



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE BIOMEDICINA

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO +3142 DO GENE HLA-G EM
PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTEMICO**

Camila Rosat Consiglio

ORIENTADOR: Dr. José Artur Bogo Chies

CO-ORIENTADOR: Tiago Degani Veit, MSc.

Porto Alegre - Brasil

2010

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO +3142 DO GENE HLA-G EM
PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTEMICO**

Camila Rosat Consiglio

Trabalho de conclusão de curso de Biomedicina elaborado no Laboratório de Imunogenética do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob orientação do professor doutor:

José Artur Bogo Chies

Porto Alegre – Brasil

2010

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. José Artur Bogo Chies, que me acolheu no laboratório de imunogenética e me auxiliou no desenvolvimento do meu projeto, me conduzindo e me ambientando na vida científica e acadêmica. Agradeço, também, pela amizade e confiança durante todo este período em que estagiei no laboratório;

À Prof^a. Dr. Marion Schiengold, que me proporcionou a chance de ingressar no laboratório;

Ao Tiago Degani Veit, que me orientou durante experimentos científicos e me ajudou a questionar e interpretar os dados obtidos, onde tal dedicação influenciou no meu crescimento intelectual e profissional;

Aos colegas do laboratório de imunogenética pela maravilhosa amizade, convivência e auxílio;

Aos amigos, ao namorado e à minha querida família, que sempre me apoiaram e me incentivaram;

Índice Geral

I. Resumo.....	04
II. Lista de Abreviaturas.....	05
III. Introdução.....	06
1. <i>Lúpus Eritematoso Sistêmico</i>	06
1.1 <i>Distúrbios Imunológicos</i>	07
1.2 <i>Diagnóstico</i>	09
1.3 <i>Distúrbios Hormonais</i>	10
1.4 <i>Fatores Ambientais</i>	11
1.5 <i>Evidências Genéticas</i>	12
2. <i>Complexo Principal de Histocompatibilidade</i>	13
3. <i>Antígeno Leucocitário Humano G</i>	15
4. <i>Genética do HLA-G</i>	18
IV. Trabalho Experimental em Formato de Artigo Científico.....	21
V. Conclusão e Perspectivas.....	38
VI. Bibliografia Referente à Introdução	38
VII. Anexo I - Protocolo de Acompanhamento de LES.....	44

I. Resumo

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença inflamatória auto-imune que envolve diversos órgãos e sistemas, caracterizada por uma grande heterogeneidade clínica. Sua etiologia permanece desconhecida. Entretanto, provavelmente possui origem multifatorial, que engloba fatores genéticos, ambientais e hormonais. O Antígeno Leucocitário Humano G (HLA-G) é um HLA classe I não clássico com

importância na manutenção da gravidez, protegendo o feto semi-alógeno da resposta imune da mãe. Além disso, estudos recentes indicam que esta molécula é induzida no curso de patologias inflamatórias e sua expressão foi sugerida como um possível mecanismo de proteção tecidual contra respostas inflamatórias auto-imunes. MicroRNAs, RNAs de 20 a 24 nucleotídeos (nt) que desempenham um importante papel na regulação da expressão gênica, parecem estar envolvidos na regulação da expressão do gene HLA-G através de um provável sítio de ligação na região 3' não traduzida. Dentro dos 20nt deste sítio de ligação, existe um polimorfismo (+3142C/G - rs1063320) que interfere na afinidade da ligação de três microRNAs (miRNA) e, possivelmente, na supressão da tradução. Este polimorfismo está em desequilíbrio de ligação com o polimorfismo inserção/deleção de 14 pb (rs1704), cuja análise havia detectado um desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg, com um excesso de heterozigotos em pacientes com LES. Neste estudo, foi investigada a influência do papel do polimorfismo +3142 do gene HLA-G na susceptibilidade e morbidade associada a LES. Nossos resultados confirmam o papel deste polimorfismo, já que uma frequência aumentada do alelo G foi encontrada em pacientes em relação a controles (0,58 vs 0,47, $P=0,011$). Uma maior frequência do genótipo GG também foi encontrada entre pacientes de LES em relação a controles (OR=1,90, 95% CI: 1,08-3,42). Duplo heterozigotos para os polimorfismos apresentaram um índice médio do SLEDAI mais baixo em comparação aos demais pacientes (1,56 vs. 3,15 e 3,26 respectivamente, P corrigido = 0,044). Estes resultados sugerem um papel para o polimorfismo +3142 do gene HLA-G na etiopatologia e modulação da severidade de lúpus eritematoso sistêmico.

Palavras-chave: antígeno leucocitário humano G, polimorfismos, lúpus eritematoso sistêmico.

II. Lista de Abreviaturas

ANA - anticorpos antinucleares;

APC - Células apresentadoras de antígenos;

BCR - Receptor de célula B;

Célula NK - do inglês, *Natural Killer*;

CR - Receptor para complemento;
DNA - Ácido desoxirribonucléico;
HLA - Antígeno Leucocitário Humano;
HLA-G - Antígeno Leucocitário Humano G;
HPA - Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal;
Ig - Imunoglobulina;
IL - Interleucina;
LES - Lúpus Eritematoso Sistêmico;
Linfócito Tc - Linfócito T citotóxico
Linfócito Th - Linfócito T auxiliar;
MHC - Complexo principal de histocompatibilidade;
miRNA - microRNA;
mRNA - RNA mensageiro;
SLEDAI - do inglês *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index* (Índice de Atividade de Doença de Lúpus Eritematoso Sistêmico);
snRNP - Ribonucleoproteínas nucleares pequenas;
SNP - Polimorfismo de nucleotídeo único;
TCR - Receptor de célula T;
UV - Ultravioleta

III. Introdução

1. *Lúpus Eritematoso Sistêmico*

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica auto-imune que envolve diversos órgãos e sistemas e que atinge principalmente mulheres em idade reprodutiva. Sua etiologia é desconhecida; entretanto, parece possuir

origem multifatorial, onde a combinação de genes e fatores ambientais predispõe a um distúrbio imunológico, que induz defeitos nos mecanismos imunológicos de tolerância (1). LES é uma doença caracterizada por uma grande variabilidade em relação às manifestações clínicas, alterações morfológicas e evolução da doença.

A prevalência estimada do LES é de 40 a 50 em 100.000 indivíduos (2). Pode-se, contudo, observar diferenças epidemiológicas em indivíduos de diversas etnias. A ocorrência de lúpus em afro-americanos parece ser de três a quatro vezes maior do que em mulheres caucasóides americanas (3); evidências sugerem que o LES é mais comum em afro-americanos, índios nativos norte-americanos e em orientais, como indianos asiáticos e chineses, do que em caucasóides (4). Não se conhece a prevalência de LES na população brasileira, visto que não existem estudos de prevalência nesta população.

O LES manifesta-se como uma doença sistêmica, caracterizada por uma reação autoimune contra antígenos próprios disseminados. Uma das características mais marcantes dos pacientes é a produção de auto-anticorpos, principalmente anticorpos anti-nucleares (ANAs), que estão presentes em mais de 95% dos pacientes. Existem, também, outros tipos de auto-anticorpos direcionados contra eritrócitos, plaquetas, linfócitos, fatores de coagulação, fosfolípidios. Os auto-anticorpos são os mediadores definitivos da lesão tecidual. Imunocomplexos são formados a partir de autoanticorpos e componentes do sistema complemento, e sua deposição, juntamente com a ativação do complemento, resultam em intensa inflamação nos diferentes tecidos. As primeiras manifestações de pacientes com a doença são decorrentes da inflamação, como vasculite e vasculopatia, apresentando principalmente lesões na pele, rins, articulações e membranas serosas. Os rins são afetados principalmente, pela deposição de imunocomplexos em estruturas, como glomérulos, membranas basais tubulares e vasos sanguíneos (5).

1.1 Distúrbios Imunológicos

No sistema imune, células B reconhecem antígenos através de seus receptores de célula B (BCRs) e co-receptores de células B. Os antígenos são internalizados, processados e expostos por moléculas do complexo principal de histocompatibilidade

(MHC) de classe II. Ao reconhecer o antígeno, as células B recebem sinal para expressar a molécula co-estimuladora B7. Quando uma célula T auxiliar (Th) reconhece o complexo MHC-antígeno através de seu receptor de células T (TCR) e moléculas co-estimulatórias, a célula T começa a expressar o CD40L, que interage com o CD40 das células B, enviando para as últimas o segundo sinal de ativação. A interação entre a molécula B7 e a molécula CD28 da célula Th induz a ativação desta célula, que libera citocinas. As células B ativadas começam a expressar receptores para as citocinas, que se ligam às citocinas expressas pelos linfócitos Th que, então, estimulam a progressão das células B para a fase S do ciclo celular, para a diferenciação em plasmócitos e produção de anticorpos. Assim como a molécula CD28 de linfócitos T auxiliares, a molécula CTLA-4 destes também é capaz de se ligar às moléculas B7. Entretanto, estas produzem um sinal inibitório. A competição CTLA-4/CD28 determina se haverá ou não o segundo sinal para as células Th (6).

Pacientes com LES possuem diversas disfunções no sistema imune. Estas envolvem ativação policlonal anormal de células B, aumento no número de plasmócitos secretores de anticorpos, hipergamaglobulinemia, produção de auto-anticorpos, formação e deposição de imunocomplexos. A produção destes auto-anticorpos parece resultar de uma hiperatividade das células B dependente de uma ativação excessiva e anormal de células T auxiliares antígeno-específicas. No contexto de LES, auto-antígenos expostos pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) e reconhecidos pelas células T induzem a produção de auto-anticorpos pelas células B. Células B dos pacientes com LES são mais sensíveis a sinais estimulatórios, como IL-6, quando comparadas com controles (7). Existe um direcionamento das células T para resposta auxiliar às células B, o que acarreta em uma maior produção de anticorpos (8). A resposta Th1 é anormal, podendo ser atribuída a um excesso de citocinas Th2, à presença de inibidores de IL-2 (que é uma citocina Th1), entre outros (9). Células T de lúpus são menos responsivas a IL-2 (10), apesar de se ter um aumento da sua expressão por células mononucleares de sangue periférico (11). A citocina IL-10 também parece ter um papel na patologia: esta citocina de perfil Th2 estimula a expansão e diferenciação de células B. A produção basal de IL-10 parece ser mais alta em LES que em controles (12), e pacientes LES possuem concentrações séricas de IL-10 mais altas que controles, o que correlaciona com a atividade da doença (13).

