

ALESSANDRO PIRRI

**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE HLA-G E SUA RELAÇÃO COM  
TRANSPLANTES DE ÓRGÃOS**

Monografia de final do Curso de Ciências Biológicas, apresentado à disciplina de Estágio II referente ao trabalho que foi realizado no Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, no período de abril de 2003 a janeiro de 2004.

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

CURITIBA  
2004

*Aos meus pais, irmãos e amigos*

## AGRADECIMENTOS

É difícil expressar o quão agradecido estou às pessoas que me ajudaram na realização deste projeto. Em primeiro lugar gostaria de agradecer aos meus pais, pela sua ajuda e apoio não só durante a minha vida acadêmica, mas em toda minha vida, e aos meus irmãos e sobrinhos, dando-me apoio e motivação. Gostaria de agradecer minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Maria da Graça, por sua excelente orientação e auxílio na elaboração deste projeto. Agradeço a Prof<sup>a</sup>. Eni Picchioni Bompeixe, por seu auxílio e ensinamentos, que me ajudaram muito. Agradeço a Pryscilla F. Wowk, por me ajudar na obtenção de alguns textos e materiais. Agradeço a toda equipe do LIGH, dentre eles em especial Sonia Maria, Clineu, Fabio, Sibelle, Fernanda, Renate, Isolde, pela ajuda e companheirismo. E enfim, aos meus amigos, Vanessa, Juliany, Anousca, Cecília, Maria, Aline entre muitos outros, que estiveram comigo durante a graduação, além de Cristina, Kazumi, Raphael, Thiago, Saul, Ricardo, entre outros, que também me ensinaram muito sobre a vida e amizade. Obrigado a todos.

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	iii
<b>SUMÁRIO</b> .....	iv
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	v
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	vi
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	vii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	3
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	4
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	5
<b>5 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	6
5.1 SOBRE O MHC .....	6
5.2 HISTÓRICO DO HLA-G .....	8
5.3 ESTRUTURA DO GENE <i>HLA-G</i> E ELEMENTOS DE CONTROLE DA EXPRESSÃO.....	9
5.4 ESTRUTURA DA PROTEÍNA HLA-G E SUAS ISOFORMAS.....	12
5.5 POLIMORFISMOS DE HLA-G.....	16
5.6 FILOGENIA.....	18
5.7 A AÇÃO DAS MOLÉCULAS DE HLA-G .....	19
5.8 HLA-G EM TRANSPLANTES .....	25
5.9 HLA-G EM TUMORES .....	28
<b>6 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO</b> .....	31
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	32
<b>ANEXOS</b> .....	39
ANEXO 1 - SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DOS ALELOS DE HLA-G COM INDICAÇÃO DAS POSIÇÕES CORRESPONDENTES AOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES E OLIGONUCLEOTÍDEOS -SONDA SEQUÊNCIA-ESPECÍFICOS (SSO).....	39

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - O MHC HUMANO.....	7
FIGURA 2 - ESTRUTURA DO RNAm DE <i>HLA-G</i> .....	10
FIGURA 3 - A ESTRUTURA DA REGIÃO PROMOTORA DOS GENES <i>HLA-E, HLA-F E HLA-G</i> .....	12
FIGURA 4 - REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL DE <i>HLA-E, HLA-F E</i> <i>HLA-G</i> .....	13
FIGURA 5 - ISOFORMAS DE <i>HLA-G</i> .....	15

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ALELOS DE <i>HLA-G</i> E POLIMORFISMO DAS PROTEÍNAS.....	11
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

células NK	– células <i>natural killer</i> ;
CIITA	– Transativador de classe II;
HLA	– Antígeno Leucocitário Humano. É o MHC humano;
IL	– Interleucina;
ILT	– classe de receptores presentes nas células <i>NK</i> , linfócitos B, macrófagos, monócitos;
INF	– Interferon;
IRF	– Fator regulador do interferon;
ISRE	– Seqüencia Consenso Interferon;
JEG-3	– células do coriocarcinoma humano;
K586	– células da eritoleucemia humana;
KIR	– receptor inibitório das células <i>natural killer</i> ;
MHC	– Complexo Principal de Histocompatibilidade Humana;
MLR	– Reação mixtas de linfócitos;
NF- $\kappa$ B	– Fator transcricional $\kappa$ B;
PCR	– Reação em Cadeia da Polimerase;
Sp1	- Fator transcricional mediador das rotas de transativação constitutivas e induzidas por citocinas;
STAT1	- Tradutor de sinal e ativador da transcrição;
TE671	– células do rabdiosarcoma humano;
TNF	– Fator de Necrose Tumoral;
TCR	– Receptor das Células T;
$\beta$ 2-m	- $\beta$ 2-microglobulina.

## 1 INTRODUÇÃO

*HLA-G* é um gene não-clássico de classe Ib pertencente ao Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês, *Major Histocompatibility Complex*, o qual, na espécie humana é denominado HLA). (CAROSELLA; DAUSSET e KIRSZENBAUM, 1996; CARROSELLA et al., 1999; O'CALLAGHAN e BELL, 1998).

É caracterizado por apresentar baixo polimorfismo (quando comparado com os HLA de classe Ia), expressão limitada nos tecidos e por codificar, pelo menos, sete isoformas diferentes de proteínas HLA-G (HLA-G1, -G2, -G3 e -G4 ligadas à membrana e HLA-G5, -G6 e -G7 em formas solúveis). As formas solúveis são resultado da presença de um códon de parada presente no íntron 4, o qual impede a tradução do domínio transmembrana da proteína (codificado pelo éxon 5). No que se refere às seqüências reguladoras da expressão de *HLA-G*, este não contém uma seqüência de resposta ao interferon, logo não é induzido pelo interferon (IFN- $\gamma$ ) (CAROSSELA et al., 1999; LILA et al., 2002; CAROSELLA; DAUSSET e KIRSZENBAUM, 1996; O'CALLAGHAN e BELL, 1998).

A expressão da proteína HLA-G ocorre nos tecidos trofoblásticos extra-embrionários, nas reações da resposta à tolerância imune entre mãe e feto, inibindo a atividade citotóxica dos linfócitos T e a atividade das células *natural-killer* (NK). Expressa-se também em linfócitos T e B maduros do sangue periférico, queratinócitos, olhos fetais e adultos, células do timo e em células germinativas masculinas (KIRSZENBAUM et al., 1994; O'CALLAGHAN e BELL, 1998; LE BOUTEILLER; BLASCHITZ, 1999; LILA et al., 2002).

A seqüência de aminoácidos da proteína codificada pelo gene *HLA-G* possui cerca de 86% de homologia com as proteínas codificadas pelos genes *HLA-A*, *-B* e *-C*. Em diversos estudos têm-se investigado sua possível atuação em complicações associadas à gravidez, tais como abortos espontâneos. Mais recentemente relatou-se uma possível associação de HLA-G com o mecanismo que certos tumores possuem para escapar da ação do sistema imune. Além disso, sua expressão é revelada em outros processos patológicos como infecções virais e também em processos de rejeição observadas em órgãos transplantados. (PÉNZES et al., 1999; CAROSELLA et al., 2001; PALMISANO et al., 2002; LE DISCORDE et al., 2002).



A ação da proteína HLA-G ocorre via receptores celulares regulando a ação das células NK e linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Como citado anteriormente, sua expressão em células trofoblásticas proporciona uma barreira imune impedindo que os linfócitos T e células NK atuem e danifiquem os tecidos fetais. Essa ação sobre o linfócito T CD8<sup>+</sup> pode ocorrer ou por interação de HLA-G com os receptores inibitórios presentes nestas células, ou ainda indiretamente inibindo a resposta proliferativa. Esse processo pode ser benéfico no caso da tolerância feto-maternal ou ainda na tolerância de aloenxerto e xenoenxerto, onde o HLA-G poderia minimizar o processo de rejeição ao órgão transplantado. Por outro lado, o processo de inibição da atividade de linfócitos T pode ser prejudicial em circunstâncias onde há expressão aberrante de HLA-G, o que proporcionaria meios para o tumor escapar ao sistema imune (KHALIL-DAHER et al., 2000; PALMISANO et al., 2002)

Em relação aos transplantes, estudos indicam que a ativação do HLA-G leva a uma diminuição da rejeição (tanto crônica quanto aguda) e uma melhor tolerância a enxertos alogênicos, além de proteção a processos inflamatórios (LILA et al., 2000).

## **2 JUSTIFICATIVA**

Os atuais estudos indicam que HLA-G pode ter um importante papel na aceitação de órgãos transplantados, através de sua ativação durante o processo de transplante, suprimindo a modulação da resposta imune do receptor e gerando uma melhor tolerância ao enxerto, controlando as rejeições aguda e crônica como ocorreu, por exemplo, em estudos feitos em transplantes de coração (LILA et al., 2000; LILA et al., 2002).

É importante realizar uma revisão bibliográfica a fim de acompanhar os progressos na área de pesquisa sobre o HLA-G em transplantes, o qual é um campo ainda relativamente novo, e atualizar os conhecimentos e os avanços neste campo que ainda está em expansão.

### 3 OBJETIVOS

- I- Conhecer os mecanismos de ação de HLA-G e sua atuação sobre os linfócitos T CD8<sup>+</sup> e células NK;
- II- Investigar as relações entre HLA-G e o prognóstico na aceitação de órgãos pelos pacientes transplantados;
- III- Conhecer outros papéis biológicos do HLA-G, tais como, sua participação na proliferação celular e/ou progressão de tumores;
- IV- Além de realizar uma revisão do assunto, colher subsídios para estruturar e redigir um trabalho científico relacionado ao HLA-G, usando informações do banco de dados do Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade.

#### **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

Foi realizada uma extensa revisão bibliográfica em livros, *sites* da internet e em artigos científicos, visando atingir os objetivos anteriormente citados, enfatizando-se o papel do HLA-G em transplantes de órgãos.

## 5 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 5.1 SOBRE O MHC

O primeiro MHC foi descrito por sua atuação em transplantes de tecidos em camundongos. As primeiras moléculas foram descritas como antígenos polimórficos da superfície celular e eram codificadas por um locus gênico denominado H-2. Os produtos do H-2 então constituiriam a principal barreira imunológica e o sucesso dos transplantes dependeria do grau de similaridade H-2 entre doador e receptor. Esses antígenos foram denominados antígenos de histocompatibilidade e codificados por genes de mesmo nome. Posteriormente, complexos gênicos homólogos foram descritos em várias espécies de mamíferos, atuando de forma similar, codificando produtos moleculares envolvidos na resposta imune (DUNHAM et al. 1987; CHRISTIANSEN et al., 1993; CROUA-ROY et al., 1994).

O Complexo de Histocompatibilidade Humano (HLA, do inglês *Human Leucocyte Antigen*) só viria a ser descoberto na década de 50, por Dausset, Payne e van Rood, enquanto realizavam estudos sorológicos em pacientes politransfundidos, e detectaram anticorpos leucoaglutinantes. Dausset descreveu o primeiro antígeno ao qual denominou Mac (atual HLA-A2). O MHC humano compreende o conjunto gênico *HLA* mapeado no braço curto do cromossomo 6, na banda 6p21.3, que ocupa uma região cromossômica de 4 megabases de DNA, onde estão presentes outros genes, muitos não pertencentes ao sistema *HLA*. Essa região do genoma, de acordo com a estrutura e função dos produtos moleculares que os genes aí situados codificam, foi subdividida em regiões de classe I, II e III (Figura 1) (LAMM et al., 1985; ZIEGLER et al. 1991; CAMPBELL et al. 1993; CHRISTIANSEN et al., 1994; BELL, 1999).

Oito loci gênicos foram descritos na Região de Classe I. Os genes *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C* (conhecidos como clássicos ou de classe Ia) codificam para 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. As proteínas HLA estão presentes em todas as células nucleadas. Existem ainda os loci *HLA-E*, *HLA-F* e *HLA-G* (conhecidos como não-clássicos ou de classe Ib), e ao

contrário dos clássicos, são pouco polimórficos. Há também os loci *HLA-H*, *HLA-J*, *HLA-K* e *HLA-L*, que são pseudogenes codificantes de cadeia  $\alpha$  (CAMPBELL, 1993).

