

O papel do gene e da molécula HLA-G na expressão clínica das doenças reumatológicas

Claiton Viegas Brenol^{1,*}, Tiago Degani Veit^{2,*}, José Artur Bogo Chies³, Ricardo Machado Xavier⁴

RESUMO

O antígeno leucocitário humano G (HLA-G) é uma molécula não clássica de complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I, caracterizada por baixo polimorfismo em sua região codificadora, um padrão de distribuição tecidual limitado em condições fisiológicas e expressão por meio de isoformas solúveis e acopladas à superfície de membranas por meio de *splicing* alternativo. O HLA-G é bastante conhecido por estar envolvido na indução e na manutenção da tolerância entre o sistema imunológico materno e o feto semialogênico ao nível da interface fetoplacentária. Além disso, diversos estudos apontam para um papel imunorregulatório mais amplo dessa molécula. Neste contexto, a expressão de HLA-G em doenças inflamatórias e reumatológicas é uma área relativamente recente de pesquisa. Os primeiros estudos descreveram a expressão de HLA-G em várias miopatias inflamatórias, dermatite atópica e psoríase cutânea. Com base nos achados de que o HLA-G poderia desviar respostas T *helper* para o tipo Th2, foi levantada a hipótese de que o HLA-G seria uma molécula protetora nas respostas inflamatórias. Neste artigo, revisamos os potenciais papéis da molécula HLA-G no sistema imunológico e em diversas doenças reumatológicas, tais como lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide, esclerose sistêmica e outras.

Palavras-chave: antígenos HLA, doenças reumáticas, polimorfismo genético.

© 2012 Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

INTRODUÇÃO

O estudo sobre a função dos genes relacionados ao sistema imune em doenças reumatológicas é uma área que vem despertando interesse crescente. Durante muito tempo, os genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I e II, historicamente conhecidos como altamente polimórficos e como os principais responsáveis pelo processo de rejeição de transplantes alogênicos, geraram grande volume de publicações sobre seus papéis nos processos autoimunes que caracterizam essas doenças. Na década de 1980, a descoberta de genes do MHC que não compartilhavam desse alto grau de polimorfismo levantou questionamentos sobre sua utilidade

fisiológica.¹ A partir de 1990, entretanto, essas questões começaram a ser respondidas, com a identificação de uma dessas moléculas, o HLA-G, na interface feto-placentária, expresso na superfície de trofoblastos. Constatou-se que além de o HLA-G ser responsável pela proteção do feto contra a resposta imune da mãe, essa molécula estava relacionada a processos de imunorregulação importantes em transplantes, em tumores e infecções virais, bem como em doenças inflamatórias. Nesta revisão pretende-se apresentar a molécula HLA-G partindo de um ponto de vista imunológico, abordando seus efeitos no sistema imune e passando para a pesquisa clínica, além de realizar uma atualização sobre os resultados mais relevantes no campo das doenças reumatológicas.

Recebido em 24/01/2011. Aprovado, após revisão, em 02/11/2011. Os autores declaram a inexistência de conflito de interesses.

Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA.

1. Doutor em Ciências Médicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS; Professor do Departamento de Medicina Interna da Faculdade de Medicina da UFRGS; Coordenador do Ambulatório de Artrite Reumatoide do Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA

2. Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS

3. Doutor em Imunologia pela Université de Paris, Paris; Professor do Departamento de Genética da UFRGS

4. Doutor em Imunologia pela Universidade de Shimane, Japão; Professor do Departamento de Medicina Interna da Faculdade de Medicina da UFRGS; Chefe do Serviço de Reumatologia do HCPA

*Os autores contribuíram igualmente para a elaboração deste trabalho científico.