Da mesma forma que existe um direcionamento para a produção de autoantígenos e ocorre a deposição de imunocomplexos, a remoção destes imunocomplexos por fagócitos parece ser anormal (14). Existe um número reduzido e defeitos funcionais de receptores para complemento CR1 (15) e alguns receptores de IgG parecem ter capacidade reduzida de se ligar a tais imunoglobulinas (16), contribuindo para uma remoção ineficiente dos imunocomplexos. Deficiências no engolfamento de células apoptóticas também já foram descritas (17), acarretando em maior persistência destas células apoptóticas. Um aumento de apoptose de linfócitos de LES (18), um engolfamento falho, associado a uma ineficiente remoção de imunocomplexos, induziria possivelmente uma ativação de células auto-reativas através do extravazamento de componentes intracelulares, ou tais componentes poderiam formar imunocomplexos, resultando em um processo inflamatório (19).

Os anticorpos anti-nucleares descritos para lúpus podem ser classificados em quatro categorias: anticorpos contra DNA, anticorpos contra histonas, anticorpos contra proteínas não-histonas ligadas ao RNA e anticorpos contra antígenos nucleolares. Ainda não se sabe exatamente como os ANAs entram em contato com os antígenos nucleares. Tais anticorpos não são capazes de penetrar nas células em condições fisiológicas. Conseqüentemente, é provável que o reconhecimento de antígenos nucleares ocorra através da liberação destes por células lesadas, o que condiz com certas disfunções mencionadas acima.

Os auto-anticorpos mais comumente descritos em LES são anticorpos anti-DNA dupla-fita (anti-dsDNA) e anti-Sm. O primeiro tem afinidade por determinantes ácido nucléico conservados, que são encontrados no DNA, enquanto o segundo reage com ribonucleoproteínas nucleares pequenas (snRNP), que consistem em moléculas de RNA ligadas a proteínas. A identificação dos tipos de autoanticorpos possui importância para a caracterização da doença, visto que alguns tipos de anticorpos já foram correlacionados com a presença de certos aspectos de morbidade associados à doença. Por exemplo, uma alta quantidade de anticorpos contra DNA está associado à glomerulonefrite ativa (20). Tais anticorpos podem se ligar a DNAs presentes na membrana glomerular através de antígenos como histonas, nucleossomos e laminina (21). Vasculopatia oclusiva, um achado comum entre os pacientes, é associado com anticorpos antifosfolipídios.

1.2 Diagnóstico

Como o LES consiste em uma doença multifatorial, o seu diagnóstico é de difícil estabelecimento. O diagnóstico consiste na identificação de quatro ou mais critérios dentro de um conjunto total de onze critérios para que o paciente seja classificado com portador de lúpus eritematoso sistêmico (22). Abaixo, encontram-se os critérios e suas descrições:

1. **Erupção malar:** Eritema sobre a região malar;
2. **Erupção discóide:** Placas eritematosas elevadas com descamação ceratótica aderente e rolhas córneas foliculares, cicatrizes atróficas podem ocorrer;
3. **Fotossensibilidade:** Erupção cutânea resultante da exposição a raios UV;
4. **Úlceras orais:** Úlceração oral ou nasofaríngea, geralmente sem dor;
5. **Artrite:** Artrite não-erosiva envolvendo duas ou mais articulações periféricas, caracterizada por sensibilidade, inchaço ou derrame;
6. **Serosite:** Pleurite – histórico convincente de dor pleurítica ou atrito escutado por médico, ou evidências de derrame pleural ou pericardite - documentado por eletrocardiograma ou atrito, ou por evidência de derrame pericárdico;
7. **Doença renal:** Proteinúria persistente ($> 0,5\text{g/dL}$ ou classificação +++ em exame) e/ ou presença de cilindros celulares no exame microscópico de urina;
8. **Doença neurológica:** Convulsões (na ausência de drogas agressoras ou disfunções conhecidas do metabolismo, como uremia, cetoacidose, desequilíbrio eletrolítico) ou Psicose (na ausência de drogas agressoras ou disfunções conhecidas do metabolismo, como uremia, cetoacidose, desequilíbrio eletrolítico);
9. **Doença Hematológica:** Anemia hemolítica (com reticulose), leucopenia (contagem menor que 4000 leucócitos totais/ μL em duas ou mais ocasiões) ou linfopenia (contagem menor que 1500 linfócitos/ μL em duas ou mais ocasiões) ou trombocitopenia (contagem de plaquetas menor que $100 \times 10^3/\mu\text{L}$ na ausência de drogas agressoras);

10. **Doença imunológica:** Anti dsDNA, anti-Sm e/ou antifosfolípido.

11. **Anticorpo antinuclear (ANA):** Titulações anormais de anticorpos antinucleares por imunofluorescência ou ensaio equivalente, a qualquer momento e na ausência de drogas conhecidas por estarem associadas com a síndrome lúpus induzida por droga. O teste de ANAs é realizado quando existe suspeita de lúpus pelos sintomas clínicos (i.e. 2 ou três sintomas), e é geralmente usado como teste confirmatório, entretanto não pode ser usado independentemente da análise clínica, já que aproximadamente 5% da população apresenta esses anticorpos em baixos títulos (23).

1.3. *Distúrbios Hormonais*

Como mencionado anteriormente, o LES é uma doença que atinge predominantemente mulheres em idade reprodutiva, o que aponta para evidências que hormônios sexuais possam estar envolvidos entre suas causas. A razão entre mulheres e homens com a doença é de 9:1. Menarca precoce, uso de contraceptivos e terapia de reposição hormonal pós-menopausa foram associados com um aumento de desenvolvimento de LES (24). Surtos da doença são mais comuns durante a segunda metade do ciclo menstrual em mulheres, quando há um aumento de estrogênio (25). Já foi identificado um metabolismo anômalo de estrógenos em pacientes de ambos os sexos, com um aumento de 16α hidroxiestrona (26), que representa um forte hormônio feminilizante, assim como concentrações mais baixas de hormônios masculinos, como a testosterona (27-29). Influências destes hormônios têm sido descritas na função imune, por exemplo, o efeito do estrogênio aumenta a diferenciação de células B e sua produção de anticorpos, e andrógenos parecem diminuir a produção de anticorpos, aumentar a resposta Th1 e inibir a Th2 (30, 31). Tal efeito oposto dos hormônios sexuais combinado com o aumento de estrogênio e diminuição de androgênios parece explicar algumas manifestações da doença.

Um distúrbio do hormônio prolactina, a prolactinemia, também já foi descrito em LES. Estudos com modelos de lúpus em camundongos mostram que hiperprolactinemia induzida aumenta a atividade da doença e que este distúrbio prejudica mecanismos de indução de tolerância em células, parecendo ter um papel importante na autoimunidade (32).

O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) controla uma série de hormônios. Um estudo realizado com mulheres com lúpus não tratadas, mostrou que a resposta do hormônio cortisol à hipoglicemia induzida destas pacientes era menor que em controles (33). Outro estudo evidenciou que o eixo pituitária-tireóide e pituitária-gônadas é afetado em pacientes não tratados recém diagnosticados (34). O aumento de glicocorticóides induzido por estresse participa na imunossupressão, importante na prevenção de respostas autoimunes. Desta forma, susceptibilidade a LES pode ser atribuída por um ou mais defeitos neste eixo. Outras evidências em camundongos-modelo para lúpus também sugerem um eixo HPA deficiente.

1.4. Fatores Ambientais

Apesar de diversos fatores hormonais, imunológicos e genéticos já terem sido descritos na susceptibilidade a lúpus eritematoso sistêmico, fatores ambientais parecem desempenhar um papel importante. Agentes infecciosos podem provocar lesão tecidual e liberar componentes intracelulares, provocando uma reação imune contra auto-antígenos, assim como podem ativar células B auto-reativas ou induzir resposta imune através de mimetismo molecular. Teoricamente, tais mecanismos poderiam iniciar um surto de lúpus ou contribuir para sua patogênese, entretanto tais achados não foram diretamente confirmados (35). Determinadas dietas também parecem estar relacionadas com a doença, como a alta ingestão de gorduras saturadas, que poderia interferir na quantidade de mediadores inflamatórios. Estudos com camundongos propensos a desenvolver lúpus NZB/NZW indicam que o desenvolvimento da doença é desacelerado quando a dieta contém ômega-3, em relação a dietas com gordura saturada, além disso, estes animais possuem menores níveis de anti-dsDNA (36).

O composto químico hidralazina, presente no cigarro e em agrotóxicos, pode induzir uma síndrome semelhante a lúpus, principalmente em indivíduos que possuem baixa acetilação genética (37). Exposição à luz solar e aos raios UV, em especial UVB, também desencadeiam e exacerbam sintomas de LES. Um provável mecanismo para tal indução pode ser a alteração da química do DNA, aumento da imunogenicidade de antígenos como nRNP e indução de apoptose em queratinócitos (38, 39).

Portanto, a patogênese desta doença multifatorial provavelmente envolve diversos processos, como a perda de tolerância a antígenos nucleares, deficiências no sistema complemento e ativação anormal do sistema imune com produção de auto-anticorpos, que pode ser desencadeada por anormalidades no processo de apoptose. Tais processos podem promover a expressão de antígenos nucleares através de moléculas HLA suscetíveis, tendo como consequência o acúmulo de imunocomplexos, inflamação e lesão tecidual (40).

1.5. Evidências Genéticas

Estudos em gêmeos indicam que fatores genéticos parecem estar envolvidos na etiopatologia de lúpus. Isso foi indicado pela concordância entre gêmeos monozigóticos de 24-58% e de gêmeos dizigóticos em torno de 3% (41), assim como uma frequência aumentada de LES entre parentes de primeiro grau. Estudos de ligação mapearam 6 regiões cromossômicas como significativamente ligadas a LES (42). A identificação dos genes que residem nestas regiões já apontou para uma série de possíveis genes envolvidos na etiopatologia de lúpus.

Anormalidades envolvendo a genética do sistema complemento parecem sustentar a hipótese de possíveis papéis na susceptibilidade de LES, principalmente com moléculas da via clássica de ativação do complemento. O desenvolvimento acontece em metade dos casos de homozigose na deficiência de C2 (43). Deficiência completa de C4 e C1q está associada a um risco de 70% e 98% respectivamente (43, 44). Uma anormalidade em C1q pode estar associada a um acúmulo de células apoptóticas pela remoção deficiente destas por fagócitos.

Um estudo encontrou associação com variantes do gene CTLA-4, que tem como função inibir a ativação de células T, em pacientes japoneses com lúpus (45). Outros pesquisadores encontraram associação com o genótipo CTLA-4 +49 AA e LES (46), apesar de existirem resultados conflitantes (47).

