

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

CARLA ALESSANDRA RUIZ LEITE

Susceptibilidade genética HLA-G e doença de Crohn em uma população do
Estado do Paraná

Maringá
2013

CARLA ALESSANDRA RUIZ LEITE

Susceptibilidade genética HLA-G e doença de Crohn em uma população do
Estado do Paraná

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde
Área de concentração: Saúde Humana.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Luiza Tamie Tsuneto.

Maringá

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

L533s Leite, Carla Alessandra Ruiz
Susceptibilidade genética HLA-G e doença de Crohn
em uma população do estado do Paraná / Carla
Alessandra Ruiz Leite. -- Maringá, 2013.
44, [7] f. : tabs.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Luiza Tamie Tsuneto.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2013.

1. HLA-G. 2. HLA-G - Susceptibilidade genética.
3. Doença de Crohn. 4. Doença de Crohn - Estudo de
caso-controle - Paraná (Estado). I. Tsuneto, Luiza
Tamie, orient. II. Universidade Estadual de Maringá.
Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD 22.ed. 616.3

AMMA-00945

FOLHA DE APROVAÇÃO

CARLA ALESSANDRA RUIZ LEITE

Susceptibilidade genética HLA-G e doença de Crohn em uma população do Estado do Paraná

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof^ª. Dr^ª. Luiza Tamie Tsuneto
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof^ª. Dr^ª. Ana Maria Sell
Universidade Estadual de Maringá

Prof^ª. Dr^ª. Sueli Donizete Borelli
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 28 de Março de 2013.

Local de defesa: Sala 01, Bloco 126, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIAS

Em todas as tempestades, adversidades, alegrias e superações, a presença desta pessoa foi fundamental para que tudo fosse encarado com a presença de um amor incondicional. Este amor jamais deixou que a escuridão da solidão, em momentos difíceis, fizesse de meus ideais algo possível. A esta pessoa, a qual tenho orgulho em chamá-la de Mãe, dedico este trabalho, como forma de retribuir com uma ínfima parte tudo aquilo que realmente lhe devo.

E, de modo tão quão especial, dedico esta conquista à minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Luiza Tamie Tsuneto, que me acolheu no momento mais difícil de minha caminhada em busca de crescimento profissional e intelectual, tornando possível a realização deste sonho, além da sua contribuição em todas as etapas de elaboração deste trabalho. À você Luiza, não encontro outras palavras para expressar o que sinto, apenas lhe digo de coração... Muito Obrigada!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar os meus passos em todos os caminhos, pelo amor ágape, pela minha vida, e pela certeza de que com fé os meus sonhos serão realizados por Ele.

À minha mãe Eliane, aos meus irmãos Kellen e Paulo Henrique, João Roberto, tias, tios, à minha querida vovó Lourdes e avô Geraldo, aos meus primos, em especial aos que me acompanharam nessa jornada de Mestrado-UEM-Maringá/Umuarama, Juliana e Henrique, pelo amor, carinho, incentivando-me em todos os momentos de dificuldades e, principalmente, por representarem o que sou hoje.

Aos amigos pelo apoio, incentivo e momentos de descontração necessários durante a caminhada. Em especial, Clarice e Bruna pelo acolhimento; Wendell e Toninha, amigos que se tornaram parte da família!

Aos amigos de Laboratório e Mestrado, de modo especial, Marcela e Rosiane pelo incentivo, apoio, carinho, atenção e dedicação, vocês estão no meu coração!

Aos estagiários do COMCAP, José Renato e Francisco pelo apoio e disponibilidade.

Aos professores e funcionários do Laboratório de Imunogenética, pela acolhida, colaboração, ensinamentos, por colaborarem direta e indiretamente para a realização deste estudo. Em especial, às Professoras Dr^a Jeane Eliete Laguila Visentainer, Dr^a Sueli Donizete Borelli e Dr^a Ana Maria Sell pela valiosa contribuição.

A todos que não estão mencionados, mas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos muito OBRIGADA. Devo a vocês este momento!

Susceptibilidade genética HLA-G e doença de Crohn em uma população do Estado do Paraná.

RESUMO

A associação de mecanismos imunológicos e genéticos com doenças gastrintestinais indica relações consistentes entre esses sistemas, tanto na fisiopatologia das doenças quanto na manutenção do estado de saúde dos pacientes. As causas exatas que levam ao desenvolvimento da doença de Crohn ainda são desconhecidas. Alguns genes relacionados ao sistema imune foram apontados como alvos potenciais no desenvolvimento da doença de Crohn. Dentre eles, encontra-se o HLA-G que codifica uma molécula com função imunossupressora, com potencial de defesa contra a agressão inflamatória e, portanto, decisiva no equilíbrio da resposta imune. O objetivo desse estudo foi avaliar a influência do gene HLA-G na susceptibilidade/resistência no desenvolvimento da doença de Crohn. O estudo de caso-controle foi realizado com 80 pacientes e 80 controles para os exons 2 e 3 de HLA-G e 99 pacientes e 323 controles para o exon 8 de HLA-G. A genotipagem foi realizada por biologia molecular para os genes HLA-G: exons 2 e 3 por PCR-SBT e exon 8 por PCR-SSP. Diferenças significativas foram encontradas nos exons 2 e 3 para os genes *HLA-G*01:03* e *HLA-G*01:04*. Os resultados desse projeto podem contribuir para a identificação de marcadores da doença e elaboração de procedimentos que minimizem os seus impactos para o indivíduo e para a população, através de propostas para o desenvolvimento de estratégias eficazes de prevenção, diagnóstico e tratamento.

Palavras-chave: HLA-G, doença de Crohn, caso-controle, susceptibilidade.

Genetic Susceptibility HLA-G and Crohn's disease in a population of the Paraná State.

ABSTRACT

The combination of genetic and immunological mechanisms with gastrointestinal diseases indicates consistent relationships between these systems in both the pathophysiology of disease and in maintaining the health status of patients. The exact causes that lead to the development of Crohn's disease are unknown. Some genes related to the immune system have been identified as potential targets in the development of Crohn's disease. Among them is the HLA-G molecule which encodes an immunosuppressive role, with defense potential against inflammatory aggression and therefore decisive in balancing the immune response. The aim of this study was to evaluate the influence of HLA-G gene in the susceptibility / resistance in the development of Crohn's disease. The case-control study was conducted with 80 patients and 80 controls for exons 2 and 3 HLA-G and 99 patients and 323 controls for exon 8 of HLA-G. Genotyping was performed by molecular biology for genes HLA-G: exons 2 and 3 by PCR-SBT and exon 8 by PCR-SSP. Significant differences were found in exons 2 and 3 for the *HLA-G*01:03* and *HLA-G*01:04*. The results of this project can contribute to the identification of disease markers and development of procedures that minimize their impacts for the individual and for the population, through proposals for the development of effective strategies for prevention, diagnosis and treatment.

Keywords: HLA-G, Crohn's disease, case-control, susceptibility.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DC	Doença de Crohn
DII	Doença Inflamatória Intestinal
CEI	Células Epiteliais Intestinais
CU	Colite Ulcerativa
RCU	Retocolite Ulcerativa
TGI	Trato Gastrointestinal
CPH	Complexo Principal de Histocompatibilidade
DNA	(<i>ADN</i>) Ácido Desoxirribonucleico
RNA _m	Ácido Ribonucleico Mensageiro
HLA	(<i>Human Leukocyte Antigen</i>) Antígenos Leucocitários Humanos
HLA-G	(<i>Histocompatibility Antigen, Class I, G</i>)
sHLA-G	HLA-G solúvel
3'UTR	(<i>Untranslated Region</i>) Região 3' transcrita e não traduzida
5'UTR	(<i>Untranslated Region</i>) Região 5' transcrita e não traduzida
PBMC	(<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>) célula mononuclear de sangue periférico
LPS	Lipopolissacarídeo
SNP	Polimorfismo de um único nucleotídeo
DNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
NK	Células <i>Natural-Killers</i>
IL	Interleucinas
LTh1	(<i>T Helper 1 Lymphocyte</i>) Linfócito T Auxiliar 1
LTh2	(<i>T Helper 1 Lymphocyte</i>) Linfócito T Auxiliar 2
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNF α	Fator de Necrose Tumoral alfa
APC	(<i>Antigen Presenting Cell</i>) Células apresentadas de antígenos
PCR	(<i>Polymerase Chain Reaction</i>) Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-SBT	(<i>Polymerase Chain Reaction-Sequence Based Typing</i>) Reação em Cadeia da Polimerase – Tipagem baseada em sequenciamento
PCR-SSP	(<i>Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primers</i>) Reação em Cadeia da Polimerase - Iniciadores de sequência específica

EDTA	(<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>) ácido etilenodiaminotetracético
OR	(<i>Odds Ratio</i>) Razão de probabilidades
p	Significância
IC	Intervalo de confiança
NS	Não Significativo

Dissertação elaborada e formatada conforme as
Normas da ABNT (Capítulo I) e da publicação
científica (Capítulo II): *Tissue Antigens*
disponível em:
< <http://authorservices.wiley.com/bauthor/journal.asp>>

SUMÁRIO

1.	CAPÍTULO I	11
1.1	Revisão Bibliográfica	11
1.1.1	Doença de Crohn	11
1.1.2	Epidemiologia	11
1.1.3	Aspectos Clínicos	12
1.1.4	Etiologia	13
1.1.5	Diagnóstico	14
1.1.6	Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH)	15
1.1.7	Sistema HLA	15
1.1.8	HLA-G: Gene, Proteína, Isoformas e Funções	16
1.2	Justificativa	20
1.3	Objetivos	21
1.3.1	Geral	21
1.3.2	Específicos	21
1.4	Referências	21
2.	CAPÍTULO II	26
2.1	Artigo: Susceptibilidade genética HLA-G (exons 2, 3 e 8) e doença de Crohn em uma população do Estado do Paraná, Brasil	26
3.	CAPÍTULO III	44
3.1	Conclusão	44
3.2	Perspectivas Futuras	44

1. CAPÍTULO I

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1 DOENÇA DE CROHN

A doença de Crohn (DC) descrita em 1932 por Burril Crohn, Gordon Oppenheimer e Leon Ginzburg, caracteriza-se pela presença de um processo inflamatório que acomete todo o sistema digestivo, entretanto, é mais comumente localizada no íleo terminal, cólon e intestino delgado (CROHN; GINZBURG, 1932; PINOTTI, 1994; PODOLSKY, 2002; THORENSEN; CULLEN, 2007).

A DC e a retocolite ulcerativa (RCU) representam a doença inflamatória intestinal (DII) caracterizada como uma doença autoimune sistêmica (PODOLSKI, 2002). Aproximadamente, 50% dos pacientes com DC apresentam a doença na porção final do intestino delgado (íleo) e na parte inicial do intestino grosso (cólon); 30-35% dos pacientes exibem doença apenas no intestino delgado; e 20-25% apenas doença colônica (SANDS, 2002).

1.1.2 EPIDEMIOLOGIA

Tanto a DC quanto a colite ulcerativa (CU) são crônicas afetando ambos os sexos (NIV; ABUKSIS; FRASER, 1999), embora segundo Le Maoult *et al.* (2003), na DC há uma discreta predominância de pacientes do sexo feminino, indicando talvez a presença de fatores hormonais na expressão da doença. James (2005) evidenciou que o risco relativo de DC é maior em fumantes, com incidência maior em mulheres que pode estar relacionada ao uso de contraceptivos orais.

De acordo com Niv, Abuksis e Fraser (1999), a distribuição dessas doenças é bimodal em relação à idade. A faixa de início da DC e também o maior pico, incide, entre 15 e 30 anos, sendo comum a doença se localizar no intestino delgado; e, o segundo menor pico, entre 50 e 70 anos, a doença se manifesta mais no cólon.

A prevalência e a incidência das doenças inflamatórias intestinais variam conforme a região estudada, afetando mais de 1.000.000 de americanos. A prevalência da DC é maior na América do Norte, e varia de 100 a 200 casos por 100.000 habitantes (LOFTUS, 2004). A DC é encontrada mais comumente em países desenvolvidos, tendo um rápido aumento na prevalência no decorrer do século XX, com estimativas de cerca de 20 a 40 casos a cada 100.000 pessoas (JAMES, 2005).

