylation in non-neoplastic prostatic tissue and organ-confined prostate adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst*, v. 93, n. 22, p. 1747-1752, 2001.

KETTING, R.F.; PLASTERK, R.H. What's new about RNAi? Meeting on siRNAs and miRNAs. *EMBO Rep*, v. 5, n. 8, p. 762-765, 2004.

LAMM, L.U.; OLAISEN, B. Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 5 and 6. *Cytogenetics and Cell Genetics, Basel*, v. 40, p. 128, 1985.

LE MAOULT, J.; ZAFARANLOO, K.; LE DANFF, C.; CAROSELLA, E.D. HLA-G up-regulates ILT2, ILT3, ILT4, and KIR2DL4 in antigen presenting cells, NK cells, and T cells. *FASEB J.*, v. 19, n. 6, p. 662-664, 2005.

LEWIN, B. *Genes VII*. Editora Artmed: Porto Alegre, 2001.

LI, L.C.; OKINO, S.T.; ZHAO, H.; POOKOT, D.; PLACE, R.F.; URAKAMI, S.; ENOKIDA, H.; DAHIYA, R. Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 103, n. 46, p. 17337-17342, 2006.

LILA, N.; AMREIN, C.; GUILLEMAIN, R.; CHEVALIER, P.; LATREMOUILLE, C.; FABIANI, J-N.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D.; CARPENTIER, A. Human leukocyte Antigen-G expression after heart transplantation is associated with a reduced incidence of rejection. *Circulation*, Hagerstown, v. 105, n. 16, p. 1949-1954, 2002.

MATOUK, C.C.; MARDSDEN, P.A. Epigenetic regulation of vascular endothelial gene expression. *Circ Res*, v. 102, n. 8, p. 873-887, 2008

MATSUZAKA, Y; MAKINO, S; NAKAJIMA, K; TOMIZAWA, M; OKA, A; BAHRAM, S; KULSKI, JK; TAMIYA, G; INOKO, H. New polymorphic microsatellite markers in the human MHC class III region. *Tissue Antigens, Copenhagen*, v. 57, n. 5, p. 397-404, 2001.

MENENDEZ, L.; WALKER, D.; MATYUNINA, L.V.; TOTTEN, K.A.; BENIGNO, B.B.; MCDONALD, J.F. Epigenetic changes within the promoter region of the HLA-G gene in ovarian tumors. *Mol Cancer*, v. 7, p. 43, 2008.

MEOLA, N.; GENNARINO, V.A.; BANFI, S. microRNAs and genetic diseases. *Pathogenetics*, v. 2, n. 1, p. 7, 2009.

METHPRIMER. Disponível em <http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>. Acesso em: outubro/ 2009.

MITSDOERFFER, M.; SCHREINER, B.; KIESEIER, B.C.; 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. *J. Neuroimmunol.*, v. 159, n. 1-2, p. 155-164, 2005.

MOREAU, P.; MOUILLOT, G.; ROUSSEAU, P.; MARCOU, C.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D. HLA-G gene repression is reversed by demethylation. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, Washington*, v. 100, n. 3, p. 1191-1196, 2003.

MORRIS, K.V. siRNA-mediated transcriptional gene silencing: the potential mechanism and a possible role in the histone code. *Cell Mol Life Sci*, v. 62, n. 24, p. 3057-3066, 2005.

MOUILLOT, G.; MARCOU, C.; ROUSSEU, P.; ROUAS-FREISS, N.; CAROSELLA, E.D. MOREAU, O. *Int J Cancer*, v. 113, n. 6, p. 928-936, 2005.

MURREL, A.; RAKYAN, V.K.; BECK, S. From genome to epigenome. *Hum Mol Genet*, v. 14 Spec, n. 1, p. R3-R10, 2005.

NICOLAE, D.; COX, N.J.; LESTER, L.A.; SCHNEIDER, D.; TAN, Z.; BILLSTRAND, C.; KULDANEK, S.; DONFACK, J.; KOGUT, P.; PATEL, N.M.; HOWARD, T.; WOLF, R.; KOPPELMAN, G.H.; WHITE, S.R.; PARRY, R.; POSTMA, D.S.; MEYERS, D.; BLEECKER, E.R.; HUNT, J.S.; SOLWAY, J.; OBER, C. Fine mapping and positional candidate studies identify HLA-G as an asthma susceptibility gene on chromosome 6p21. *Am J Hum Genet*, v. 76, n. 2, p. 349-357, 2005.

OBER, C.; ALDRICH, C.L.; CHERVONEVA, I.; BILLSTRAND, C.; RAHIMOV, F.; GRAY, H.L.; HYSLOP, T. Variation in the HLA-G promoter region influences miscarriage rates. *Am J Hum Genet*, v. 72, n. 6, p. 1425-1435, 2003.