Em uma das regiões de susceptibilidade, no cromossomo 1, se localizam genes que codificam para receptores do fragmento Fc de imunoglobulinas (FcγR), que estão envolvidos em processos de remoção de imunocomplexos e citotoxicidade dependente de anticorpos. O alelo R131 do FcγRIIa, que tem menor afinidade por

ligar IgG, parece ser mais comum entre pacientes de lúpus com glomerulonefrite (48). O mesmo parece acontecer com o alelo F176 do gene Fc γ RIII (41).

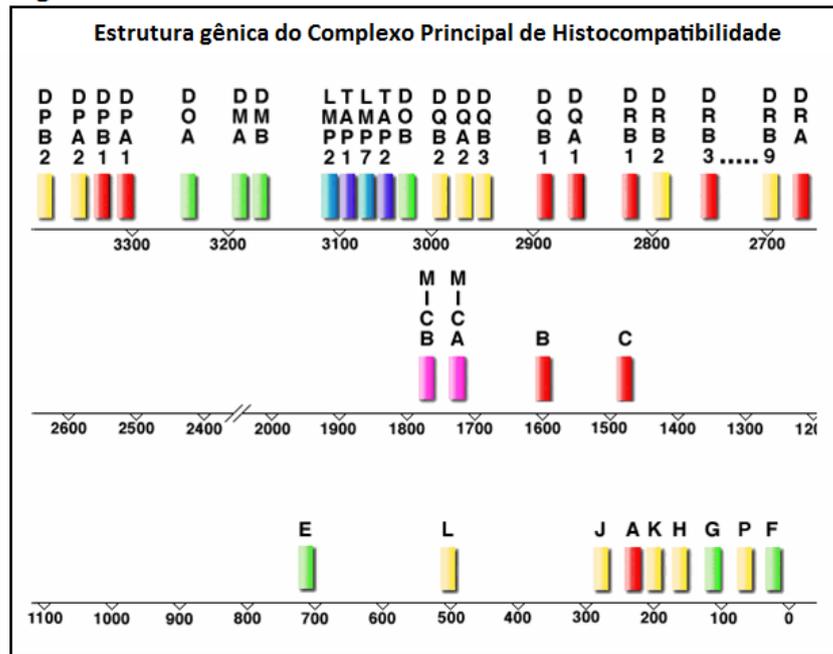
2. *Complexo Principal de Histocompatibilidade*

O complexo principal de histocompatibilidade (MHC) compreende um grupo de genes altamente polimórficos que codificam moléculas de superfície celular que possuem, como função primária, a capacidade de ligar fragmentos peptídicos e os expôr na superfície celular, para que possam ser reconhecidos pelos TCRs de linfócitos T auxiliares ou citotóxicos. O MHC foi primariamente descrito com esta denominação pela identificação destas moléculas que pareciam desempenhar um papel na aceitação e rejeição de enxertos (49).

Em humanos, o MHC é referido como o complexo antígeno leucocitário humano (HLA), e os genes presentes neste complexo estão organizados em regiões que codificam três classes de moléculas: Os MHC de classe I, II e III (Figura 1). Basicamente, os genes do MHC de classe I, codificados pelas regiões HLA-A, -B, -C, representam glicoproteínas de membrana que são expressas em quase todas as células nucleadas. Esta classe expõe peptídeos endógenos, processados pela via citosólica, que serão reconhecidos por linfócitos T citotóxicos CD8+. Os genes do MHC de classe II codificam glicoproteínas expressas na superfície de células apresentadoras de antígenos, onde apresentam peptídeos exógenos para células T auxiliares CD4+. A molécula de MHC de classe II é codificada pelos genes HLA-DP, -DQ e -DR. Já os genes do MHC de classe III codificam várias proteínas solúveis com importante função no sistema imune, como, os componentes do sistema complemento e moléculas envolvidas no processo inflamatório (6).

O complexo HLA se localiza no braço curto do cromossomo 6 (6p21.3) e nesta região foi encontrada uma ligação significativa com LES (42). Visto que as moléculas HLA, que apresentam antígenos às células T, são geneticamente determinadas, o MHC afeta a susceptibilidade a doenças infecciosas e a propensão à autoimunidade.

Figura 1



Muitos estudos demonstram associação entre LES e alguns alelos do HLA de classe II (HLA-DR, DQ e -DP), como os alelos DR3 (DRw17) e DR2 (DRB1*1501 e DRB1*1503) (41). DR2 e DR3 também são fortemente associados com anticorpos anti-SSA e anti-SSB, enquanto DR4 e DR7 são associados com anticorpos anticardiolipina (41).

Os HLA de classe I se dividem em clássicos e não-clássicos. As moléculas clássicas são caracterizadas pela expressão em todas as células nucleadas e por serem altamente polimórficas. Foram descritas primeiro, e compreendem os genes HLA-A, -B e -C. Já os genes não-clássicos, HLA-E, -F e -G, são expressos em um repertório restrito de células e possuem outras funções, que não a apresentação de antígenos endógenos.

A estrutura das moléculas HLA de classe I clássicas consiste em uma cadeia α pesada, que é organizada em três domínios extracelulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$), possui um segmento transmembrana e uma cauda citoplasmática, e uma cadeia β_2 -microglobulina que se liga à cadeia α . Existe um sulco profundo na cadeia α ao qual se liga o peptídeo a ser apresentado (fenda peptídica). A estrutura das moléculas HLA de classe II é parecida, possuindo também um sulco de ligação ao peptídeo, entretanto entre as cadeias α e β .

3. Antígeno Leucocitário Humano G

O antígeno leucocitário humano G (HLA-G) é, como mencionado anteriormente, uma molécula HLA não-clássica. É constituída por três α -domínios ligados a uma cadeia β_2 -microglobulina, assim como as moléculas HLA clássicas. Entretanto, o HLA-G possui um número baixo de polimorfismos na sua região codificante, o que intrigou cientistas, pois indicava que a molécula codificada não estaria envolvida na apresentação de antígenos. Quarenta e seis alelos já foram descritos para o gene HLA-G (vide o site <http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>), enquanto as moléculas HLA-A, -B e -C possuem, respectivamente, 1001, 1605 and 690 alelos. A baixa variabilidade do HLA-G restringe o repertório de peptídios capazes de se ligarem à fenda desta molécula (50).

O padrão de expressão do HLA-G em condições fisiológicas é limitado e sua expressão constitutiva foi encontrada na medula do timo, na córnea, nas ilhotas pancreáticas e em precursores endoteliais e eritróides e em células supressoras (51).

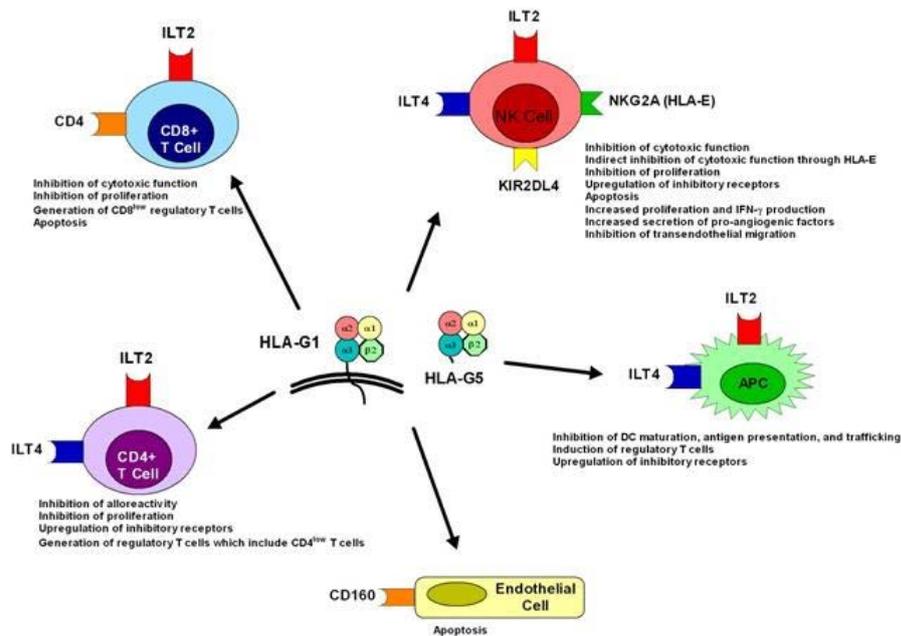
Através de *splicing* alternativo, o gene do HLA-G pode gerar sete isoformas diferentes, sendo quatro delas ligadas à membrana (G1-G4) e as outras três secretadas (G5-G7) (51). A produção destas isoformas depende das condições fisiológicas e do tipo celular em questão (52, 53).

A expressão de HLA-G foi descrita pela primeira vez em células do citotrofoblasto, e a análise de sua função demonstrou sua importância na indução e manutenção da tolerância na gravidez (54). Durante a gravidez, o sistema imune materno está em contato íntimo aos tecidos do feto, que é descrito como semi-alogênico por apresentar apenas 50% dos antígenos de origem materna. Portanto, para não ocorrer rejeição, ocorre uma diminuição da expressão de moléculas HLA de classe I clássicas do feto e a expressão de HLA-G é exacerbada. Tal processo demonstrou o caráter imunomodulador da molécula HLA-G, onde a ativação de células do sistema imune materno, como células T citotóxicas e células NK, foi inibida (55).

Atualmente, sabe-se que o HLA-G é uma molécula que desempenha funções imunossupressoras através de diferentes mecanismos. Ela pode se ligar a receptores de diferentes células do sistema imune, receptores LILR (*leukocyte immunoglobulin-*

like receptor), que são expressos em células NK e APCs, incluindo monócitos (56); também a alguns receptores KIR (*killer cell immunoglobulin-like receptor*) expressos por alguns subconjuntos de células NK (57); possivelmente, se ligam a moléculas CD8+ ativadas através do CD8, em células NK e células T citotóxicas (58). O HLA-G também parece estar envolvido na geração de células supressoras CD4+, CD8+ e células dendríticas (59). HLA-G pode exercer funções imunossupressoras através de um processo chamado trogocitose, que envolve um contato entre células, no qual partes da membrana destas são trocadas, e, conseqüentemente, as moléculas de superfície destas partes também (60). Como conseqüência destes processos, a imunossupressão de diferentes subtipos celulares acontece através de mecanismos exemplificados na tabela e na figura (61) localizadas abaixo:

Tipo celular	Efeitos imunossupressores
Células T CD8+	Inibição da citotoxicidade, da proliferação, indução de apoptose, geração de células T regulatórias CD8+;
Células T CD4+	Inibição da alorreatividade, da proliferação, <i>upregulation</i> de receptores inibitórios, geração de células T regulatórias CD4+;
Células NK	Inibição da citotoxicidade, da proliferação, <i>upregulation</i> de receptores inibitórios, indução de apoptose, inibição de migração transendotelial;
Células Apresentadoras de Antígenos	Inibição da maturação, da apresentação de antígenos, <i>upregulation</i> de receptores inibitórios.