No Brasil existem poucos estudos epidemiológicos sobre a DC, possivelmente, devido à multiplicidade de sintomas e do custo elevado de exames diagnósticos. Contudo, estudos indicam que a incidência das DIIs parece ser menor nos países em desenvolvimento. Tal fato é complexo para ser analisado, dada à dificuldade em realizar diagnósticos adequados, bem como da ampla prevalência de diarreias infecciosas e parasitárias. Dados comprovam que, com o avanço da industrialização, as modificações de dieta e estilo de vida das populações, que contribuem para o aumento da incidência da doença (LOFTUS, 2004).

1.1.3 ASPECTOS CLÍNICOS

O quadro clínico da DC varia para cada indivíduo e depende da extensão, da localização e da presença de complicações. Frequentemente, os pacientes apresentam sintomas relacionados à dor abdominal com componentes inflamatórios ativos, cólica intermitente, intercalando períodos de dor mais intensos e outros mais amenos. Também é possível observar quadros de diarreia com moderada intensidade com muco, sangue e pus; febre, quadros de perda de apetite, desnutrição frequentes, emagrecimento, náuseas, vômitos e mal estar geral (REBMANN *et al.*, 2001; SANDS, 2002; JAMES, 2005).

Em alguns casos, o câncer de intestino grosso e sangramentos digestivos podem estar relacionados e, frequentemente, os pacientes exibem sangue, muco e/ou pus nas fezes. Na maioria das vezes, os sintomas da DC e colite ulcerativa são similares, o que dificulta o diagnóstico precoce (NIDDK, 1998).

A característica endoscópica marcante da DC consiste na agressão transmural que pode comprometer todas as camadas intestinais, da mucosa à serosa, implicando em lesões de caráter descontínuo (áreas de mucosa preservada em meio às de atividade inflamatória). O aumento dos folículos linfóides com anel eritematoso em volta é a primeira anormalidade constatada, levando à úlcera aftóide com progressão para ulceração profunda, fissura, fibrose, estenose e fistulização (FLORES, 2008).

De acordo com Sands (2002), os pacientes com DC ileocolônica podem exibir maior risco de formação de fístula em fossa ilíaca direita, com simulação de apendicite aguda, podendo apresentar suboclusão e oclusão intestinal repetidamente e, na maioria dos casos, necessitam de intervenção cirúrgica.

À medida que a inflamação transmural penetra nos órgãos adjacentes, tecidos ou pele, favorece a ocorrência de fístulas. Com a ativação do sistema imune ocorre a liberação de proteases e metaloproteinases que cooperam para a destruição dos tecidos, com formação do trajeto fistuloso e penetração nos tecidos adjacentes (SANDS, 2004).

Estudo realizado por Baker e Milton-Thompson (1971) revelou que em cerca de um terço dos pacientes com doença colônica são observados fístulas e abscessos com início concomitante aos sintomas luminais, ou mais raramente tais sintomas persistem até quatro anos em média.

Os medicamentos disponíveis atualmente reduzem a inflamação e frequentemente controlam os sintomas, contudo não curam a DC (GONÇALVES *et al.*, 2005).

1.1.4 ETIOLOGIA

As causas exatas que levam ao desenvolvimento da DC ainda são desconhecidas. Todavia, várias pesquisas sugerem que a doença, por ser uma doença multifatorial, é o resultado de uma interação anormal entre fatores genéticos; interação do sistema imune das mucosas, bem como o epitélio gastrointestinal com o meio ambiente, particularmente, o ambiente microbiano no intestino; e fatores alimentares, como os responsáveis pela DC. Tais fatores estariam envolvidos na modificação da resposta imune, desenvolvendo uma resposta inflamatória descontrolada e desordenada (STROBER; FUSS; BLUMBERG, 2002).

Em um familiar de primeiro grau, os riscos de desenvolvimento de DC é em torno de 5-8% (BINDER, 1998). Nesse mesmo estudo, o autor revela que um em cada cinco pacientes com DC pode ter um membro da família com a mesma patologia; de 5-10% dos pacientes têm mais um caso de DII entre os seus parentes de primeiro grau, com cerca de 75-80% de concordância para a mesma doença na família. O risco relativo da DC em familiares de primeiro grau é de 4 a 15 vezes em pacientes com DC.

Nas doenças autoimunes os fatores ambientais, genéticos, socioeconômicos contribuem para a ocorrência de reações inflamatórias. Um quadro viral ou bacteriano, ou até mesmo, a própria flora bacteriana intestinal, são agravantes para desregular o equilíbrio entre os antígenos luminais e a resposta imune da mucosa intestinal, ampliando e perpetuando a reação de inflamação do indivíduo geneticamente susceptível (ORHOLM *et al.*, 1991; FARRELL; LEMONT, 2002).

Os avanços científicos das últimas décadas aprofundaram conhecimentos acerca das alterações imunológicas analisadas na DC, tanto em relação aos fatores ambientais como os fatores genéticos. Entretanto, observa-se a presença de três fatores importantes para compreensão dos mecanismos imunológicos e posterior tratamento, sendo eles: susceptibilidade do hospedeiro, microbiota entérica e imunidade da mucosa (KUCHARZIK *et al.*, 2006). Assim sendo, a inflamação intestinal é iniciada e perpetuada por uma resposta imunológica a antígenos desconhecidos num hospedeiro geneticamente susceptível.

Alguns genes relacionados ao sistema imune foram apontados como possíveis marcadores no desenvolvimento da DC. Também alvo de probabilidade, o produto do gene HLA-G atua como uma molécula imunossupressora, funcionando como potencial de defesa contra a agressão inflamatória, sendo considerada decisiva para o equilíbrio da resposta imune. Embora o HLA-G apresente uma distribuição tecido-específica e um polimorfismo restrito, quando comparado às moléculas HLA clássicas, pode ser expresso de maneira diferente nos processos inflamatórios crônicos, favorecendo ou não a resposta T auxiliares do tipo 2 (Th2), e inibindo ou não as células *natural-killers* (NK) (TORRES *et al.*, 2004).

1.1.5 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da DC baseia-se na constatação de características clínicas e patológicas típicas da doença e na ausência/exclusão de provas de outras condições que imitam a doença, como por exemplo, infecção, neoplasia, colite ulcerativa. A endoscopia gastrointestinal com biópsia e os exames de imagem, tais como: a tomografia computadorizada e os estudos de contraste são apontados como os testes de diagnóstico com maior especificidade (LANDERS *et al.*, 2002).

Na fase aguda, o diagnóstico da DC é realizado por meio de critérios clínicos, imagens radiográficas, estudo radiológico contrastado, exames endoscópicos como colonoscopia, endoscopia, exames de diagnóstico por imagem (tomografia e ultrassonografia) e critérios histológicos. Ressalta-se que o diagnóstico diferencial é feito com a retocolite ulcerativa (PINOTTI, 1994; PODOLSKI, 2002). A diferenciação da DC de outras condições inflamatórias, como a infecção ou a colite ulcerativa, muitas vezes, não podem ser feitas com base na biópsia. Os aspectos macroscópicos são mais eficazes para a localização e distribuição (LANDERS *et al.*, 2002).

Com relação às manifestações clínicas e processo diagnóstico, Stange *et al.* (2006) relataram que a diarreia, quando estendida por mais de seis semanas, é o critério sugerido como prazo útil para diferenciação entre DC e diarreia aguda infecciosa. Nos exames radiológicos, os achados mais característicos consistem na agressão do intestino delgado e aparecimento de fístulas; a endoscopia exhibe lesões ulceradas características, intercaladas de áreas com mucosa normal de acometimento focal, com representação assimétrica e descontínua. Tal apresentação pode ser útil para a coleta de material e análise histopatológica, indicando acometimento transmural, padrão segmentar e presença de granulomas não caseosos.

Os achados endoscópicos são variados, desde erosões discretas, edema, enantema, friabilidade, sendo mais peculiar a presença de úlceras que podem ser aftóides, elípticas ou lineares, interpostas por mucosa normal, assim como lesões fibroestenósantes e fistulizantes (HYLENIUS *et al.*, 2004; NIKOLAUS; SCHREIBER, 2007; FLORES, 2008).

A endoscopia exerce um papel fundamental no diagnóstico da doença inflamatória intestinal, sobretudo, na DC, envolvendo o seguimento, a monitorização do tratamento e exclusão de outros diagnósticos (FREIRE; PORTELA; SOFIA, 2010).

1.1.6 COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE (CPH)

Na região do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) encontram-se diversos locos, dentre eles o conhecido sistema antígeno leucocitário humano (HLA), cujos produtos transcritos estão localizados na superfície de praticamente todas as células do organismo, e é responsável pela apresentação de peptídeos exógenos e endógenos aos linfócitos T auxiliares e T citotóxicos, respectivamente. As primeiras moléculas descritas, em camundongos, foram tidas como antígenos polimórficos da superfície celular, codificadas por um loco gênico denominado H-2. Foram demonstrados que os produtos desse loco constituíam a principal barreira imunológica aos transplantes de aloenxertos. Por isso, esses antígenos receberam a denominação histocompatibilidade. Em seguida, foram constatados que os mesmos produtos faziam parte de um complexo de genes pertencente à mesma região cromossômica e participavam diretamente na resposta imune. Os genes do CPH foram encontrados em diferentes espécies de mamíferos (DUNHAM *et al.*, 1987).

1.1.7 SISTEMA HLA

Na década de 50, o sistema HLA foi descoberto por Dausset, Payne e Van Rood em estudos sorológicos de pacientes politransfundidos detectando anticorpos leucoaglutinantes, sendo descritos o primeiro antígeno ao qual denominou MAC (atual HLA-A2) referindo-se ao conjunto gênico HLA mapeado em um segmento de aproximadamente 4 megabases de DNA do braço curto do cromossomo 6 humano, na banda 6p21.31. Nessa região do CPH há mais de 220 genes, que codificam diferentes produtos moleculares. Muitos desses genes atuam como codificadores de funções relacionadas à resposta imunológica (TERASAKI, 1960; CHRISTIANSEN *et al.*, 1994; PARHAM, 2001).

O sistema gênico HLA caracteriza-se por um acentuado polimorfismo nas populações. As moléculas do HLA são divididas em Classes I e II. As moléculas HLA de Classe I são expressas pela maioria das células, com a função de apresentar peptídeos intracelulares às

células T citotóxicas CD8⁺. A Classe II está presente, essencialmente, em células denominadas de apresentadoras de antígeno (APC) (ISHITANI *et al.*, 2003).

De acordo com a estrutura e função, os produtos dos genes do CPH são usualmente referidos e classificados por Lewin (2001) como: *Proteínas de Classe I*: em humanos correspondem aos antígenos clássicos de transplantes ou moléculas Classe Ia (HLA-A, HLA-B e HLA-C); e o grupo de moléculas não clássicas ou Classe Ib (HLA-E, HLA-F e HLA-G); *Proteínas de Classe II*: HLA-DR, -DQ e -DP encontram-se presentes na superfície dos linfócitos B e T e, em outras células do sistema imune como os macrófagos. Existe ainda um loco HLA-H, -J, -K, e -L, denominados pseudogenes. A região de Classe II humana está dividida em quatro sub-regiões, DR, DQ, DZ/DO e DP (LEWIN, 2001; FAINARDI *et al.*, 2003).

As proteínas codificadas pelos genes HLA são dímeros localizados na membrana plasmática. Uma parte da proteína projeta-se a partir da superfície extracelular. As proteínas de Classe II são formadas por duas cadeias, alfa(α) e beta(β), cuja combinação determina uma estrutura tridimensional, com dois domínios extracelulares. As proteínas de Classe I consistem em um dímero formado pela cadeia alfa, codificada pelos respectivos genes de Classe I e pela proteína beta2-microglobulina, codificada por um gene de mesmo nome situado no cromossomo 15, com três domínios externos, uma região transmembrana e um pequeno domínio citoplasmático que reside no interior da célula (LEWIN, 2001; FAINARDI *et al.*, 2003).

