

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 22/02/2017.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Andréia da Silva Souza

**Análise do polimorfismo da região 3' não traduzida
(3'NT) do gene *HLA-G* de pacientes com esclerose
múltipla e neuromielite óptica da região noroeste do
estado de São Paulo**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de Mestra
em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Doralina Guimarães Brum Souza

**Botucatu
2016**

Andréia da Silva Souza

Análise do polimorfismo da região 3' não traduzida (3'NT) do gene *HLA-G* de pacientes com esclerose múltipla e neuromielite óptica da região noroeste do estado de São Paulo

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Doralina Guimarães Brum Souza

Botucatu
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Souza, Andréia da Silva.

Análise do polimorfismo da região 3' não traduzida (3'NT) do gene *HLA-G* de pacientes com esclerose múltipla e neuromielite óptica da região noroeste do estado de São Paulo / Andréia da Silva Souza. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Doralina Guimarães Brum Souza
Capes: 21103003

1. Esclerose múltipla. 2. Polimorfismo (Genética). 3. Neuromielite óptica. 4. Antígenos de histocompatibilidade HLA.

Palavras-chave: 3'NT; Esclerose múltipla; HLA-G; Neuromielite óptica.

Andreia da Silva Souza

Análise do polimorfismo da região 3' não traduzida (3'NT) do gene *HLA-G* de pacientes com esclerose múltipla e neuromielite óptica da região noroeste do estado de São Paulo

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de mestra em patologia.

Orientador: Profa. Dra. Doralina Guimarães Brum Souza

Comissão examinadora

Profa. Dra. Doralina Guimarães Brum Souza
Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Prof. Dr. Celso Teixeira Mendes-Junior
Universidade de São Paulo (USP)

Prof. Dr. Erick C. Castelli
Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Botucatu, 22 de fevereiro de 2016

Dedicatória

Dedico este trabalho...

Aos meus pais Antônio e Lourdes que são meu porto seguro, meus presentes do céu e a razão de cada luta. A eles que comigo suportaram a distância e a saudade e que sempre têm as melhores palavras para me ajudar a seguir em frente. A eles que são meus maiores exemplos honradez, coragem e persistência. Obrigada por toda dedicação e amor.

Agradecimentos

- ❖ *Agradeço primeiramente a **Deus** pela sua constante presença em minha vida, pela força e pelo colo de Pai. De fato, não estaria distante de minha vida acadêmica o autor de toda ciência.*
- ❖ *Aos meus pais **Antônio** e **Lourdes** pelo apoio incondicional em todos os momentos.*
- ❖ *Aos familiares e amigos que mesmo distantes estão sempre torcendo e ajudando na minha caminhada.*
- ❖ *Ao meu quarteto preferido e único no mundo: **Sônia Regina**, **Emanuelle Priscilla**, **Dany Cleudy** e **Thaís Alencar**. Mesmo com toda distância física, a amizade, o apoio e o carinho de vocês foram fundamentais nos momentos difíceis.*
- ❖ *À minha amiga de todas as horas **Paula Mikaela**, pelas risadas, pelos ouvidos, pelo ombro amigo, mas principalmente pela amizade que é um verdadeiro presente de Deus.*
- ❖ *Às minhas companheiras de casa e amigas **Kelly Nunes**, **Ana Emília** e **Alaine Patrícia** pela oportunidade de dividirmos um **lar**, por terem tornado a saudade da família suportável. Muito obrigada.*
- ❖ *Às minhas amigas **Renata Brant**, **Luana Vilela**, **Thálitta Ayala** e **Iane Porto** pelos conselhos, ensinamentos e companheirismo.*
- ❖ *Aos amigos mais que especiais **Breno Kennedy**, **Marlon Jocimar**, **Rosemary Cristina** e **Luciana Pizzani** por estarem sempre ao meu lado, pelo apoio e por serem como luzes, me fazendo enxergar sempre o lado bom de tudo.*
- ❖ *À **Vânia Soler**, secretária da Pós-graduação em Patologia, pela disponibilidade em ajudar sempre que precisei.*
- ❖ *Ao prof^o Dr.^o **Erick Castelli** por contribuir com o meu aprendizado durante a realização deste trabalho e ter gentilmente cedido um espaço em seu*

laboratório para realização de experimentos.

- ❖ *Aos professores Dr.º Eduardo A. Donadi e Dr.º Amilton Antunes pelas sugestões e contribuição no meu Exame de Qualificação.*
- ❖ *À minha orientadora Prof.ª Dr.ª Doralina Guimarães Brum por acreditar em mim, por todo conhecimento transmitido, pelos conselhos, pelo apoio, e por fazer com que esse trabalho fosse possível. Obrigada por ensinar muito do que hoje eu sei.*
- ❖ *E a todos que fizeram parte dessa caminhada: muito obrigada!*

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	8
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
CAPÍTULO I-REVISÃO DE LITERATURA.....	12
Introdução.....	13
Esclerose múltipla.....	13
Neuromielite óptica.....	15
CPH e tolerância imunológica.....	17
HLA-G.....	18
Região 3'NT do gene HLA-G.....	20
Referências bibliográficas.....	25
OBJETIVOS	38
1. Objetivo geral.....	39
2. Objetivos específicos.....	39
CAPÍTULO II-ARTIGO	40
Abstract	42
Introduction	43
Materials and methods	45
Results	47
Discussion	50
Conclusion	53
Tables and figures	54
References	61
ANEXO.....	69

Lista de Abreviaturas e Siglas

AIM	Marcador informativo de ancestralidade (do inglês, <i>Ancestry Informative Markers</i>)
APC	Célula apresentadora de antígeno (do inglês, <i>antigen presenting cell</i>)
AQP	Aquaporina
AR	Artrite reumatoide
CCR5	Receptor de quimiocinas CC tipo 5 (do inglês, <i>C-C chemokine receptor type 5</i>)
CPH	Complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês, <i>major histocompatibility complex</i>)
EAE	Encefalomielite experimental autoimune (EAE, do inglês, <i>experimental autoimmune encephalomyelitis</i>)
EDSS	Escala de Incapacidade Funcional (do inglês, <i>expanded disability status scale</i>)
EM	Esclerose múltipla
EMPP	Esclerose múltipla primária-progressiva
EMRR	Esclerose múltipla recorrente-remitente
EMSP	Esclerose múltipla secundária-progressiva
HLA	Antígeno leucocitário humano (do inglês, <i>human leukocyte antigens</i>)
IC	Intervalo de confiança
IFN	Interferon
IL	Interleucina
LD	Desequilíbrio de ligação (<i>LD – Linkage disequilibrium</i>)
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
Mb	Megabases (10^6 bases)
mL	Mililitro (10^{-3} Litro)
MOG	Glicoproteína da mielina do oligodendrócito (do inglês, <i>myelin oligodendrocyte glycoprotein</i>)
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro ou RNA mensageiro
MTLE	Mielite transversal longitudinal extensa
MTP	Metilprednisolona
Ng	Nanograma (10^{-9} gramas)
NK	Célula assassina natural (do inglês, <i>natural killer</i>)
NMO	Neuromielite óptica
NMOSD	Desordens do espectro de NMO (do inglês, <i>neuromyelitis optica spectrum disorder</i>)

NO	Neurite óptica
NT	Não traduzida
Pb	Pares de bases
PBM	Proteína básica de mielina
PF	Plasmaférese
PLP	Proteína proteolipídica
RM	Ressonância magnética
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Polimorfismo de base única (do inglês, <i>single nucleotide polymorphism</i>)
TCR	Receptor de célula T
Th	Linfócito T auxiliar (do inglês, <i>T helper</i>)
TNF	Fator de necrose tumoral
UTR	Região não traduzida (do inglês, <i>untranslated region</i>)