FIGURA 1 – O MHC HUMANO

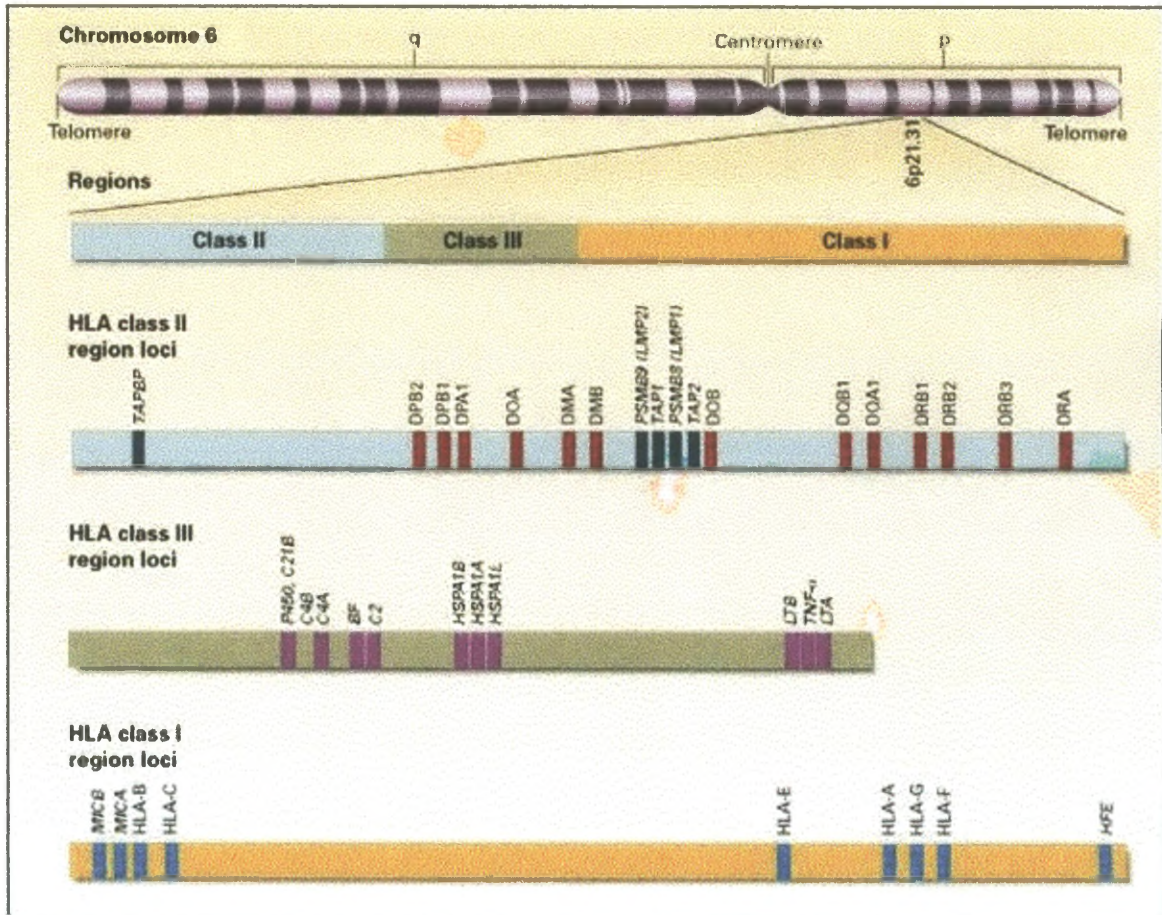


Ilustração mostrando a posição do MHC no cromossomo 6 e a disposição dos genes dentro dos loci. (disponível em [http://nejm.org/teaching\\_tools/jpegs\\_large/klei.fig1.jpg](http://nejm.org/teaching_tools/jpegs_large/klei.fig1.jpg))

As moléculas de Classe II são codificadas por diferentes loci no MHC e mapeados na região *HLA-D*, respectivamente nas sub-regiões *HLA-DR*, *HLA-DQ* e *HLA-DP*. A sub-região *DR*, por exemplo, apresenta um locus gênico que codifica para a cadeia  $\alpha$  e pelo menos dois loci codificando para as cadeias  $\beta$  da respectiva molécula, o mesmo sendo observado para *DQ*. Existem ainda os loci *HLA-DOB*, *HLA-DMA* e *HLA-DMB*, *HLA-DNA* que codificam para cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  respectivas. Essa organização mais complexa reflete numa maior variabilidade estrutural para as moléculas de Classe

II, as quais apresentam uma distribuição restrita a linfócitos B, monócitos, macrófagos, células endoteliais de capilares e vênulas.

Na Região de Classe III foram definidos genes que atuam no processo de ativação do sistema complemento (*Bf*, *C2*, *C4A*, *C4B*) e genes da 21-hidroxilase, da hemocromatose, *TNF* e *LTA*, que codificam as citocinas  $TNF-\alpha$  e  $LT-\alpha$  (antigo  $TNF-\beta$ ) respectivamente, entre outros.

## 5.2 HISTÓRICO DO HLA-G

*HLA-G* foi primeiramente descrito por GERAGHTY et al., em 1987, quando realizavam uma análise do DNA genômico. Esta análise revelou genes similares aos bem conhecidos genes do MHC de classe I *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C* (HUNT et al, 2000). ELLIS et al., em 1986, já haviam observado uma molécula diferente de HLA de classe I em seus estudos com células trofoblásticas que Geraghty descreveu e nominou de *HLA-6.0* (por estar localizado no interior de um fragmento de restrição gerado por Hind III, com 6.0 kb). Somente em 1990, foi possível associar *HLA-6.0* como sendo *HLA-G*. (VAN DER VEN; PFEIFFER; SKRABLIN, 2000).

Inicialmente acreditava-se que o *HLA-G* era polimórfico somente em algumas populações (afro-americanas), mas posteriormente observou-se que ele era polimórfico nas outras populações também (BAINBRIDGE et al, 2001).

Nos primeiros estudos, *HLA-G* foi detectado no fluido amniótico e soro de mulheres grávidas, e pensava-se que estava 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 (nestes, em taxas elevadas), rim, ovário, cólon, intestino (nestes, em níveis reduzidos) 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; DAUSSET e KIRSZENBAUM, 1996; CAROSELLA et al., 1998; LILA et al., 2002; WIENDL et al., 2003).

### 5.3 ESTRUTURA DO GENE HLA-G E ELEMENTOS CONTROLE DE SUA EXPRESSÃO

*HLA-G* localiza-se no interior da região do MHC de classe I do cromossomo 6 apresentando 4396 pares de base, com oito éxons, sete íntrons e uma região 3' não traduzida, sendo homólogo àqueles do grupo clássico de classe Ia. Quanto à sua estrutura gênica possui: Éxon 1, com 73 pb, codificando o peptídeo sinal; Éxon 2, com 270 pb, 3, com 276 pb, e 4, com 276 pb, os quais codificam os domínios  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$  respectivamente; Éxon 5, com 114 pb, codificando a região transmembrana; Éxons 6, 7 e 8, com 105 pb, codificando o domínio citoplasmático da molécula *HLA-G*. Entretanto, devido a um codón de parada no éxon 6 a cauda citoplasmática apresenta 6 aminoácidos enquanto a cauda das moléculas de classe Ia apresentam aproximadamente 30 (Figura 2) (CAROSELLA; DAUSSET e KIRSZENBAUM, 1996; O'CALLAGHAN e BELL, 1998; CAROSELLA et al., 1999).

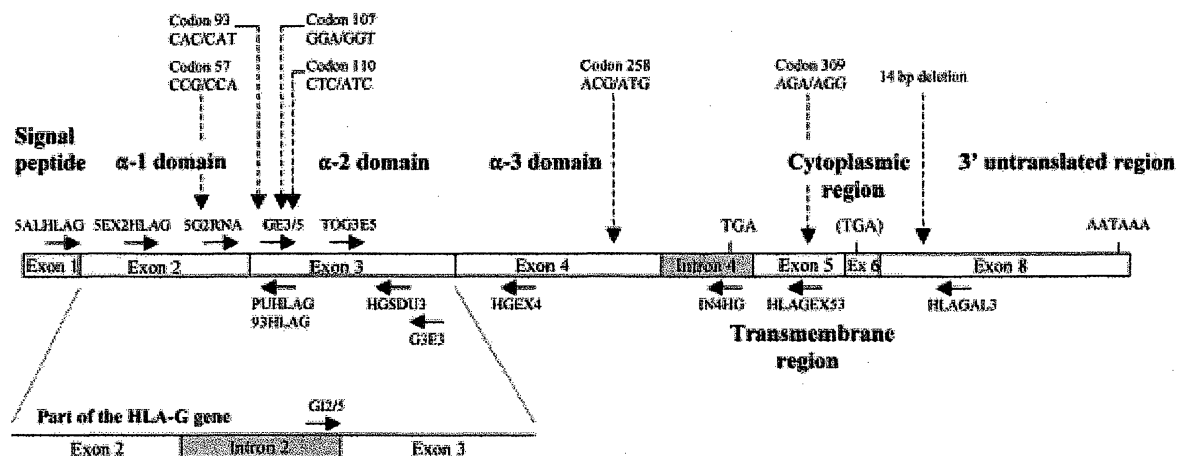
Já foram descritos 16 alelos de *HLA-G*. As diferenças nucleotídicas que geram diferenças na seqüência dos aminoácidos definem os seis principais grupos alélicos: *G\*0101*, *G\*0102*, *G\*0103*, *G\*0104*, *G\*0105N* e *G\*0106*. As substituições silenciosas (não afetam o aminoácido codificado) encontradas dentro do grupo *G\*0101* geram oito subgrupos: *G\*01011*, *G\*01012*, *G\*01013*, *G\*01014*, *G\*01015*, *G\*01016*, *G\*01017*, *G\*01018*, e para o grupo *G\*0104*, geram três subgrupos: *G\*01041*, *G\*01042*, *G\*01043*. O alelo *G\*0105N* possui uma deleção no códon 130, do éxon 3 e é o primeiro alelo descrito com uma deleção que altera o quadro de leitura e situado no início do éxon 4 (SUÁREZ et al., 1997; MARSH, 2000).

Em resumo, dos 16 alelos de *HLA-G*, 4 resultam de mutações não-sinônimas codificando as proteínas *HLA-G* de membrana: *G\*01011* ("selvagem"); *G\*0103* - Thr31 para Ser; *G\*01041* e *G\*0104b* - Leu110 para Ile; e Thr258 para Met; assim como a proteína solúvel truncada, delCys130 (Tabela 1). Os códons modificados 31, 110 e 258 estão localizados fora da região de ligação com peptídeos, sugerindo que este polimorfismo não afeta interações com peptídeos antigênicos ligantes ou TCRs. O alelo *G\*0105N* (que possui a mutação delCys130) foi o primeiro alelo nulo do *HLA-G* encontrado ocorrendo independentemente em diferentes grupos étnicos (2,3% dos



caucasianos) (VAN DER VEN et al., 1998; KIRSZENBAUM et al., 1999; CAROSELLA et al., 1999).

FIGURA 2 - ESTRUTURA DO RNAm DE HLA-G



Desenho esquemático do RNAm transcrito na íntegra, incluindo o intron 4. A orientação e localização da PCR e das seqüências de *primers* estão indicadas com setas. Os polimorfismos detectados são mostrados (HVIID et al., 1998).

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 seqüência consenso interferon (ISRE) e o módulo SXY (Figura 3). 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 seqüências S, X (compreendendo os meio-sítios X<sub>1</sub> e X<sub>2</sub>) e Y ligadas cooperativamente por complexos de multiproteínas (RFX, CREB/ATF e NFY). Em *HLA-G*, este módulo SXY possui seqüências S e X<sub>1</sub> homólogas ao HLA de classe I, mas seqüências Y e X<sub>2</sub> 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. Além desses 3 elementos regulatórios, um outro elemento regulatório de 250 pb que controla a transcrição de *HLA-G* está localizado a 1000pb do 1º éxon, O que foi observado em

placentas transgênicas de camundongos (CAROSELLA; DAUSSET e KIRSZENBAUM, 1996; GOBIN e VAN DEN ELSEN, 2000; ROUSSEAU et al., 2004).