A região do CPH de classe III compreende aproximadamente 760 kb, localizada entre as regiões de classe I e II, caracteriza-se por uma densidade de genes notavelmente elevada em meio às três regiões CPH, com pelo menos 59 genes expressos. Contudo, não é conhecido se todos os genes identificados nessa região são funcionais ou pseudogenes. Foram definidos locos de susceptibilidade a doenças como de Graves, DC, Lúpus Eritematoso Sistêmico, além de genes que atuam no processo de ativação do sistema complemento que codificam as citocinas TNF α e LT α (MATSUZAKA *et al.*, 2001).

1.1.8 HLA-G: GENE, PROTEÍNA, ISOFORMAS E FUNÇÕES

O loco HLA-G situa-se telomericamente ao HLA-A, no braço curto do cromossomo 6. A organização gênica do HLA-G assemelha-se à disposição dos genes de Classe I (HLA-A, HLA-B e HLA-C), compostos por 8 exons, 7 introns e uma região 3' transcrita e não traduzida (3'UTR) (OBER; ALDRICH, 1997; VAN DER VEN; PFEIFFER; SKRABLIN, 2000; VIANNA *et al.*, 2007).

O HLA-G constitui-se por uma molécula de classe Ib composta por três domínios alfa ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$), não covalentemente agregada a uma cadeia de beta2-microglobulina, com pouca expressão em condições saudáveis, possuindo alelos que codificam 14 proteínas distintas que formam as três cadeias alfa, com baixo índice de polimorfismo apresentando isoformas ligadas à membrana celular ou sob forma solúvel (LEWIN, 2001; FAINARDI *et al.*, 2003; VIANNA *et al.*, 2007).

No HLA-G há 4.396 pb, sendo que o exon 1 (73 pb) codifica um peptídeo sinal, o exon 2 (270 pb) codifica o domínio $\alpha 1$, o exon 3 (276 pb) codifica o domínio $\alpha 2$ e o exon 4 (276 pb) codifica o domínio $\alpha 3$. O exon 5 (114 pb) codifica a região transmembrana. Os exons 6, 7 e 8 totalizam 115 pb e codificam o domínio citoplasmático da molécula e a região 3' não traduzida, respectivamente (OBER; ALDRICH, 1997; CAROSELLA; DAUSSET, KIRSZENBAUM, 1999). Os domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$ das moléculas de classe I transcritos dos exons 2 e 3 dos genes HLA constituem a região de ligação com peptídeo antigênico, no qual estes se ligam e são apresentados aos receptores das células T (VAN DER VEN; PFEIFFER; SKRABLIN, 2000).

O HLA-G foi inicialmente identificado no citotrofoblasto que constitui a interface materno-fetal (ROUAS-FREISS *et al.*, 1999). No decorrer da gestação, as células citotrofoblásticas implicam na tolerância imunológica, indicando a ocorrência de mecanismos moduladores e moderadores característicos no sistema imune materno que evitam a rejeição do feto (ROUAS-FREISS *et al.*, 1999; BARICORDI *et al.*, 2008).

Possivelmente, as moléculas HLA-G podem estar envolvidas na proteção do feto contra a atividade lítica das células NK, podendo atuar sobre os receptores inibitórios (KIR) de células NK presentes na decídua materna, protegendo as células trofoblásticas contra a lise mediada por células NK, que contribuem para a eliminação do tecido embrionário (ROUAS-FREISS *et al.*, 1999; ROUSSEAU *et al.*, 2000). Estudos comprovaram que no decorrer de uma gestação normal há uma elevação do número de receptores inibidores nas células NK deciduais, que reconhecem as moléculas do HLA-G fetal, evitando a ativação de tais células (BARICORDI *et al.*, 2008).

Desta forma, há evidências de que a modulação da expressão das moléculas HLA-G poderia ser uma condição essencial para uma gestação sem comprometimentos, podendo o que, em parte, poderia estar associada à expressão em níveis elevados da molécula sHLA-G (PFEIFFER *et al.*, 2000), inibindo a ativação das células T citotóxicas e células NK maternas (SELINGER; ABKEN; FERRONE, 2003; VIANNA *et al.*, 2007). Para Van Der Ven; Pfeiffer; Skrablin (2000), o HLA-G, tanto nas isoformas ligadas à membrana, quanto solúveis

no plasma, atua como imunorregulador, com importante função imunossupressora e possível indução de imunotolerância.

Alguns mecanismos têm sido descritos sobre a inibição de alguns processos imunológicos mediados por HLA-G. Entre esses, destacam-se a inibição da atividade citotóxica de linfócitos TCD8⁺ e células NK (LE GAL *et al.*, 1999); efeitos inibitórios na aloproliferação de células TCD4⁺ (BAINBRIDGE; ELLIS; SARGENT, 2000); inibição na resposta proliferativa das células T, bem como na maturação das células dendríticas (BAHRI *et al.*, 2006; RISTCH *et al.*, 2005). O efeito inibidor do HLA-G ocorre via interação com receptores inibidores, como ILT-2 (presente também em alguns tipos de células NK e em todos os monócitos e células B) e ILT-4 (presente também em todos os monócitos, macrófagos e células dendríticas). Isso ndicam que o HLA-G atua em ambas as respostas: inata e adquirida (CAROSELLA *et al.*, 1999; VIANNA *et al.*, 2007).

Carosella (2011) relata que a interação da molécula HLA-G com alguns receptores celulares produz efeitos inibitórios na atividade dessas células e, portanto, uma diminuição da resposta imunológica. No que se refere à modulação da função de algumas células, a sua expressão em doenças inflamatórias crônicas, como é o caso da DC, poderia gerar um efeito inibitório da resposta imune, contribuindo para a redução do processo inflamatório dessa doença. De acordo com Carosella *et al.* (2008), a expressão do HLA-G pode ser induzida em células em condições patológicas como câncer, transplantes, infecções virais e doenças autoimunes.

Apesar da existência de estudos, o mecanismo que regula a expressão do HLA-G ainda não foi bem elucidado. A que região 3' transcrita e não traduzida (3'UTR) tem uma função importante na expressão do HLA-G, por meio de mecanismos reguladores pós-transcricionais. Assim, os alelos HLA-G que apresentam a inserção de 14bp (+ 14pb), durante o processamento alternativo (*splicing*) que elimina as primeiras 92 bases da região 3'UTR (exon 8) torna o RNAm (ácido ribonucléico mensageiro) mais estável do que o RNAm, que contém a sequência completa, portanto, mais resistente à degradação (ROUSSEAU *et al.*, 2003). O alelo + 14pb está também associado à diminuição da taxa de transcritos de HLA-G, tanto nas isoformas de membrana quanto nas solúveis e, em alguma extensão, com níveis menores de moléculas HLA-Gs (HVIID *et al.*, 2003). Portanto, patologias como a DC poderiam estar associadas à deleção de 14pb na região 3'UTR do exon 8 presente em alguns alelos.

A distribuição de alelos HLA-G e suas frequências apresentam diferenças entre populações e grupos étnicos, embora certas variações nucleotídicas possam ser

compartilhadas por todas as populações indicando uma origem comum de alelos do HLA-G (VAN DER VEN; PFEIFFER; SKRABLIN, 2000). Os diferentes alelos HLA-G apresentam pouca variações, destes apenas cinco são observados em populações no mundo todo. Em meio a esses, constatou-se que o grupo $G^*01:01:01$ é predominante, com frequências variadas entre 32 e 82% nas populações caucasianas africanas e japonesas (LARSEN; HVIID, 2009; MOREAU; FLAJOLLET; CAROSELLA, 2009). Contudo, ressalta-se que a maioria dos polimorfismos do HLA-G é sinônima, não apresentando modificações na composição de aminoácidos da proteína HLA-G (VAN DER VEN; PFEIFFER; SKRABLIN, 2000). Quando comparado com os genes HLA de Classe I clássicos, que apresentam centenas de variantes, observou-se que loco HLA-G mostra um baixo número de variantes. Conforme o Sistema de Informação Internacional de Imunogenética – IMGT (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html>), até a data de 20 de fevereiro de 2013, estão listados no *IMGT/HLA Database* 50 alelos, que codificam 16 proteínas funcionais distintas e dois alelos nulos (LARSEN; HVIID, 2009; DONADI *et al.*, 2011; IMGT/HLA Database, 2013).

Os polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) definem o maior grupo de alelos HLA-G. Apesar disso, a maioria das mutações desse gene é silenciosa, gerando poucas mutações que contribuem para alterações de aminoácidos na proteína HLA-G. A partir dessas modificações são definidas 16 proteínas variantes (*HLA-G*01:01*, **01:02*, **01:03*, **01:04*, **01:06*, **01:07*, **01:08*, **01:09*, **01:10*, **01:11*, **01:12*, **01:14*, **01:15*, **01:16*, **01:17*, e **01:18*) (CAMPBELL; ANTONIOU; POWIS, 2012; LARSEN; HVIID, 2009; MOREAU; FLAJOLLET; CAROSELLA, 2009; IMGT, 2013).

Resultantes de mutações de exons que geram uma parada precoce da transcrição, têm-se dois alelos nulos do gene HLA-G: o alelo $G^*01:05N$ que exibe uma deleção no códon 130, dentro do exon 3, causando a parada prematura da transcrição no códon 171; e o alelo $G^*01:13N$ que se caracteriza por uma mutação pontual no códon 54, no exon 2, gerando, também, um códon de parada prematuro (LARSEN; HVIID, 2009).

As variações nucleotídicas das regiões promotora e 3'UTR exercem certa influência nos níveis de HLA-G, mediante uma modificação da afinidade das sequências-alvos do gene causadas por fatores transcricionais e/ou pós-transcricionais. Os polimorfismos da região codificadora passam a produzir alterações conformacionais nas moléculas de HLA-G, com modificações que refletem nas suas principais funções, tais como: a produção de isoformas, interação com receptores celulares, modulação da resposta imune e capacidade de se acoplar a peptídeos (PÉNZES *et al.*, 1999; DONADI *et al.*, 2011).

Decorrente de uma determinada situação fisiológica e/ou clínica, a presença de HLA-G pode ser favorável ou prejudicial ao organismo. Em caso de condições patológicas, em que uma resposta imune potente e espaçada seja necessária, a expressão de HLA-G não é benéfica (casos de câncer e nas doenças virais crônicas), por exemplo. Ao contrário, nos casos em que uma resposta imune vigorosa seja indesejável, a presença de HLA-G é benéfica (casos de transplantes e de doenças autoimunes) (DONADI *et al.*, 2011).

O HLA-G pode atuar de forma direta na atividade das células participantes da resposta imune, constituindo-se em um foco atrativo para estudos voltados à compreensão dos mecanismos de diferentes situações clínicas como em casos de gravidez e suas complicações, transplantes, infecções virais, cânceres, doenças inflamatórias e autoimunes (CAROSELLA, 2011).

A despeito da associação de diferentes patologias e/ou situações clínicas aos polimorfismos do gene HLA-G, inclusive, os polimorfismos 3'UTR, as relações das variações dessa molécula com os casos de DC, ainda não são bem esclarecidas (DONADI *et al.*, 2011).

1.2 JUSTIFICATIVA

A DC é autoimune e multifatorial. A sua prevalência vem aumentando de forma gradativa, principalmente, em países industrializados e desenvolvidos. Apesar do avanço nos métodos diagnósticos, ainda não foi possível a identificação da etiologia e os fatores desencadeadores da DC para o melhor controle e cura da mesma. A associação de mecanismos imunológicos e genéticos com doenças gastrintestinais é um campo de pesquisa promissor. Evidências indicam relações consistentes entre esses sistemas, tanto na fisiopatologia das doenças, quanto na manutenção dos estados de saúde (ZELANTE *et al.*, 2001; RIZZO *et al.*, 2012).

Apesar da importância dos genes HLA-G na resposta imune, poucos estudos de associação têm sido realizados para investigar esses genes e a DC (DONADI *et al.*, 2011). Assim sendo, o estudo da presença de genes de susceptibilidade/resistência no desenvolvimento da DC pode contribuir para uma melhor compreensão do papel e influência dos fatores genéticos na resposta inflamatória do indivíduo com doenças crônico-degenerativas, visando o desenvolvimento de estratégias efetivas para a prevenção, diagnóstico e possibilidades de tratamento.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 GERAL

Avaliar a influência do gene HLA-G na susceptibilidade ou resistência no desenvolvimento da doença de Crohn.