Além de seu papel na gravidez, o HLA-G já foi descrito em diferentes contextos patológicos. Um deles é em infecções virais. Ao invadir células do hospedeiro, vírus são capazes de alterar a expressão de certas moléculas do hospedeiro para escapar de mecanismos de vigilância do sistema imune. A expressão de moléculas HLA de classe I é reduzida, porém possivelmente ocorre uma maior expressão de moléculas de HLA-G, como alguns estudos demonstraram (62).

Um contexto no qual a expressão de HLA-G foi evidenciada é o de microambientes tumorais. Alguns estudos demonstram maior transcrição e expressão da proteína HLA-G em lesões tumorais (63), protegendo contra citólise e também se correlacionando com grau de malignidade do tumor (64). Desta forma, a expressão de HLA-G favoreceria o desenvolvimento de tumores.

Existem, entretanto, outras ocasiões, além da gravidez, em que a expressão de HLA-G seria benéfica. Uma consiste na sua expressão em transplantes, no qual estudos mostraram que pacientes que expressam HLA-G no enxerto ou no plasma possuem maior índice de aceitação do transplante (65).

A indução e expressão de HLA-G no curso de patologias inflamatórias foi sugerida como um possível mecanismo de proteção tecidual contra respostas inflamatórias. Sua expressão já foi comprovada em doenças inflamatórias como em esclerose múltipla (66). Contudo, baixos níveis séricos de HLA-G solúvel foram

encontrados em outras patologias, como artrite reumatóide (67) e lúpus eritematoso sistêmico (68).

A expressão de HLA-G em lúpus eritematoso sistêmico, portanto, influenciaria na intensa inflamação associada à doença, sendo esta molécula um possível mediador inflamatório e marcador prognóstico da doença, onde maiores níveis de HLA-G, hipoteticamente, reduziriam o perfil inflamatório.

4. *Genética do HLA-G*

Os mecanismos responsáveis pela expressão do gene HLA-G permanecem desconhecidos. Todavia, uma melhor compreensão das bases moleculares deste gene pode conduzir a um possível entendimento sobre sua expressão.

O gene HLA-G está localizado na região 6p21.3 e é composto por oito éxons e sete íntrons, sendo que a região promotora se localiza há pelo menos 1,4kb do códon ATG (69) e o códon de parada se localiza no interior do éxon 6. Portanto, o gene possui uma região 3' não-traduzida (3'UTR).

A região promotora do gene possui uma notável quantidade de polimorfismos, com mais de 30 SNPs (polimorfismos de um único nucleotídeo) identificados no Centro Nacional de Informação de Biotecnologia. Treze haplótipos foram identificados baseados em 27 polimorfismos com prováveis diferenças no padrão de atividade do promotor (70). A expressão do gene HLA-G também pode sofrer a ação de mecanismos epigenéticos, uma vez que o perfil de metilação da região promotora foi inversamente correlacionado com a expressão deste gene (71).

Além da região promotora, a região 3' não-traduzida parece também possuir um papel importante na expressão do gene HLA-G e possivelmente influenciar na estabilidade do seu RNA mensageiro (mRNA). No éxon 8 existe um polimorfismo de inserção/ deleção de 14 pares de base (rs1704). O polimorfismo ins/del de 14pb já foi estudado em uma ampla variedade de doenças inflamatórias, com associação do alelo -14pb com susceptibilidade a artrite idiopática juvenil (72), cardiomiopatia dilatada idiopática (73) e pênfigo vulgar (74). Também foram encontradas associações do alelo +14pb com o desenvolvimento de pré-eclampsia e abortos recorrentes (75, 76), sarcoidose (77) e lúpus eritematoso sistêmico (78). No entanto, nosso grupo de pesquisa encontrou resultados conflitantes com relação a este

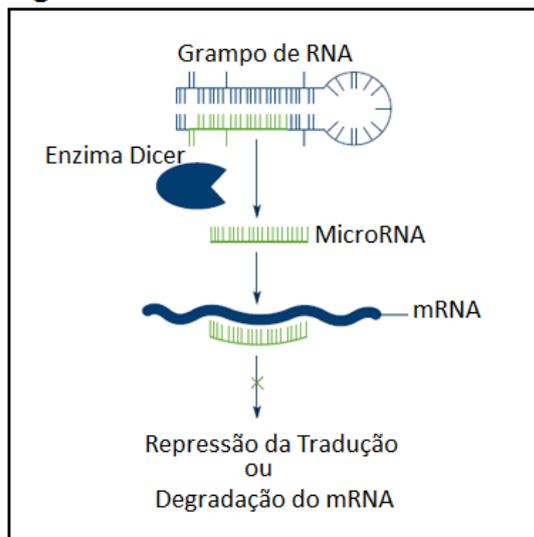
polimorfismo em pacientes com LES, visto que não foi observada associação entre o alelo +14 e a susceptibilidade a doença. Além disso, nossa análise detectou um desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg, com um excesso de heterozigotos (79).

Apesar de ser o polimorfismo mais citado do gene HLA-G, o real papel do polimorfismo de 14pb ainda não está bem esclarecido. Foi verificado *in vitro* que transcritos com a inserção dos 14pb podem sofrer um passo adicional de *splicing*, onde 92 bases são clivadas, conferindo ao mRNA uma maior estabilidade em relação aos transcritos sem os 14pb (80). Entretanto, estudos *in vivo* mostram que indivíduos ins/ins possuem menores níveis circulantes de HLA-G (81), o que foi chamado de o paradoxo do polimorfismo de 14pb (82).

Para buscar a solução do paradoxo do polimorfismo de 14pb e entender seu real papel na expressão de HLA-G, outros polimorfismos da região 3' estão começando a ser estudados, destacando-se entre eles um SNP C/G na posição +3142 (rs1063320) do gene HLA-G. Este polimorfismo parece estar inserido em um potencial sítio de ligação para microRNAs (miRNAs), podendo, dessa forma, estar envolvido na regulação da expressão gênica do HLA-G.

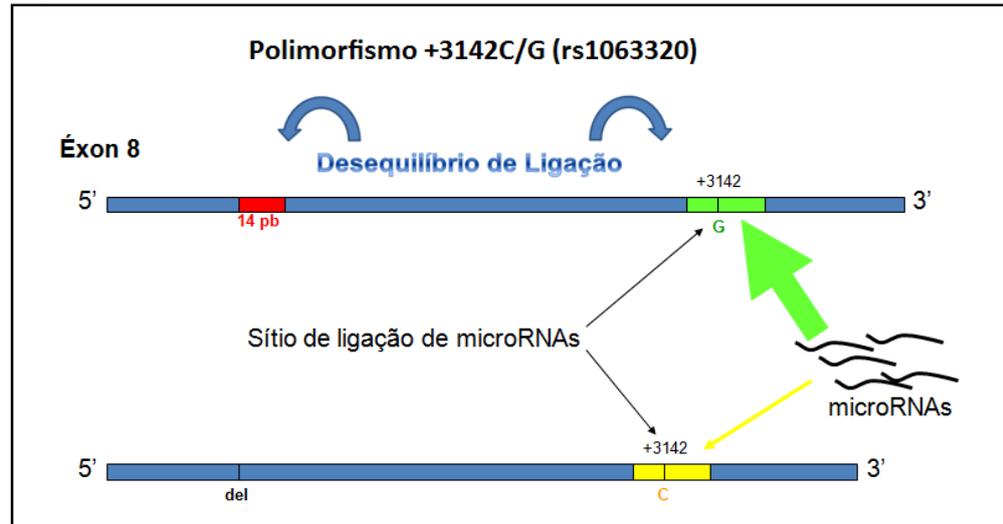
MicroRNAs são pequenos RNAs de 20 a 24nt que desempenham um importante papel na supressão da expressão gênica através da sua ligação com sítios aceptores presentes em RNA mensageiros, onde agem bloqueando sua tradução e/ ou direcionando-os para a degradação (Figura 2).

Figura 2



O sítio de ligação para miRNAs, onde se insere o polimorfismo +3142, é um alvo potencial para ligação de três microRNAs distintos: miR-148a, miR-148b e miR-152 (83). Estudos *in silico* e *in vitro* demonstram que a presença do alelo G favorece a ligação com estes três microRNAs e, portanto, direciona a repressão da expressão do gene HLA-G, enquanto o alelo C confere menor afinidade ao sítio de ligação (83) - Figura 3.

Figura 3



O polimorfismo +3142 está em desequilíbrio de ligação parcial com o polimorfismo inserção/deleção de 14pb (desequilíbrio ins 14pb/G e del/C) (83). Uma hipótese formulada por *Veit e Chies* (82) foi a de que o polimorfismo + 3142 do gene HLA-G pode ter um papel mais importante do que o polimorfismo de inserção/deleção de 14pb no efeito de menor expressão gênica observado com o alelo de inserção de 14pb.

O presente estudo teve como objetivo analisar a influência dos polimorfismos +3142 e 14pb ins/del do gene HLA-G na susceptibilidade e morbidade associada a lúpus eritematoso sistêmico através da análise de frequências alélicas, genótípicas e haplotípicas, buscando correlacionar os parâmetros genéticos com as características clínicas da doença.

IV. Trabalho Experimental em Formato de Artigo Científico

A revista escolhida para publicação do trabalho de conclusão de curso realizado durante o semestre 2010/1 foi a *Tissue Antigens*. Este periódico, que possui índice de impacto de 2,33, é direcionado para temas relacionados à pesquisa com imunogenética de antígenos de superfície celulares, ontogenia e filogenia do sistema imune, imunogenética das interações celulares, controle genético da resposta imune, entre outros.