TABELA 1. ALELOS DE HLA-G E POLIMORFISMO DAS PROTEÍNAS

HLA-G alleles	Exon 2			Exon 3			Exon 4		
	31	35	57	93	107	110	130	188	258
G*01011/0102	ACG (I)	CGG (R)	CCG (P)	CAC (H)	GGA (G)	CTC (L)	CTG (L)	CAC(H)	ACG (I)
G*01012	ACG	CGG	CCA	CA <sup>F</sup>	GGA	CTC	CTG	CAC	n.d.
G*01013	ACG	CGG	CCA	CAC	GG <sup>F</sup>	CTC	CTG	n.d.	n.d.
G*II	ACG	CGG	CCA	CAC	GGA	CTC	CTG	n.d.	n.d.
G*0103	T	CGG	CCG	CAC	GGA	CTC	CTG	n.d.	n.d.
	-								
	CG (S)								
G*0105N	ACG	CGG	CCA	CA <sup>F</sup>	GGA	CTC	-TG (fr)	n.d.	n.d.
G*0101g	ACG	CGA	CCA	CA <sup>F</sup>	GGA	CTC	CTG	n.d.	n.d.
G*0104b	ACG	CGG	CCA	CA <sup>F</sup>	GGA	A	CTG	n.d.	n.d.
						TC (I)			
G*01015	ACG	CGG	CCG	CAC	GG <sup>F</sup>	CTC	CTG	CAC	ACG
G*01016	ACG	CGG	CCG	CAC	GGA	CTC	CTG	CA <sup>F</sup>	ACG
G*01017	ACG	CGG	CCA	CA <sup>F</sup>	GG <sup>F</sup>	CTC	CTG	CAC	ACG
G*01018	ACG	CGG	CCA	CAC	GGA	CTC	CTG	CAC	ACG
G*01041/0104	ACG	CGG	CCA	CAC	GGA	A	CTG	CAC	ACG
						TC (I)			
G*01042	ACG	CGG	CC <sup>E</sup>	CAC	GGA	A	CTG	CA <sup>F</sup>	ACG
						TC (I)			
G*01043	ACG	CGG	CCG	CAC	GGA	A	CTG	CAC	ACG
						TC (I)			
not assigned	ACG	CGG	CCA	CA <sup>F</sup>	GGA	CTC	CTG	CAC	A <sup>T</sup> G (M)

G, Gly; H, His; I, Ile; L, Leu; M, Met; P, Pro; R, Arg; S, Ser; T, Thr; fr, frameshift.

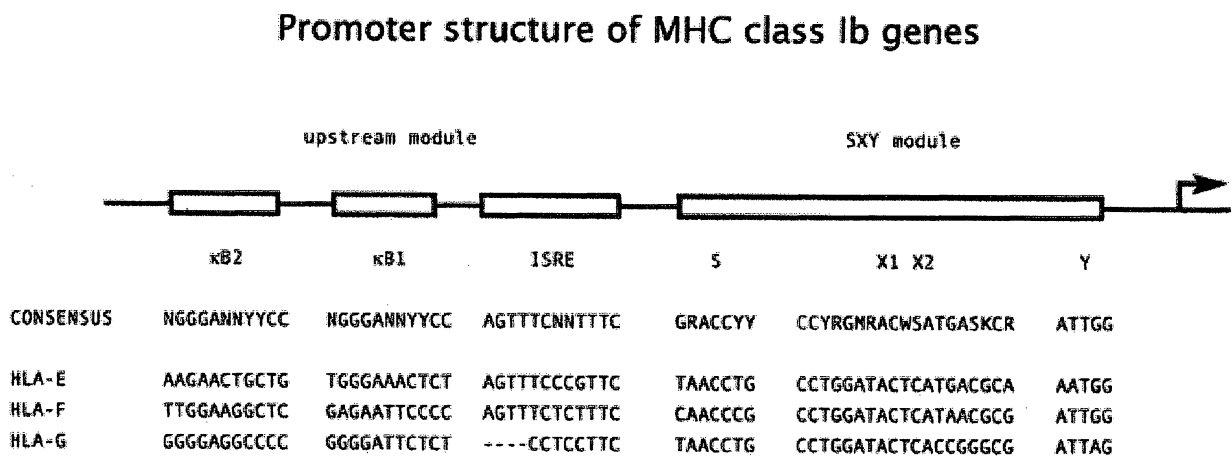
Nos 16 alelos de HLA-G, 4 resultam de mutações não-sinônimas codificando as proteínas HLA-G de membrana observa-se que em G\*01013 ocorre uma alteração Thr31 para Ser; Em G\*01041 e G\*0104b, ocorre a alteração Leu110 para Ile; e outra alteração Thr258 para Met, ocorre em um alelo não nominado. O alelo G\*0105N possui a mutação delCys130. Os códons modificados 31, 110 e 258 estão localizados fora da região de ligação dos peptídeos, sugerindo que este polimorfismo não afeta interações com peptídeos antigênicos ligantes ou TCRs (KIRSZENBAUM et al., 1999).

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, aparentemente está parcialmente ausente em *HLA-G*. Esta região (a porção 3' do sítio  $\kappa$ B1 e as seqüências supressoras) não apresenta qualquer afinidade de ligação com proteínas da família de fatores transcricionais IRF (fator regulatório 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- $\gamma$ . 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- $\gamma$  (Figura 4) (GOBIN e VAN DEN ELSEEN, 2000).

Análises de seqüências têm revelado a presença de outra região regulatória em potencial a 1438 pb na região promotora do gene *HLA-G*, assim como sítios de ligações para as proteínas AP1, STAT1, IRF1, NF- $\kappa$ B e ZF (*zinc finger*). Entretanto esta região foi incapaz de induzir a transativação de *HLA-G*. Em adição, ZFX não induz a expressão de HLA-G (GOBIN e VAN DEN ELSEEN, 2000).

FIGURA 3 - A ESTRUTURA DA REGIÃO PROMOTORA DOS GENES *HLA-E*, *HLA-F*, E *HLA-G*.



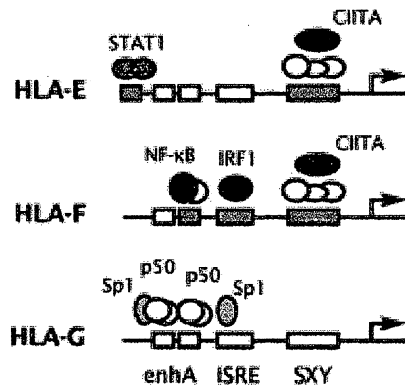
A seqüência de nucleotídeos dos elementos regulatórios conservados dos módulos de indução e SXY dos promotores de *HLA-E*, *HLA-F*, e *HLA-G*. Seqüências Consenso dos sítios  $\kappa$ B e ISRE, e dos blocos S, X1X2, e Y são mostrados em comparação (GOBIN; VAN DEN ELSEEN, 2000).

#### 5.4 ESTRUTURA DA PROTEÍNA HLA-G E SUAS ISOFORMAS

Sobre a estrutura da molécula HLA-G, esta possui uma grande similaridade com a molécula funcional de HLA-A2, em regiões altamente conservadas as quais acredita-se serem essenciais para a interação com as células T. Similarmente, todas posições relevantes para a interação com a  $\beta_2$ -microglobulina, a qual é um requisito básico na manutenção da conformação nativa das moléculas de HLA de classe I, estão

conservadas na seqüência "selvagem" do HLA-G, ou seja HLA-G\*01011 (VAN DER VEN; PFEIFFER; SKRABLIN, 2000).

FIGURA 4 - REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL DE *HLA-E*, *HLA-F*, E *HLA-G*



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 (GOBIN; VAN DEN ELSEN, 2000).

Os domínios  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  das moléculas de classe I, os quais correspondem aos éxons 2 e 3 dos genes *HLA* classe I, formam a região de ligação com peptídeo antigênico, onde os antígenos se ligam e são apresentados para os receptores das células T. O HLA-G difere do HLA-A2 em 12 das 29 posições de aminoácidos as quais são relevantes para a ligação com o antígeno. Comparações entre as seqüências de aminoácidos mostram que ambos genes exibem o mais alto grau de diversidade nas regiões onde o polimorfismo pode ser tolerado, em oposição aos outras regiões de funcionalidade crítica. (VAN DER VEN; PFEIFFER; SKRABLIN, 2000).

Assim como os genes clássicos de classe Ia (*HLA-A*, *-B* e *-C*) e os outros não-clássicos de classe Ib (*HLA-E* e *-F*), *HLA-G* codifica glicoproteínas que ligam-se covalentemente a cadeia leve,  $\beta_2$ -microglobulina, na superfície das células (CAROSELLA; DAUSSET e KIRSZENBAUM, 1996).

*HLA-G* teoricamente é capaz de apresentar um número expressivo de peptídeos estranhos que podem capacitar células T a proteger o trofoblasto (e outros tecidos) de infecções virais ou transformações malignas (VAN DER VEN; PFEIFFER; SKRABLIN, 2000).

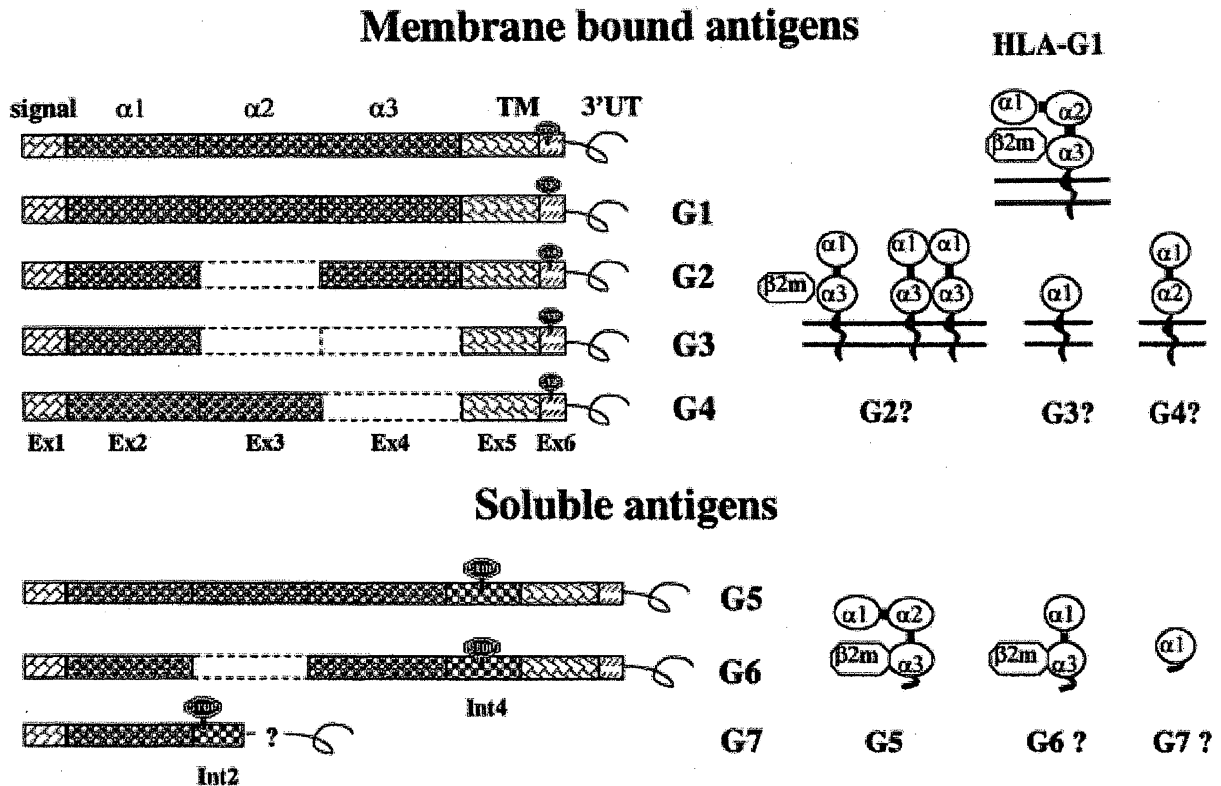
A estrutura do peptídeo ligante de HLA-G segue os mesmos princípios das moléculas de HLA clássicas, ainda que apresente suas próprias características. Os peptídeos que se ligam à molécula HLA-G foram estudados por DIEHL et al. (1996) e os resultados indicaram um grande arranjo de peptídeos derivados de proteínas celulares. Geralmente consistem de 9 aminoácidos, com uma seqüência específica, com resíduos de ancoragem na posição 2 (isoleucina ou leucina), posição 3 (prolina) e a posição carboxi-terminal 9 (leucina). O ensaio peptídeo–ligante indicou que 2 ou 3 resíduos de ancoragem são suficientes para a ligação, e que 3 ligantes naturais do HLA-G identificados ligaram-se tanto ao HLA-G quanto ao HLA-A2 (o que não surpreendeu, já que ambos são capazes de reconhecer resíduos de ancoragem nas posições 2 e 9). Por outro lado, somente alguns peptídeos ligantes do HLA-A2, não todos, puderam também se ligar ao HLA-G (PAUL et al., 2000).