1.3.2 ESPECÍFICOS

- Identificar os alelos HLA-G em uma população de indivíduos adultos que desenvolveram a doença de Crohn;
- Identificar os alelos HLA-G em uma população de indivíduos adultos saudáveis, não relacionados e sem histórico de doença;
- Comparar os alelos HLA-G nos grupos pacientes e controles;
- Estimar as frequências alélicas e genótípicas destes genes polimórficos nos grupos pacientes e controles;
- Identificar a associação dessas variantes alélicas HLA-G na susceptibilidade e/ou resistência à Doença de Crohn.

1.4 REFERÊNCIAS

BAHRI, R.; HIRSCH, F.; JOSSE, A.; ROUAS-FREISS, N. *et al.* Soluble HLA-G inhibits cell cycle progression in human alloreactive T lymphocytes. **Journal of Immunology**, v.176, p. 1331-1339, 2006.

BAINDRIDGE, D.R.; ELLIS, S.A.; SARGENT, I.L. HLA-G suppresses proliferation of CD4(+) T lymphocytes. **Journal of Reproductive Immunology**, v.48, p. 17-26, 2000.

BAKER, W.N; MILTON-THOMPSON, G.J. The anal lesion as the sole presenting symptom of intestinal Crohn's disease. **Gut**, v.12, p.865-868, 1971.

BARICORDI, O.; STIGMANI, M.; MELCHIORRI, L.; RIZZO, R. HLA-G and inflammatory diseases. **Inflammation & Allergy - Drug Targets**, v.7, p. 67-74, 2008.

BINDER, V. Genetic epidemiology of Inflammatory Bowel Disease. **Digestive Diseases and Sciences**, v.16, p.351-55, 1998.

CAMPBELL, E.; ANTONIOU, A.; POWIS, S. The multi-faceted nature of HLA class I dimer molecules. **Immunology**, v.136, n.4, p.380-4, ago 2012.

CAROSELLA, E.D. The tolerogenic molecule HLA-G. **Immunology Letters**, v.138, p.22-4, 2011.

CAROSELLA, E.D.; DAUSSET, J.; KIRSZENBAUM, M. Hla-G Revised. **Immunology Today**, Amsterdam, v.20, n.2, p.60-62, 1999.

CAROSELLA, E.D.; MOREAU, P.; LE MAOULT, J.; ROUAS-FREISS, N. HLA-G: from biology to clinical benefits. **Trends in Immunology**, v.29, n.3, p. 125-132, 2008.

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

CROHN, B.; GINZBURG, L., OPPENHEIMER, G. Regional ileitis. A pathological and clinical entity. **JAMA**, v.99, p. 1323-29, 1932.

DONADI, E.A.; CASTELLI, E.C.; ARNAIZ-VILLENA, A.; ROGER, M. *et al.* Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.68, p.369-395, 2011.

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

FAINARDI, E.; RIZZO, R.; MELCHIORRI, L.; VAGHI, L. *et al.* Presence of detectable levels of soluble HLA-G molecules in CSF of relapsing-remitting multiple sclerosis: relationship with CSF soluble HLA-I and IL-10 concentrations and MRI findings. **Journal of Neuroimmunology**, Amsterdam, v.142, n.1-2, p. 149-158, 2003.

FARRELL, R.; LEMONT, J. Microbial factors in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology Clinics of North America**, v.31, p.41-62, 2002.

FLORES, C. **Doenças Inflamatórias Intestinais: Acompanhamento Endoscópico**. SOBED - Sociedade Brasileira de Endoscopia Digestiva. Rio Grande do Sul, dezembro, 2008.

FREIRE, P.; PORTELA, F.; SOFIA, C. Scores endoscópicos na doença de Crohn. **Revista Portuguesa de Coloproctologia**, v.7, n.3, p.126-134, 2010.

GONÇALVES, C.G.; COELHO, J.C.U. AMARANTE, H.M.B.S. Obstrução intestinal após uso de infliximab no tratamento de fístula êntero-cutânea na Doença de Crohn. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.2, n.4, p.223:224, 2005.

HVIID, T.V.; HYLENIUS, S.; RORBYE, C.; NIELSEN, L.G. HLA-G allelic variants are associated with differences in HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels. **Immunogenetics**, v. 55, p. 63-79, 2003.

HYLENIUS, S.; ANDERSEN, A-M.N.; MELBY, M.; HVIID, T.V. Association between HLA-G genotype and risk of preeclampsia: a case-control study using family triads. **Molecular Human Reproduction**, v.10, n. 4, p. 237-246, 2004.

IMGT/HLA, Database. **HLA Alleles Numbers**. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html>>. Acesso em: 25 fev. 2013.

ISHITANI, A.; SAGESHIMA, N.; LEE, N.; DOROFEEVA, 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. **Journal of Immunology**, v.171, p.1376-1384, 2003.

JAMES, S. P. Prototypic disorders of gastrointestinal mucosal immune function: Celiac disease and Crohn's disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.115, n.1, p. 25-30, January, 2005.

KUCHARZIK, T.; MAASER, C.; LUGERING, A.; KAGNOFF, M.; *et al.* Recent understanding of pathogenesis: implications for future therapies. **Inflammatory Bowel Disease**, v.12, n.11, p.1068-1083, nov., 2006.

LANDERS, C.J.; COHAVY, O.; MISRA, R.; YANG, H. *et al.* Selected Loss of Tolerance Evidenced by Crohn's Disease-Associated Immune Responses to Auto-and Microbial Antigens. **Gastroenterology**, v.123, p.689-699, 2002.

LARSEN, M.; HVIID, T.V. Human leukocyte antigen-G polymorphism in relation to expression, function, and disease. **Human Immunology**, v.70, n.12, p.1026-34, dez 2009.

LE GAL, F.A. ; RITEAUL, B. ; SEDLIK, C. ; KHALIL-DAHER, I. *et al.* HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. **International Immunology**, v.11, n.8, p. 1351-1356, 1999.

LE MAOULT, J.; LE DISCORDE, M.; ROUAS-FREISS, N.; MOREAU, P. *et al.* Biology and functions of human leukocyte antigen-G in health and sickness, **Tissue Antigens**, v.62, p.273-84, 2003.

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

LOFTUS, E. Clinical epidemiology of Inflammatory Bowel Disease: incidence, prevalence and environmental influences. **Gastroenterology**, v. 126, p.1504-17, 2004.

MATSUZAKA, Y.; MAKINO, S.; NAKAJIMA, K.; TOMIZAWA, M. *et al.* New polymorphic microsatellite markers in the human MHC class III region. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v.57, n.5, p.397-404, 2001.

MOREAU, P.; FLAJOLLET, S.; CAROSELLA, E.D. Non-classical transcriptional regulation of HLA-G: an update. **Journal of Cellular and Molecular Medicine's**, v.13, p.2973-89, 2009.

NIDDK, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. **Crohn's Disease**. NIH Publication, n. 98, p.3410, 1998.

NIKOLAUS, S.; SCHREIBER, S. Diagnostics of Inflammatory Bowel Disease. **Gastroenterology**, v.133, n.5, p.1670-1689, November, 2007.

NIV, Y.; ABUKSIS, G.; FRASER, G.M. Epidemiology of Crohn's disease in Israel: a survey of Israeli kibbutz settlements. **American Journal of Gastroenterology**. v.94, n.10, p.2961-2965, 1999.

OBER, C.; ALDRICH, C.L. HLA-G polymorphisms: neutral evolution or novel function? **Journal of Reproductive Immunology**, v. 36, p. 1-21, 1997.

ORHOLM, M.; MUNKHOLM, P.; LANGHOLZ, E., NIELSEN, O.H. *et al.* Familial occurrence of inflammatory bowel disease. **New England Journal of Medicine**, v. 324, n. 2, p. 84-88, Jan. 10, 1991.

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

PÉNZES, M.; RAJCZY, K.; GYODI, E.; RETI, M.; *et al.* HLA-G gene polymorphism in the normal population and in recurrent spontaneous abortion in Hungary. **Transplantation Proceedings**, New York, v. 31, n. 4, p.1832-1833, 1999.

PFEIFFER, K.A.; REBMANN, V.; PASSLER, M.; VAN DER VEN, K. *et al.* Soluble histocompatibility antigen levels in early pregnancy after IVF. **Human Immunology**, New York, v. 61, p. 559-564, 2000.

PINOTTI, H.W. **Tratado de clínica cirúrgica do aparelho digestivo**. São Paulo: Atheneu; 1994.

PODOLSKI, D.K. Inflammatory Bowel Disease. **New England Journal of Medicine**, v.347, n. 6, p.417-29, 2002.

REBMANN, V.; VAN DER VEN, K.; PÄSSLER, M.; PFEIFFER, K. *et al.* Association of soluble HLA-G plasma levels with HLA-G alleles. **Tissue Antigens**; v.57, n.1, p. 15-21, 2001.

RISTICH, V.; LIANG, S.; ZHANG, W.; WU, J. *et al.* Tolerization of dendritic cells by HLA-G. **European Journal of Immunology**, v.35, n.4, p. 1133-1142, 2005.

RIZZO, R.; BORTOLOTTI, D.; BARICORDI, O.R.; FAINARDI, E. New Insights into HLA-G and Inflammatory Diseases. **Inflamm Allergy Drug Targets**, v.11, n.5, p. 1-15, 2012.

ROUAS-FREISS, N.; KHALIL-DAHER, I.; GONÇALVES, R.; MENIER, C. *et al.* Role of HLA-G in maternal-fetal immune tolerance. **Transplantation Proceedings**, New York, v. 31, p. 724-725, 1999.

ROUSSEAU, P.; LE DISCORDE, M.; MOUILLOT, G.; MARCOU, C. *et al.* The 14bp deletion-insertion polymorphism in the 3'UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. **Human Immunology**; v.64, p.105-10, 2003.

ROUSSEAU, P.; PAUL, P.; O'BRIEN, M.; DAUSSET, J. *et al.* The X1 box of HLA-G promoter is a target site for RFX and Sp1 factors. **Human Immunology**, New York, v. 61, p. 1132-1137, 2000.

SANDS, B. Crohn's Disease. In: **Gastrointestinal and Liver Disease**; Sleisenger & Fordtran. 2002. 7th edition.

SANDS, B. From symptom to diagnosis: clinical distinctions among various forms of intestinal inflammation. **Gastroenterology**, v.126, p. 1518-32, 2004.

SELIGER, B.; ABKEN, H.; FERRONE, S. HLA-G and MIC expression in tumors and their role in anti-tumor immunity. **Trends Immunology**, n.24, p. 82-87, 2003.

STANGE, E.F.; TRAVIS, S.P.L.; VERMEIRE, S.; BEGLINGER, C. *et al.* European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. **Gut**, v.55(Suppl 1), p. i1-i15, March, 2006.

STROBER, W.; FUSS, J.M.; BLUMBERG, R.S. The immunology of mucosal models of inflammation. **Annual Review of Immunology**, v.20, p.495-549, 2002.

TERASAKI, P. I. **History of HLA – Ten Recollections**. Los Angeles: Ucla, 1960.

THORESON, R.; CULLEN, J.J. Pathophysiology of inflammatory bowel disease: an overview. **Surgical Clinics of North America**, v.87, p.575–585, 2007.

TORRES, M.I.; LE DISCORDE, M.; LORITE, P.; RÍOS, A. *et al.* Expression of HLA-G in inflammatory bowel disease provides a potential way to distinguish between ulcerative colitis and Crohn's disease. **International Immunology**; v.16, p.579-83, 2004.

VAN DER VEN, K.; PFEIFFER, K.; SKRABLIN, S. HLA-G polymorphisms and molecule function – question and more questions- a review. **Placenta**, v.7, n.4, p.373-378, 2000.

VIANNA, P.; DALMÁZ, C.A.; VEIT, T.D.; TEDOLDI, C. *et al.* Immunogenetics of pregnancy: role of 14bp deletion in maternal HLA-G gene in primiparous pre-eclamptic Brazilian women. **Human Immunology**, v.68, p.668-74, 2007.

2. CAPÍTULO II

2.1 Artigo: SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA HLA-G (EXONS 2, 3 E 8) E DOENÇA DE CROHN EM UMA POPULAÇÃO DO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL

SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA HLA-G (EXONS 2, 3 E 8) E DOENÇA DE CROHN EM UMA POPULAÇÃO DO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL

Carla Alessandra Ruiz Leite¹, Andressa Alves Fernandez Gonçalves², Priscila Samara Mazine³, Jeane Eliete Laguila Visentainer⁴, Maria Luiza Petzl-Erler⁴, Luiza Tamie Tsuneto⁵.