Association of the HLA-G gene +3142 polymorphism with systemic lupus erythematosus

Camila Rosat Consiglio¹, Tiago Degani Veit^{1,2}, João Carlos Tavares Brenol³,

Ricardo Machado Xavier³, Tamara Mucenic³, Odirlei André Monticielo³

& José Artur Bogo Chies^{1,2*}

¹*Genetics Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil*

²*Post-Graduation Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil*

³*Rheumatology Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil*

*Corresponding author:

Departament of Genetics

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Av. Bento Gonçalves, 9500

Caixa Postal 15053

91501-970 Porto Alegre, RS

Brazil

Tel: +55 51 3308 6740

Fax: +55 51 3308 7311

e-mail: jabchies@terra.com.br

Short title: HLA-G 3'UTR polymorphisms and systemic lupus erythematosus

Abstract

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an inflammatory autoimmune disease that affects several organs and systems. Its etiology remains unknown, although it is probably multifactorial. The Human Leukocyte Antigen G (HLA-G) is a nonclassic MHC I molecule characterized by restricted expression and low DNA polymorphism. HLA-G plays a role in immunosuppression through different mechanisms. In inflammatory diseases, it has been postulated that HLA-G expression may be a possible mechanism of tissue protection against exacerbated inflammatory response. On the 3' untranslated region (3'UTR) of the HLA-G gene, there is an insertion/deletion polymorphism of 14bp (rs1704) that was shown to influence the mRNA stability. The influence of this polymorphism in disease susceptibility is controversial. Also in the 3'UTR there is a single nucleotide polymorphism (SNP) C/G (rs1063320) on the position +3142, at a possible binding site for microRNAs (miRNA) and having an influence on miRNA affinity. In the present study we analyzed the +3142 and the 14bp polymorphisms in 195 SLE European-derived female patients. Our findings show a significant increase of the +3142G allele frequency was observed among patients as compared to controls (0.58 vs 0.47, $P=0.011$). Also, patients presented a higher frequency of the GG genotype (OR=1.90, 95% CI: 1.08-3.42). Double heterozygotes for the two polymorphisms presented a milder mean Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI) than heterozygotes for only one of the variants or non-heterozygous individuals (1.56 vs. 3.15 and 3.26 respectively, corrected $P = 0.044$). These results suggest the involvement of the HLA-G molecule on SLE susceptibility and outcome.

Key words: human leukocyte antigen G, immunogenetics, polymorphism, systemic lupus erythematosus

Introduction

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is a systemic autoimmune and inflammatory disease that affects mainly women in reproductive age. Its pathogenesis is characterized by autoantibody production, which are mainly antinuclear antibodies (ANA), and deposit of immunocomplexes, promoting intense inflammation of several organs and systems. SLE is a disease with clinical heterogeneity, resulting in a spectrum of different symptoms and disease activity. These variable clinical outcomes are a result of its probably multifactorial etiopathogenesis, where the interaction of genetic and environmental factors contributes to disease susceptibility (1). There is an evident genetic component, as has been shown in studies that observed heritability higher than 66%, a siblings risk ratio between 8 and 29 and concordance of monozygotic twins (24 to 69%) and dizygotic twins (2 to 9%) (2, 3). Genome-wide linkage studies demonstrate a strong linkage with the region 6p21.1-q15, which encompasses the HLA region (4).

The Human Leukocyte Antigen G (HLA-G) is a class I nonclassical Major Histocompatibility Complex (MHC) molecule characterized by restricted expression and low DNA polymorphism. Seven different isoforms of HLA-G can be produced by alternative splicing, where HLA-G1 to –G4 are membrane-bound and HLA-G5 to –G7 are soluble molecules. It has been shown that the HLA-G plays a role in immunosuppression, interacting with cells of the immune system and suppressing the immune response by different mechanisms such as upregulation of inhibitory receptors and inhibition of cytotoxicity of CD8+ T lymphocytes and Natural Killer (NK) cells (5). The expression of HLA-G was first described in fetal cytotrophoblast, where it is involved on the induction and maintenance of tolerance between the mother and the fetus (6, 7). In inflammatory diseases, it has been postulated that the HLA-G expression may be a possible mechanism of tissue protection against inflammatory responses (8). For instance, Rizzo et al. have demonstrated that SLE Italian and Danish patients have a lower expression of HLA-G when compared to controls (9).

The HLA-G gene is located on chromosome 6 (6p21.31) and several polymorphisms have been studied in inflammatory disease susceptibility. On the 3' untranslated region (3'UTR), an insertion/deletion polymorphism of 14bp (rs1704) was shown to influence the mRNA stability (10). Transcripts with the insertion allele are able to undergo an additional step of splicing that removes 92 nucleotides (nt) and is shown to have an effect on the stability of the mRNA, as mRNAs lacking the 92 nt (deletion allele) appear to be more stable *in vitro* (10). In spite of this, several studies have repeatedly reported the association of the 14 bp insertion and lower soluble HLA-G levels and even the lack of detectable HLA-G expression in the plasma of homozygotes for the insertion allele (9, 11-13). This polymorphism has been investigated in SLE by previous studies, which observed controversial results (9, 14). Also on the 3'UTR of the HLA-G gene, there is a single nucleotide polymorphism (SNP) C/G on the position +3142 (rs1063320) which is known to be within a putative binding site for microRNAs (miRNA). The G allele was shown to favor the targeting of three miRNAs (miR-148a, miR-148b and miR-152), possibly resulting in a higher repression of translation and mRNA degradation and, consequently, less expression of HLA-G, while the C allele would yield a binding site with lower affinity for these miRNA (15). In the present study, we analyzed the influence of the +3142C/G and the 14bp ins/del polymorphisms of the HLA-G gene on SLE susceptibility and outcome.

Material and Methods

Patients and controls

The SLE patients were recruited from the Division of Rheumatology of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil. All the patients included in the study satisfied the American College of Rheumatology (ACR) revised criteria for SLE (16). The group totaled 195 European-derived women diagnosed after 20 years of age. The ethnic classification was based on physical appearance, which was judged by the researcher at the time of blood collection and on data about the ethnicity of parents/grandparents reported by the participants. The systemic lupus erythematosus disease activity index (SLEDAI) (17) was applied to each patient as a measure of disease activity. One hundred twenty two controls

with the same ethnic, sex and age profile were recruited. This group was from the urban population of Porto Alegre and other cities from the same geographic area of the patients.

The study's protocol was approved by the Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, and informed consent was obtained from all patients and controls.

Polymerase chain reaction amplification of the +3142 and 14bp polymorphism in exon 8 (3'UTR) of the HLA-G gene and genotyping

Patients' and controls' DNA was isolated from peripheral blood cells using a salting out method (18). The genotyping of the 14bp polymorphism of the HLA-G gene was performed as previously described (19). Briefly, 100 ng of genomic DNA was amplified in a 25 mL reaction, with final concentrations as follows: polymerase chain reaction (PCR buffer) 1x, dNTP 0.2 mM, MgCl₂ 1.5mM, Taq DNA polymerase 0.75 U and 10 pmol of each primer (GE14HLAG 5'GTGATGGGCTGTTTAAAGTGCACC-3', RGH4 - 5'-GGAAGGAATGCAGTTCAGCATGA-3'). The thermocycling conditions were as follows: 94°C for 2 min; 35 cycles of 94°C for 30 s, 64°C for 60 s and 72°C for 60 s; final extension of 72°C for 10 min. The amplified PCR products were visualized in 6% polyacrylamide gel stained with ethidium bromide, with the amplicon sizes being 224 bp for the 114 bp allele and 210 bp for the 214 bp allele.

The PCR of the +3142 polymorphism was performed as described (20): 200 ng of genomic DNA were added to a final volume of 25 µL, with final concentrations as follows: PCR buffer 1x, 2.0 mM MgCl₂; 0.2 mM of each dNTP; 1.0 U of Taq-polymerase and 10 pmol of each primer (GMIRNAF-5'-CATGCTGAACTGC ATTCCTCC-3', GMIRNAR-5'-CTGGTGGACAAGGTTCTACTG-3'). Thermocycling conditions were: 94°C for 5 min; 32 cycles of 94°C for 30 s, 65.5°C for 30s and 72°C for 60s followed by a final extension step at 72°C for 5 min.

The amplified PCR products were cleaved with 3U of the restriction enzyme BaeGI (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA) according to manufacturer's instructions. RFLP products were analyzed by electrophoresis in a 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide, with amplicon sizes of 406bp for the C allele and 316 and 90bp for the G allele.

Statistical analysis

The +3142 and 14bp polymorphisms genotypic were compared with Hardy–Weinberg expectations using chi-squared tests. The allelic and genotypic frequencies of the HLA-G polymorphisms of controls and SLE patients were compared using the chi-squared test (with Yates correction when necessary) or Fisher’s exact test. Bonferroni correction for multiple comparisons was applied when the P value was significant. Relative risks were estimated by the odds ratio. Means for SLEDAI were analysed by Kruskal–Wallis tests. The significance level was set at $\alpha = 0.05$ (two-tailed), and all statistical analyses were performed with SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) and winPEPI (21).

Results

One hundred ninety five SLE female patients and 122 healthy female controls were genotyped for the two HLA-G 3’UTR polymorphisms. Mean age of controls was 48.3 ± 15.4 years., while the mean age of patients was 50.2 ± 13.1 years and the mean age at diagnosis was 35.8 ± 11.5 years. Further patient details are displayed on Table 1. As previously published, when comparing genotype frequencies of patients and controls to expected HW frequencies, we observed a heterozygote excess for the 14bp polymorphism (59.3, $P=0.014$) among patients (14). However, no departures from HW equilibrium were observed among patients or controls concerning the +3142 polymorphism (data not shown).

In the present study, a significant increase of the +3142G allele frequency was observed among patients as compared to controls (0.58 vs 0.47, $P=0.011$). Also, patients presented a higher frequency of the GG genotype (OR=1.90, 95% CI: 1.08-3.42 – Table 2). Further analysis of estimated haplotype frequencies revealed an increased frequency of the del/G haplotype in patients (0.16 vs. 0.07) whereas the frequency of the del/C haplotype was decreased as compared to controls (0.40 vs. 0.51 - $P = 0.0019$ – Table 3).

The influence of HLA-G genotype in the patients’ disease activity was undertaken by assessing the patients’ first SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index). Because SLEDAI values did not follow a normal distribution, a non-parametric test was applied to evaluate differences among genotypes. Among the 196 patients, 164 had their first SLEDAI score (meaning the SLEDAI at diagnosis) registered on their records. As it is shown on Table 4, patients homozygous for the insertion allele or the G allele presented

the highest mean SLEDAI among genotypes (3.44 vs. 2.06), although not significant after correction for multiple comparisons ($P_{\text{corr}}=0.096$). Conversely, both the heterozygotes for the 14bp or for the +3142 polymorphisms presented the lowest mean SLEDAI among their respective genotypes, and double heterozygotes presented a milder mean disease activity score than heterozygotes for only one of the polymorphisms or non-heterozygous individuals (1.56 vs. 3.15 and 3.26 respectively, corrected $P = 0.044$).

We also assessed the influence of the HLA-G genotype in clinical and immunological features individually, but no statistically significant differences were observed.

Discussion

In the present study, we analyzed the role of two 3'UTR polymorphisms of the HLA-G gene on the susceptibility and clinical outcome of SLE patients, with special emphasis to the +3142C/G polymorphism, which hasn't yet been studied in this disease. Considering the inflammatory character of systemic lupus erythematosus, a role for the HLA-G molecule seems suitable in the etiopathology of this disease.