As isoformas conhecidas de HLA-G são resultados de processamentos (cortes) alternativos (*splices*) no RNAm transcrito, resultando em pelo menos sete RNAm de HLA-G que codificam sete proteínas: 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 et al., 2001).

HLA-G1 codifica uma proteína que contém os domínios extracelulares  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$  ligados ao domínio transmembrana codificado pelo éxon 5 e uma cauda citoplasmática curta devido a presença de um códon de parada no éxon 6. Um processo alternativo que resultou nas isoformas HLA-G2, -G3, e -G4 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 (PAUL et al., 2000).

Os mecanismos que geram proteínas solúveis alternativas de HLA-G incluem o uso do íntron 4. A molécula solúvel de HLA-G5 contém domínios  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$  idênticos, mas adiciona as seqüências do íntron 4 produzindo uma fita aberta de leitura que inclui 21 aminoácidos ligados ao domínio  $\alpha_3$  e exclui o domínio transmembrana. Uma forma similar a HLA-G2, retendo o íntron 4, também foi descrita, sugerindo a presença de uma isoforma HLA-G6 truncada que perde o domínio  $\alpha_2$  da proteína (PAUL et al., 2000).

FIGURA 5 - ISOFORMAS DE HLA-G



Representação de várias isoformas HLA-G. A transcrição primária do gene sofre cortes alternativos gerando pelo menos quatro formas ligadas à membrana e três isoformas solúveis. HLA-G1 codificado pelo RNAm integral associado com  $\beta_2$ -microglobulina e tem estrutura similar aos HLA de classe Ia. A transcrição de HLA-G2, -G3 e -G4 exclui respectivamente o éxon 3, os éxons 3 e 4, ou éxon 4 gerando isoformas truncadas que retêm somente o domínio  $\alpha_1$  para HLA-G3, os domínios  $\alpha_1$  e  $\alpha_3$  para HLA-G2 e o domínio  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  para HLA-G4, adicionados da região transmembrana. Devido a um códon de parada no íntron 4, HLA-G5 e -G6 perde o domínio transmembrana formando as isoformas solúveis. Isso ocorre também para forma solúvel HLA-G7, devido a uma tradução de um sinal de terminalização no íntron 2 (BAINBRIDGE et al., 2001).

A forma solúvel HLA-G7 é uma variante descoberta mais recentemente em que o RNAm do HLA-G retém as seqüências do íntron 2, produzindo uma proteína HLA-G7 com 117 aminoácidos que contém apenas o domínio  $\alpha_1$  do HLA-G ligado a 2 aminoácidos no terminal carboxila especificamente codificado pelo íntron 2 (PAUL et al., 2000).

A expressão de HLA-G1 e HLA-G5 foi detectada em subpopulações de células citotrofoblásticas, em células tímicas, em células endoteliais de vasos sanguíneos coriônicos, em fluido amniótico e amniocoriônico, em tecidos tumorais, em oócitos e embrião em estágio pré-implantação, em linhagens de macrófagos ativadas e em monócitos do sangue periférico. O RNAm de HLA-G2, -G3 e -G4 foram detectados da

mesma forma que em células transfectadas. As formas solúveis foram detectadas em fluídos corporais, biópsias de tumores, e soro de pacientes. HLA-G7, especificamente, foi detectado no trofoblasto, placenta e tecidos amnióticos. HLA-G6 foi detectado em maiores níveis de expressão em tratamento de estresse, sugerindo que algumas isoformas solúveis possam ter uma ativação seletiva durante situações patológicas (PAUL et al., 2000).

Alguns experimentos permitiram concluir que HLA-G5 induziu uma resposta apoptótica em linfócitos T CD8+ ativados. A expressão fisiológica e funções de HLA-G2, -G3, -G4 ainda não foram totalmente caracterizadas (PAUL et al., 2000).

PARK et al. (2004) afirmam que formas solúveis de HLA-G1 podem ser obtidas pela ação de metaloproteinases, as quais causam uma clivagem proteolítica na cadeia pesada livre na superfície celular. A molécula de HLA-G1 solúvel é menor em aproximadamente 1-2 kDa que a molécula de HLA-G5. Neste mesmo estudo, foi demonstrado que moléculas solúveis de HLA-G são capazes de inibir a atividade lítica das células NK. A isoforma HLA-G1 solúvel gerada por processos proteolíticos poderia desempenhar um papel importante na modulação da resposta imune em determinadas condições fisiológicas. Ainda não se conhece a razão pela qual as células geram HLA-G solúvel por dois mecanismos distintos: por processamentos alternativos e por ação proteolítica, uma vez que as atividades da HLA-G1 solúvel e do HLA-G5 parecem ser redundantes. Possíveis explicações sugerem que a isoforma HLA-G1 possa ser gerada em situações patológicas em que ocorram mutações no gene HLA-G nos sítios de corte (*splice*). Em todo caso, acredita-se que HLA-G1 solúvel gerada por ação proteolítica seja uma medida alternativa em caso de impossibilidade da ocorrência de *splices*, como um controle de funções imunomodulatórias específicas. Alternativamente, HLA-G1 e HLA-G5 podem ser qualitativamente diferentes, ligando-se a variedades diferentes de peptídeos.

## 5.5 POLIMORFISMOS DE HLA-G.

Embora inicialmente acreditava-se que *HLA-G* não fosse polimórfico, um número expressivo de variações nucleotídicas já foram descritas ao longo de sua seqüência gênica. O relato do número de sítios polimórficos vem crescendo e diferenças no que se

refere à localização, natureza e frequência relativa de polimorfismos entre diferentes grupos étnicos são encontradas. Além disso observa-se que certas variações nucleotídicas são compartilhadas por todas as populações estudadas até o momento (OBER, 1998; VAN DER VEN; PFEIFFER; SKRABLIN, 2000; BAINBRIDGE et al., 2000).

A maioria das variações nucleotídicas descritas em *HLA-G* decorrem de mutações sinônimas e, logo, a composição de aminoácidos da proteína correspondente não se altera. Somente três polimorfismos não-sinônimos, todos localizados na região de ligação com o peptídeo, tem sítios úteis para diferenciar grupos étnicos. A primeira está localizada no códon 31 relacionado ao domínio  $\alpha_1$ , as outras, nos códons 110 e 130, relacionados ao domínio  $\alpha_2$ . Os polimorfismos nos códons 31 (thr  $\rightarrow$  ser) e 110 (leu  $\rightarrow$  ile), respectivamente, levam a uma substituição conservativa no que se refere a polaridade dos aminoácidos, não interferindo com a estrutura e função da molécula (VAN DER VEN; PFEIFFER; SKRABLIN, 2000).

O terceiro polimorfismo não-sinônimo resultado da deleção de uma única base no códon 130, chamada 1597delC. A presença dessa mutação leva à instabilidade da maior proteína variante de HLA-G, chamada HLA-G1. Como resultado dessa mutação perde-se uma ponte dissulfeto entre os resíduos 101 e 164, os quais estabilizam as moléculas HLA-G normais. Entretanto, variações alternativas das proteínas HLA-G, nas quais falta o domínio  $\alpha_2$  (ou este encontra-se não funcional), como por exemplo, a proteína G2, podem ainda ser detectadas mesmo nos indivíduos 1597delC homozigotos. A mutação 1597delC foi a primeira mutação nula (não se expressa na membrana celular) em *HLA-G* que ocorre independentemente em todos grupos étnicos. Além disso, o polimorfismo 1597delC ocorre em combinação com dois polimorfismos silenciosos comuns, nos códons 57 (éxon 2, codificando pro57A) e 93 (éxon 3, codificando his93T). O alelo *G\*0105N* (o qual carrega a mutação 1597delC, como já foi dito) está em desequilíbrio de ligação com *HLA-A30*. (VAN DER VEN; PFEIFFER; SKRABLIN, 2000).

Com base nos dois polimorfismos nos códons 31 e 110 e na mutação no códon 130, quatro grupos alélicos (*G\*0101*, *G\*0103*, *G\*0104*, *G\*0105N*) foram definidos e variações adicionais da seqüência de nucleotídeos dos alelos *G\*0101* e *G\*0104*



definem subtipos alélicos nesses grupos, respectivamente. As frequências dos diferentes alelos do HLA-G variam entre os grupos étnicos, por exemplo, o alelo G\*0105N, que é relativamente freqüente em afro-americanos (7.4 %) é menos freqüente em europeus do norte (0.6 %) (VAN DER VEN; PFEIFFER; SKRABLIN, 2000).

O grau de polimorfismo em *HLA-G* só é considerado baixo comparado às moléculas clássicas de HLA. O alelo G\*0105N codifica uma molécula instável de HLA-G1. Através do método de Elisa, estudou-se a presença de HLA-G1 instável em portadores do alelo G\*0105N. Verificou-se que os níveis de HLA-G1 solúvel no plasma são significativamente baixos em portadores heterozigotos para G\*0105N, enquanto portadores de G\*0104 tiveram significativamente altos níveis de HLA-G1 solúvel. O polimorfismo dos alelos *HLA-G* não explica os diferentes níveis observados da isoforma HLA-G1 no plasma. Entretanto a interferência de polimorfismos conhecidos (ou não) no gene *HLA-G* com a transcrição ou a tradução de *HLA-G* não pode ser excluída, uma vez que a definição de seus alelos é exclusivamente baseada na variação de nucleotídeos nos éxons 2 e 3, e os elementos regulatórios da transcrição de *HLA-G* não foram completamente definidos. Não há informações definitivas sobre as concentrações relativas das isoformas das proteínas HLA-G associadas aos diferentes alelos de *HLA-G*, mas a mudança relativa dos níveis das proteínas ligadas à membrana e solúveis de HLA-G1 pode ser uma explicação alternativa para o fenômeno. Homozigotos para G\*0105N possuem altíssimos níveis de HLA-G1, tanto aderido à membrana quanto na forma solúvel, enquanto que homozigotos para G\*01013 possuem um baixo nível de HLA-G1. Entretanto, ambos alelos possuem baixa freqüência em caucasianos, e em consequência homozigotos são raros. Em populações indígena-africanas, o alelo G\*0105N é encontrado em uma freqüência alta, mas em heterozigose. O alelo de maior freqüência em indígena-africanos é G\*01041 (VAN DER VEN; PFEIFFER; SKRABLIN, 2000; MATTE et al., 2000).