RESUMO

A esclerose múltipla (EM) e as desordens do espectro de neuromielite óptica (NMOSD) são doenças inflamatórias autoimunes com predileção pelo sistema nervoso central, sendo que a EM ocorre mais frequentemente em populações caucasianas, enquanto a NMO é mais frequente em indivíduos não caucasianos. O gene *HLA-G* codifica uma molécula com um importante papel na tolerância imunológica. Essa molécula foi primeiramente descrita na interface materno-fetal, onde foi associada ao sucesso da gravidez. Além disso, a expressão da molécula de HLA-G tem sido relatada em condições patológicas como câncer, infecções virais e doenças autoimunes, incluindo EM. O nível de expressão de HLA-G depende principalmente de fatores que modulam sua expressão transcricional e pós-transcricional, tais como a região *3' não traduzida (3'NT)* do gene através da manutenção da estabilidade do mRNA e da interação com microRNAs específicos. Alguns haplótipos de *3'NT* foram associados a maior expressão de HLA-G, o que seria benéfico em desordens autoimunes. O objetivo deste estudo foi analisar os sítios polimórficos da região *3'NT* do gene *HLA-G* de pacientes com EM e NMOSD. A região *3'NT* do gene *HLA-G* de 105 pacientes com EM, 54 pacientes NMOSD e 108 controles, foi sequenciada através do método Sanger. Foram identificados 10 sítios de variações, incluindo *14pb indel +3001C/T, +3003T/C, +3010G/C, +3027C/A, +3035C/T, +3142C/G, +3187G/A, +3196C/G, +3227G/A*. Não foi encontrada qualquer associação desses alelos à EM quando comparada a controles saudáveis ou a NMOSD. Porém, comparado a controles, o alelo *+3187A* apareceu em maior frequência no grupo NMOSD e conseqüentemente o alelo *+3187G* e *UTR-1 (DelCTGCCCCGCG)*, único haplótipo que carrega esse alelo, foram sub-representados nesse grupo, particularmente no grupo de pacientes soropositivos para anticorpos anti-AQP4. Por outro lado, o grupo de pacientes NMOSD soronegativos para anti-AQP4 apresentou maior frequência de *UTR-6 (DelCTGCCCACG)* quando comparado a controles saudáveis. Considerando que: i) o alelo *+3187A* está associado a menor expressão de HLA-G e ii) o alelo *+3187A* e o genótipo *+3187AA* são mais frequentes no grupo NMOSD, principalmente nos pacientes anti-AQP4 positivos, a baixa expressão de HLA-G poderia estar contribuindo para a quebra da tolerância imunológica na patogenia de NMOSD.

Palavras-chaves: *HLA-G, 3'NT, UTR-1, +3187A*, esclerose múltipla, neuromielite óptica.

ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) and neuromyelitis optica spectrum disorders (NMOSD) are autoimmune inflammatory diseases with predilection for the central nervous system, and the MS occurs most frequently in Caucasian populations, while NMOSD is more frequent in non-Caucasian individuals. A key feature of MS and NMOSD is the breakdown of immunological tolerance. *Human leukocyte antigen G (HLA-G)* gene encodes a nonclassical HLA class I molecule that plays a pivotal role in immune tolerance, inhibiting different cell subsets involved in innate and adaptive immunity and autoimmune responses. Constitutive expression of HLA-G has been primarily observed in placenta, and ectopic expression been observed in cancer, allografts and autoimmune disorders. As a corollary, HLA-G expression is expected to be advantageous in autoimmune disorders. The regulation of the *HLA-G* gene may depend on transcriptional and posttranscriptional regulatory elements, such as *HLA-G* 3' untranslated region (UTR) by maintaining mRNA stability and interaction with specific microRNAs. The aim of this study was to verify polymorphic sites at *HLA-G* 3'UTR in MS and NMOSD patients. *HLA-G* 3'UTR of Brazilian patients with MS ($n=105$), NMO ($n=54$) and in healthy individuals ($n=108$) was typed using Sanger method. Ten variation sites were observed, including the *14bp indel +3001C/T,+3003T/C, +3010G/C,+3027C/A, +3035C/T, +3142C/G, +3187G/A, +3196C/G, +3227G/A*. *HLA-G* 3'UTR allele, genotype and haplotype frequencies showed no differences after comparison of MS with controls and MS with NMOSD were closely similar. Compared to controls; i) the *+3187A* allele was overrepresented and UTR-1(*DelCTGCCCCGCG*) that contains *+3187G* was underrepresented in NMOSD patients; ii) *+3187A* and *+3187AA* were overrepresented, whereas UTR-1(*DelCTGCCCCGCG*) was underrepresented in NMO AQP4+ patients, and iii) the UTR-6 (*DelCTGCCCACG*) was overrepresented in NMO AQP4- patients. *HLA-G* 3'UTR polymorphic sites are differentially associated with neuromyelitis optica and multiple sclerosis further corroborating that NMO and MS are distinct diseases. Considering that: i) the *+3187A* allele has been associated with decreased expression of HLA-G, ii) the *+3187A* allele and *AA* genotype were overrepresented in NMOSD patients, particularly in those exhibiting AQP4 antibodies (AQP4 group), a low HLA-G expression may contribute to breakdown of immune tolerance in the pathogenesis of NMOSD.

Keywords: *HLA-G, 3'UTR, UTR-1, +3187A, multiple sclerosis, neuromyelitis optica*

Capítulo I - Revisão de Literatura

INTRODUÇÃO

As doenças desmielinizantes inflamatórias do sistema nervoso central (SNC) são as principais causas de incapacidade neurológica não traumática em adultos jovens em todo o mundo. Esclerose múltipla (EM) e neuromielite óptica (NMO) são as principais doenças inflamatórias desmielinizantes, autoimunes restritas ao SNC (1).

Esclerose múltipla

A EM é a doença desmielinizante mais comum do SNC. Estudos de prevalência mostram que EM afeta aproximadamente 2,3 milhões de jovens adultos em todo o mundo, é duas vezes mais frequente em mulheres e têm maior prevalência em populações caucasianas (2). Por afetar adultos jovens, com início entre 20 e 40 anos, e ser uma doença incapacitante, gerando déficits sensoriais, motores, autonômicos e de funções cognitivas, a EM tem uma relevante importância socioeconômica (3,4).

A prevalência difere conforme a região geográfica no globo, aumentando com o distanciamento da linha do equador em ambos os hemisférios (5). Europa e América do Norte têm as maiores prevalências (140 e 108 por 100.000, respectivamente), enquanto África Subsaariana e Ásia Oriental, as menores (2,1 e 2,2 por 100.000, respectivamente) (2). No Brasil, a prevalência de EM é igualmente variável, a menor frequência é encontrada no Nordeste brasileiro (1,36/100.000) e as maiores nas regiões Sudeste e Sul, com 15 a 18/100.000 e 27,2/100.000, respectivamente (6–9).

A doença pode apresentar diferentes formas clínicas. Aproximadamente 85% dos pacientes com EM apresentam a forma recorrente-remitente (EMRR), caracterizada por exacerbações clínicas com diminuição da capacidade funcional do paciente, seguidas por recuperação total ou parcial. Em torno de 50% dos pacientes com EMRR converte em secundária-progressiva (EMSP) após 10 anos de evolução, que é caracterizada por uma história de piora gradual com ou sem exacerbações agudas. O terceiro tipo, primária-progressiva (EMPP) é caracterizado por progressão contínua da incapacidade do paciente desde o início da doença com acúmulo progressivo de déficits neurológicos (10–12).

A incapacidade funcional resultante dos diversos surtos (piora neurológica) ou atividade inflamatória silenciosa é acumulada ao longo dos anos de evolução e mensurada pela Escala Expandida do Estado de Incapacidade de Kurtzke (*EDSS, do inglês, Expanded Disability Scale Score*). Essa varia de 0 a 10, sendo zero caracterizado pela ausência de sinais

e sintomas neurológicos; de 1,0 a 2,5, por incapacidade leve; de 3,0 a 4,5, por incapacidade moderada; $\geq 5,0$ por incapacidade grave, particularmente pelo déficit de marcha; e 10, óbito pela doença (13).

O diagnóstico é essencialmente por exclusão de diagnósticos alternativos, sendo atualmente utilizados os critérios de McDonald e revisões, que estabelecem o diagnóstico com base na demonstração objetiva de disseminação de lesões no espaço e no tempo por motivos clínicos, isoladamente, ou por cuidadosa e padronizada integração de achados clínicos, de ressonância magnética (RM) e laboratorial (análise do líquido) (14–16).