¹Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá (UEM);

²Laboratório de Imunogenética, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá.

³Doutoranda do Programa Biociências Aplicadas à Farmácia, Universidade Estadual de Maringá.

⁴Laboratório de Genética Molecular Humana, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.

⁵Doutora, Docente do Departamento de Ciências Básicas da Saúde da UEM.

Endereço para correspondência: Universidade Estadual de Maringá (UEM). Departamento de Ciências Básicas da Saúde (DBS) – Laboratório de Imunogenética – Av. Colombo, nº 5790
CEP 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

Ittsuneto@uem.br

SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA HLA-G (EXONS 2, 3 E 8) E DOENÇA DE CROHN EM UMA POPULAÇÃO DO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL

RESUMO

Introdução. Alguns genes relacionados ao sistema imune foram apontados como possíveis marcadores no desenvolvimento da doença de Crohn (DC). Os produtos do gene HLA-G atua como uma molécula imunossupressora, com potencial de defesa contra a agressão inflamatória tornando-se, decisiva no equilíbrio da resposta imune. **Objetivo.** Avaliar a influência do gene HLA-G na susceptibilidade ou resistência no desenvolvimento da doença de Crohn. **Métodos.** O estudo caso-controle foi realizado com 80 pacientes e 80 controles para os exons 2 e 3 de HLA-G e 99 pacientes e 323 controles para o exon 8 de HLA-G. A genotipagem foi realizada nos exons 2 e 3 por PCR-SBT e exon 8 por PCR-SSP. **Resultados.** As associações realizadas entre grupo controle vs indivíduos com DC não demonstraram nenhuma associação significativa, exceto entre as frequências alélicas dos exons 2 e 3 do alelo *HLA-G*01:04* (27,5% vs 8,8%; $p = 0,000018$; OR 3,9557; IC 2,067-7,5693); e para o alelo *HLA-G*01:03* (5,6% vs 13,1%; $p = 0,03342$; OR 0,3945; IC 0,1748-0,8905). As comparações das frequências genotípicas do exon 8 entre pacientes e controles não apresentaram nenhuma diferença significativa. **Conclusão.** Nossos resultados sugerem a participação de genes HLA-G na susceptibilidade e resistência à DC.

Palavras-chave: HLA-G, doença de Crohn, caso-controle, susceptibilidade.

ANALYSIS OF GENETIC SUSCEPTIBILITY HLA-G (AXONS 2, 3 AND 8) AND CROHN'S DISEASE IN A POPULATION OF THE PARANÁ STATE, BRAZIL

ABSTRACT

Introduction. Some genes related to the immune system have been suggested as possible markers in the development of Crohn's diseases (DC). Also target of probability, the product of the gene HLA-G, which acts as an immunosuppressive molecule with defense potential against inflammatory aggression, is therefore decisive in balancing the immune response.

Objective. Evaluate the influence of the HLA-G gene in the susceptibility or the resistance to the development of Crohn's disease. **Methods.** The case-control study was conducted with 80 patients and 80 controls for exons 2 and 3 HLA-G and 99 patients and 323 controls for exon 8 of HLA-G. Genotyping was performed by molecular biology for genes HLA-G: exons 2 and 3 by PCR-SBT and exon 8 by PCR-SSP. **Results.** The associations made between the control group *vs.* individuals with CD not showed significant associations, except between the allelic variants of exons 2 and 3 HLA-G*01:04 (27.5% *vs.* 8.8%, $p = 0.000018$, OR 3.9557, CI 2.067 - 7.5693) and for HLA-G*01:03 (5.6% *vs.* 13.1%, $p = 0.03342$, OR 0.3945, CI 0.1748 to 0.8905). Comparisons of genotype frequencies of exon 8 between patients and controls showed no significant difference. **Conclusion.** Our results suggest that HLA-G gene in the susceptibility and resistance to DC.

Keywords: HLA-G, Crohn's disease, case-control, susceptibility.

INTRODUÇÃO

A doença de Crohn (DC) foi descrita em 1932, por Burril Crohn, Gordon Oppenheimer e Leon Ginzburg [1]. A DC é compreendida como uma afecção sistêmica, inflamatória crônica, transmural e intermitente ao longo do tubo digestivo, com manifestações relacionadas, principalmente ao trato gastrointestinal (TGI), devido às alterações na imunorregulação intestinal [2, 3, 4, 5]. Em indivíduos jovens, primeiro pico da doença entre 15-30 anos, a tendência comum de localização é no intestino delgado; e no segundo e menor pico de incidência, de 50-70 anos, a doença costuma localizar-se no cólon [2].

Indivíduos com DC podem apresentar quadro clínico característico de dor abdominal, diarreias muco-pio-sanguinolenta com moderada intensidade, quadros de desnutrição frequentes, emagrecimento, anorexia, náuseas e vômitos. O grau de severidade da diarreia tem correlação com a extensão e a severidade da inflamação transmural do intestino, com manifestações sistêmicas como: fadiga, febre, emagrecimento e anorexia, na maioria dos pacientes [5, 6, 7, 8].

Até o momento, não existe uma causa exata para definir da DC. Estudos realizados mostram que o fator genético e ambiental está fortemente presente, o que caracteriza a DC como uma doença de herança multifatorial. O somatório dos fatores genéticos, socioeconômicos e a microbiota intestinal supõem uma predisposição diferencial à doença [9, 10, 11].

A origem da DC está relacionada a um quadro viral ou bacteriano, ou até mesmo a própria flora bacteriana intestinal no indivíduo geneticamente susceptível, o que causa um desequilíbrio entre os antígenos luminiais e a resposta imune da mucosa intestinal, que contribui para ampliar e perpetuar a reação de inflamação [9, 10, 12, 13].

Os avanços científicos das últimas décadas aprofundaram conhecimentos acerca das alterações imunológicas analisadas na DC. Alguns genes relacionados ao sistema imune são apontados como possíveis marcadores no desenvolvimento da DC, sendo o produto do gene HLA-G, também, alvo de probabilidade [14, 15, 16].

O HLA-G foi observado primeiramente na gestação, cuja expressão nas células citotrofoblásticas poderia contribuir na inibição das células *natural-killers* (NK) e permitir a continuidade da gestação. A falha deste mecanismo permitiria a ativação das células NK,

levando a ocorrência da pré-eclampsia, ou até mesmo a extinção do tecido embrionário [13, 17, 18, 19].

Embora a molécula de HLA-G pertencente ao CPH classe Ib apresente uma distribuição tecido específica e também um polimorfismo restrito quando comparado às moléculas de HLA clássicas, essa pode ser expressa de modo diferente nos processos inflamatórios crônicos, podendo desequilibrar o balanço da resposta imune Th1/Th2 [12, 13, 17, 20, 21, 22]. A ação do HLA-G como molécula imunossupressora, tem relação com uma função de defesa contra a agressão inflamatória [13, 14, 15, 22, 23].

O gene HLA-G está localizado no braço curto do cromossomo 6. A molécula HLA-G apresenta diversos sítios de variabilidade que pode influenciar etiopatogenia da doença. A presença de uma deleção (14pb) na região 3' UTR (exon 8) do gene HLA-G pode exercer influência na estabilidade do RNAm de HLA-G, dessa forma, pode influenciar na atividade de transcrição Essa posição têm sido investigada em diversas doenças, porém com DC nenhum estudo foi mencionado até agora [24, 25].

Assim sendo, o presente estudo tem como objetivo avaliar a influência do gene HLA-G na susceptibilidade ou resistência no desenvolvimento da doença de Crohn.

MATERIAL E MÉTODOS

Aspectos Éticos. O presente estudo foi conduzido de acordo com as normas preconizadas pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – COPEP da Universidade Estadual de Maringá – UEM, sob o Parecer nº 213/2008 – CAAE 0008-08. Todos os participantes assinaram o termo de consentimento, após esclarecimentos sobre o projeto.

Caracterização do estudo. Nesse estudo caso-controle foram investigados 80 pacientes com diagnóstico clínico-laboratorial de doença de Crohn, pela análise histopatológica de biópsia, associados aos sintomas clínicos; e 80 indivíduos controle saudáveis, não relacionados e sem histórico de doença intestinal, pareados de acordo com o grupo racial, sexo e idade, para os exons 2 e 3; 99 pacientes com diagnóstico clínico-laboratorial de doença de Crohn; e 323 controles para o exon 8 de HLA-G. Os indivíduos do

grupo controle foram selecionados nas campanhas de doação de medula óssea. Foram coletadas amostras de 10mL de sangue, por meio de agulhas e seringas descartáveis.

Amostras biológicas. O DNA genômico foi extraído de células sanguíneas nucleadas coletadas com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), através do kit PureLink™ (*Invitrogen®*, Inc. Carlsbad, CA, USA). Na sequência, foram avaliadas a concentração e o grau de pureza do DNA, por meio do espectrofotômetro NanoDrop (2000c/2000 UV-Vis) (*Thermo Scientific*, Wilmington, USA).

Genotipagem. As tipagens dos genes HLA-G dos exons 2 e 3 foram realizadas por PCR-SBT (*Polymerase Chain Reaction-Sequence Based Typing*); e do exon 8 por PCR-SSP (*Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primer*).

Sequenciamento dos exons 2 e 3 de HLA-G. As tipagens dos exons 2 e 3 foram realizadas utilizando-se dois oligonucleotídeos iniciadores (*Invitrogen®*) para a posição 5' (G25S e G35S) e dois para a posição 3' (G23S e G33S), conforme protocolo de Sarturi (2005) [26] especificados a seguir:

G25S' TCCATGAGGTATTTTCAGCGC

G23S' AGGTAATCCTTGCCATCGTA

G35S' CCCAGACCCTCTACCTGGGAGA

G33S' CTCTCCTTGTGCTAGGCCAGGCTG

As leituras das tipagens PCR-SBT foram realizadas no MEGA-Base *Sequencing ScoreCard®*. Cada amostra de DNA, ajustada entre 25 a 100 ng/μL, foi adicionada a um produto amplificado loco específico, juntamente com a enzima Taq DNA polimerase (5u/μL; *Invitrogen®*), de acordo com os volumes recomendados pelo protocolo de Sarturi (2005) [26]. A técnica de purificação permitiu a remoção de fragmentos indesejáveis, tais como excesso de iniciadores, DNTPs, sais e fragmentos de DNA, para posterior sequenciamento. Em seguida, as amostras foram submetidas a reação de sequenciamento com o Kit *BigDye 3.1 Terminator* (*Applied Biosystems®*). O produto purificado foi analisado em sequenciador automático (Analisador Genético de DNA modelo 3500xl marca *Applied Biosystems*) e os dados coletados pelos *softwares* de Aplicação (*Sequencing Analysis v5.4 e SeqScope v2.7 e GeneMapper v4.1*). Posteriormente, os dados de sequenciamento obtidos para os exons 2 e 3 foram visualizados com a ajuda do *software* BIOEDIT [27].

Análise do polimorfismo do exon 8 de HLA-G. Para a amplificação do exon 8 foram utilizados dois oligonucleotídeos iniciadores (*Invitrogen*®), um para a posição 5' *Forward* (G85S); e outro para a posição 3' *Reverse* (G83S), conforme protocolo de Sarturi (2005) [26] especificado a seguir:

G85S' GTGATGGGCTGTTTAAAGTGTCACC

G83S' GGAAGGAATGCAGTTCAGCATGA

Os fragmentos de PCR obtidos para o exon 8 foram analisados por meio de corrida em gel de Agarose (*Invitrogen*®, 2,5%), por 90V/40minutos e corados com brometo de etídio. Foram obtidos fragmentos com 210 e 224pb (amostra com a deleção e amostra sem a deleção, respectivamente).

Análise estatística. As frequências de cada alelo dos pacientes e controles foram obtidas por contagem direta e colocadas em tabela 2x2 para a análise comparativa. Para o cálculo do teste exato de Fisher, *Odds Ratio* (OR) e Intervalo de Confiança (IC) de 95% utilizou-se o programa *Epi Info*TM 7. Para os resultados que apresentaram significância ($P < 0,05$) foram calculados o valor de OR com IC de 95%, utilizando o método de Woolf (1995) [28]. Foram consideradas significativas as associações com $P \leq 0,05$; e como próximas ao limiar de significância (tendência), os valores de $P > 0,05$ e $\leq 0,10$.