As observed in our study, patients of systemic lupus erythematosus had a significantly higher frequency of the +3142/G allele ($P=0.011$) and the GG genotype (OR=1.90, 95% CI: 1.08-3.42) when compared with healthy controls, suggesting this genotype as a disease susceptibility factor. The +3142 polymorphism might affect disease susceptibility by its influence on post-transcriptional regulation of HLA-G expression, as suggested by Tan *et al* in asthma patients (15). To date, conflicting results have been reported concerning the analysis of another HLA-G 3'UTR polymorphism, the 14bp ins/del. Rizzo *et al.* (9) observed an increased frequency of the +14 insertion among Italian SLE patients, while our group observed an excess of heterozygotes among Brazilian patients (14) and Wu *et al* described a lack of association between this variant and SLE among Chinese SLE patients (22). It is interesting to point out that the 14 bp polymorphism is in partial linkage disequilibrium (LD) with the +3142 polymorphism. It is possible that these conflicting data are due to the LD with the C/G +3142 polymorphism or with other variants differently present in these ethnically diverse populations. Further analysis of the +3142 polymorphism on those, and other, populations would help to clarify the influence of 3'UTR polymorphisms in the pathology of SLE.

The haplotype analysis conducted in the present study revealed that while the frequencies of the ins/C and ins/G haplotypes were similar between patients and controls, a significant increase of the del/G allele frequency among patients was observed, while the del/C haplotype was shown to be overrepresented in controls (Table 3 and Figure 1). This difference suggests the involvement of the del/G haplotype in lupus susceptibility. A recent study has investigated the haplotype structure of the 3' UTR of the *HLA-G* gene (23). According to this study, the del/G haplotype fits in the so called UTR-3' extended haplotype, which is associated to three alleles – G*010401, G*010403 and G*010404, which are closely related in terms of evolution (24). Intriguingly, G*010401, the most prevalent allele associated to this haplotype, was previously shown to be a high producer allele (25). On the other hand, it has been shown that the majority of the miRNAs which were described as potentially targeting the 14bp region have higher affinity for the deletion allele. Also, the deletion of the 92 nucleotide region, which occurs only with the 14 bp insertion, could favor the stability of these shorter transcripts, as this region is a target for several miRNAs (26). Nevertheless, it should be pointed out that the regulation of HLA-G expression at the 3'UTR remains elusive and further studies are needed in order to clarify these mechanisms.

The SLEDAI ranking analysis among genotypes of the two 3'UTR polymorphisms showed no significant association between disease severity and homozygosity to a particular allele. Interestingly, both the heterozygotes for the 14bp or the +3142 polymorphism presented a lower mean SLEDAI. Taking the two polymorphisms together, a milder mean activity score was significantly observed on double heterozygotes when compared to the other genotypes. A similar trend was observed in our previous study, where we analyzed the 14bp polymorphism alone (14). It was already shown that the HLA-G locus seems to be under balancing selection (27). In this way, heterozygosity to HLA-G alleles would confer some kind of advantage to their carriers. In this perspective, HLA-G can be seen as a modifier of clinical outcome in SLE, where the expression of high or low levels of HLA-G, conferred by homozygosity of high or low expression alleles, respectively, would lead to worst disease outcomes. Analysis of HLA-G levels, since the HLA-G expression was shown to be lower in SLE patients as compared to healthy controls (9), and also microRNAs expression in SLE may clarify the importance of the HLA-G molecule in disease susceptibility and outcome.

In conclusion, we have observed differences in the genotypic, allelic and haplotypic frequencies of the two 3'UTR polymorphisms analyzed, with emphasis at an increased frequency of the G allele and the del/G haplotype among SLE patients, pointing out to a

role of the HLA-G gene on disease susceptibility. Also, double heterozygous patients presented lower disease activity scores, reinforcing previous data pointing to a role of this molecule in disease outcome. Although we cannot rule out the existence of other polymorphic loci in LD with the analyzed HLA-G polymorphisms, as involved on the SLE etiopathogenesis, our results support a role of the HLA-G molecule in the pathology of SLE.

Acknowledgements

This work was supported by a CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) grants 475484/2007-0 and 302105/2008-5.

References

1. Veit TD, Chies JA. Tolerance versus immune response -- microRNAs as important elements in the regulation of the HLA-G gene expression. *Transpl Immunol.* 2009;**20**:229-31.
2. Alarcon-Segovia D, Alarcon-Riquelme ME, Cardiel MH, et al. Familial aggregation of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other autoimmune diseases in 1,177 lupus patients from the GLADEL cohort. *Arthritis Rheum.* 2005;**52**:1138-47.
3. Deapen D, Escalante A, Weinrib L, et al. A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1992;**35**:311-8.
4. Forabosco P, Gorman JD, Cleveland C, et al. Meta-analysis of genome-wide linkage studies of systemic lupus erythematosus. *Genes Immun.* 2006;**7**:609-14.
5. Pistoia V, Morandi F, Wang X, Ferrone S. Soluble HLA-G: Are they clinically relevant? *Semin Cancer Biol.* 2007;**17**:469-79.
6. Ellis SA, Palmer MS, McMichael AJ. Human trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA Class I molecule. *J Immunol.* 1990;**144**:731-5.
7. Kovats S, Main EK, Librach C, Stubblebine M, Fisher SJ, DeMars R. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science.* 1990;**248**:220-3.

8. Carosella ED, Moreau P, Aractingi S, Rouas-Freiss N. HLA-G: a shield against inflammatory aggression. *Trends Immunol.* 2001;**22**:553-5.
9. Rizzo R, Hviid TV, Govoni M, et al. HLA-G genotype and HLA-G expression in systemic lupus erythematosus: HLA-G as a putative susceptibility gene in systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens.* 2008;**71**:520-9.
10. Rousseau P, Le Discorde M, Mouillot G, Marcou C, Carosella ED, Moreau P. The 14 bp deletion-insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. *Hum Immunol.* 2003;**64**:1005-10.
11. Hviid TV, Hylenius S, Rorbye C, Nielsen LG. HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels. *Immunogenetics.* 2003;**55**:63-79.
12. Hviid TV, Rizzo R, Christiansen OB, Melchiorri L, Lindhard A, Baricordi OR. HLA-G and IL-10 in serum in relation to HLA-G genotype and polymorphisms. *Immunogenetics.* 2004;**56**:135-41.
13. Rosado S, Perez-Chacon G, Mellor-Pita S, et al. Expression of human leukocyte antigen-G in systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol.* 2008;**69**:9-15.
14. Veit TD, Cordero EA, Mucenic T, et al. Association of the HLA-G 14 bp polymorphism with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2009;**18**:424-30.
15. Tan Z, Randall G, Fan J, et al. Allele-specific targeting of microRNAs to HLA-G and risk of asthma. *Am J Hum Genet.* 2007;**81**:829-34.
16. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1982;**25**:1271-7.
17. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum.* 1992;**35**:630-40.
18. Lahiri DK, Nurnberger JI, Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 1991;**19**:5444.
19. Hviid TV, Hylenius S, Hoegh AM, Kruse C, Christiansen OB. HLA-G polymorphisms in couples with recurrent spontaneous abortions. *Tissue Antigens.* 2002;**60**:122-32.
20. Cordero EA, Veit TD, da Silva MA, Jacques SM, Silla LM, Chies JA. HLA-G polymorphism influences the susceptibility to HCV infection in sickle cell disease patients. *Tissue Antigens.* 2009;**74**:308-13.
21. Abramson JH. WINPEPI (PEPI-for-Windows): computer programs for epidemiologists. *Epidemiol Perspect Innov.* 2004;**1**:6.

22. Wu FX, Wu LJ, Luo XY, et al. Lack of association between HLA-G 14-bp polymorphism and systemic lupus erythematosus in a Han Chinese population. *Lupus*. 2009;**18**:1259-66.
23. Castelli EC, Mendes-Junior CT, Deghaide NH, et al. The genetic structure of 3'untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes. *Genes Immun*.**11**:134-41.
24. Cervera I, Herraiz MA, Penaloza J, et al. Human leukocyte antigen-G allele polymorphisms have evolved following three different evolutionary lineages based on intron sequences. *Hum Immunol*.
25. Rebmann V, van der Ven K, Passler M, Pfeiffer K, Krebs D, Grosse-Wilde H. Association of soluble HLA-G plasma levels with HLA-G alleles. *Tissue Antigens*. 2001;**57**:15-21.
26. Castelli EC, Moreau P, Oya e Chiromatzo A, et al. In silico analysis of microRNAS targeting the HLA-G 3' untranslated region alleles and haplotypes. *Hum Immunol*. 2009;**70**:1020-5.
27. Tan Z, Shon AM, Ober C. Evidence of balancing selection at the HLA-G promoter region. *Hum Mol Genet*. 2005;**14**:3619-28.

Table 1: Patients' clinical features.

<i>Patients's features</i>	<i>N¹ (%)</i>	<i>Mean</i>	<i>SD</i>
Patients' age (years)	195	50.2	13.1
Age at diagnosis (years)	195	35.8	11.5
Disease time (years)	195	14.4	8.1
Controls' age (years)	122	48.3	15.1
Malar rash	102/195 (52.3)		
Discoid rash	31/195 (15.9)		
Photosensitivity	162/195 (83.1)		
Oral ulcers	68/195 (34.9)		
Arthritis	166/195 (85.1)		
Serositis	57/195 (29.2)		
Nephritis	72/195 (36.9)		
Neurologic disorders	22/195 (11.3)		
Hematologic disorders	147/195 (75.4)		
Hemolytic anemia	60/195 (30.8)		
Leukopenia/ Lymphopenia	111/195 (56.9)		
Thrombocytopenia	35/195 (17.9)		
Immunologic disorders	131/194 (67.5)		
Anti-DNA	85/194 (43.8)		
Anti-Sm	38/194 (19.6)		
Anticardiolipin	55/194 (28.4)		

Lupic Anticoagulant	14/194 (7.2)			
false positive VDRL	11/194 (5.7)			
Anti-Ro	73/178 (41.0)			
Anti-La	23/178 (12.9)			
Anti-RNP	60/178 (33.7)			
Anti-Scl70	5/178 (2.8)			
ANA	193/194 (99.5)			
Sjögren	(11.1)			
SLEDAI	168	1.0 ^a	0, 4.0 ^b	
SLICC	187	1.0 ^a	0, 2.0 ^b	

^aMedian ^bPercentiles 25, 75 ¹number of patients with the feature/total analyzed

Abbreviations:; VDRL = Venereal Disease Research Laboratory test; RNP = Ribonucleoprotein; ANA = Antinuclear antibody; SLEDAI = Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index; SLICC = Systemic Lupus International Collaborating Clinics.