A etiologia da doença não é conhecida. Porém, há evidências que fatores ambientais e genéticos podem contribuir para o seu desenvolvimento. Estudos familiares sistematizados evidenciam risco diferencial para consaguíneos não gêmeos (1,9%), gêmeos dizigóticos (1,7-2,3%) e monozigóticos (15-25%) que enfatiza o papel genético na doença (17,18). Aproximadamente 100 genes já apresentaram associação com a EM, muitos deles relacionados à resposta imune, tais como, apresentação de antígenos, transdução de sinais, citocinas (IL-10 e IFN- γ) e receptores (receptor α de IL-4 e receptor β de IL-2), receptores de quimiocinas (CCR5), vitamina D e estrógenos (3,19). Porém, genes do complexo principal de histocompatibilidade (CPH ou MHC, do inglês *major histocompatibility complex*), localizados no cromossomo 6, principalmente os antígenos leucocitários humanos (HLA, do inglês *human leucocytes antigens*), têm sido os mais robustamente associados a EM há mais de 40 anos. Os alelos classe II, *HLA-DRB1*15:01*, *HLA-DRB1*13:03*, *HLA-DRB1*03:01*, *HLA-DRB1*08:01* e *HLA-DQB1*03:02* têm sido associado à susceptibilidade, enquanto alguns alelos de HLA de classe I relacionados à proteção, entre eles, *HLA-A*02:01*, *HLA-B*44:02*, *HLA-B*38:01* e *HLA-B*55:01* (20).

A neuropatologia das lesões na EM caracteriza-se por inflamação, desmielinização, dano axonal e gliose (21). O principal mecanismo é a imunomediação celular por linfócitos T CD4+, mas linfócitos T CD8+, células NK (do inglês, *Natural Killer*), macrófagos, linfócitos B, anticorpos e moléculas do sistema complemento também contribuem para a patogenia da EM (3,12,22). A encefalomielite experimental autoimune (EAE, do inglês, *experimental autoimmune encephalomyelitis*), modelo animal da EM, pode ser induzida em camundongos, ratos e cobaias pela inoculação de componentes da bainha de mielina do SNC, tais como proteína básica da mielina (PBM), proteína proteolipídica (PLP) e glicoproteína da mielina do oligodendrócito (MOG) (23) e se desenvolve em uma a duas semanas após a inoculação do antígeno (23). Ativação de células TCD4+ auto-reativas, expansão clonal, diferenciação em

células *Th1* (linfócitos T auxiliares 1 – do inglês, *T helper*) e transmigração através da barreira hematoencefálica são etapas cruciais para o mecanismo inicial da EAE (23).

Apesar da predominância do perfil de resposta celular (*Th1* e *Th17*) apontado pela EAE (24–26), achados de biópsia e necropsia de pacientes com EM evidenciam heterogeneidade nos mecanismos da patogenia da doença, com quatro subtipos histopatológicos - I, II, III e IV (22). O mecanismo mediado por célula T, subtipo histopatológico I, é o predominante na EM. Porém, a deposição de imunocomplexos nas placas de lesões ativas, particularmente do padrão histológico tipo II, demonstra que a participação das células B é relevante (22). O papel das oligoclonais IgG no líquido de mais de 95% dos pacientes caucasianos não foi especificado (27) e ainda necessita de esclarecimentos. Adicionalmente, pessoas saudáveis apresentam anticorpo anti-PBM (28,29). Portanto, não há um biomarcador para a EM (12) e o modelo patogênico considerando T CD4+, isoladamente, não é suficiente para explicar a patogênica da doença (30).

Posto que a etiologia da EM é desconhecida e há evidências que o mecanismo patogênico é inflamatório, o tratamento baseia-se na redução da atividade inflamatória durante os surtos, com o uso dos corticóides, e na prevenção de novos surtos com o uso de imunomoduladores (31–33).

Neuromielite óptica

A NMO ou doença de Devic é uma doença inflamatória desmielinizante do SNC com uma particular predileção pelo nervo óptico e medula espinhal (34). Por mais de um século, essa doença foi considerada uma variante da EM devido as suas características clínicas em comum, como a manifestação de neurite óptica e mielite (35,36). Em 2004, a descoberta do anticorpo anti-AQP4 (NMO-IgG), que evidenciou 91% de especificidade para a NMO, foi um marco na diferenciação dessas duas doenças (37). Portanto, o anticorpo anti-AQP4 é o primeiro biomarcador nas doenças desmielinizantes.

Estudos de prevalência de NMO ainda são escassos, mas alguns estudos populacionais mostraram prevalência de 0,52 a 4,4 por 100.000 habitantes (38–41). Apesar da baixa prevalência, casos já foram relatados em diversas populações em todos os continentes (34,42–44). A NMO representa 15% a 48% das desordens inflamatórias desmielinizantes do SNC em populações não caucasianas, como asiáticas (20% a 48%) e brasileiros (15%), diferentemente da EM que tem sido considerada mais comum em populações caucasianas (45–50). A idade de início varia desde a infância até a idade adulta, incluindo idosos, e a idade média de início

da doença é superior à da EM (51–54). Adicionalmente, a NMO é 3 a 11 vezes mais frequente em mulheres (55).

A NMO pode ser monofásica ou apresentar curso recidivante. Inicialmente, os critérios diagnósticos da NMO consideravam aspectos clínicos e de RM (34). Os critérios diagnósticos revisados após a descoberta do anticorpo anti-AQP4 exigem: a ocorrência de mielite aguda, neurite óptica (NO) e duas das três características seguintes: i) RM do encéfalo não típica da esclerose múltipla; ii) RM da medula espinhal com mielite transversa longitudinal extensa (MTLE) correspondente a, pelo menos, três corpos vertebrais e/ou iii) NMO-IgG (anti-AQP4) reagente (34,56).

Episódios de MTLE com anti-AQP4+ são considerada síndromes de alto risco para conversão a NMO em um ano (57). A importância desse conceito é permitir o tratamento precoce desde o primeiro episódio. Assim, formas clínicas limitadas de NMO, como NO bilateral ou MTLE (eventos únicos ou recorrentes), com soropositividade para anti-AQP4 foram definidas como transtornos do espectro de NMO (NMOSD - *NMO spectrum disorder*) (46). No entanto, devido ao envolvimento mais restrito ou mais extenso do SNC e a um subgrupo de pacientes soronegativos para anti-AQP4, recentemente, uma revisão desses critérios estabeleceu o termo unificador, NMOSD estratificado pelo teste sorológico (NMOSD com ou sem AQP4-IgG) (57).

Pelo menos um terço dos pacientes soronegativos para anti-AQP4 podem apresentar positividade para anticorpos anti-MOG e estes parecem ter características clínicas mais favoráveis do que aqueles com anticorpos anti-AQP4 ou negativos para ambos os anticorpos (58).

A etiologia de NMO não é conhecida. Porém, a descoberta do anticorpo contra a molécula aquaporina 4 (AQP4), canal de água presente nos prolongamentos dos astrócitos (37,59), e a deposição periarteriolar de imunocomplexos nos espaços de Virchow-Robin são pilares da patogenia da doença (60) e respaldam o mecanismo autoimune humoral. Alguns estudos têm sugerido que células T específicas para AQP4 são necessárias para a produção de anti-AQP4 por linfócitos B no compartimento imunológico periférico, bem como para o desenvolvimento de lesões no SNC (61–63). O perfil de resposta *Th2* é sugerido como o predominante (64,65), porém há ainda aumento de células *Th1* e *Th17* no sistema periférico de pacientes com NMO (66,67). Modelos animais da NMO não são ainda bem sucedidos (68).

A coexistência de outras doenças autoimunes – lúpus eritematoso sistêmico (LES) e síndrome de Sjogren, em 20% a 30% dos pacientes com NMO ou apenas dos marcadores laboratoriais dessas doenças (40%), sugerem que os indivíduos acometidos podem ter uma

maior predisposição genética a autoimunidade (69,70). A associação da NMO com genes *HLA* (44,71–73) corroboram esse conceito. Não há estudos familiares metodologicamente adequados na NMO. Porém, análise de 12 famílias com mais de um membro acometido sugere que o fator genético pode ter um papel importante na doença (74).

Ainda não foram realizados estudos clínicos randomizados, controlados, duplo-cegos no tratamento de surto ou prevenção de novos surtos na NMO. Os poucos estudos são restritos à análise de série de casos ou coortes, retrospectivos ou observacionais utilizando metilprednisolona (MTP) e plasmaférese (PF), em surtos não responsivos à MTP. Terapia imunossupressora é prescrita para a prevenção de novos surtos da doença (75,76).

Sumariando, a EM e NMO podem ser consideradas doenças distintas em termos de patogenia, epidemiologia, fatores de risco genéticos e ambientais, manifestações clínicas, laboratoriais, prognóstico e tratamento (77). Porém, ambas apresentam em comum a quebra da tolerância imunológica e associação com genes do CPH.

CPH e Tolerância imunológica

O CPH, localizado no braço curto do cromossomo seis (6p21.3), compreende uma região de aproximadamente 3,6 Mb e é dividido didaticamente em três regiões: as teloméricas classe I e III, e a centromérica classe II, sendo alguns dos genes de classe I e classe II os responsáveis por codificar as moléculas transmembrânicas que realizam a apresentação antigênica, moléculas *HLA* (78,79).