RESULTADOS

As amostras de pacientes e controles, a partir da caracterização dos alelos (exons 2 e 3), e das variantes (exon 8) de HLA-G permitiram comparar as frequências alélicas e genotípicas apresentadas nas Tabela 1 e 2.

Como apresentado na Tabela 1 observou-se um aumento da frequência do alelo *HLA-G*01:03* no grupo controle quando comparado ao grupo de pacientes (5,6% vs 13,1%, $p = 0,03342$, OR=0,3, IC 0,1748 – 0,8905), indicando fator de proteção.

A análise dos resultados sugere que o alelo *HLA-G*01:04* no grupo de pacientes em relação ao grupo controle (27,5% vs 8,8%, $p = 0,000018$, OR=3,9, IC 2,067 – 7,5693), indica fator de risco.

A comparação das frequências genotípicas e alélicas do exon 8 (Tabela 2) entre os grupos de pacientes e controles, não apresentou diferença significativa, -14/-14 (28,3% vs 27,3%), -14/+14 (64,7% vs 61,9%), +14/+14 (7,0% vs 10,8%); -14 (60,6% vs 58,2) e +14 (39,4 vs 41,8%).

DISCUSSÃO

A doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa (RCU) são doenças intestinais inflamatórias crônicas (DIIs) de origem desconhecida [2, 3, 4, 5, 29]. Estudos demonstraram que uma das prováveis explicações para a ocorrência dessas doenças está relacionada à exposição a determinados fatores ambientais por indivíduos geneticamente susceptíveis, podendo levar a uma resposta imune inadequada, caracterizando-se como uma doença autoimune sistêmica de herança multifatorial [9, 10, 11, 12, 30, 31, 32].

Embora as respostas inadequadas do sistema imune intestinal em indivíduos geneticamente predispostos desempenhem um papel importante na patogênese das doenças, as características típicas de RCU e DC se diferem em relação à localização anátomo patológica da doença [33]. Estudos realizados em diversas populações sugeriram associações de variantes HLA em mais de 40 doenças, principalmente, as autoimunes [34]. Investigações em famílias de portadores da DC mostraram agregação da doença entre os seus membros, sugerindo que os fatores genéticos predisõem à doença [31, 35].

Estudo de Masachs; Casellas; Malagelada (2007) [36] apontaram que pacientes com doença celíaca e seus familiares têm uma maior predisposição para a DC em relação ao controle populacional. Tal associação pode explicar o fato de que ambos os transtornos, ocasionalmente, se apresentam em um paciente ou em seus parentes de primeiro grau com mais frequência do que o esperado. Assim, marcadores genéticos têm sido investigados em relação à DC, tais como: genes *KIR*, *HLA*, receptores Toll Like e NOD [29, 31, 32, 37, 38].

Um estudo de meta-análise realizado por Van Heel e colaboradores (2004) [39] confirmou a relação entre DII e moléculas HLA. O papel das moléculas de HLA-G em doenças inflamatórias ganhou interesse científico e clínico, dada a possibilidade de ser proposto como biomarcador molecular e possível alvo terapêutico. Sugere-se, ainda, o possível envolvimento do HLA-G na regulação do sistema imunológico, em condições autoimunes e alérgicas, tais como: a pele, gastrointestinais, doenças neurológicas e reumáticas

[12, 13, 15, 40, 41]. Em particular, nestas desordens, o HLA-G pode interagir diretamente com células imunitárias ou controlar o balanço entre as citocinas Th1 e Th2. O que ainda precisa ser entendido é se a produção de HLA-G é uma tentativa de restauração do equilíbrio adequado em células inflamatórias e cascatas que foram ativadas, ou se é uma parte da patogênese em curso por sua repressão de células imunologicamente ativas, ou uma mudança no sentido do fenótipo Th2 [15].

Torres e colaboradores (2004) [13] estudaram amostras intestinais de pacientes com CU e DC, utilizando a técnica de imunofluorescência, verificando que enquanto as células intestinais de CU apresentam HLA-G na sua superfície, as biópsias intestinais da DC não. Este resultado combinado com os níveis elevados de IL-10 encontrado na lâmina do cólon de pacientes com CU sugere que o HLA-G pode regular as respostas imunes das mucosas em CU.

Apesar do número de estudos envolvendo o HLA-G e doenças autoimunes seja ainda limitado, estes sugerem um amplo espectro de situações patológicas que esta molécula possa estar envolvida [15]. Donadi e colaboradores (2011) [42] salientaram que a expressão de HLA-G em condições patológicas pode ser benéfica ou prejudicial, dependendo do tipo de desordem específica. Ao considerar tais indivíduos, alguns podem expressar o HLA-G enquanto outros não [43].

No nosso estudo, os dados obtidos evidenciaram um aumento significativo da frequência do alelo *G*01:04* no grupo de pacientes em relação ao grupo controle, indicando associação positiva à susceptibilidade no desenvolvimento da DC. Em nível molecular, no códon 110 há uma substituição de um aminoácido L (leucina) por uma I (isoleucina).

Evidenciou-se, ainda, uma diminuição significativa da frequência do alelo *G*01:03* no grupo de pacientes quando comparado ao grupo de controles, indicando que estes indivíduos apresentam resistência em desenvolver a DC. Essa molécula difere das demais pela substituição do códon 31 de um aminoácido T (treonina) por uma S (serina) [44].

Na maioria das populações apenas quatro diferentes proteínas HLA-G são mais comumente observadas, sendo: *G*01:01*, *G*01:03*, *G*01:04* [42]. Os mesmos alelos foram encontrados em nosso estudo com maior frequência *G*01:03* e *G*01:04*.

Glas e colaboradores (2007) [14] observaram que o HLA-G tem papel importante na modulação do curso da DC, todavia não concluíram como sendo determinante no que se refere à susceptibilidade. Contudo, o HLA-G funciona como um elemento de proteção contra a agressão inflamatória [14, 45], desempenhando um papel importante na imunopatogênese da DII e, na DC sugere um papel de modulação da doença [14]. A este respeito, Le Maoult e colaboradores (2004) [46] relataram que o HLA-G é uma molécula de imunomodulação e supressão.

Rizzo e colaboradores (2008) [47] relataram que as células mononucleares de sangue periférico (PDMCs), de pacientes com DC expressaram níveis mais elevados de HLA-G; ao passo que os pacientes CU não apresentaram níveis detectáveis, mesmo após estimulação com lipopolissacarídeo (LPS). Tais achados sugerem que o sHLA-G, produzido por PBMC, é uma ferramenta de diagnóstico menos invasivo nas fases precoces de doenças inflamatórias intestinais. Também, para Torres e colaboradores (2004) [13], este padrão de expressão diferencial de HLA-G auxilia na diferenciação entre a imunopatogênese da DC e CU, podendo ser influenciado pelas variações genéticas no interior do gene HLA-G.

Ao investigarem o papel de moléculas de HLA-G em doenças inflamatórias, Rizzo e colaboradores (2012) [15] evidenciaram que o HLA-G pode estar associado ao risco e cronicidade da doença, onde sua expressão estará diminuída.

Apesar das funções das isoformas ainda serem pouco compreendidas a produção das diferentes isoformas de HLA-G é direcionada por mecanismos de regulação e, dependendo da situação fisiológica e do tipo celular envolvido, algumas isoformas são expressas e outras não [43].

Dadas às amplas funções imunológicas da molécula HLA-G e situações em que possa estar envolvida, Rizzo e colaboradores (2012) [15] pontuaram que a compreensão do papel específico e mecanismos de ação de moléculas HLA-G no desenvolvimento e progressão de doenças inflamatórias poderia justificar o uso destas, como marcadores da inflamação e tratamento. Assim, de acordo com os autores, a identificação de estratégias farmacológicas, com o objetivo de controlar a produção de HLA-G pode ser uma possibilidade concreta para melhorar a prevenção de doenças inflamatórias, abrindo novas perspectivas terapêuticas.

Corroborando com esses achados, Zelante e colaboradores (2001) [48] estudaram a expressão de HLA-G em pacientes com DC e CU em tratamento, a fim de observar se a

terapia contribui para a modificação da expressão desse gene. Os resultados sugeriram que a terapia é capaz de normalizar a produção de moléculas HLA-G em ambos os indivíduos com doenças de CU e DC, embora, de modo diferente, pois: a terapia imunossupressora diminui a hiperprodução de HLA-G em pacientes com DC, enquanto que nos pacientes com UC desencadeia a produção de HLA-G. Tais dados confirmam a disparidade no comportamento destas duas patologias. Estudos prospectivos são apontados pelos autores como necessários para a análise de sHLA-G nesses pacientes durante a terapêutica. Se confirmados, o HLA-G pode ser indicado como um biomarcador plasmático no tratamento individualizado de controle da inflamação, redução dos sintomas, manutenção e remissão em doenças inflamatórias intestinais.

A molécula HLA-G apresenta diversos sítios de variabilidade que exercem influência na etiopatogenia da doença. Assim, a presença de uma deleção (-14) na região 3' UTR (exon 8) do gene HLA-G exerce influência na estabilidade do RNAm de HLA-G, influenciando a atividade de transcrição e, portanto, de relevância funcional [25].

O polimorfismo -14/+14 parece ser relevante na regulação da expressão do HLA-G, entretanto, a ligação funcional e sua importância permanecem incertas. Apesar de determinados alelos do HLA-G não apresentem divergências no que se refere à composição de aminoácidos que codificam, estão associados à diferentes níveis plasmáticos de proteínas HLA-G funcionais [49].

Embora o polimorfismo -14/+14 possa estar associado com o controle da produção de HLA-G, modulando a estabilidade do RNAm, os mecanismos que estão envolvidos nesse processo ainda não estão bem elucidados. Os alelos que apresentam a inserção da sequência de +14pb (5'-ATTTGTTTCATGCCT-3') estão sendo associados, a células de trofoblastos [50], com uma produção mais baixa dessa molécula, tanto para as isoformas solúveis como para as isoformas ligadas à membrana. Por outro lado, uma fração dos mRNAs que apresentam a inserção de +14pb pode ser processada, por *splicing* alternativo, ocorrendo a remoção de 92 bases do RNAm maduro, resultando em transcritos de HLA-G menores, os quais têm sido relatados como formas mais estáveis da molécula do que os mRNAs completos [42, 51].

Para investigar a associação do polimorfismo de deleção de -14pb a DIIs, 371 pacientes com DC, 257 pacientes com CU e 739 controles foram genotipados por Glas e colaboradores (2007) [14], que observaram o genótipo heterozigoto (P = 0,031) e fenótipo -14 (P = 0,038), significativamente aumentados, enquanto que o fenótipo homozigoto -14 (P =

0,038) foi significativamente diminuído em RCU, quando comparado com DC. O polimorfismo de deleção de -14 pb do gene HLA-G apresentou diferença significativa entre CU e DC. Além disso, um aumento significativo do alelo homozigoto -14 ($P = 0,002$) e genótipo +14/+14 ($P = 0,013$) e uma redução consecutiva do alelo heterozigoto -14 ($P = 0,024$) foram observadas nos casos de DC positiva para ressecção ileocecal, demonstrando um potencial efeito do gene HLA-G em DII que pode afetar tanto a CU como a DC. Os autores relatam ainda que, os vários polimorfismos funcionais dentro da região promotora, podem influenciar a expressão de HLA-G e, assim, estudos adicionais em DII são necessários no âmbito da expressão diferencial de HLA-G entre CU e DC [21].

Em um estudo realizado por Wu e colaboradores (2010) [52] com pacientes portadores de doenças reumáticas, foram constatadas diferenças significativas na distribuição do HLA-G polimorfismo 14bp de +14/-14, podendo ser confirmadas em pacientes com anticorpos anti-snRNP, anticorpos positivos e doentes com anticorpos anti-histonas, quando comparados com os respectivos anticorpos-negativos. Estas descobertas indicam que o polimorfismo de HLA-G 14bp de +14/-14 pode ser um fator de risco genético influenciando a susceptibilidade para a produção de autoanticorpos nessas doenças.