Table 2: HLA-G genotype frequencies in patients and comparison with controls

	<i>Patients</i>	<i>Controls</i>	<i>Odds Ratio</i>	<i>P</i>
--	-----------------	-----------------	-------------------	----------

	<i>N (frequency)</i>	<i>N (frequency)</i>	<i>(95% CI)</i>	<i>(allele)</i>
14 bp (n=193)				
Del/del	51 (0.26)	40 (0.33)	0.71 (0.42-1.21) ^a	
Ins/del	114 (0.59)	60 (0.50)		
Ins/ins	28 (0.15)	21 (0.17)		
Del	216 (0.56)	140 (0.58)		NS
Ins	170 (0.44)	102 (0.42)		
+3142 (n=192)				
GG	61 (0.32)	24 (0.20)	1.90 (1.08-3.42)^b	
CG	100 (0.52)	67 (0.55)		
CC	31 (0.16)	31 (0.25)		
G	222 (0.58)	115 (0.47)		0.011
C	162 (0.42)	129 (0.53)		

^aDel/Del as risk genotype ^b GG as risk genotype

Table 3: HLA-G haplotype estimated frequencies.

<i>Haplotype</i>	<i>Patients</i>	<i>Controls</i>	<i>Residuals (P)^e</i>	
del/C	157 (0.40)	127 (0.51)	-2.67 (0.007)	0.0019
del/G	64 (0.16)	18 (0.07)	3.38 (<0.001)	
ins/C	8 (0.02)	5 (0,02)	0.04 (0.97)	
ins/G	163 (0,42)	100 (0,40)	0.40 (0.61)	

^e Of patients in relation to controls.

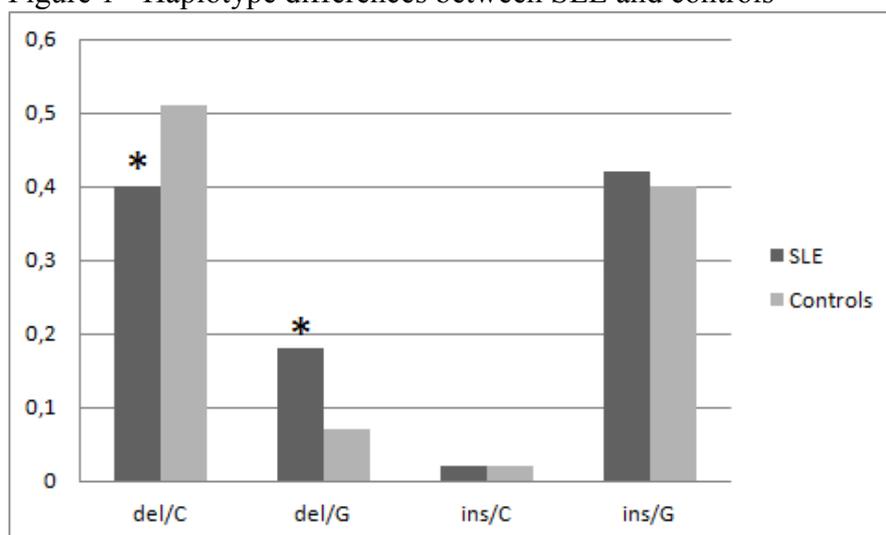
Table 4 – Genotype and first SLEDAI index in SLE patients

	<i>Mean (SD)</i>	<i>Mean Rank</i>	<i>P</i>	<i>P_{corr}</i>
14pb				
ins/ins	3.39±4.18	94.57	0.053 ^a	0.212
ins/del	2.11±3.48	74.05		
del/del	2.96±3.66	88.11		
+3142				
C/C	3.00±3.83	90.46	0.026 ^a	0.104

C/G	1.85±3.01	73.41		
G/G	3.44±4.20	92.89		
Ins/ins or G/G	3.44±4.09	90.71	0.024 ^b	0.096
Other	2.06±3.31	74.49		
Double hetero	1.56±2.91	67.42	0.011 ^a	0.044
Single hetero	3.15±3.90	84.88		
Other	3.26±4.00	90.67		

^a Kruskal-Wallis test ^b Mann-Whitney test

Figure 1 - Haplotype differences between SLE and controls



*P=0.0019

V. Conclusão e Perspectivas

No presente estudo, foi possível observar diferenças nas frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas dos dois polimorfismos na região 3'UTR entre pacientes LES e controles, com ênfase na frequência aumentada do alelo G, do genótipo GG e do haplótipo del/G, sugerindo o papel do gene HLA-G na susceptibilidade ao LES. Também foi verificado que pacientes duplo heterozigotos apresentaram menores *scores* da atividade da doença, o que reforça dados encontrados na literatura nos quais a molécula HLA-G também parece exercer influência na morbidade associada à doença.

Não se pode ignorar o fato de que é possível que outros *loci* estejam em desequilíbrio de ligação com os polimorfismos analisados. Entretanto, os dados deste trabalho sustentam a idéia de um papel da molécula HLA-G na etiopatologia de LES. Contudo, deve se ressaltar a importância de mais estudos para o esclarecimento dos mecanismos através dos quais esta molécula influencia a susceptibilidade e morbidade associada ao LES.

Entre as perspectivas deste trabalho, destaca-se fazer uma análise dos níveis de HLA-G e da expressão de microRNAs nos pacientes com LES para que, desta forma, o possível papel dos polimorfismos da 3'UTR seja elucidado.

VI. Bibliografia Referente à Introdução

1. Criswell LA. The genetic contribution to systemic lupus erythematosus. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* 2008;**66**:176-83.
2. Lawrence RC, Helmick CG, Arnett FC, et al. Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. *Arthritis Rheum.* 1998;**41**:778-99.
3. McCarty DJ, Manzi S, Medsger TA, Jr., Ramsey-Goldman R, LaPorte RE, Kwok CK. Incidence of systemic lupus erythematosus. Race and gender differences. *Arthritis Rheum.* 1995;**38**:1260-70.
4. Lau CS, Yin G, Mok MY. Ethnic and geographical differences in systemic lupus erythematosus: an overview. *Lupus.* 2006;**15**:715-9.
5. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Robbins SL, Cotran RS. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease.* 7th ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders, 2005.

6. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA, Kuby J. *Kuby immunology*. 6th ed. New York: W.H. Freeman, 2007.
7. Linker-Israeli M, Deans RJ, Wallace DJ, Prehn J, Ozeri-Chen T, Klinenberg JR. Elevated levels of endogenous IL-6 in systemic lupus erythematosus. A putative role in pathogenesis. *J Immunol*. 1991;**147**:117-23.
8. Linker-Israeli M, Quismorio FP, Jr., Horwitz DA. CD8+ lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus sustain, rather than suppress, spontaneous polyclonal IgG production and synergize with CD4+ cells to support autoantibody synthesis. *Arthritis Rheum*. 1990;**33**:1216-25.
9. Lauwerys BR, Houssiau FA. Cytokines: clues to the pathogenesis of SLE. *Lupus*. 1998;**7**:211-3.
10. Warrington RJ. Interleukin-2 abnormalities in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. A role for overproduction of interleukin-2 in human autoimmunity? *J Rheumatol*. 1988;**15**:616-20.
11. Horwitz DA, Wang H, Gray JD. Cytokine gene profile in circulating blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus: increased interleukin-2 but not interleukin-4 mRNA. *Lupus*. 1994;**3**:423-8.
12. Llorente L, Richaud-Patin Y, Wijdenes J, et al. Spontaneous production of interleukin-10 by B lymphocytes and monocytes in systemic lupus erythematosus. *Eur Cytokine Netw*. 1993;**4**:421-7.
13. Grondal G, Gunnarsson I, Ronnelid J, Rogberg S, Klareskog L, Lundberg I. Cytokine production, serum levels and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol*. 2000;**18**:565-70.
14. Nagata S, Hanayama R, Kawane K. Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell*. 2010;**140**:619-30.
15. Kiss E, Csipo I, Cohen JH, Reveil B, Kawai M, Szegedi G. CR1 density polymorphism and expression on erythrocytes of patients with systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*. 1996;**25**:53-8.
16. Dijkstra-Hoogkamporen HM, Bijl M, Fijnheer R, et al. Fcγ receptor polymorphisms in systemic lupus erythematosus: association with disease and in vivo clearance of immune complexes. *Arthritis Rheum*. 2000;**43**:2793-800.
17. Herrmann M, Voll RE, Zoller OM, Hagenhofer M, Ponner BB, Kalden JR. Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1998;**41**:1241-50.
18. Courtney PA, Crockard AD, Williamson K, McConnell J, Kennedy RJ, Bell AL. Lymphocyte apoptosis in systemic lupus erythematosus: relationships with Fas expression, serum soluble Fas and disease activity. *Lupus*. 1999;**8**:508-13.
19. Mok CC, Lau CS. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol*. 2003;**56**:481-90.
20. Bootsma H, Spronk P, Derksen R, et al. Prevention of relapses in systemic lupus erythematosus. *Lancet*. 1995;**345**:1595-9.
21. van Bruggen MC, Kramers C, Walgreen B, et al. Nucleosomes and histones are present in glomerular deposits in human lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant*. 1997;**12**:57-66.
22. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1997;**40**:1725.
23. Salzman BE, Nevin JE, Newman JH. A primary care approach to the use and interpretation of common rheumatologic tests. *Clinics in Family Practice*. 2005;**7**:335-58.
24. Costenbader KH, Feskanich D, Stampfer MJ, Karlson EW. Reproductive and menopausal factors and risk of systemic lupus erythematosus in women. *Arthritis Rheum*. 2007;**56**:1251-62.