## 5.6 FILOGENIA

*HLA-G* é pouco polimórfico em humanos e o mesmo é observado em moléculas homólogas de primatas proximalmente relacionados (chimpanzés, gorilas e

orangotangos). Contudo, macacos africanos e asiáticos de médio porte (*Cercopithecinae*) apresentam alto polimorfismo e observa-se na proteína correspondente a ausência do domínio  $\alpha 2$ , resultado de um códon de parada no éxon 3. Já que todas isoformas descritas até o momento contêm o domínio  $\alpha 1$ , este deve ser suficiente para a atividade da molécula homóloga ao HLA-G. Já os primatas do Novo Mundo (“cotton-top tamarins”) exibem alto polimorfismo nos sítios ligantes do TCR e nos sítios de ligação com peptídeos. Portanto estes primatas mais antigos (38 milhões de anos atrás) mostram um alto polimorfismo em suas moléculas homólogas ao HLA-G enquanto os primatas mais recentes apresentam baixo polimorfismo e constantes deleções, as quais também foram detectadas em macacos de médio porte na Europa (CAROSELLA et al., 1999).

Em humanos, alguns alelos de *HLA-G* mostram uma forte e seletiva ligação com vários (mas não todos) alelos de *HLA-A*. Esta associação não-aleatória é devida a presença de uma região de alto polimorfismo entre os 2 genes, produzindo uma verdadeira variação na distância física entre os segmentos A-G presente em diferentes haplótipos. A associação mais comum encontrada entre em todas populações estudadas, *A\*2-G\*01011*, é provavelmente o mais antigo desequilíbrio da associação A/G presente no genoma humano que é compartilhado com outros primatas “não-humanos” em suas moléculas homólogas (ALVAREZ et al., 1999).

## 5.7 A AÇÃO DA MOLÉCULA DE HLA-G

A expressão de *HLA-G* inibe a citólise mediada pelas células NK e linfócitos T através de interações com receptores inibitórios. Essa ação foi primeiramente descrita em tecidos da placenta (no trofoblasto, onde a expressão dos antígenos de HLA-A e HLA-B é ausente e HLA-C expressa-se em níveis reduzidos) mas, posteriormente, também foi encontrada em melanomas, conferindo a habilidade de inibir a citólise pelas células NK *in vitro*, e em células epiteliais tímicas e monócitos do sangue periférico ativadas por interleucina-10 (IL-10) e interferon-gama (TNF- $\gamma$ ). Evidências de que HLA-G exibe funções de imunotolerância foram vistas em estudos feitos a partir de pacientes que sofreram transplantes cardíacos. Outras pesquisas afirmam ainda que a seqüência

líder de peptídeos de HLA-G pode ajudar na ativação de HLA-E (sugerindo que HLA-E possa ser expresso em certas células placentárias), o qual é capaz também de inibir a ação das células NK. Estuda-se a possibilidade de HLA-G ativar também HLA-F. (KIRSZENBAUM et al., 1996; PAUL et al., 1998; LAINER, 1998; LEIBSON, 1998; O'CALLAGHAN; BELL, 1998; RITEAU et al., 1999; LE BOUTEILLER; BLASCHITZ, 1999; SASAKI et al., 1999; LILA et al., 2000).

HLA-G tem sido muito estudado devido ao seu papel nas relações feto-maternais. Análises de microensaios de DNA sugeriram que HLA-G é capaz de modular a expressão gênica de leucócitos mononucleares no sangue, confirmando a hipótese de que a molécula HLA-G solúvel na interface feto-maternal atua sobre linhagens de monócitos e macrófagos favorecendo a gestação (HUNT, 2000). A expressão de *HLA-G* no trofoblasto também permite a migração dos monócitos e macrófagos na circulação materna e infiltração nos seus tecidos, gerando um estado de tolerância (CAROSELLA, 2000). Estudos sobre expressão de *HLA-G* em outros tecidos e a relevância dessa expressão estão sendo feitos a fim de verificar a ação da molécula HLA-G em tumores, transplantes e outras possíveis aplicações.

CRISA et al., em 1996, estudaram a expressão de *HLA-G* nas células epiteliais tímicas. A expressão ocorre na superfície do epitélio medular e subcapsular. Linhagens de células epiteliais tímicas foram geradas e demonstraram expressar três tipos alternativos de HLA-G transcritos, identificados previamente nas células trofoblásticas humanas. Seqüenciando o HLA-G1 transcrito, revelou-se pequenas mudanças nucleotídicas resultando em substituições de aminoácidos, todas compactadas no interior do éxon 3 de *HLA-G*, codificando o domínio  $\alpha 2$  da molécula. O estudo de Crisa levanta a possibilidade de que a não responsividade maternal para os tecidos fetais expressando HLA-G possa ser gerada no timo por uma prévia apresentação a este MHC no epitélio medular.

Em vários dos experimentos feitos sobre a expressão de *HLA-G*, foram utilizadas linhagens de células HLA classe I negativas, as quais eram submetidas à ação de transfectantes de HLA-G, porém RITEAU et al. (2001) fizeram experimentos para detectar a expressão das isoformas de HLA-G (no caso, a G1, G2, G3 e G4, que são as isoformas de membrana) em células HLA classe I positivas, submetida à ação de transfectantes de HLA-G e depois foram analisadas a presença das isoformas através

de anticorpos monoclonais específicos para as mesmas. Detectou-se que todas as células transfectadas sintetizaram as isoformas de HLA-G como proteínas, mas somente HLA-G1 foi detectado na membrana das mesmas, sendo que as outras isoformas foram precipitadas em reações com anticorpos monoclonais. Confirmou-se então que *HLA-G* (G1) pode expressar-se juntamente com os outros *HLAs* de classe I nas células. Esse experimento, se constitui numa abordagem útil para um estudo das relações entre as moléculas de HLA de classe I, e para estudo das funções das outras isoformas do HLA-G.

MATSUNAMI et al. (2001) estudaram a ação inibitória das isoformas HLA-G1 e -G3 em células endoteliais de suínos transfectadas com estas isoformas. Nesse estudo, verificou que HLA-G1 inibiu a ação lítica de células NK humanas sobre estas células, ao contrário de HLA-G3, que não se expressou. Entretanto, evidências indiretas demonstraram que a transfecção de HLA-G3 resultou na expressão de *HLA-E*, e quando transfectado na linhagem de células humanas 721.221, o resultado foi o mesmo.

Em experimentos feitos por RITEAU et al. (1999) para determinar o papel do HLA-G na inibição na proliferação alogênica dos linfócitos T, foram usadas células da linhagem K562 (células HLA classe I e II negativas da eritroleucemia humana), acrescidas de moléculas HLA-G. O efeito inibitório em reações mixtas de linfócitos (MLR do inglês *mixed lymphocyte reaction*), que é dependente do número de células HLA-G positivas demonstra que o HLA-G pode, por ele mesmo, inibir a aloproliferação de linfócitos T. Essa inibição ocorre via interação com receptores inibitórios presentes nas células T, como o p49 (que é composto por dois domínios semelhantes aos das imunoglobulinas), ILT-2 (presente também em alguns tipos de células NK e em todos monócitos e células B) e ITL-4 (presente também em todos monócitos, macrófagos e células dendríticas, sugerindo que HLA-G interaja em ambas respostas imunes, inata e adquirida). Estudos feitos por O'CALLAGHAN e BELL em 1998, evidenciam que o maior efeito de HLA-G sobre as células NK ocorra através do receptor CD94/NKG2 (que já foi observado por STEFFENSEN et al., em 1998, por ser o receptor por onde HLA-E interage também com as células NK). Foi demonstrado por Cantoni que o receptor p49 em células NK é capaz de se ligar a células transfectadas com HLA-G1 e HLA-A3, mas não com HLA-A2, e usando um anticorpo monoclonal anti-HLA de classe

I (W6/32), inibiu-se essa ligação, confirmando essa especificidade. Já foi observado também, por ALLAN et al. (2002), que os receptores ILT-2 e ILT-4 não interagem somente com HLA-G, mas também com HLA-F e outras moléculas de classe I. (COLONNA et al., 1998; LANIER, 1998; O'CALLAGHAN e BELL, 1998; STEFFENSEN et al., 1998; RITEAU et al., 1999; CANTONI et al., 1999; CAROSELLA et al., 1999; ALLAN et al., 2002).

LILA et al., em um estudo feito em 2002, concluíram que o HLA-G solúvel, in vitro, foi capaz de induzir a apoptose de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (citotóxicos) e inibir a proliferação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (auxiliares ou helpers), além de modular as células NK e induzir a liberação de citocinas Th2. BAINBRIDGE et al. em 2000, também obtiveram esse mesmo resultado, observando através da ação das formas de membrana da proteína HLA-G, a inibição da secreção de citocinas e da proliferação de monócitos do sangue periférico.

WIENDL et al. (2003) baseados em seus resultados concluíram que HLA-G1; assim como HLA-G5, inibia a resposta aloproliferativa primária, mas não causava uma resposta apoptótica em células T e monócitos, diferentemente dos outros estudos feitos que relatavam a ação de HLA-G na resposta apoptótica, nos quais os monócitos do sangue periférico já estariam pré-estimulados antes do encontro com moléculas HLA. Utilizando-se células não estimuladas, a molécula HLA-G apenas induziria a uma parada do ciclo celular (o efeito apoptótico da molécula HLA fortemente relacionado com a duração do estímulo prévio).

No estudo de LE FRIEC et al. (2003), HLA-G5 não foi capaz de induzir apoptose em monócitos ou células dendríticas humanas, além de não afetar na maturação e desenvolvimento de monócitos e de células precursoras hematopoiéticas CD34<sup>+</sup> (de onde derivam as células dendríticas). Entretanto, a exposição de células dendríticas ao HLA-G5 afetou a proliferação alogênica de células T, demonstrando a ação da molécula HLA-G sobre o sistema imune.

ALLAN et al. (2002) trabalharam com complexos tetraméricos de HLA-G, -E e -F e observaram que, ao contrário de HLA-E, os tetrâmeros de HLA-G não se ligam significativamente a linfócitos CD56<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> ou CD19<sup>+</sup>, porém, ligam-se a monócitos CD14<sup>+</sup>, especialmente a um subgrupo que expressava CD16. Tetrâmeros de HLA-G também falharam em apresentar ligação com transfectantes expressando KIRs

(receptores inibitórios das células NK) ou receptores CD94/NKG2A. Entretanto, como outros trabalhos já sugeriram que HLA-G afeta a citotoxicidade das células NK via receptores CD94/NKG2A, é quase certo que essa interação ocorra via o estímulo da expressão do HLA-E na superfície celular. LANIER, em 1998, também já havia afirmado que a maior interação entre células NK e HLA de classe I era via HLA-E. Porém, YAN e FAN, em 2003, afirmam que HLA-G é um ligante natural de KIR2DL4 (o qual é expresso pelas células NK uterinas), e demonstraram em seu estudo que as porções Met<sup>76</sup> e Gln<sup>79</sup> do domínio HLA-G $\alpha$ 1 são responsáveis por esta ligação. Este resultado pode explicar como a isoforma HLA-G3, a qual contém somente o domínio  $\alpha$ 1, pode regular as funções das células NK.

MOREAU et al. (1998) investigaram a atuação da interleucina-10 (IL-10) sobre a expressão de HLA-G em células trofoblásticas e monócitos do sangue periférico. A IL-10 é secretada por diferentes tipos celulares, tais como células placentárias, linfócitos T e B ativados e queratinócitos irradiados por luz ultravioleta. Possui ação antiinflamatória e imunossupressora, inibindo a expressão de moléculas clássicas HLA de classe I e II em melanomas receptor-positivos para IL-10, inibindo também a resposta proliferativa antígeno-específica de macrófagos apresentadores de antígeno e de células T CD4<sup>+</sup>. Induz resposta estimulatória ou inibitória em células T CD8<sup>+</sup>, dependendo do estado de ativação das mesmas, e tem um efeito estimulatório em mastócitos e células B. A síntese de diversas citocinas tipo Th1, como o Fator de Necrose Tumoral (TNF)- $\alpha$  e IL-2, em células T, é inibida pela IL-10. Já foi demonstrado, previamente em outros estudos, que a IL-10 inibe a síntese de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1, IL-6, LT- $\alpha$  (antes conhecido como TNF- $\beta$ ) em macrófagos ativados. Ela também promove o desenvolvimento de citocinas Th2, por inibir a produção de interferon (IFN)- $\gamma$ , em células T e NK, e por suprimir a produção de IL-12 por monócitos/macrófagos e células dendríticas.