Conforme relatam Donadi e colaboradores (2011) [42], a expressão de HLA-G depende de diversos fatores, tais como: 1) fatores de transcrição no curso da doença que regulam a expressão HLA-G; 2) presença de sítios polimórficos selecionados na região promotora que podem ser alvos de fatores de transcrição; 3) a magnitude de fatores pós-transcricionais de HLA-G que podem degradar RNAm, sobretudo, que podem direcionar microRNAs locais polimórficos na UTR 3'; 4) características estruturais da molécula HLA-G codificados pelos alelos desse indivíduo disponíveis para interagir com os receptores de HLA-G; 5) características intrínsecas de células de tecidos doentes; 6) sítios polimórficos em genes que codificam os mediadores envolvidos na patogênese da doença; 7) papel do genes que atuam sobre o gene HLA-G; e 8) papel dos fatores epigenéticos, entre outros. Devido à complexidade desse cenário, a maioria dos estudos limita-se em um ou alguns desses aspectos somente, acrescentando apenas alguns dados em meio a tantos que precisam ser elucidados. Há muito para ser compreendido sobre a regulação da expressão HLA-G, os indivíduos em risco de desenvolver complicações associadas com o excesso ou a escassa produção de HLA-G, no sentido de individualizar o fornecimento de terapêutica e/ou abordagens junto a essa molécula [42].

Ainda que o número de pesquisas em doenças autoimunes e/ou pró-inflamatório seja limitado, estas pesquisas indicam uma gama de situações patológicas em que o HLA-G pode estar envolvido. Há estudos reveladores de que as estratégias terapêuticas promissoras, que incluem o controle, estimulação e/ou inibição da expressão do HLA-G em tais ocorrências pode exercer influência na atividade da doença e no seu prognóstico [42].

Nessa perspectiva, nossos resultados sugerem a participação de genes HLA-G tanto na susceptibilidade quanto resistência à DC. Assim, considerando a importância da compreensão da patogênese da DC e a identificação de genes de susceptibilidade ou resistência ficou evidenciada a necessidade de novos estudos com técnicas que detectem as isoformas de HLA-G e suas relações com a manifestação da doença, visando uma melhor compreensão do papel destes marcadores genéticos na susceptibilidade e/ou proteção à DC, e para o desenvolvimento de estratégias preventivas, diagnósticas e terapêuticas da doença.

REFERÊNCIAS

1. Crohn B, Ginzburg L, Oppenheimer G. Regional ileitis. A pathological and clinical entity. *JAMA* 1932; **99**: 1323-29.
2. Shivananda M, Fear N, Logan R, *et al.* Incidence of inflammatory bowel disease across Europe. Results of the European Collaborative Study of Inflammatory Bowel Disease (EC-DII). *Gut* 1996; **39**:690-97.
3. Niddk, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. *Crohn's Disease*. NIH Publication, 1998; **98**:3410.
4. Niv Y, Abuksis G, Fraser GM. Epidemiology of Crohn's disease in Israel: a survey of Israeli kibbutz settlements. *Am J Gastroenterol* 1999; **94**;10: 2961-2965.
5. Sands B. Crohn's Disease. In: **Gastrointestinal and Liver Disease**; Sleisenger & Fordtran. 2002. 7th edition
6. Rebmann V. *et al.* Association of soluble HLA-G plasma levels with HLA-G alleles. *Tissue Antigens*; 2001; **57**;1: 15-21.
7. Hylenius S, Andersen A-MN, Melby M, Hviid TV. Association between HLA-G genotype and risk of preeclampsia: a case-control study using family triads. *Mol Hum Reprod* 2004; **10**;4:237-246.
8. James SP. Prototypic disorders of gastrointestinal mucosal immune function: Celiac disease and Crohn's disease. *J Allergy Clin Immunol* January 2005; **115**;1:25-30.

9. Strober W, Fuss JM, Blumberg RS. The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol* 2002;**20**:495-549.
10. Farrell R, Lemont J. Microbial factors in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin N Am* 2002; **31**: 41-62.
11. Kucharzik T, Maaser C, Lugering A, Kagnoff M. *et al.* Recent understanding of pathogenesis: implications for future therapies. *Inflamm Bowel Dis* Nov. 2006; **12**; 11: 1068-1083.
12. Podolski DK. Inflammatory Bowel Disease. *N Eng J Med* 2002; **347**; 6: 417-29.
13. Torres MI, Le Discorde M, Lorite P, *et al.* Expression of HLA-G in inflammatory bowel disease provides a potential way to distinguish between ulcerative colitis and Crohn's disease. *Intern Immunol* 2004; **16**;4: 579-583.
14. Glas J, Töröko H-P, Tonenchi L. *et al.* The 14-bp deletion polymorphism in the HLA-G gene displays significant differences between ulcerative colitis and Crohn's disease and is associated with ileocecal resection in Crohn's disease. *Intern Immunol* 2007; **19**; 5: 621–626.
15. Rizzo R, Bortolotti D, Baricordi OR, Fainardi E. New Insights into HLA-G and Inflammatory Diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets*: 2012; **11**; 5: 1-15.
16. Veit TD, Vianna P, Chies JAB. HLA-G – From Fetal Tolerance to a Regulatory Molecule in Inflammatory Diseases. *Curr Immunol Rev*, 2010; **6**; 1: 1-15.
17. Baricordi O, Stigmani M, Melchiorri L. *et al.* HLA-G and inflammatory diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets*: 2008; **7**: 67-74.
18. Rouas-Freiss N, Khalil-Daher I, Gonçalves R, Menier C. *et al.* Role of HLA-G in maternal-fetal immune tolerance. *Transplant Proc*, New York 1999; **31**: 724-725.
19. Rousseau P, Paul P, O'Brien M, Dausset J. *et al.* The X1 box of HLA-G promoter is a target site for RFX and Sp1 factors. *Hum Immunol*, New York 2000; **61**: 1132-1137.
20. Van Der Ven K, Pfeiffer K, Skrablin S. HLA-G polymorphisms and molecule function – question and more questions- a review. *Placenta* 2000; **7**; 4:373-378.
21. Vianna P, Dalmaz C, Chies J, *et al.* Immunogenetics of pregnancy: role of 14bp deletion in maternal HLA-G gene in primiparous pre-eclamptic Brazilian women. *Hum Immunol* 2007; **68**: 668-74.
22. Carosella ED. The tolerogenic molecule HLA-G. *Immunol Lett* 2011; **138**:22-4.
23. Sands B. From symptom to diagnosis: clinical distinctions among various forms of intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2004; **126**: 1518-32.
24. Carosella ED, Dausset J, Kirszenbaum M. Hla-G Revised. *Immunol Today*, Amsterdam, 1999; **20**; 2: 60-62.

25. Rousseau P, Le Discorde M, Mouillot G. *et al.* The 14bp deletion-insertion polymorphism in the 3'UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. *Hum Immunol* 2003; 64: 105-110.
26. Sarturi PR. *Variação genética nos exons 2, 3 e 8 de HLA-G e sua relação com o abortamento recorrente.* Dissertação de mestrado em Genética, do setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005, 70p.
27. Hall, T. An user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids*: 1999; **41**:95-98.
28. Woolf B. On estimating the relation between blood group and disease. *Ann Hum Genet*, London 1955: **19**:251-253.
29. Okada Y, Yamazaki K, Umeno J, Takahashi A. *et al.* HLA-Cw*1202-B*5201-DRB1*1502 haplotype increases risk for ulcerative colitis but reduces risk for crohn's disease. *Gastroenterol* 2011: **141**:864–871.
30. Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH. *et al.* Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 10, 1991: **324**; 2: 84-88.
31. Newman B, Siminovitch K. Inflammatory bowel disease: Crohn's disease and the success of NODern genetics. *Clin Invest Med* 2003: **26**;6:303-14.
32. Wilson TJ, Jobim M, Jobim LF, Portela P. *et al.* Study of killer immunoglobulin-like receptor genes and human leukocyte antigens class I ligands in a Caucasian Brazilian population with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Hum Immunol* 2010: **71**:293–297.
33. Cho J H. Inflammatory bowel disease: Genetic and epidemiologic considerations. *World J Gastroenterol*, January 2008: **14**;3:338-347.
34. Ghodke Y, Joshi K, Chopra A, Patwardhan B. HLA and disease. *Eur J Epidemiol* 2005: **20**:475-88.
35. Binder V. Genetic epidemiology of Inflammatory Bowel Disease. *Dig Dis Sci* 1998: **16**: 351-355.
36. Masachs M, Casellas F, Malagelada JR. Inflammatory bowel disease in celiac patients. *Rev Esp Enferm Dig* Madrid 2007: **99**; 8: 446-450.
37. David AVH, Sheila AF, Andrew K, Mark JD, John DR, Cathryn M. Lewis Inflammatory bowel disease susceptibility loci defined by genome scan meta-analysis of 1952 affected relative pairs. *Hum Mol Genet* 2004: **13**:763-770.
38. Hollenbach JA, Ladner MB, Saeteurn K, Taylor KD. *et al.* Susceptibility to Crohn's disease is mediated by KIR2DL2/ KIR2DL3 heterozygosity and the HLA-C Ligand. *Immunogenetics* 2009: **61**;663:671.
39. Van Heel DA, Fisher SA, Kirby A, Daly MJ, Rioux JD, Lewis CM, *et al.* Inflammatory bowel disease susceptibility loci defined by genome scanmeta-analysis of 1952 affected relative pairs. *Hum Mol Genet* 2004: **13**:763–70.

40. James SP. Prototypic disorders of gastrointestinal mucosal immune function: Celiac disease and Crohn's disease. *J Allergy Clin Immunol* January 2005; **115**; 1: 25-30.
41. Fabris A, Segat L, Catamo E, Morgutti M. *et al.* Hla-g 14 bp deletion / insertion polymorphism in celiac disease. *Am J Gastroenterol* 2011; **106**: 139-144.
42. 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**: 369-395.
43. Campbell E, Antoniou A, Powis S. The multi-faceted nature of HLA class I dimer molecules. *Immunology*, ago 2012; **136**;4:380-4.
44. IMGT/Hla, Database. **HLA Alleles Numbers**. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html>>. Acesso em: 25 fev. 2013.
45. Carosella ED, Moreau P, Aractingi S, Rouas-Freiss N. HLA-G: a shield against inflammatory aggression. *Trends Immunol* 2001; **22**:553.
46. Le Maoult J, Krawice-Radanne I, Dausset J. *et al.* HLA-G1-expressing antigen-presenting cells induce immunosuppressive CD4⁺T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*: 2004; **101**:7064-69.
47. Rizzo R, Melchiorri L, Simone L, Stignani M. *et al.* Different production of soluble HLA-G antigens by peripheral blood mononuclear cells in ulcerative colitis and Crohn's disease: a noninvasive diagnostic tool? *Inflamm Bowel Dis* 2008; **14**;1: 100-105.
48. Zelante A, Borgoni R, Galuppi C, *et al.* Therapy Modifies HLA-G Secretion Differently in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis Patients. *Inflamm Bowel Dis* Aug, 2011; **17**;8: E94-95.
49. Hviid TVF. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. *Hum Reprod Update* 2006; **12**: 3: 209-232.
50. Hviid V, Hylenius S, Rorbye C. *et al.* HLA-G allelic variants are associated with differences in HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels. *Immunogenetics* 2003; **55**:63-79.
51. Rousseau P, Masternak K, Krawczyk M, Reith W, Dausset J, Carosella ED, Moreau P. In vivo, RFX5 binds differently to the human leukocyte antigen-E, -F and -G promoters and participates in HLA class I protein expression in a cell type-dependent manner. *Immunology*, Oxford 2004; **111**; 1: 53-65.
52. Wu FX, Wu LJ, Luo XY. *et al.* Association of HLA-G 14bp insertion/deletion polymorphism with autoantibody production in patients with autoimmune rheumatic diseases. *Clin Immunol Immunopathol Res* August 2010; **2**;2:15-21.