25. Bruce IN, Laskin CA. Sex hormones in systemic lupus erythematosus: a controversy for modern times. *J Rheumatol*. 1997;**24**:1461-3.
26. Lahita RG, Bradlow HL, Kunkel HG, Fishman J. Alterations of estrogen metabolism in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1979;**22**:1195-8.
27. Jungers P, Nahoul K, Pelissier C, Dougados M, Tron F, Bach JF. Low plasma androgens in women with active or quiescent systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1982;**25**:454-7.
28. Lahita RG, Bradlow HL, Ginzler E, Pang S, New M. Low plasma androgens in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1987;**30**:241-8.
29. Mok CC, Lau CS. Profile of sex hormones in male patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2000;**9**:252-7.
30. Stoegeger ZM, Chiorazzi N, Lahita RG. Regulation of the immune response by sex hormones. I. In vitro effects of estradiol and testosterone on pokeweed mitogen-induced human B cell differentiation. *J Immunol*. 1988;**141**:91-8.
31. Suzuki T, Suzuki N, Engleman EG, Mizushima Y, Sakane T. Low serum levels of dehydroepiandrosterone may cause deficient IL-2 production by lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Exp Immunol*. 1995;**99**:251-5.
32. Saha S, Tieng A, Pepeljugoski KP, Zandamn-Goddard G, Peeva E. Prolactin, Systemic Lupus Erythematosus, and Autoreactive B Cells: Lessons Learnt from Murine Models. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2009. doi: 10.1007/s12016-009-8182-6.
33. Gutierrez MA, Garcia ME, Rodriguez JA, Rivero S, Jacobelli S. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and prolactin secretion in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 1998;**7**:404-8.
34. Koller MD, Templ E, Riedl M, et al. Pituitary function in patients with newly diagnosed untreated systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2004;**63**:1677-80.
35. Herrmann M, Hagenhofer M, Kalden JR. Retroviruses and systemic lupus erythematosus. *Immunol Rev*. 1996;**152**:145-56.
36. Alexander NJ, Smythe NL, Jokinen MP. The type of dietary fat affects the severity of autoimmune disease in NZB/NZW mice. *Am J Pathol*. 1987;**127**:106-21.
37. Adams LE, Mongey AB. Role of genetic factors in drug-related autoimmunity. *Lupus*. 1994;**3**:443-7.
38. Furukawa F, Kashihara-Sawami M, Lyons MB, Norris DA. Binding of antibodies to the extractable nuclear antigens SS-A/Ro and SS-B/La is induced on the surface of human keratinocytes by ultraviolet light (UVL): implications for the pathogenesis of photosensitive cutaneous lupus. *J Invest Dermatol*. 1990;**94**:77-85.
39. Casciola-Rosen L, Rosen A. Ultraviolet light-induced keratinocyte apoptosis: a potential mechanism for the induction of skin lesions and autoantibody production in LE. *Lupus*. 1997;**6**:175-80.
40. Wakeland EK, Wandstrat AE, Liu K, Morel L. Genetic dissection of systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Immunol*. 1999;**11**:701-7.
41. Perdriger A, Werner-Leyval S, Rollot-Elamrani K. The genetic basis for systemic lupus erythematosus. *Joint Bone Spine*. 2003;**70**:103-8.
42. Wakeland EK, Liu K, Graham RR, Behrens TW. Delineating the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Immunity*. 2001;**15**:397-408.
43. Tsao BP, Grossman JM. Genetics and systemic lupus erythematosus. *Curr Rheumatol Rep*. 2001;**3**:183-90.
44. Stone NM, Williams A, Wilkinson JD, Bird G. Systemic lupus erythematosus with C1q deficiency. *Br J Dermatol*. 2000;**142**:521-4.
45. Ahmed S, Ihara K, Kanemitsu S, et al. Association of CTLA-4 but not CD28 gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus in the Japanese population. *Rheumatology (Oxford)*. 2001;**40**:662-7.

46. Ulker M, Yazisiz V, Sallakci N, et al. CTLA-4 gene polymorphism of exon 1(+49 A/G) in Turkish systemic lupus erythematosus patients. *Int J Immunogenet.* 2009;**36**:245-50.
47. Chua KH, Pua SM, Chew CH, Tan SY, Lian LH. Study of the CTLA-4 gene polymorphisms in systemic lupus erythematosus (SLE) samples from Malaysia. *Ann Hum Biol.* **37**:274-80.
48. Salmon JE, Millard S, Schachter LA, et al. Fc gamma RIIA alleles are heritable risk factors for lupus nephritis in African Americans. *J Clin Invest.* 1996;**97**:1348-54.
49. Dausset J. [Iso-leuko-antibodies.]. *Acta Haematol.* 1958;**20**:156-66.
50. Ishitani A, Sageshima N, Lee N, et al. Protein expression and peptide binding suggest unique and interacting functional roles for HLA-E, F, and G in maternal-placental immune recognition. *J Immunol.* 2003;**171**:1376-84.
51. Carosella ED, Moreau P, Le Maoult J, Le Discorde M, Dausset J, Rouas-Freiss N. HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. *Adv Immunol.* 2003;**81**:199-252.
52. Lila N, Carpentier A, Amrein C, Khalil-Daher I, Dausset J, Carosella ED. Implication of HLA-G molecule in heart-graft acceptance. *Lancet.* 2000;**355**:2138.
53. Morales PJ, Pace JL, Platt JS, et al. Placental cell expression of HLA-G2 isoforms is limited to the invasive trophoblast phenotype. *J Immunol.* 2003;**171**:6215-24.
54. Ellis SA, Palmer MS, McMichael AJ. Human trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA Class I molecule. *J Immunol.* 1990;**144**:731-5.
55. Rouas-Freiss N, Goncalves RM, Menier C, Dausset J, Carosella ED. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;**94**:11520-5.
56. Borges L, Cosman D. LIRs/ILTs/MIRs, inhibitory and stimulatory Ig-superfamily receptors expressed in myeloid and lymphoid cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2000;**11**:209-17.
57. Goodridge JP, Lathbury LJ, Steiner NK, et al. Three common alleles of KIR2DL4 (CD158d) encode constitutively expressed, inducible and secreted receptors in NK cells. *Eur J Immunol.* 2007;**37**:199-211.
58. Contini P, Ghio M, Poggi A, et al. Soluble HLA-A,-B,-C and -G molecules induce apoptosis in T and NK CD8+ cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation. *Eur J Immunol.* 2003;**33**:125-34.
59. Carosella ED, HoWangYin KY, Favier B, LeMaoult J. HLA-G-dependent suppressor cells: Diverse by nature, function, and significance. *Hum Immunol.* 2008;**69**:700-7.
60. LeMaoult J, Caumartin J, Daouya M, et al. Immune regulation by pretenders: cell-to-cell transfers of HLA-G make effector T cells act as regulatory cells. *Blood.* 2007;**109**:2040-8.
61. Veit TD, Vianna P, Chies JAB. HLA-G - From Fetal Tolerance to a Regulatory Molecule in Inflammatory Diseases. *Current Immunology Reviews.* 2010:1-15.
62. Lozano JM, Gonzalez R, Luque J, Frias M, Rivero A, Pena J. CD8(+)/HLA-G(+) regulatory T cells are expanded in HIV-1-infected patients. *Viral Immunol.* 2009;**22**:463-5.
63. Rouas-Freiss N, Moreau P, Ferrone S, Carosella ED. HLA-G proteins in cancer: do they provide tumor cells with an escape mechanism? *Cancer Res.* 2005;**65**:10139-44.
64. Singer G, Rebmann V, Chen YC, et al. HLA-G is a potential tumor marker in malignant ascites. *Clin Cancer Res.* 2003;**9**:4460-4.
65. Naji A, Le Rond S, Durrbach A, et al. CD3+CD4^{low} and CD3+CD8^{low} are induced by HLA-G: novel human peripheral blood suppressor T-cell subsets involved in transplant acceptance. *Blood.* 2007;**110**:3936-48.
66. Mitsdoerffer M, Schreiner B, Kieseier BC, et al. 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.* 2005;**159**:155-64.

67. Verbruggen LA, Rebmann V, Demanet C, De Cock S, Grosse-Wilde H. Soluble HLA-G in rheumatoid arthritis. *Hum Immunol*. 2006;**67**:561-7.
68. Rizzo R, Hviid TV, Govoni M, et al. HLA-G genotype and HLA-G expression in systemic lupus erythematosus: HLA-G as a putative susceptibility gene in systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens*. 2008;**71**:520-9.
69. Solier C, Mallet V, Lenfant F, Bertrand A, Huchenq A, Le Bouteiller P. HLA-G unique promoter region: functional implications. *Immunogenetics*. 2001;**53**:617-25.
70. Tan Z, Shon AM, Ober C. Evidence of balancing selection at the HLA-G promoter region. *Hum Mol Genet*. 2005;**14**:3619-28.
71. Moreau P, Mouillot G, Rousseau P, Marcou C, Dausset J, Carosella ED. HLA-G gene repression is reversed by demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;**100**:1191-6.
72. Veit TD, Vianna P, Scheibel I, et al. Association of the HLA-G 14-bp insertion/deletion polymorphism with juvenile idiopathic arthritis and rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens*. 2008;**71**:440-6.
73. Lin A, Yan WH, Xu HH, et al. 14 bp deletion polymorphism in the HLA-G gene is a risk factor for idiopathic dilated cardiomyopathy in a Chinese Han population. *Tissue Antigens*. 2007;**70**:427-31.
74. Gazit E, Slomov Y, Goldberg I, Brenner S, Loewenthal R. HLA-G is associated with pemphigus vulgaris in Jewish patients. *Hum Immunol*. 2004;**65**:39-46.
75. Tripathi P, Abbas A, Naik S, Agrawal S. Role of 14-bp deletion in the HLA-G gene in the maintenance of pregnancy. *Tissue Antigens*. 2004;**64**:706-10.
76. Yie SM, Taylor RN, Librach C. Low plasma HLA-G protein concentrations in early gestation indicate the development of preeclampsia later in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2005;**193**:204-8.
77. Hviid TV, Milman N, Hylenius S, Jakobsen K, Jensen MS, Larsen LG. HLA-G polymorphisms and HLA-G expression in sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*. 2006;**23**:30-7.
78. Rosado S, Perez-Chacon G, Mellor-Pita S, et al. Expression of human leukocyte antigen-G in systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol*. 2008;**69**:9-15.
79. Veit TD, Cordero EA, Mucenic T, et al. Association of the HLA-G 14 bp polymorphism with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2009;**18**:424-30.
80. Rousseau P, Le Discorde M, Mouillot G, Marcou C, Carosella ED, Moreau P. The 14 bp deletion-insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. *Hum Immunol*. 2003;**64**:1005-10.
81. Hviid TV, Hylenius S, Rorbye C, Nielsen LG. HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels. *Immunogenetics*. 2003;**55**:63-79.
82. Veit TD, Chies JA. Tolerance versus immune response -- microRNAs as important elements in the regulation of the HLA-G gene expression. *Transpl Immunol*. 2009;**20**:229-31.
83. Tan Z, Randall G, Fan J, et al. Allele-specific targeting of microRNAs to HLA-G and risk of asthma. *Am J Hum Genet*. 2007;**81**:829-34.

VII. Anexo I - Protocolo de Acompanhamento de LES

**PROTOCOLO DE ACOMPANHAMENTO DO AMBULATÓRIO DE LÚPUS
ERITEMATOSO SISTÊMICO**

IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____

Registro: _____

Pesquisador: _____ DATA: _____

MEDICAMENTO	DOSE ATUAL
AINEs	
Prednisona	