O experimento de Moreau mostrou que a IL-10 induziu a expressão de *HLA-G* em monócitos do sangue periférico, sugerindo que possa atuar tanto em reações antiinflamatórias quanto de imunotolerância. Tal fato gera controvérsias pois neste experimento Moreau utilizou monócitos não purificados diferentemente de AMIOT et al., em 1998, que utilizando monócitos purificados não detectaram a influência da IL-10, e

nem do IFN- $\gamma$  na expressão de HLA-G. Moreau questiona se essa não indução da expressão de *HLA-G* pela IL-10 e pelo IFN- $\gamma$  não foi consequência do processo de purificação dos monócitos ou pelas condições da cultura de monócitos. O estado fisiológico e o microambiente dos monócitos podem também afetar sua resposta às citocinas. Esses diferentes aspectos podem, em parte, explicar discrepâncias relatadas da expressão de HLA-G em ambas culturas tratadas e não-tratadas com IFN- $\gamma$ . Neste experimento, levantou-se a possibilidade do HLA-G atuar em processos inflamatórios, além de processos de imunotolerância, juntamente com a IL-10. (MOREAU et al., 1999). Posteriormente, WIENDL et al. (2000) demonstraram que *HLA-G* expressou-se em fibras musculares, durante várias miopatias inflamatórias. Neste estudo, observou-se que o IFN- $\gamma$  estimulou tanto a transcrição do RNAm quanto à expressão na superfície celular da proteína HLA-G, em suas diferentes isoformas. Os resultados do experimento permitiram concluir que HLA-G deve ter um papel importante durante miopatias inflamatórias e outras reações imunes locais, como ocorre em vacinações, transplantes mioblásticos e terapias gênicas.

O estudo de YANG et al. (1996) também havia detectado a indução da expressão do HLA-G, tanto intra quanto extracelularmente, pelo IFN- $\gamma$ , em células do estroma semelhantes a macrófagos. Percebeu-se que a proporção de HLA-G em relação aos HLA-B e HLA-C também aumentou, efeito esse não percebido quando as células foram tratadas com IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  (os quais são fracos indutores do HLA-G).

E, ainda sobre a indução do HLA-G por IL-10, KHOSROTEHRANI et al. (2001) demonstraram que HLA-G expressava-se em infiltrados de células T e, em menor extensão e menos freqüentemente, em monócitos-macrófagos ou mesmo células de Langerhans, durante o processo lesivo causado durante a evolução da doença crônica conhecida como dermatite atópica. Posteriormente demonstraram que IL-10 é produzido em excesso durante este processo, sugerindo relação entre ambos, assim como Moreau havia afirmado. Recentemente, FAINARDI et al. (2003) estudaram os níveis da expressão de HLA-G no fluido cérebro-espinal de pacientes com esclerose múltipla e sua relação com os níveis de moléculas HLA classe I e de IL-10. Neste estudo, percebeu-se uma correlação inversa entre os níveis de HLA-G e de HLA de classe I, mas não entre HLA de classe I e IL-10. Devido à metodologia empregada, a

qual possuía sensibilidade limitada e, por isso, houve redução na capacidade de detecção de HLA-G, permaneceu em aberto a possibilidade de relação entre HLA-G e IL-10. Em termos estatísticos, não foi possível estabelecer relação entre os níveis de HLA-G, HLA classe I e IL-10 e ainda com a gravidade e duração da doença.

## 5.8 HLA-G EM TRANSPLANTES

LILA et al. (2000) estudaram 31 pacientes (25 homens e 6 mulheres com uma média etária de 53-4 anos) que fizeram transplantes cardíacos entre 1987 e 1998, no hospital Broussais, em Paris, França. Estes pacientes foram divididos em 3 grupos baseados no tempo decorrido após o transplante (de 1 a 5 anos no grupo I, de 6 a 10 anos, no II e de 11 a 15 anos, no III), sendo que estes grupos tinham 10, 9 e 12 pacientes, respectivamente. A avaliação da expressão do HLA-G foi realizada através de biópsias do endomiocárdio e através do soro, correlacionando-se com os dados clínicos. Houve casos de rejeição pós-operatória no primeiro ano (rejeição aguda) e depois de um ano foram avaliados os casos de rejeição crônica por uma avaliação angiográfica sistemática das artérias coronárias, feita anualmente em cada paciente.

Para a avaliação da expressão de HLA-G, foram utilizados anticorpos monoclonais como o 87-G (detecta HLA-G1 e -G5), 4H84 (reconhece as formas desnaturadas de HLA-G), W6/32 (detecta todas as formas de HLA de classe I) e IgG2 como controle isotípico de anticorpos. Em 5 pacientes (2 do grupo I e 2 do grupo II e 1 do grupo III), a expressão nas biópsias do miocárdio foi detectada. Desses 5, houve 3 (dos grupos I e II) que reagiram positivamente com 87-G e 4H84 e HLA-G5 solúvel foi detectado no soro. Os 2 pacientes restantes (do grupo II) foram positivos somente ao 4H84, mas HLA-G6 solúvel foi detectado nos seus soros. Em pacientes HLA-G positivos, o número de rejeições agudas foi menor que em HLA-G negativos. Além disso, não houve rejeição crônica em pacientes HLA-G positivos. Fatores ambientais específicos ou liberação local ou sistêmica de citocinas, como a IL-10, depois do transplante cardíaco, ou tratamento imunossupressor intensivo pode ser associado com a indução da expressão de *HLA-G*. Conseqüentemente, a expressão de *HLA-G* pode contribuir para a aceitação do enxerto, por inibição da lise mediada por células NK e



linfócitos T citotóxicos, assim como por supressão da resposta proliferativa alogênica (LILA et al.,2000).

Esses resultados preliminares obtidos suportam a hipótese que o *HLA-G* pode ser ativado durante o processo de transplante, reduzindo a resposta imune e promovendo a tolerância do aloenxerto controlando a rejeição aguda e crônica (LILA et al.,2000).

CREPUT et al. (2003) em seu estudo detectaram uma alta concentração de *HLA-G* no soro de pacientes que sofreram transplante combinado hepático-renal, mas não em pacientes transplantados renais somente. Estudos com número reduzido de pacientes permitiram sugerir que a rejeição renal aguda foi menor em pacientes transplantados hepático-renais quando comparada com pacientes transplantados renais. Entretanto, KATZENELSON e CECKA, e (1996), afirmaram que o fígado não “protegeria” o rim em transplantes combinados, indicando que a frequência de rejeição aguda em pacientes transplantados hepático-renais e em transplantados renais foi semelhante, porém, neste estudo, não é considerada a condição imunológica prévia dos pacientes, o que poderia afetar a aceitação do(s) enxerto(s). Vários mecanismos poderiam estar envolvidos na tolerância em transplantes hepático-renais. Estes incluem a expansão de células T inibitórias (*HLA-G* positivas), induzida por microquimerismo, devida à presença de células do doador presentes no fígado enxertado e também à resposta imune polarizada de Th2 induzida por precursores hematopoiéticos presentes no enxerto hepático. Entretanto, não foi observada a expansão de células T inibitórias no sangue periférico dos pacientes hepático-renais. A redução da rejeição aguda pode também ser devida à produção e secreção na circulação sistêmica de antígenos de classe I pelo fígado transplantado, porque estes antígenos podem neutralizar aloanticorpos e/ou linfócitos T citotóxicos, ou pode ser devida à secreção de fatores imunomoduladores pelo enxerto hepático.

Em pacientes transplantados renais, *HLA-G* é raramente expresso, enquanto em pacientes hepático-renais, *HLA-G1* já foi detectado na membrana dos hepatócitos e nas células tubulares renais. No estudo de Creput, a fração solúvel detectada no soro dos pacientes corresponderia às moléculas expressas pela superfície celular. Alternativamente, algumas células poderiam produzir *HLA-G5*. A expressão do *HLA-G* já foi detectada em biópsias do enxerto e no soro de pacientes transplantados

cardíacos ou hepático-renais. Neste estudo, HLA-G não foi detectado em amostras renais e hepáticas normais. Entretanto, em pacientes transplantados hepáticos-renais, *HLA-G* expressa-se em algumas células tubulares, o que não foi observado em células glomerulares nas biópsias renais. HLA-G também foi detectado em algumas células epiteliais biliares, mas não em hepatócitos nas biópsias hepáticas. A expressão de *HLA-G* pelas células epiteliais biliares foi correlacionada com a ausência de rejeição hepática neste estudo. Os dados sugerem uma inibição não *in situ*, através da expressão das formas de membrana ao invés da secreção de formas solúveis pelas células epiteliais. Outra hipótese é que HLA-G possa ser produzido por células hematopoiéticas uma vez que HLA-G solúvel pode ser produzido por monócitos e por linfócitos T CD4 e CD8, ambos *in vitro* e em MLR.

HLA-G também está sendo estudado no transplante de córnea. LE DISCORDE et al. (2003) estudaram córneas de doadores (a porção periférica da córnea, a qual não é enxertada) e de pacientes com doenças corneanas (ceratopatia bolhosa, uma condição inflamatória da córnea, e ceratocone, uma doença degenerativa). A córnea já era conhecida por ser um tecido imune-privilegiado, e neste estudo, demonstrou-se, por RT-PCR, que ela expressa HLA-G (HLA-G1 ao -G4 e o solúvel -G5), e que esta expressão é aparentemente inalterada em ambas córneas afetadas por ambas doenças. O papel da molécula HLA-G neste tecido ainda não está esclarecido, mas suas implicações em desordens oculares não podem ser excluídas, uma vez que a distribuição dos polimorfismos de HLA-G já foi correlacionada com tantas patologias como, por exemplo, a pré-eclampsia.

Outras pesquisas feitas por SASAKI et al. (1999), feitas através de experimentos com células endoteliais de porcos e células tumorais humanas, permitiram que os autores concluíssem que a expressão de HLA-G é suficiente para proteger xenoenxertos da lise pelas células NK. FORTE et al. em 2001, afirmaram com base nos resultados de seu experimento, que HLA-G reduz a rolagem de adesão de células NK humanas ativadas em células endoteliais de porcos. A expressão de HLA-G tanto nas células endoteliais microvasculares quanto aórticas do porco promove uma proteção somente parcial quanto a citotoxicidade por linhagens policlonais de células NK humanas, portanto, sozinho, HLA-G não é capaz de sobrepujar a rejeição do xenoenxerto, a menos que este seja combinado com outros recursos.

WIENDL et al. (2003) fizeram novas pesquisas, com base nos resultados obtidos em seu trabalho prévio em 2000 (nos quais observou-se que HLA-G era expresso em fibras musculares durante miopatias inflamatórias e em cultura de mioblastos), utilizando anticorpos diversos (87-G, 4H84, W6-32, entre outros), linhagens de culturas de células como a K562 (células da eritroleucemia humana), JEG-3 (células da coriocarcinoma humano) e TE671 (células do rhabdomyosarcoma humano), HLA-G transfectantes, como K562-HLA-G1(usado como controle positivo), TE671-pEGFP, TE671-HLA-G1 e TE671-HLA-G5 (pois a linhagem de células TE671 não expressa quantidades significantes de HLA-G) , além de populações de linfócitos purificados e monócitos do sangue periférico. O experimento demonstrou que HLA-G expresso nas células musculares confere imunoproteção não somente por inibição das células NK, mas também por interação direta com as células T CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>. Além disso, o HLA-G expresso nas células musculares previne eficientemente a citotoxicidade antígeno-específica das células T e reduz a lise antígeno específica. Nesse estudo fica evidente que o importante papel imuno-regulatório da proteína HLA-G co-expressa na presença de MHC de classe I e II. As observações feitas defendem a hipótese de que HLA-G é capaz de modular as respostas citotóxicas, tanto antígeno-específicas quanto as antígeno-inespecíficas, das células T durante as respostas imunes primária e secundária. (WIENDL et al., 2000; WIENDL et al., 2003)

## 5.9 HLA-G EM TUMORES

Como já foi dito, a expressão da proteína HLA-G foi observada em algumas linhagens de melanomas humanos, além de carcinomas renais, de mama e na língua, linfomas cutâneos e gliomas, conferindo a habilidade de inibir a citólise das células NK *in vitro*. Tanto a expressão constitutiva de HLA-G quanto a induzida por interferon foi detectada em alguns tipos de melanoma humano e linhagens de células de gliomas. Vários níveis de RNAm transcrito de HLA-G associados com a perda da expressão da proteína de HLA-G foram observados no cólon, pâncreas, mamas e carcinomas na bexiga, assim como em melanomas e tumores na linhagem de células hematopoiéticas (CAROSELLA et al., 1999; LE FRIEC et al., 2003).