As moléculas *HLA* de classe I são expressas pela maior parte das células nucleadas, embora com níveis de expressão variáveis de acordo com o tecido, e atuam na apresentação de antígenos intracelulares às células T citotóxicas ou CD8 (79,80). Por sua vez, as moléculas de *HLA* de classe II são expressas em subgrupos de células imunológicas e apresentam peptídeos processados de proteínas exógenas pela interação com os receptores de células T auxiliares ou CD4 (79).

A interação entre moléculas de *HLA* associadas a peptídeos e os receptores dos linfócitos T (TCRs) é estabilizada por uma série de moléculas na superfície do linfócito, que sustenta a interação e realiza a transdução de sinal, permitindo ativação e expansão clonal do linfócito e sua ação contra antígenos, geralmente não próprios (81,82).

Além da sua importante contribuição para a resposta imunológica, as moléculas de *HLA* estão diretamente envolvidas na seleção do repertório de células T no timo, cuja falha é um dos principais fatores contribuintes para o desenvolvimento de doenças autoimunes (83). A seleção tímica é realizada de duas formas: na seleção positiva, cujo objetivo é gerar um

repertório de células T capazes de interagir com moléculas de HLA do indivíduo, são selecionados apenas linfócitos cujos TCRs ligam-se, fracamente, a moléculas de HLA; posteriormente, na seleção negativa, onde há presença de moléculas coestimulatórias, a forte afinidade entre HLA/peptídeo-próprio e TCR gera sinalização a apoptose do linfócito, dessa forma são eliminadas as células com capacidade de iniciar uma resposta autorreativa (79,83,84). Alguns linfócitos autorreativos que conseguem entrar em tecidos periféricos precisam ser inativados, suprimidos ou eliminados pela tolerância periférica para não desencadear autoimunidade (83,85).

Dado a importância das moléculas de HLA para a resposta e tolerância imunológica, diversos trabalhos tem mostrado a contribuição de múltiplas variantes destes *loci* em doenças autoimunes, tais como espondilite anquilosante, lúpus eritematoso sistêmico (LES), artrite reumatoide (AR), diabetes tipo 1 (DT1), colite ulcerativa, doença de Crohn e EM (78,86).

Na EM, alguns alelos de *HLA* classe II foram associados a risco, particularmente *HLA-DRB1*15* (20,87–89), destacando-se a maior frequência do alelo *HLA-DRB1*1501* em pacientes brancos e do alelo *HLA-DRB1*1503* em pacientes afrodescendentes (87,90). Enquanto isso, vários estudos têm associado o alelo *HLA-DRB1*03* à NMO (44,72,73).

Outra forma de olhar o cenário de tolerância imunológica tem sido o estudo de genes do MHC de classe I conhecidos como não clássicos ou Ib (*HLA-G*, *-E* e *-F*) que embora semelhantes estruturalmente aos clássicos (*HLA-A*, *-B* e *-C*) são menos polimórficos que estes, e estão envolvidos no processo modulação da resposta imunológica (91). As moléculas codificadas pelos genes *HLA* não clássicos são capazes de desempenhar funções tolerogênicas através de ligações a receptores inibitórios específicos em monócitos, células T, B e NK (92–94).

HLA-G

O gene *HLA-G* codifica a molécula de *HLA* classe Ib cuja as características, funções biológicas e distribuição tecidual estão melhores esclarecidas. Uma das características biológicas da molécula é que existem isoformas ligadas à superfície celular (*HLA-G1*, *-G2*, *-G3* *-G4*) e solúveis (*sHLA-G5*, *-G6* e *-G7*), geradas por edição alternativa (*splicing*) do transcrito primário do RNA mensageiro (mRNA). Adicionalmente, a isoforma *HLA-G1* pode gerar uma forma solúvel através da clivagem por matriz metaloproteinase-2 (MMP-2), produzindo *sHLA-G1* (92,95). As moléculas *sHLA-G1* e *sHLA-G5* possuem estruturas similares.

Ambas as isoformas, sHLA-G ou de membrana exercem funções imunomodulatórias: inibem a atividade citotóxica de células T CD8+ e NK induzindo-as a apoptose (96–98); inibem a proliferação de linfócitos T CD4+ ou os direcionam ao perfil imunossupressor (99,100); inibem células apresentadoras de antígenos (APCs) e ativação de linfócitos B (101,102); induzem células T regulatórias (103) e células dendríticas tolerogênicas (104,105); liberação de interleucina-10 (IL-10) e polarização do perfil de citocinas na resposta imune (106,107).

Apesar do potencial da molécula de HLA-G de induzir a resposta Th2, Kapasi e colaboradores (107) encontraram respostas bifásicas sobre a produção de citocinas TNF- α , IFN- γ (Th1) e IL-10 (Th2) por linfócitos T citotóxicos quando submetidos a variadas concentrações de HLA-G. Em concentrações de HLA-G de ≤ 50 ng / mL, a secreção de TNF- α e IFN- γ aumentou e a de IL-10 foi reduzida, porém, a uma concentração de HLA-G ≥ 100 ng / mL, os níveis dessas citocinas foram invertidos. Isso sugere que o nível de expressão de sHLA-G pode direcionar a resposta imunológica por efeito concentração dependente.

As funções da molécula de HLA-G no processo de imunomodulação são realizadas pela interação com receptores específicos presentes nas células do sistema imunológico, entre eles: ILT-2(CD85j/LILRB1), expresso em células NK, T, B e mielomonocíticas (102); ILT4 (CD85d/LILR2), expresso em monócitos, células dendríticas e neutrófilos (108–110); e KIR2DL4 (CD158d), presente em células NK (111). Interessantemente, a expressão desses receptores é aumentada na superfície de células expostas a HLA-G de membrana e solúvel, tornando estas células mais sensíveis à inibição e promovendo a tolerância imunológica (112,113).

A expressão de HLA-G foi primeiramente identificada na interface materno-fetal, em células do citotrofoblasto extraviloso, onde foi associada à proteção do feto semialogênico da citólise por células NK maternas (114–116). Essa molécula também parece ser primordial para a implantação do embrião, pois a interação da molécula com KIR2DL4 em células NK induz a secreção de citocinas e fatores angiogênicos fundamentais para o remodelamento das artérias espiraladas uterinas (117,118).

À parte do contexto gestacional, o *HLA-G* é transcrito em níveis basais na maioria das células e tecidos (115), no entanto a expressão proteica é restrita a alguns tipos celulares de tecidos do timo (119), da córnea (120), da matriz ungueal (121), do pâncreas (122) e precursores eritroides e endoteliais (123). Adicionalmente, a expressão de HLA-G pode ser induzida em condições não fisiológicas como após transplantes alogênicos (99,124,125), como mecanismo de escape à vigilância imunológica por células tumorais (126–128), como

escape de células infectadas em infecções virais (129,130) e em doenças autoimunes (131–133). A expressão de HLA-G nessas condições sugere que fatores do microambiente podem controlar a expressão da molécula (115).

Menor expressão de sHLA-G no soro foi relatada em doenças autoimunes como AR (134) e artrite juvenil idiopática (135), e apesar dos resultantes conflitantes encontrados em LES (136,137), a menor expressão de sHLA-G têm sido associada à quebra da tolerância imunológica nessas doenças. Por outro lado, a expressão em tecidos lesionados por desordens autoimunes tais como: pele, na psoríase (138), no pênfigo vulgar (139) e na esclerose sistêmica (140); e no parênquima cerebral, na EM (141); sugere implicação da molécula no controle da resposta imunológica, uma vez que esses tecidos não expressam moléculas de HLA-G em condições fisiológicas (115,141,142).

Na EM, foram detectados níveis significativamente diminuídos de RNAm do HLA-G e de sHLA-G no período pós-parto das pacientes quando comparados ao pós-parto de mulheres saudáveis (143). A menor expressão foi detectada principalmente nas pacientes com ativação da doença, apontando para uma possível relação entre baixos níveis da molécula nesse período e recidiva pós-parto (143). Por outro lado, a maior expressão de HLA-G no líquido de pacientes tem sido correlacionada à resolução da inflamação no SNC, evidenciada por imagem de RM de lesões inativas (144–147). Esses achados são sugestivos de que os níveis de HLA-G podem estar relacionados à atividade da doença e contribuir ou para recidiva ou para remissão da doença.