TABELAS

Tabela 1. Comparação das frequências alélicas (exons 2 e 3) de HLA-G, entre pacientes com doença de Crohn e controles

Alelos	Pacientes (80)		Controles (80)		P	OR	IC95%
	N	%	N	%			
<i>G*01:01</i>	99	61,9	109	68,1	NS		
<i>G*01:02</i>	2	1,3	0	0,0	NS		
<i>G*01:03</i>	9	5,6	21	13,1	0,03342	0,3945	0,1748 - 0,8905
<i>G*01:04</i>	44	27,5	14	8,8	0,000018	3,9557	2,067 - 7,5693
<i>G*01:07</i>	1	0,6	1	0,6	NS		
<i>G*01:10</i>	1	0,6	4	2,5	NS		
<i>G*01:11</i>	2	1,3	5	3,1	NS		
<i>G*01:14</i>	0	0,0	2	1,3	NS		
<i>G*01:15</i>	2	1,3	4	2,5	NS		

P: probabilidade; *NS*: Não Significativo; *OR*: Odds Ratio; *IC 95%*: Intervalo de Confiança de 95%

Tabela 2. Comparação das frequências genóticas e alélicas (exon 8) de HLA-G, entre pacientes com doença de Crohn e controles

Genótipos	Pacientes		Controles		P
	n = 99	%	n = 323	%	
del / del	28	28,3	88	27,3	NS
del / 14	64	64,7	200	61,9	NS
14 / 14	7	7,0	35	10,8	NS
del	120	60,6	376	58,2	NS
14	78	39,4	270	41,8	NS

n: número da amostra; %: percentual; *P*: probabilidade; *NS*: Não Significativo

3. CAPÍTULO III

3.1 CONCLUSÃO

Foram observadas associações entre as variantes alélicas dos exons 2 e 3 sugerindo a participação de genes HLA-G na susceptibilidade ou resistência à doença de Crohn, a saber:

- ✓ Foi identificado uma associação positiva do alelo *HLA-G*01:04* sugerindo que este influencia na susceptibilidade à doença de Crohn.
- ✓ Foi detectado uma associação negativa do *HLA-G*01:03* sugerindo influência na proteção à doença de Crohn.

3.2 PERSPECTIVAS FUTURAS

Por ser uma doença de etiologia multifatorial a doença de Crohn sugere diversos fatores ambientais e genético para o seu desenvolvimento. Portanto, estudos voltados para o entendimento da regulação da expressão HLA-G e o papel de sítios polimórficos se fazem necessários para uma melhor compreensão sobre o papel destes marcadores genéticos na susceptibilidade ou proteção à DC e, conseqüente, desenvolvimento de estratégias de prevenção, diagnóstico e tratamento desta doença.

Este estudo destaca a necessidade e a perspectiva de estudos futuros no sentido de complementar e corroborar os resultados apresentados.

ANEXO

Author Guidelines

Tissue Antigens

Editor-in-Chief

Professor James McCluskey

Department of Microbiology and Immunology

The University of Melbourne

Parkville, Victoria 3052 Australia

Tel: +61 3 8344 5709

E-mail: TissueAntigens@bigpond.com

Please submit your manuscript online: <http://mc.manuscriptcentral.com/tan>

Submissions are no longer accepted by email

The journal to which you are submitting your manuscript employs a Similarity Detection System comparing your submission against previously published works. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened using this system.

Upon acceptance of your manuscript by the Editorial Office, kindly send a completed [Copyright Transfer Agreement form](#) via email, fax or post, to the Production Editor (contact details below). The work shall not be published elsewhere in any language without the written consent of the publisher. The articles published in this journal are protected by the licence, which covers translation rights and the exclusive right to reproduce and distribute all of the articles printed in the journal. No material published in the journal may be stored on microfilm or videocassettes or in electronic databases and the like without the prior written permission of the publisher.

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available [here](#).

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

Publication Ethics

Tissue Antigens is a member of the Committee on Publication Ethics (COPE).

Conflicts of Interest

When submitting a manuscript, authors are responsible for disclosing all financial and personal relationships that could be viewed as presenting a potential conflict of interest. To prevent ambiguity, all authors must state explicitly whether potential conflicts do or do not exist. This information will be included on the title page of the published article. Authors must include the statement in the manuscript on a conflicts of interest notification page following the title page, providing additional detail, if necessary, in a cover letter accompanying the manuscript.

Authorship

All persons listed as authors must have contributed substantially to the design, performance, analysis, or reporting of the work and are required to indicate their specific contribution. The specific requirements for authorship have been defined by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE; <http://www.icmje.org>). Examples of authors' contributions are: 'designed research/study', 'performed research/study', 'contributed important reagents', 'collected data', 'analyzed data', 'wrote paper' etc.

Acknowledgements

All contributors who do not meet the criteria for authorship must be listed in an acknowledgements section at the end of the manuscript. Financial and material support must also be acknowledged. Authors are required to describe the role of the study sponsor(s), if any, in study design; in collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the supporting source had no such involvement, the authors should state so. Also, if no specific funding was obtained, this should be stated.

Manuscripts must be written in correct English. *Review articles, Letters to the Editor, Commentaries, full-length Original Articles, Brief Communications, New Allele Alerts* and articles focusing on *People in Immunogenetics* are accepted.

Review articles, of up to 12 printed pages, are generally invited in areas covered by the journal or concerning recent topical developments. Suggestions are welcome in the form of a one page synopsis sent to our Reviews Editor, Katharina Fleischhauer, at the address shown below.

Katharina Fleischhauer

Unit of Molecular and Functional Immunogenetics
San Raffaele Scientific Institute
via Olgettina 58
20132 Milano
Italy

fleischhauer.katharina@hsr.it

Commentaries briefly explore important current topics.

Brief Communications are encouraged for reporting new gene sequences of functional relevance, MHC peptide motifs and studies of monoclonal antibodies and disease susceptibility.

People in Immunogenetics (maximum 2 printed pages) highlight the scientific contributions of one or more people in relation to a specific event involving the person(s).

Original Articles should not exceed **10** printed pages. Full-length papers should consist of: Title page (including full title and short title, all authors and their affiliations, communicating author with full address including e-mail address. All authors must state explicitly whether potential conflicts do or do not exist. This information will be included on the title page of the published article.), Key words, Abstract, Introduction, Material and methods, Results, Discussion, Acknowledgements (including grant and/or other sources of support), References, Tables, Figures and Figure legends. All pages should be numbered consecutively, **beginning with the title page, which should be uploaded with the main body of the paper.**

Key words. Four to nine key words for indexing should be given by the author(s) together with the Abstract. They should be placed in alphabetical order and, when possible, adjusted to the medical subject headings of **Index Medicus**.

Tables. The tables should be uploaded as a Word file, separate from the text, and titles must be self-explanatory. They should be numbered consecutively with Arabic numerals, and due regard should be paid to the proportions of the printed page.

Figures. Figures should be numbered in sequence with Arabic numerals. A legend (as a Word file) should be supplied for each figure. These should also take into consideration the proportions of the printed page and ensure legibility of any labels if reduction for printing is necessary. Figures should be uploaded as PDF files.

It is the policy of Tissue Antigens for authors to pay the full cost for the reproduction of their colour artwork. Therefore, please note that if there is colour artwork in your manuscript when it is accepted for publication, Wiley-Blackwell require you to complete and return a colour work agreement form before your paper can be published. This form can be downloaded as a PDF from the Internet. If you are unable to access the Internet, or are unable to download the form, please contact Dr. Eva Strinovich at: tissueantigens@bigpond.com and she will be able to e-mail or fax a form to you. Once completed, please return the form to the Production Editor at the address below:

Production Editor
Wiley Singapore
1 Fusionopolis Walk
#05-01 Solaris South Tower
Singapore 138628
Fax: +65 6643 8008
E-mail: tan@wiley.com

Any article received by Wiley-Blackwell with colour work will not be published until the form has been returned.

Page Charges. Any article which exceeds 10 printed pages will be charged. Excess pages must be paid for at a rate of GBP 75 per page unless specific written arrangements have been negotiated with the Editor-in-Chief. Invited papers are as a rule not charged for excess pages. Papers will be invoiced upon publication.

References. Number references consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. Identify references in text, tables and legends by Arabic numerals (in parentheses). All authors cited, and only these, must be listed at the end of the paper. List all authors when six or less; when seven or more, list only first three and add 'et al'. The titles of journals should be abbreviated according to the List of journals indexed, printed annually in the January issue of Index Medicus.

Examples:

1. Brock JH, Esparza I. Failure of reticulocytes to take up iron from lactoferrin saturated by various methods Br J Haematol 1979; 42: 481-3.

2. Marsh N. Fibrinolysis. Chichester: John Wiley & Sons, 1981: 46.

3. Galton DAG. The chronic leukaemias. In: Hardisty RM, Weatherall DJ, ed. Blood and its disorders. 2nd edn. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1982: 877-917.

4. Defesche JC, Dekker E, Kastelein JJP. The South African 2.5 kb deletion: a typical Dutch FH mutation. Proc. 9th Int Symp Atherosclerosis 1991: 141.

Unpublished data, not yet in press, should not be included in the list of references. They may be referred to in the text as '(unpublished data)' or '(personal communications)'.

Abbreviations and symbols. Use Chemical Abstracts as a guide for abbreviations and symbols. All units must be metric. The following examples illustrate preferred abbreviations: 37°C, 3H, 14C, min (for minutes), h (for hours), ml, g.

Scientific names and nomenclature. Official or standardized nomenclature should be used whenever available (e.g. the CD nomenclature for leukocyte differentiation antigens; official HLA Nomenclature). Original nucleotide or amino acid sequence data described in manuscripts must be submitted to GenBank before submission. Manuscripts containing DNA or protein sequences without accession number are not accepted. Sequences of new alleles should meet the requirements of international nomenclature committees e.g. New HLA alleles require sequencing of complete genes for their proper definition.

Brief Communications must not exceed 10 type-written pages and must not be divided into sections. Brief communications should include a Title page, as described above for Original Articles. Please also include an Abstract (not to exceed 120 words). The first paragraph should state the purpose of the report. Description of methods or technical notes should preferably be in the legends to tables and figures. Brief communications are encouraged for brief reports describing MHC peptide motifs and studies of monoclonal

antibodies and disease susceptibility. They may contain important negative issues or might serve to reasonably discourage wasted effort by other researchers.

New Allele Alerts. All reports confined to describing new alleles will be published under the heading New Allele Alert and are not formally peer reviewed. New allele alerts are designed to provide rapid publication of new HLA and other gene alleles. New allele reports should have no more than five authors.

Title: 100 characters maximum. Title must be concise and descriptive (not declarative). Do not include a link to the footnote in the title.

Words: 600 words maximum

References: 6 references maximum

Figure: 1 figure or table maximum

Key words: 5 maximum, listed in alphabetical order

A summary statement of no more than 15 words must be supplied.

New Allele submissions are not formally peer reviewed but require editorial assessments to ensure proper English syntax, compliance with guidelines for New Allele Alerts, and appropriate allele nomenclature approved by the WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA system or other relevant nomenclature body.

People in Immunogenetics articles should not exceed 2 printed pages.

Letters to the Editor should not exceed 2 printed pages and should contain figures and tables only if completely necessary to the information contained within the letter.

Reports of meetings or workshops

Contact the Editor before the meeting to determine acceptability.

Proofs. The corresponding author will receive an e-mail alert containing a link to a website. A working e-mail address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (Portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following web site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>.

This will enable the file to be opened, read on screen and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately.

Offprints. Authors can download an electronic PDF offprint of their article upon publication through Wiley-Blackwell's Author Services. Additional paper offprints may be ordered online at <http://offprint.cosprinters.com/blackwell>

Early View. Tissue Antigens is covered by Wiley-Wiley-Blackwell's *Early*

View service. *Early View* articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled issue. *Early View* articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the

authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of *Early View* articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so *Early View* articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

Author Services. Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit authorservices.wiley.com/bauthor for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

Note to NIH grantees. Pursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate.

Author Material Archive Policy. Please note that unless specifically requested, Wiley-Blackwell will dispose of all hardcopy or electronic material submitted two months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible if you have not already done so.

Disclaimer. The Publisher and Editors cannot be held responsible for errors or any consequences arising from the use of information contained in this journal; the views and opinions expressed do not necessarily reflect those of the Publisher and Editors, neither does the publication of advertisements constitute any endorsement by the Publisher and Editors of the products advertised.