Contribuições importantes foram feitas observando-se a expressão de *HLA-G* *in vivo*; altos níveis de transcrição de *HLA-G* e de suas proteínas foram detectados em biópsias obtidas dos melanomas primário e metastático. Além disso, uma regulação diferencial da transcrição das isoformas solúveis de *HLA-G* foi observada, assim como uma queda no nível de regulação da transcrição quando o tumor regrediu; A proteína *HLA-G* foi detectada em macrófagos e células dendríticas infiltrados no carcinoma pulmonar (CAROSELLA et al., 1999).

Resultados de vários estudos permitem sugerir que a expressão de *HLA-G* em tumores é altamente dependente de ativação estimulada pelo microambiente do tumor. AMIOT afirmou que *HLA-G* não é expresso nos leucócitos do sangue periférico, nem em células hematopoiéticas malignas (leucemias) em condições fisiológicas normais e nem em culturas de células hematopoiéticas em condições normais. Só houve expressão em linhagens de células u937 (células leucêmicas) tratadas com IFN- $\gamma$  (o mesmo fato foi constatado por REAL et al. em 1999). Vários artigos enfatizam a capacidade dos interferons, GM-CSF, IL-2 e IL-10 de aumentar a expressão da proteína *HLA-G*. MOREAU et al. confirmam essa afirmação, concluindo que a IL-10 além de induzir a expressão de *HLA-G* em melanomas, inibe a expressão de moléculas *HLA* clássicas de classe I e II e a produção de citocinas como o TNF- $\alpha$ . Alternativamente, conclusões que relatam que as linhagens de células tumorais perdem a expressão da proteína do *HLA-G1* poderiam ser decorrentes de falhas na detecção das outras isoformas que possam desempenhar papéis na inibição da função das células NK (como, por exemplo, as isoformas solúveis). Outra isoforma de *HLA-G*, talvez o *HLA-G3*, mostrou ser capaz de inibir a citólise das células NK. PAUL et al. (1998) afirmaram que *HLA-G2*, assim como *HLA-G1*, é capaz de inibir a citólise pelas células NK em melanomas (AMIOT et al., 1998; PAUL et al., 1998; CAROSELLA et al., 1999; MOREAU et al., 1999; REAL et al., 1999).

O mecanismo exato de ativação da expressão de *HLA-G* em células de melanomas não é bem conhecido ainda. PAUL et al. (2000) sugeriram que talvez a ativação de genes nas células tumorais como o *MAGE-1*, pode estar correlacionado ao mecanismo de demetilação que afeta vários promotores e poderia levar a uma desregulação da expressão de *HLA-G*. Algumas observações controversas indicam uma possível dependência de influências endócrinas pelo melanoma humano. A

presença de receptores para o estrógeno nas células do melanoma e o uso de um “anti-estrógeno” no tratamento de melanomas foram reportados, mas apenas uma pequena porcentagem respondeu ao tratamento. Considerando-se que foi observado uma velocidade de metástase maior em mulheres grávidas, pôde-se sugerir que alterações hormonais podem alterar a capacidade de metástase do melanoma, e conseqüentemente, a expressão de *HLA-G* poderia ser induzida nas células tumorais por hormônios, favorecendo a formação de clones metastáticos malignos (PAUL et al., 1998).

ARACTINGI et al. (2003), perceberam que *HLA-G* era detectado em pacientes de tecidos transplantados, principalmente naqueles com poucos episódios de rejeição. Uma vez que carcinomas desenvolvem-se freqüentemente em pacientes com órgãos transplantados, pesquisou-se se haveria relação entre este fato e *HLA-G*. Foram analisados pacientes transplantados renais os quais apresentaram diversos tipos de tumores epiteliais malignos e lesões cutâneas benignas, utilizando-se anticorpos anti-*HLA-G* específicos. Foi demonstrado que *HLA-G* não foi expresso nas lesões benignas, estando restrito aos sítios malignos. *HLA-G* expressou-se em queratinócitos, infiltrados inflamatórios e mesmo em células epiteliais. Citocinas liberadas devido ao transplante de órgão, como a IL-10, poderiam induzir a expressão de *HLA-G*, o qual beneficiaria o desenvolvimento tumoral em pacientes transplantados. LE FRIEC et al., também em 2003, percebeu a alta expressão de *HLA-G* em tumores, mais especificamente de *HLA-G5*, após transplantes cardíacos. Outro trabalho recente, de 2003, feito por BUKUR et al., através da análise por RT-PCR (PCR por transcriptase reversa), com *primers* específicos para *HLA-G*, detectou a expressão de *HLA-G* em uma série grande de lesões e/ou linhagens de células de carcinomas renais, mas não em células epiteliais renais normais (ao contrário de *HLA-E* e *HLA-F* que aparecem tanto em células carcinômicas quanto em normais). *HLA-G4* não foi detectado nas linhagens de células carcinômicas renais, mas foi demonstrou-se a secreção de *HLA-G5* por estas células, enquanto baixos níveis foram detectados nas lesões carcinômicas.

## 6 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Embora muito estudado, a proteína HLA-G ainda gera muitas dúvidas sobre seu modo de ação sobre as células do sistema imune. Além disso, não foi determinada a função de algumas isoformas. Ainda que existam resultados contrastantes e divergências entre os resultados de alguns pesquisadores, é aceito que HLA-G, sem sombra de dúvida, funciona como uma barreira imunológica, auxiliando na tolerância feto-maternal e na aceitação de aloenxertos nos tecidos onde ele é mais amplamente difundido. Ainda não se sabe ao certo se esta tolerância se deve somente ao HLA-G ou à sua atuação em conjunto com outras moléculas como HLA-C e HLA-E, por exemplo, além de outras ainda não identificadas.

De qualquer modo, HLA-G oferece uma gama imensa de possibilidades. O conhecimento de sua ação imunomodulatória poderá permitir o delineamento de estratégias terapêuticas que possam ser utilizadas no tratamento de diferentes condições tais como distúrbios gestacionais e episódios de rejeição do aloenxerto.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Disponível em: [http://www.anthonynolan.org.uk/HIG/lists/class1\\_list.html](http://www.anthonynolan.org.uk/HIG/lists/class1_list.html). Acesso em fevereiro de 2004.

Disponível em: [http://nejm.org/teaching\\_tools/jpegs\\_large/klei.fig1.jpg](http://nejm.org/teaching_tools/jpegs_large/klei.fig1.jpg). Acesso em fevereiro de 2004.

ALLAN, D.S.J.; LEPIN, E.J.M.; BRAUD, V.M.; O'CALLAGHAN, C.A.; MCMICHAEL, A.J. Tetrameric complexes of HLA-E, HLA-F, and HLA-G. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 268, n. 1, p. 43-50, 2002.

ALVAREZ, M.; SANTOS, P.; MARTINHO, A.; SIMÕES, O.; ABADE, A.; BRÊDA-COIMBRA, H. HLA-G Genetic polymorphism in 57 Portuguese White families studied by PCR-RFLP and PCR-SSOP. **Transplantation Proceedings**, New York, v. 31, p. 1829-1831, 1999.

AMIOT, L.; ONNO, M.; DRÉNOU, B.; MONVOISIN, C.; FAUCHET, R. HLA-G class I gene expression in normal and malignant hematopoietic cells. **Human Immunology**, New York, v. 59, p. 524-528, 1998.

ARACTINGI, S.; KANITAKIS, J.; EUVRARD, S.; LE DANFF, C.; CAROSELLA, E.D. Selective expression of HLA-G in malignant and premalignant skin specimens in kidney transplant recipients. **International Journal of Cancer**, New York, v. 106, n. 2, p. 232-235, 2003.

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

BAINBRIDGE, D.R.; ELLIS, S.A.; SARGENT, I.L.; The short forms of HLA-G are unlikely to play a role in pregnancy because they are not expressed at the cell surface. **Journal of Reproductive Immunology**, Shannon, v. 47, n. 1, p. 1-16, 2000.

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

BLASCHITZ, A.; LENFANT, F.; MALLETT, V.; HARTMANN, M.; BENSUSSAN, A.; GERAGHTY, D.E.; LE BOUTEILLER, P.; DOHR, G. Endothelial cells in chorionic fetal vessels of first trimester placenta express HLA-G. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 27, p. 3380, 1997.

BRAUD, V.; JONES, E.Y.; MCMICHAEL, A.J. The human major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E binds signal sequence derived peptides with primary anchor residues at positions 2 and 9, **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 27, p. 1164-1169, 1997.

BUKUR, J.; MALENICA, B.; HUBER, C.; SELIGER, B. Altered expression of nonclassical HLA class Ib antigens in human renal cell carcinomas and its association with impaired immune response, **Human Immunology**, New York, v. 64, n.11, p. 1081-1092, 2003.

CANTONI, C.; FALCO, M.; PESSINO, A.; MORETTA, A.; MORETTA, L.; BIASSONI, R. p49 a novel putative HLA-class I-specific inhibitory NK receptor belonging to the immunoglobulin superfamily. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 28, p. 1980-1990, 1999.

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.

CAROSSELA, E.D. HLA-G: fetomaternal tolerance. **Comptes Rendus de l'Academie des Sciences. Serie III, Sciences de la vie**, Paris, v. 323, n. 8, p. 675-680, 2000.

CHRISTIANSEN, O.B.; MATHIENSES, O.; HUSTH, M.; LAURITSEN, J.G.; JERSIL, C.; GRUNNET, N. Prognostic significance of maternal DR histocompatibility type danish women with recurrent miscarriages. **Human Reproduction**, Oxford, UK, v. 8, n. 11, p. 1843-1847, 1993.

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.

COLONNA, M.; SAMARIDIS, J.; CELLA, M.; ANGMAN, L.; ALLEN, R.; O'CALLAGHAN, C.; DUNBAR, R.; OGG, G.; CERUNDOLO, V.; ROLINK, A. A common inhibitory receptors for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 160, p. 3096-3100, 1998.

CREPUT, C.; LE FRIEC, G.; BAHRI, R.; AMIOT, L.; CHARPENTIER, B.; CAROSELLA, E.D.; ROUAS-FREISS, N.; DURRBACH, A. Detection of HLA-G in serum and graft biopsy associated with fewer acute rejections following combined liver-kidney transplantation: possible implications for monitoring patients, **Human Immunology**, New York, v. 61, n. 11, p. 1033-1038, 2003.

CRISA, L.; MCMASTER, M.T.; ISHII, J.K.; FISHER, S. J.; SALOMON D.R. Identification of a thymic epithelial cell subset sharing expression of the class Ib HLA-G molecule with fetal trophoblasts, **Journal of Experimental Medicine**, Bethesda, v. 186, n. 2, p. 289, 1997.

CROUAU-ROY, B.; AMADOU, C.; BOUISSOU, C.; CLAYTON, J.; VERENET, C.; RIBOUCHON, M.T.; PONTAROTTI, P. Localization of the OTF3 Gene within the human



MHC class I region by physical and meiotic mapping. **Genomics**, San Diego, n. 21, p. 241-243, 1994.

DIEHL, M.; MÜNZ, C.; KEIHOLZ, W.; STEVANOVIC, S.; HOLMES, N.; LOKE, Y.W.; RAMMENSEE, H-G. Nonclassical HLA-G molecules are classical peptide presenters. **Current Biology**, Cambridge, v. 6, n. 3, p. 305-314, 1996.

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.

ELLIS, S.A.; SARGENT, I.L.; REDMAN, C.W.; MCMICHAEL, A.J. Evidence for a novel HLA antigen found on human extravillous trophoblast and a choriocarcinoma cell line. **Immunology**, Oxford, v. 59, p. 595-601, 1986.