Em um panorama geral, a expressão da molécula HLA-G é vista como benéfica no contexto de transplantes, gravidez e desordens autoimunes, porém prejudicial quando a resposta imune deve ser mantida, como em infecções e câncer (92), por isso o conhecimento das regiões que controlam sua expressão é fundamental.

As regiões regulatórias do gene *HLA-G*, promotora e 3' não traduzida (3'NT ou 3'UTR – do inglês, *3'untranslated region*), são responsáveis pelo controle dos níveis de expressão e, diferente da região codificadora do gene, são altamente polimórficas (92,148). A região promotora é responsável pelo controle transcricional do *HLA-G*, através da interação com fatores de transcrição para o início da síntese de mRNA, enquanto a região 3'NT do gene atua no controle pós-transcricional (92,148–150).

Região 3'NT do gene *HLA-G*

A região 3'NT do gene *HLA-G*, localizada principalmente no éxon 8, é uma das responsáveis pelo controle dos níveis de expressão da molécula de *HLA-G* e sua variabilidade

influencia, principalmente, a estabilidade da molécula de mRNA e ligação a microRNAs (92,148–150). Os principais polimorfismos e haplótipos da região 3'NT do *HLA-G* e suas frequências na população mundial estão representados na Figura 1.

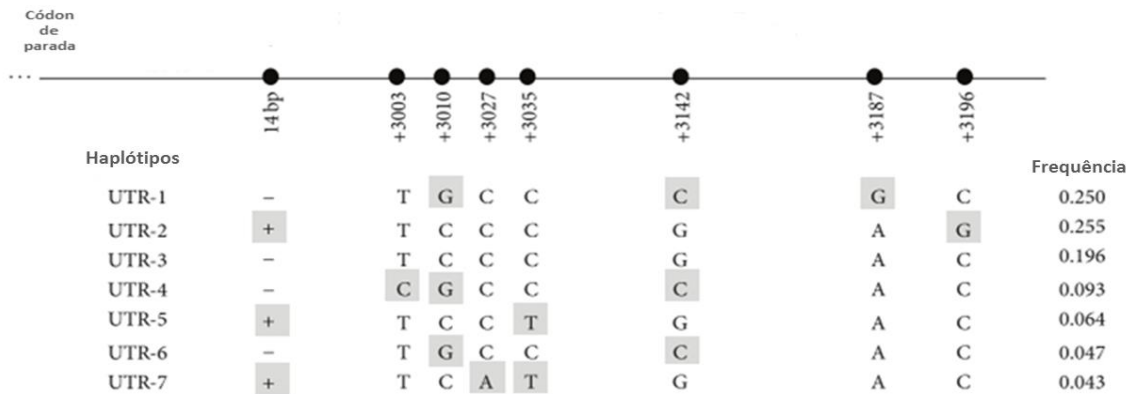


Figura 1 - Estrutura da região 3' não traduzida do gene *HLA-G* com seus principais polimorfismos e frequência dos haplótipos na população mundial.

Fonte: Adaptado de Castelli et al., 2014.

Pelo menos três dessas variações da região 3'NT podem influenciar o nível de expressão de *HLA-G*: uma variação do tipo inserção/deleção (indel) de 14 pares de bases e duas variações de nucleotídeos únicos (SNP - do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) nas posições +3142 e +3187, definidas considerando como nucleótideo +1 a adenina (A) do primeiro ATG traduzido (92,150).

Esses polimorfismos podem afetar a expressão da molécula por mecanismos diferentes. A presença dos 14pb no transcrito primário está relacionado à edição alternativa do RNA resultando em maior estabilidade do mRNA (151). Apesar disso, a inserção desses nucleotídeos foi associada a menor expressão de mRNA em amostras de trofoblastos e a abortos recorrentes em mulheres dimamarquesas (152,153). A presença de uma guanina na posição +3142 aumenta a afinidade com microRNAs específicos, tais como o *miR-148a*, *miR-148b* e *miR-152*, que leva ao aumento da degradação do mRNA e diminuição da produção de *HLA-G* (154). Por último, uma adenina na posição +3187 diminui a estabilidade do mRNA, pela sua proximidade a uma sequência rica em adenina-uracila (AU) que influencia a degradação do mRNA e está associada à pré-eclampsia (155).

Apesar de não estar bem esclarecida a influência das outras variações sobre a estabilidade do mRNA, análises *in silico* têm mostrado que diversos miRNAs humanos têm potencial para ligar ao mRNA do *HLA-G* e influenciar sua expressão, inclusive nas posições +3003, +3010, +3027 e +3035 (92,156,157).

Outro aspecto importante é que esses polimorfismos geralmente estão associados entre si. A inserção dos *14pb*, por exemplo, está associada, na maioria dos haplótipos de 3'NT, aos alelos +3142G e +3187A (150,158,159), o que poderia justificar a menor produção de HLA-G relacionada aos *14pb* (92). Estas associações são decorrentes de um forte padrão de desequilíbrio de ligação (*LD*, do inglês *Linkage Disequilibrium*) encontrado entre quase todas as variantes da região 3'NT (150,158).

Há evidências da correlação entre a variabilidade da 3'NT e o fenótipo produtor de sHLA-G (160–163). A influência conjunta desses SNPs em um haplótipo foi estudada por Martelli-Palomino e colaboradores (163) e seus resultados mostraram a produção diferencial de sHLA-G por cada *UTR*. A *UTR-1* está associada aos mais altos níveis de produção de sHLA-G, enquanto as *UTR-5* e *-7* aos níveis mais baixos. As *UTRs* (-2, -3, -4 e -6) foram associadas a níveis intermediários (163). Dado a importância dos níveis de expressão de HLA-G para a modulação da resposta imunológica, esses polimorfismos e haplótipos podem estar associados ao desenvolvimento de diversas patologias. No entanto, não se pode descartar a influência de outros segmentos do gene *HLA-G* na regulação dos níveis de expressão e função da molécula, tais como a região promotora e codificadora, respectivamente. Vários trabalhos têm mostrado a variabilidade desses segmentos e um forte padrão de *LD* no gene *HLA-G* inteiro, fazendo que algumas *UTRs* estejam associadas a determinados haplótipos de promotora e codificadora com maior frequência (149,150,164). Assim, a associação de haplótipos de 3'NT do *HLA-G* com algumas patologias pode ser causal ou um efeito do forte *LD* entre a região 3'NT e os outros segmentos do gene.

Estudos de variabilidade da região 3'NT do gene *HLA-G* têm associado os polimorfismos dessa região, individual ou conjuntamente, à uma série de contextos patológicos, tais como doenças autoimunes (158,165–170), neoplasias (171–173), aceite/rejeição de transplantes (174,175) e infecções (176–179).

Na EM, apenas três trabalhos exploraram variações em regiões regulatórias do gene *HLA-G*. O primeiro, realizado por Kroner e colaboradores (180), analisou três polimorfismos em regiões distintas do gene, na população alemã: o polimorfismo -725C/G, na região promotora; *G*0105 null*, éxon 3; e *14pb* na 3'NT do *HLA-G*, e nenhuma das variações apresentou relação com a suscetibilidade a doença ou qualquer associação com idade de início, gravidade e progressão ($n=698$). O segundo analisou -725C/G/T (metodologia incluindo o alelo T) e -716G/T, na região promotora; e *14pb* na 3'NT, em 227 pacientes poloneses com EM, onde Wiśniewski e colaboradores (181) encontrou maior frequência de 725G em pacientes com EM e relação entre os *14pb Ins* e menor idade de início da doença.

Por último, Rizzo e colaboradores (182) analisaram apenas a produção de sHLA-G, em pacientes com EM ($n=69$), relacionada as variações dos *14pb indel* e *+3142 C/G*.

Na NMO, não há qualquer estudo que referencie o papel do *HLA-G* ou que tenha analisado variações do gene associadas à suscetibilidade ou proteção a doença.

É importante mencionar que muitos desses estudos de associação à doença foram realizados em populações diferentes, com tamanhos amostrais variáveis, assim como o número de variações analisadas. Estes fatores podem estar relacionados a diferentes resultados em estudos da mesma patologia.

Estudos que analisaram a diversidade genética da região *3'NT* do gene *HLA-G* em populações mundiais mostraram diferentes frequências alélicas e haplotípicas entre as populações estudadas, principalmente europeia e africana (159,164). De maneira similar, Lucena-silva e colaboradores (183) encontraram diferenças na frequência de alelos, genótipos e na diversidade de haplótipos entre as populações do Nordeste e Sudeste do Brasil.