O'CALLAGHAN, C.; BELL, J.I. Structure and function of the human MHC class Ib molecules HLA-E, HLA-F and HLA-G. *Immunological Reviews*, Copenhagen, v. 163, p. 129-138, 1998.

PARHAM, P. O sistema imune. Editora Artmed: Porto Alegre, 2001.

PAUL, P.; CABESTRE, F.A.; IBRAHIM, E.C.; LEFEBVRE, S.; KHALIL-DAHER, I.; VAZEUX, G.; QUILES, R.M.M.; BERMOND, F.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D. Identification of HLA-G7 as a new splice variant of the HLA-G mRNA and expression of soluble HLA-G5, -G6, and -G7 transcript in human transfected cells. *Human Immunology*, New York, v. 64, n. 11, p. 1138-1149, 2000.

PRADHAN, S.; ESTEVE, P.O. Mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases and their expression. *Clin Immunol*, v. 109, n. 1, p. 6-16, 2003.

RAKYAN, V.K.; HILMANN, T.; NOVIK, K.L.; LEWIN, J.; TOST, J.; COX, A.V.; ANDREWS, T.D.; HOWE, K.L.; OTTO, T.; OLEK, A.; FISCHER, J.; GUT, I.G.; BERLIN, S. DNA methylation profiling of the human major histocompatibility complex: a pilot study for the human epigenome project. *PLoS Biol*, V. 2, N. 12, P. E405, 2004.

RITEAU, B.; MOREAU, P.; MENIER, C.; KHALIL-DAHER, I.; KHOSROTEHRANI, K.; BRAS-GONÇALVES, R.; PAUL, P.; DAUSSET, J.; ROUAS-FREISS, N.; CAROSELLA, E.D. Characterization of HLA-G1, -G2, -G3, and -G4 isoforms transfected in a human melanoma cell line, *Transplantation Proceedings*, New York, v. 33, n. 3, p. 2360-2364, 2001.

RITEAU, B.; FAURE, F.; MENIER, C.; VIEL, S.; CAROSELLA, E.D.; AMIGORENA, S.; ROUAS-FREISS, N. Exosomes bearing HLA-G are released by melanoma cells. *Hum. Immunol.*, v. 64, n. 11, p. 1064-1072, 2003.

ROBERTSON, K.D.; JONES, P.A. DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis*, v. 21, n. 3, p. 461-467, 2000.

ROBINS, H.; LI, Y.; PADGETT, R.W. Incorporating structure to predict microRNA targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 102, n. 11, p. 4006-4009, 2005.

RODENHISER, D.; MANN, M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CMAJ*, v. 174, n. 3, p. 341-348, 2006.

ROUAS-FREISS, N.; MOREAU, P.; FERRONE, S.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D. HLA-G proteins in cancer: do they provide tumor cells with an escape mechanism? *Cancer Res.*, v. 65, n. 22, p. 10139-10144, 2005.

ROUAS-FREISS, N.; MOREAU, P.; MENIER, C.; LE MAOULT, J.; CAROSELLA, E.D. Expression of tolerogenic HLA-G molecules in cancer prevents antitumor responses. *Semin. Cancer Biol.*, v. 17, n. 6, p. 413-421, 2007.