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.

FORTE, P.; PAZMANY, L.; MATTER-REISSMANN, U.B.; STUSSI, G.; SCHNEIDER, M.K.J.; SEEBACH, J.D. HLA-G inhibits rolling adhesion of activated human NK cells on porcine endothelial cells. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 167, p. 6002-6008, 2001.

GERAGHTY, D.E.; KOLLER, B.H.; ORR, H.T. A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 84, p. 9145, 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.

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.

HVIID, T.V.F.; MOLLER, C.; SORENSEN, S.; MORLING, N. Co-dominant expression of HLA-G gene and various forms of alternatively spliced HLA-G mRNA in human first trimester trophoblast, **Human Immunology**, New York, v. 59, p. 87-98, 1998.

KATZNELSON, S.; CECKA, J.M. The liver neither protects the kidney from rejection nor improves kidney graft survival after combined liver and kidney transplantation from the same donor. **Transplantation**, Baltimore, v. 61, p. 1403-1405, 1996.

KHALIL-DAHER, I.; ROUASS-FREISS, N.; CAROSELLA, E.D.; DAUSSET, J. Human leukocyte antigen-G: immunotolerant major histocompatibility complex molecule in transplantation. **World Journal of Surgeon**, New York, v. 24, n.7, p. 819-822, 2000.

KHOSROTEHRANI, K.; LE DANFF, C.; REYNAUD-MENDEL, B.; DUBERTRET, L.; CAROSELLA, E.D.; ARACTINGI, S. HLA-G expression in atopic dermatitis, **Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 117, n. 3, p. 750, 2001.

KIRSZENBAUM, M.; DJOULAH, S.; HORS, J.; LE GALL, I.; OLIVEIRA, E.B.; PROST, S.; DAUSSER, J.; CAROSELLA, E.D. HLA-G gene polymorphism segregation within CEPH reference families. **Human Immunology**, New York, v. 53, p. 140-147, 1997.

KIRSZENBAUM, M.; DJOULAH, S.; HORS, J.; PROST, S.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D. Polymorphism of HLA-G gene and protein. **Journal of Reproductive Immunology**, Shannon, v. 43, n.2, p. 105-109, 1999.

KIRSZENBAUM, M.; MOREAU, P.; GLUCKMAN, E.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D. Na alternatively spliced form of HLA-G mRNA in human trophoblasts and evidence for the presence of HLA-g transcript in adult lymphocytes. **Proceeds of National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 91, p. 4209-4213, 1994.

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.

LANIER, L.L. Follow the leader: NK cell receptors for classical and nonclassical MHC class I. **Cell**, Cambridge, v. 92, p. 705-707, 1998.

LE BOUTEILLER, P.; BLASCHITZ, A. The functionality of HLA-G is emerging. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 167, p. 233-244, 1999.

LE DISCORDE, M.; MOREAU, P.; ROUAS-FREISS, N.; CAROSELLA, E. HLA-G: Immunotolérance em physiologie normale et pathologique. **Pathologie Biologie**, Paris, v. 50, n. 1, p. 45-51, 2002.

LE DISCORDE, M.; MOREAU, P.; SABATIER, P.; LEGEAIS, J.-M.; CAROSELLA, E.D. Expression of HLA-G in human cornea, an immune-privileged tissue. **Human Immunology**, New York, v. 64, n. 11, p.1039-1044, 2003.

LE FRIEC, G.; LAUPZE B.; FARDEL, O; SEBTI, Y.; PANGAULT, C.; GUILLOUX, V.; BEAUPLÉ, A.; FAUCHET, R.; AMIOT, L. Soluble HLA-G inhibits human dendritic cell triggered allogeneic T-cell proliferation without altering dendritic differentiation and maturation processes, **Human Immunology**, New York, Article in Press, 2003.

LEIBSON P.J. Cytotoxic lymphocyte recognition of HLA-E: utilizing a nonclassical window to peer into classical MHC. **Immunity**, Oxford, v. 9, p. 289-294, 1998.

LEPIN, E.J.M.; BASTIN, J.M.; ALLAN, D.S.J.; RONCADOR, G.; BRAUD, V.M.; MASON D.Y.; VAN DER MERWE, P.A.; MCMICHAEL, A.J.; BELL, J.I.; POWIS, S.H.; O'CALLAGHAN, A. Functional characterization and binding of HLA-F tetramers to ILT-2 and ILT-4 receptors. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 30, p. 3552-3561, 2000.

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.

LILA, N.; CARPENTIER, A.; AMREIN, C.; KHALIL-DAHER, I.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D. Implication of HLA-G molecule in heart-graft acceptance. **The Lancet**, New York, v. 355, p. 2138, 2000.

MATSUNAMI, K.; MIYAGAWA, S.; NAKAI, R.; MURASE A.; SHIRAKURA R. The possible use of HLA-G1 and G3 in the inhibition of NK cell-mediated swine endothelial cell lysis, **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 126, n. 1, p. 165, 2001.

MATTE, C.; LACAILLE, J.; ZIJENAH, L.; WARD, B.; THE ZVITAMBO STUDY GROUP; ROGER, M. HLA-G and HLA-E polymorphisms in an indigenous African population. **Human Immunology**, New York, v. 61, p. 1150-1156, 2000.

MENIER, C.; SAEZ, B.; HOREJSI, V.; MARTINOZZI, S.; KRAWICE-RADANNE, I.; BRUEL, S.; LE DANFF, C.; REBOUL, M.; HILGERT, I.; RABREAU, M.; LARRAD, M.L.; PLA, M.; CAROSSELA, E.D.; ROUASS-FREISS, N. Characterization of monoclonal antibodies recognizing HLA-G or HLA-E: new tools to analyze the expression of nonclassical HLA class I molecules, **Human Immunology**, New York, v. 64, n. 3, p. 315-326, 2003.

MOREAU, P.; ADRIAN-CABESTRE, F.; MENIER, C.; GUIARD, V.; GOURAND, L.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D.; PAUL, P. IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. **International Immunology**, Oxford, v. 11, n. 5, p. 803-811, 1999.

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.

OBBER, C. HLA and pregnancy: the paradox of the fetal allograft. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 62, p. 1-5, 1998.

PALMISAMO, G.L.; PISTILLO, M.P.; FARDIN, P.; CAPANNI P.; NICOLO, G.; SALVI, S. SPINA, B.; PASCIUCCO, G.; FERRARA, G.B. Analysis of HLA-G in breast cancer tissues, **Human Immunology**, New York, v. 63 n.11, p. 969-976, 2002.

PARK, G.M.; LEE, S.; PARK, B.; KIM, E.; SHIN, J.; CHO, K.; AHN, K. Soluble HLA-G generated by proteolytic shedding inhibits NK-mediated cell lysis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 313, n. 3, p. 606-611, 2004.

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 solubles HLA-G5, -G6, and -G7 transcript in human transfected cells. **Human Immunology**, New York, v. 64, n. 11, p. 1138-1149, 2000.

PAUL, P.; ROUAS-FREISS, N.; KHALIL-DAHER, I.; MOREAU, P.; RITEAU B.; LE GAL, F.-A.; AVRIL, M.-F.; DAUSSET, J.; GUILLER, J.-G.; CAROSSELA, E.D. HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance. **Proceedings of National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 95, p. 4510-4515, 1998.

PÉNZES, M.; RAJCZY, K.; GYÓDI, E.; RÉTI, M.; FEHÉR, É; PETRÁNYI, G. HLA-G gene polymorphism in the normal population and in recurrent spontaneous abortion in hunary. **Transplantation Proceedings**, New York, v. 31, n. 4, p. 1832-1833, 1999.

REAL, L.M.; CABRERA, T.; COLLADO, A.; JIMENEZ, P.; GARCIA, A.; RUIZ-CABELLO F.; GARRIDO, F. Expression of HLA-G in human tumors is not a frequent event. **International Journal of Cancer**, New York, v. 81, p. 512-518, 1999.

RITEAU, B.; MENIER, C.; KHALIL-DAHER, I.; SEDLIK, C.; DAUSSET, J.; ROUAS-FREISS, N.; CAROSSELA, E.D. HLA-G inhibits the allogeneic proliferative response. **Journal of Reproductive Immunology**, Shannon, v. 43, p. 203-211, 1999.

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.

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.

SASAKI, H.; XU, X.-C.; SMITH, D.; SHENOY, S.; LOWELL, J.; HOWARD, T.; MOHANAKUMAR, T. HLA-G expression protects porcine endothelial cells from xenogeneic cytotoxicity mediated by human natural killer cells, **Transplantation Proceedings**, New York, v. 312, p. 953-954, 1999.

STEFFENSEN, R.; CHRISTIANSEN, O. B.; BENNET, E.P.; JERSILD, C. HLA-E polymorphism in patients with recurrent spontaneous abortion. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 52, p. 569-572, 1998.

SUÁREZ, M.B.; MORALES, P.; CASTRO, M.J.; FERNÁNDEZ, V.; VARELA, P.; ALVAREZ, M.; MARTINEZ-LASO, J.; ARNAIZ-VILLENA, A. A new HLA-G allele (HLA-G\*0105N) and its distribution in the Spanish population. **Immunogenetics**, New York, v. 45, p. 464-465, 1997.

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.

VAN DER VEN, K.; SKRABLIN, S.; ENGELS, G.; KREBS, D. HLA-G polymorphism and allele frequencies in Caucasians, **Human Immunology**, New York, v. 59, n. 5, p. 302-312, 1998.

WAINWRIGHT, S.D.; BIRO, P.A.; HOLMES, C.H. HLA-F is a predominantly empty, intracellular, TAP-associated MHC class Ib protein with a restricted expression pattern, **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 164, p. 319-328, 2000.

WIENDL, H.; BEHRENS, L.; MAIER, S.; JOHNSON, M.A.; WEISS, E.H.; HOHLFELD, R. Muscle fibers in inflammatory myopathies and cultured myoblasts express the non-classical major histocompatibility antigen HLA-G. **Annals of Neurology**, Boston, v. 48, n. 4, p. 679-684, 2000.

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.

YAN, W.H.; FAN, L.A. Residues Met<sup>76</sup> and Gln<sup>79</sup> in HLA-G $\alpha$ 1 domain involve KIR2DL4 recognition. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v.62, p.346-347, 2003.

YANG, Y.; CHU, W.; GERAGHTY, D.E.; HUNT, J. Expression of HLA-G in human mononuclear phagocytes and selective induction by IFN-gamma. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 59, p. 524, 1996.































			290					960				300						990				310				
G*01011	GTT	GCT	GGC	CTG	GTT	GTC	CTT	GCA	GCT	GTA	GTC	ACT	GGA	GCT	GCG	GTC	GCT	GCT	GTG	CTG	TGG	AGA	AAG	AAG	AGC	TCA
G*01012	---	---	---T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---G	---	---	---	---
G*01013	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
G*01014	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
G*01015	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
G*01016	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
G*01017	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
G*01018	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
G*0102	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G*0103	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
G*01041	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
G*01042	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
G*01043	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
G*0105N	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
G*0106	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***

Exon 5 | Exon 6

LEGENDA

G*01011	G		AT TGA		INICIADORES	G2.3', G2.5', G3.3', G3.5'
G*01012	-		---			
G*01013	*		** ***		G*31.01	 G*31.02
G*01014	*		** ***			
G*01015	*		** ***		G*54.01	 G*54.02
G*01016	*		** ***			
G*01017	*		** ***		G*57.01	 G*57.02  G*57.03
G*01018	*		** ***			
G*0102	-		---		G*69.01	 G*69.02
G*0103	*		** ***			
G*01041	*		** ***		G*107.01	 G*107.02
G*01042	*		** ***			
G*01043	*		** ***		G*110.01	 G*110.02
G*0105N	*		** ***			
G*0106	*		** ***		G*130.01	 G*130.02

Obs: Os hífen (-) indicam a repetição da base da seqüência consenso. Os asteriscos (\*) indicam posições não sequenciadas. Os números sobre as seqüências indicam o número do códon.