O Brasil é um país com alta diversidade genética e sua composição populacional possui influência europeia, africana e ameríndia. Adicionalmente, informações sobre autotaxonomia pela cor da pele não correlacionam com a contribuição genética ancestral individual (184). Portanto, o uso de marcadores informativos de ancestralidade (AIM) é relevante para evitar associações espúrias ou conflitantes em estudos genéticos em populações miscigenadas, como a brasileira.

Ao considerar que: a EM e a NMO são doenças com riscos étnicos e genéticos diferentes (46); o Brasil possui população estruturada com contribuição europeia, africana e ameríndia (185); a frequência dos haplótipos da região *3'NT* do *HLA-G* difere entre europeus e africanos (159,164), a distribuição e a diversidade dos haplótipos da região *3'NT* do *HLA-G* é diferente entre grupos populacionais brasileiros (158,183), o uso de AIMs é imprescindível para este estudo e em estudos multicêntricos futuros, particularmente com o gene *HLA-G*.

Uma investigação prévia sobre a contribuição ancestral europeia, africana e ameríndia em pacientes brasileiros com NMO e EM, avaliada por um conjunto de 12 AIM, mostrou que apesar da contribuição étnico-genética conhecida nessas doenças, a contribuição ancestral europeia foi predominante em todos os grupos analisados – NMO, MS e controles (186) e as medianas do índice de ancestralidade africana foram similares entre os três grupos (186). Assim, devido à homogeneidade quanto à contribuição ancestral nessas populações, revelada no estudo anterior, os mesmos grupos de pacientes e controles analisados para AIMs foram considerados adequados para a análise proposta por esse estudo.

Além disso, posto que: i) a expressão de HLA-G está desbalanceada na EM e outras doenças autoimunes e ii) estudos da região 3'NT do *HLA-G* em pacientes com EM são escassos e ausentes na NMO; os estudos sobre o gene *HLA-G* na NMO e EM tornam-se relevantes para a melhor compreensão do aspecto imunogenético dessas doenças. O objetivo do estudo apresentado no II capítulo desse manuscrito foi verificar os sítios polimórficos da região 3'NT do *HLA-G* em pacientes brasileiros com EM e NMOSD combinada com o uso de AIMS.

CONCLUSION

Polymorphic sites at the *3'UTR* of immunoregulatory *HLA-G* gene are differentially associated with NMO but not with multiple sclerosis further corroborating that NMO and MS are distinct diseases. Considering that the expression of HLA-G molecule is pivotal for the immune tolerance mechanism and the allele *+3187G* is associated with more efficient production of HLA-G, the low frequency of allele *+3187G* and *UTR-1* haplotype in NMOSD group may contribute to the breakdown of immune tolerance in the pathogenesis of NMO.

REFERENCES

1. Wingerchuk DM, Hogancamp WF, O'Brien PC, Weinshenker BG. The clinical course of neuromyelitis optica (Devic's syndrome). *Neurology*. 1999;53(5):1107–14.
2. Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Fujihara K, et al. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet*. 2004 Jan;364(9451):2106–12.
3. Sato D, Callegaro D, Lana-Peixoto MA, Fujihara K. Treatment of neuromyelitis optica: an evidence based review. *Arq Neuropsiquiatr. Brazil*; 2012 Jan;70(1):59–66.
4. Lucchinetti CF, Mandler RN, McGavern D, Bruck W, Gleich G, Ransohoff RM, et al. A role for humoral mechanisms in the pathogenesis of Devic's neuromyelitis optica. *Brain. England*; 2002 Jul;125(Pt 7):1450–61.
5. Wingerchuk DM, Banwell B, Bennett JL, Cabre P, Carroll W, Chitnis T, et al. International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. *Neurology* . 2015 Jul 14;85(2):177-89.
6. Wingerchuk DM, Lennon VA, Lucchinetti CF, Pittock SJ, Weinshenker BG. The spectrum of neuromyelitis optica. *Lancet Neurol*. 2007;6(9):805–15.
7. Matiello M, Kim HJ, Kim W, Brum DG, Barreira AA, Kingsbury DJ, et al. Familial neuromyelitis optica. *Neurology*. 2010;75(4):310–5.
8. Ebers GC, Bulman DE, Sadovnick AD, Paty DW, Warren S, Hader W, et al. A Population-Based Study of Multiple Sclerosis in Twins. *N Engl J Med. United States*; 1986 Dec 25;315(26):1638–42.
9. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.; 2011 Aug 11;476(7359):214–9.
10. Sadovnick AD. Genetic background of multiple sclerosis. *Autoimmun Rev*. 2012 Jan;11(3):163–6.
11. Brum DG, Barreira AA, Louzada-Junior P, Mendes-Junior CT, Donadi EA. Association of the HLA-DRB1*15 allele group and the DRB1*1501 and DRB1*1503 alleles with multiple sclerosis in White and Mulatto samples from Brazil. *J Neuroimmunol*. 2007;189(1-2):118–24.
12. Vasconcelos CCF, Fernandez O, Leyva L, Thuler LCS, Alvarenga RMP. Does the DRB1*1501 allele confer more severe and faster progression in primary progressive multiple sclerosis patients? HLA in primary progressive multiple sclerosis. *J Neuroimmunol. Netherlands*; 2009 Sep;214(1-2):101–3.
13. Brum DG, Barreira AA, dos Santos AC, Kaimen-Maciél DR, Matiello M, Costa RM, et al. HLA-DRB association in neuromyelitis optica is different from that observed in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2010;16(1):21–9.
14. Zephir H, Fajardy I, Outteryck O, Blanc F, Roger N, Fleury M, et al. Is neuromyelitis

- optica associated with human leukocyte antigen? *Mult Scler.* England; 2009 May;15(5):571–9.
15. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:683–747.
 16. Popescu BF, Pirko I, Lucchinetti CF. Pathology of multiple sclerosis: where do we stand? *Contin (Minneap Minn).* 2013; 19(4 Multiple Sclerosis):901–21.
 17. Carosella ED, Rouas-Freiss N, Paul P, Dausset J. HLA-G: a tolerance molecule from the major histocompatibility complex. *Immunol Today.* 1999;20(2):60–2.
 18. Colonna M, Navarro F, Bellón T, Llano M, García P, Samaridis J, et al. A Common Inhibitory Receptor for Major Histocompatibility Complex Class I Molecules on Human Lymphoid and Myelomonocytic Cells. *J Exp Med.* The Rockefeller University Press; 1997 Dec 1;186(11):1809–18.
 19. Liang S, Ristich V, Arase H, Dausset J, Carosella ED, Horuzsko A. Modulation of dendritic cell differentiation by HLA-G and ILT4 requires the IL-6-STAT3 signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(24):8357–62.
 20. Colonna M, Samaridis J, Cella M, Angman L, Allen RL, O’Callaghan CA, et al. Human myelomonocytic cells express an inhibitory receptor for classical and nonclassical MHC class I molecules. *J Immunol.* United States; 1998 Apr; 160(7):3096–100.
 21. Baudhuin J, Migraine J, Faivre V, Loumagne L, Lukaszewicz A-C, Payen D, et al. Exocytosis acts as a modulator of the ILT4-mediated inhibition of neutrophil functions. *Proc Natl Acad Sci USA.* National Academy of Sciences; 2013 Oct 29;110(44):17957–62.
 22. Rajagopalan S, Long EO. A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *J Exp Med.* 1999;189(7):1093–100.
 23. Rouas-Freiss N, Khalil-Daher I, Marchal-Bras Goncalves R, Menier C, Dausset J, Carosella ED. Role of HLA-G in maternal-fetal immune tolerance. *Transpl Proc.* 1999; 31(1-2):724–5.
 24. 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 USA.* United States; 1997 Oct;94(21):11520–5.
 25. Lefebvre S, Adrian F, Moreau P, Gourand L, Dausset J, Berrih-Aknin S, et al. Modulation of HLA-G expression in human thymic and amniotic epithelial cells. *Hum Immunol.* United States; 2000 Nov;61(11):1095–101.
 26. Cirulli V, Zalatan J, McMaster M, Prinsen R, Salomon DR, Ricordi C, et al. The class I HLA repertoire of pancreatic islets comprises the nonclassical class Ib antigen HLA-G. *Diabetes.* United States; 2006 May;55(5):1214–22.
 27. Le Discorde M, Moreau P, Sabatier P, Legeais J-M, Carosella ED. Expression of HLA-G in human cornea, an immune-privileged tissue. *Hum Immunol.* United States; 2003 Nov;64(11):1039–44.