- ROUNTREE, M.R.; BACHMAN, K.E.; HERMAN, J.G.; BAYLIN, S.B. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene*, v. 20, n. 24, p. 3156-3165, 2001.
- ROUSSEAU, P.; LE DISCORDE, M.; MOUILLOT, G.; MARCOU, C.; CAROSELLA, E. D.; MOREAU, P. The 14bp deletion-insertion polymorphism in the 3'UTR region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability, *Human Immunology*, New York, v. 64, p. 1005-1010, 2003.
- ROUSSEAU, P.; MASTERNAK, K.; KRAWCZYK, M.; REITH, W.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D.; MOREAU, P. In vivo, RFX5 binds differently to the human leukocyte antigen-E, -F, and -G promoters and participates in HLA class I protein expression in a cell type-dependent manner. *Immunology*, Oxford, v. 111, n. 1, p. 53-65, 2004.
- SELIGER, B.; SCHLAF, G. Structure, expression and function of HLA-G in renal cell carcinoma. *Semin Cancer Biol*, v. 17, n. 6, p. 444-450., 2007.
- SETHUPATHY, P.; COLLINS, F.S. MicroRNA target site polymorphisms and human disease. *Trends Genet*, v. 24, n. 10, p. 489-497, 2008.
- SHIROISHI, M.; TSUMOTO, K.; AMANO, K.; SHIRAKIHARA, Y.; COLONNA, M.; BRAUD, V.M.; ALLAN, D.S.; MAKADZANGE, A.; ROWLAND-JONES, S.; WILLCOX, B.; JONES, E.Y.; VAN DER MERWE, P.A.; KUMAGAI, I.; MAENAKA, K. Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 100, p. 8856-8861, 2003.
- SINGAL, R.; GINDER, G.D. DNA methylation. *Blood*, v. 93, n. 12, p. 4059-4070, 1999.
- SINGHAL, H.; THOMSON, S. Breast Cancer Evolution: instant access to minds of medicine. *Emedicine*. Disponível em: <http://www.emedicine.com/med/topic3287.htm>; 2004.
- STERNER, D.E.; BERGER, S.L. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev*, v. 64, n. 2, p. 435-459, 2000.
- SUN, L.L.; HAN, Y.; CHEN, J.H.; YAO, Y.Q. Down-regulation of HLA-G boosted natural killer cell-mediated cytotoxicity in JEG-3 cells cultured in vitro. *Fertil Steril*, v. 90, n. 6, p. 2398-2405, 2008.
- TAN, Z.; RANDALL, G.; FAN, J.; CAMORETTI-MERCADO, B.; BRICKMAN-SCHNEIDER, R. PAN, L.; SOLWAY, J. GERN, J.E.; LEMANSKE, R.F.; NICOLAE, D.; OBER, C. Allele-specific targeting of microRNAs to HLA-G and risk of asthma. *Am J Hum Genet*, v. 81, n. 4, p. 829-834, 2007.
- TOMARI, Y. Biochemical dissection of RISC assembly and function." *Nucleic Acids Symp Ser*, Oxford, v. 53, p. 15, 2009.
- TURKER, M.S. Gene silencing in mammalian cells and the spread of DNA methylation. *Oncogene*, v. 21, n. 35, p. 5388-5393, 2002.
- TYCKO, B. Epigenetic gene silencing in cancer. *J Clin Invest*, v. 105, n. 4, p. 401-407, 2000.
- UNIGENE. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=unigene>. Acesso em: outubro 2009.
- VAN DER VEN, K.; PFEIFFER, K.; SKRABLIN, S. HLA-G polymorphisms and molecule function- questions and more questions- a review. *Placenta*, London, v. 21, p. S86-S92, 2000.
- VEIT, T.D.; CHIES, J.A. Tolerance versus immune response -- microRNAs as important elements in the regulation of the HLA-G gene expression. *Transpl Immunol*, v. 20, n. 4, p. 229-231, 2009.

- VERMA, M.; SRIVASTAVA, S. Epigenetics in cancer: implications for early detection and prevention. *Lancet Oncol*, v, 3, n. 12, p. 755-763, 2002.
- VOLINIA, S.; VISIONE, R.; GALASSO, M.; ROSSI, E.; CROCE, C.M. Identification of microRNA activity by Targets' Reverse EXpression. *Bioinformatics*, Nov, 2009.
- WAGGONER, D. Mechanisms of disease: epigenesis. *Semin Pediatr Neurol*, v. 14, n. 1. p. 7-14, 2007.
- WIENDL, H.; MITSDOERFFER, M.; HOFMEISTER, V.; WISCHHUSEN, J.; WEISS, E.H.; DICHGANS, J.; LOCHMULLER, H.; HOHLFELD, R.; MELMS, A.; WELLER, M. The non-classical MHC molecule HLA-G protects human muscle cells from immune-mediated lysis: implications for myoblast transplantation and gene therapy, *Brain*, Oxford, v. 126, p. 176-185, 2003.
- WIENDL, H.; FEGER, U.; MITTELBRONN, M.; JACK, C.; SCHREINER, B.; STADELMANN, C.; ANTEL, J.; BRUECK, W.; MEYERMANN, R.; BAR-OR, A.; KIESEIER, B.C.; WELLER, M. Expression of the immune-tolerogenic major histocompatibility molecule HLA-G in multiple sclerosis: implications for CNS immunity. *Brain*, v. 128; n. 11, p. 2689-2704, 2005.
- WILSON, A.S.; POWER, B.E.; MOLLOY, P.L. DNA hypomethylation and human diseases. *Biochim Biophys Acta*, v. 1775, n. 1, p. 138-162, 2007.
- WORM, J.; GULDBERG, P. DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target for anticancer therapy. *J Oral Pathol Med*, v. 31, n. 8, p. 443-449, 2002.
- YAN, W.H.; LIN, A.F.; CHANG, C.C.; FERRONE, S. Induction of HLA-G expression in a melanoma cell line OCM-1A following the treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cell Res*, v. 15, n. 7, p. 523-531, 2005.
- YANG, X.; YAN, L.; DAVIDSON, N.E. DNA methylation in breast cancer. *Endocr Relat Câncer*, v. 8, n. 2, p. 115-127, 2001.
- YOO, C.B.; JONES, P.A. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov*, v. 5, n. 1, p. 37-50, 2006.