28. Ito T, Ito N, Saathoff M, Stampachiachiere B, Bettermann A, Bulfone-Paus S, et al. Immunology of the human nail apparatus: the nail matrix is a site of relative immune privilege. *J Invest Dermatol.* United States; 2005 Dec; 125(6):1139–48.
29. Menier C, Rabreau M, Challier J-C, Le Discorde M, Carosella ED, Rouas-Freiss N. Erythroblasts secrete the nonclassical HLA-G molecule from primitive to definitive hematopoiesis. *Blood.* United States; 2004 Nov;104(10):3153–60.
30. Lila N, Rouas-Freiss N, Dausset J, Carpentier A, Carosella ED. Soluble HLA-G protein secreted by allo-specific CD4+ T cells suppresses the allo-proliferative response: a CD4+ T cell regulatory mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98(21):12150–5.
31. Rouas-Freiss N, LeMaout J, Moreau P, Dausset J, Carosella ED. HLA-G in transplantation: a relevant molecule for inhibition of graft rejection? *Am J Transplant.* Denmark; 2003 Jan;3(1):11–6.
32. Lila N, Carpentier A, Amrein C, Khalil-Daher I, Dausset J, Carosella ED. Implication of HLA-G molecule in heart-graft acceptance. *Lancet.* England; 2000 Jun 17;355(9221):2138.
33. Favoino E, Favia IE, Vettori S, Vicenti C, Prete M, Valentini G, et al. Clinical correlates of human leucocyte antigen (HLA)-G in systemic sclerosis(1). *Clin Exp Immunol.* England; 2015 Jul;181(1):100–9.
34. Morandi F, Venturi C, Rizzo R, Castellazzi M, Baldi E, Caniatti ML, et al. Intrathecal soluble HLA-E correlates with disease activity in patients with multiple sclerosis and may cooperate with soluble HLA-G in the resolution of neuroinflammation. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2013 Sep;8(4):944–55.
35. Cardili RN, Alves TG, Freitas JCOC, Soares CP, Mendes-Junior CT, Soares EG, et al. Expression of human leucocyte antigen-G primarily targets affected skin of patients with psoriasis. *Br J Dermatol.* England; 2010 Oct;163(4):769–75.
36. Yari F, Zavarani Hosseini A, Nemat Gorgani M, Khorramizadeh MR, Mansouri P, Kazemnejad A. Expression of HLA-G in the skin of patients with pemphigus vulgaris. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* Iran;2008 Mar; 7(1):7–12.
37. Wastowski IJ, Sampaio-Barros PD, Amstalden EM, Palomino GM, Marques-Neto JF, Crispim JC, et al. HLA-G expression in the skin of patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 2009;36(6):1230–4.
38. Ibrahim EC, Guerra N, Lacombe MJ, Angevin E, Chouaib S, Carosella ED, et al. Tumor-specific up-regulation of the nonclassical class I HLA-G antigen expression in renal carcinoma. *Cancer Res.* United States; 2001 Sep;61(18):6838–45.
39. Wiendl H, Mitsdoerffer M, Hofmeister V, Wischhusen J, Bornemann A, Meyermann R, et al. A functional role of HLA-G expression in human gliomas: an alternative strategy of immune escape. *J Immunol.* 2002;168(9):4772–80.
40. Paul P, Rouas-Freiss N, Khalil-Daher I, Moreau P, Riteau B, Le Gal FA, et al. HLA-G expression in melanoma: A way for tumor cells to escape from immunosurveillance. *Proc Natl Acad Sci USA.* The National Academy of Sciences; 1998 Apr 14;95(8):4510–5.

41. Lozano JM, Gonzalez R, Kindelan JM, Rouas-Freiss N, Caballos R, Dausset J, et al. Monocytes and T lymphocytes in HIV-1-positive patients express HLA-G molecule. *AIDS*. England; 2002 Feb;16(3):347–51.
42. Onno M, Pangault C, Le Friec G, Guilloux V, Andre P, Fauchet R. Modulation of HLA-G antigens expression by human cytomegalovirus: specific induction in activated macrophages harboring human cytomegalovirus infection. *J Immunol*. United States; 2000 Jun;164(12):6426–34.
43. Donadi EA, Castelli EC, Arnaiz-Villena A, Roger M, Rey D, Moreau P. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(3):369–95.
44. Castelli EC, Veiga-Castelli LC, Yaghi L, Moreau P, Donadi EA. Transcriptional and posttranscriptional regulations of the HLA-G gene. *J Immunol Res*. 2014;2014:734068.
45. Rizzo R, Bortolotti D, Fredj N Ben, Rotola A, Cura F, Castellazzi M, et al. Role of HLA-G 14bp deletion/insertion and +3142C>G polymorphisms in the production of sHLA-G molecules in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Hum Immunol*. 2012 Nov;73(11):1140–6.
46. Martelli-Palomino G, Pancotto JA, Muniz YC, Mendes-Junior CT, Castelli EC, Massaro JD, et al. Polymorphic sites at the 3' untranslated region of the HLA-G gene are associated with differential hla-g soluble levels in the Brazilian and French population. *PLoS One*. 2013;8(10):e71742.
47. Hviid T V, 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(3):135–41.
48. Rizzo R, Hviid T V, Stignani M, Balboni A, Grappa MT, Melchiorri L, et al. The HLA-G genotype is associated with IL-10 levels in activated PBMCs. *Immunogenetics* . 2005;57(3-4):172–81.
49. 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(11):1005–10.
50. Tan Z, Randall G, Fan J, Camoretti-Mercado B, Brockman-Schneider R, Pan L, et al. Allele-specific targeting of microRNAs to HLA-G and risk of asthma. *Am J Hum Genet*. United States; 2007 Oct;81(4):829–34.
51. Yie S, Li L, Xiao R, Librach CL. A single base-pair mutation in the 3'-untranslated region of HLA-G mRNA is associated with pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* . 2008 Nov 1;14 (11):649–53.
52. Castelli EC, Moreau P, Oya e Chiromatzo A, Mendes-Junior CT, Veiga-Castelli LC, Yaghi L, et al. In silico analysis of microRNAs targeting the HLA-G 3' untranslated region alleles and haplotypes. *Hum Immunol*. 2009;70(12):1020–5.
53. Porto IOP, Mendes-Junior CT, Felício LP, Georg RC, Moreau P, Donadi EA, et al. MicroRNAs targeting the immunomodulatory HLA-G gene: a new survey searching for microRNAs with potential to regulate HLA-G. *Mol Immunol*. 2015 Jun;65(2):230–

- 41.
54. Catamo E, Addobbati C, Segat L, Sotero Fragoso T, Tavares Dantas A, de Ataíde Mariz H, et al. Comprehensive analysis of polymorphisms in the HLA-G 5' upstream regulatory and 3' untranslated regions in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens*. England; 2015 Jun;85(6):458–65.
 55. Consiglio CR, Veit TD, Monticelo OA, Mucenic T, Xavier RM, Brenol JCT, et al. Association of the HLA-G gene +3142C>G polymorphism with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens*. Denmark; 2011 Jun;77(6):540–5.
 56. Lucena-Silva N, de Souza VSB, Gomes RG, Fantinatti A, Muniz YCN, de Albuquerque RS, et al. HLA-G 3' untranslated region polymorphisms are associated with systemic lupus erythematosus in 2 Brazilian populations. *J Rheumatol*. Canada; 2013 Jul;40(7):1104–13.
 57. Mariaselvam CM, Chaaben AB, Salah S, Charron D, Krishnamoorthy R, Tamouza R, et al. Human leukocyte antigen-G polymorphism influences the age of onset and autoantibody status in rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens*. England; 2015 Mar;85(3):182–9.
 58. Veit TD, de Lima CPS, Cavaleiro LC, Callegari-Jacques SM, Brenol CV, Brenol JCT, et al. HLA-G +3142 polymorphism as a susceptibility marker in two rheumatoid arthritis populations in Brazil. *Tissue Antigens*. England; 2014 Apr;83(4):260–6.
 59. Gazit E, Slomov Y, Goldberg I, Brenner S, Loewenthal R. HLA-G is associated with pemphigus vulgaris in Jewish patients. *Hum Immunol*. United States; 2004 Jan; 65(1):39–46.
 60. Hviid TVF, Milman N, Hylenius S, Jakobsen K, Jensen MS, Larsen LG. HLA-G polymorphisms and HLA-G expression in sarcoidosis. *Sarcoidosis, Vasc Diffus lung Dis Off J WASOG / World Assoc Sarcoidosis Other Granulomatous Disord*. Italy; 2006 Mar;23(1):30–7.
 61. Kroner A, Grimm A, Johannssen K, Mäurer M, Wiendl H. The genetic influence of the nonclassical MHC molecule HLA-G on multiple sclerosis. *Hum Immunol*. 2007 May; 68(5):422–5.
 62. Wiśniewski A, Bilińska M, Klimczak A, Wagner M, Majorczyk E, Nowak I, et al. Association of the HLA-G gene polymorphism with multiple sclerosis in a Polish population. *Int J Immunogenet*. 2010 Aug;37(4):307–11.
 63. Wiendl H, Feger U, Mittelbronn M, Jack C, Schreiner B, Stadelmann C, et al. Expression of the immune-tolerogenic major histocompatibility molecule HLA-G in multiple sclerosis: implications for CNS immunity. *Brain*. 2005 Nov;128(Pt 11):2689–704.
 64. Huang Y-H, Zozulya AL, Weidenfeller C, Metz I, Buck D, Toyka K V, et al. Specific central nervous system recruitment of HLA-G(+) regulatory T cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2009 Aug;66(2):171–83.
 65. Morandi F, Venturi C, Rizzo R, Castellazzi M, Baldi E, Caniatti ML, et al. Intrathecal soluble HLA-E correlates with disease activity in patients with multiple sclerosis and

- may cooperate with soluble HLA-G in the resolution of neuroinflammation. *J Neuroimmune Pharmacol.* United States; 2013 Sep;8(4):944–55.
66. Fainardi E, Rizzo R, Melchiorri L, Castellazzi M, Paolino E, Tola MR, et al. Intrathecal synthesis of soluble HLA-G and HLA-I molecules are reciprocally associated to clinical and MRI activity in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler.* England; 2006 Feb;12(1):2–12.
 67. Fainardi E, Rizzo R, Melchiorri L, Stignani M, Castellazzi M, Tamborino C, et al. CSF levels of soluble HLA-G and Fas molecules are inversely associated to MRI evidence of disease activity in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler.* England; 2008 May;14(4):446–54.
 68. Fainardi E, Rizzo R, Melchiorri L, Stignani M, Castellazzi M, Caniatti ML, et al. Soluble HLA-G molecules are released as HLA-G5 and not as soluble HLA-G1 isoforms in CSF of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* Netherlands; 2007 Dec;192(1-2):219–25.
 69. Airas L, Nikula T, Huang Y-H, Lahesmaa R, Wiendl H. Postpartum-activation of multiple sclerosis is associated with down-regulation of tolerogenic HLA-G. *J Neuroimmunol.* 2007 Jul;187(1-2):205–11.
 70. Verbruggen LA, Rebmann V, Demanet C, De Cock S, Grosse-Wilde H. Soluble HLA-G in Rheumatoid Arthritis. *Hum Immunol.* 2006 Aug;67(8):561–7.
 71. Rizzo R, Hviid T V, Govoni M, Padovan M, Rubini M, Melchiorri L, 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(6):520–9.
 72. Rosado S, Perez-Chacon G, Mellor-Pita S, Sanchez-Vegazo I, Bellas-Menendez C, Citores MJ, et al. Expression of human leukocyte antigen-G in systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol.* 2008 Jan;69(1):9–15.
 73. Castelli EC, Ramalho J, Porto IO, Lima TH, Felício LP, Sabbagh A, et al. Insights into HLA-G Genetics Provided by Worldwide Haplotype Diversity. *Front Immunol.* 2014; 5:476.
 74. Sabbagh A, Luisi P, Castelli EC, Gineau L, Courtin D, Milet J, et al. Worldwide genetic variation at the 3' untranslated region of the HLA-G gene: balancing selection influencing genetic diversity. *Genes Immun.* 2014;15(2):95–106.
 75. Pena SDJ, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy F de SG, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One.* United States; 2011;6(2):e17063.
 76. Wingerchuk DM, Lennon VA, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Weinshenker BG. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology.* 2006;66(10):1485–9.
 77. Wingerchuk DM, Banwell B, Bennett JL, Cabre P, Carroll W, Chitnis T, et al. International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. *Neurology.* United States; 2015 Jul;85(2):177–89.
 78. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al.

- Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol.* 2011;69(2):292–302.
79. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2001 Jul;50(1):121–7.
 80. Brum DG, Luizon MR, Santos AC, Lana-Peixoto MA, Rocha CF, Brito ML, et al. European ancestry predominates in neuromyelitis optica and multiple sclerosis patients from Brazil. *PLoS One.* 2013;8(3):e58925.
 81. Pritchard JK, Stephens M, Rosenberg NA, Donnelly P. Association mapping in structured populations. *Am J Hum Genet.* 2000 Jul;67(1):170–81.
 82. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res. England;* 1988 Feb;16(3):1215.
 83. Castelli EC, Mendes-Junior CT, Deghaide NH, de Albuquerque RS, Muniz YC, Simões RT, et al. The genetic structure of 3'untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes. *Genes Immun.* 2010;11(2):134–41.
 84. Raymond M, Rousset F. GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *J Hered.* 1995 May 1;86(3):248–9.
 85. Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics. United States;* 1992 Jun;48(2):361–72.
 86. Excoffier L, Slatkin M. Incorporating genotypes of relatives into a test of linkage disequilibrium. *Am J Hum Genet.* 1998 Jan;62(1):171–80.
 87. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online. Libertas Academica;* 2005 Feb 23;1:47–50.
 88. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics.* 2005 Jan 15;21(2):263–5.
 89. Excoffier L, Slatkin M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Mol Biol Evol.* 1995 Sep 1;12(5):921–7.
 90. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet.* 2001 Apr;68(4):978–89.
 91. Keller A, Leidinger P, Meese E, Haas J, Backes C, Rasche L, et al. Next-generation sequencing identifies altered whole blood microRNAs in neuromyelitis optica spectrum disorder which may permit discrimination from multiple sclerosis. *J Neuroinflammation.* London: BioMed Central; 2015 Oct 31;12:196.
 92. Lucena-Silva N, Teixeira MA, Ramos A. L, de Albuquerque RS, Diniz GT, Mendes-Junior CT, et al. The +3187A/G HLA-G polymorphic site is associated with polar forms and reactive reaction in leprosy. *Mol Genet Genomic Med.* 2013;1(3):123–30.
 93. Bugatti S, Vitolo B, Caporali R, Montecucco C, Manzo A. B Cells in Rheumatoid

- Arthritis: From Pathogenic Players to Disease Biomarkers. *Biomed Res Int*. Hindawi Publishing Corporation; 2014 Apr 29;2014:681678.
94. Pathak S, Mohan C. Cellular and molecular pathogenesis of systemic lupus erythematosus: lessons from animal models. *Arthritis Res Ther*. BioMed Central; 2011 Sep 30;13(5):241.
 95. Crow MK. Developments in the clinical understanding of lupus. *Arthritis Res Ther*. BioMed Central; 2009 Oct 14;11(5):245.
 96. Correale J, Fiol M. Activation of humoral immunity and eosinophils in neuromyelitis optica. *Neurology*. United States; 2004 Dec 28;63(12):2363–70.
 97. Naji A, Menier C, Morandi F, Agaoglu S, Maki G, Ferretti E, et al. Binding of HLA-G to ITIM-Bearing Ig-like Transcript 2 Receptor Suppresses B Cell Responses. *J Immunol*. United States; 2014 Feb 15;192(4):1536–46.
 98. Castelli EC, Mendes-Junior CT, Veiga-Castelli LC, Roger M, Moreau P, Donadi EA. A comprehensive study of polymorphic sites along the HLA-G gene: implication for gene regulation and evolution. *Mol Biol Evol*. 2011 Nov 1;28(11):3069–86.
 99. Abecasis G, Auton A, Brooks L, DePristo M, Durbin R, Handsaker R, et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved; 2012 Nov 1;491(7422):56–65.
 100. Lucena-Silva N, Monteiro AR, de Albuquerque RS, Gomes RG, Mendes-Junior CT, Castelli EC, et al. Haplotype frequencies based on eight polymorphic sites at the 3' untranslated region of the HLA-G gene in individuals from two different geographical regions of Brazil. *Tissue Antigens*. 2012;79(4):272–8.
 101. Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science*. United States; 2002 Jun; 296(5576):2225–9.