Correspondência para: Claiton Viegas Brenol, M.D., PhD. Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350/sala 645 – Santa Cecília. CEP: 90035-003. Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: claiton.brenol@gmail.com

GENE E MOLÉCULA HLA-G

O HLA-G é uma molécula de classe Ib, cuja estrutura assemelha-se às moléculas clássicas do HLA de classe I, com uma cadeia alfa constituída por até três domínios, não covalentemente associada a uma cadeia de β 2microglobulina. O gene HLA-G apresenta baixo polimorfismo em sua região codificadora, tem padrão de expressão limitado em condições saudáveis e uma característica única entre as moléculas de HLA, que é formar multímeros. Além disso, através de *splicing* alternativo podem ser geradas sete diferentes isoformas da molécula. Todas essas características contribuem para o crescente interesse científico nessa molécula, algumas das quais são de vital importância nas funções biológicas do HLA-G, caracterizadas principalmente pela indução de tolerância imunológica.²

O gene HLA-G possui 47 alelos descritos até o momento, que codificam 15 proteínas diferentes, em comparação com 1729, 2329 e 1291 alelos de HLA A, B e C, respectivamente, de acordo com o banco de dados IMGT/HLA em dezembro de 2011 (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html>). Esse baixo polimorfismo é distribuído ao longo dos três domínios da cadeia alfa, enquanto em moléculas clássicas de HLA quase a totalidade do polimorfismo está concentrada em torno do sítio de ligação com peptídeos. Na molécula HLA-G, o peptídeo situa-se mais profundamente na fenda entre os domínios alfa 1 e 2 em comparação com as moléculas do HLA clássico.⁴ Essas características especiais do HLA-G tornam improvável que esta molécula desempenhe um papel importante na apresentação de antígenos.

O gene HLA-G apresenta também polimorfismos em íntrons, região promotora e região 3' não traduzida (3'UTR). Este último consiste na deleção/inserção de 14 pares de bases (pb), e sua inserção está associada a níveis reduzidos de RNA mensageiro. O polimorfismo de inserção/deleção de 14 pb localizado na posição +2960 no éxon 8 (rs1704) tem atraído a atenção devido ao seu papel potencial de *splicing* alternativo e na estabilidade do RNA. Foi demonstrado que as transcrições com a sequência 14 pb (*ins*) podem sofrer uma etapa adicional de *splicing* que retira 92 pb da região em que esta sequência está localizada.⁵ Apesar de o polimorfismo de 14 pb ser o mais estudado, ainda não existem evidências robustas de que ele tenha algum efeito na produção proteica.

As proteínas de HLA-G podem ocorrer em diferentes isoformas (quatro ligadas à membrana, G1–G4, e três formas solúveis, G5–G7), e são geradas por *splicing* alternativo.⁶ Dependendo do tipo de célula e da condição fisiológica, diferentes isoformas de HLA-G são produzidas.⁷ Todas as isoformas contêm pelo menos um domínio alfa-1, e a HLA-G1 é a

isoforma completa. Nas isoformas G5–G7, os domínios transmembrana e citoplasmático não são traduzidos, resultando em formas solúveis.⁸ Devido a uma mutação, o HLA-G apresenta uma cauda citoplasmática que é menor que as existentes nos HLA-A, B e C.⁹ Essa característica tem implicações importantes para a expressão do HLA-G, já que proporciona uma expressão mais prolongada de HLA-G na superfície celular em comparação com as moléculas de HLA clássicas.¹⁰

A expressão do HLA-G é altamente restrita a determinados tecidos – além de ser expresso em tecidos fetais, como as células do trofoblasto, o HLA-G é constitutivamente expressado apenas no timo em adultos, córnea, ilhotas pancreáticas e precursores de células endoteliais e eritroides. No entanto, a expressão de HLA-G pode ser induzida em situações como transplantes, doenças inflamatórias, em células tumorais, esclerose múltipla e nas infecções virais.²

HLA-G E A TOLERÂNCIA IMUNOLÓGICA

Efeitos imunorregulatórios do HLA-G

A expressão de HLA-G foi descrita pela primeira vez no citotrofoblasto e, portanto, os primeiros estudos sobre essa molécula avaliaram seu papel na gestação. Durante a gravidez, o sistema imune materno está em estreito contato com as células e tecidos do feto semialogênico. Isso sugere que mecanismos específicos devem modular o sistema imune materno para evitar a rejeição do feto, ou seja, promover a tolerância do feto semialogênico. De fato, certas complicações durante a gestação, como a pré-eclampsia (PE), têm sido associadas com uma resposta imune Th1.¹¹ Para proteger o feto do sistema imunológico da mãe, impedindo a citólise mediada por células T citotóxicas (CTL), os citotrofoblastos são desprovidos de HLA-A ou B e expressam pouco HLA-C. Adicionalmente, a expressão de HLA-G por essas células inibe a ativação das células T maternas, bem como a citólise por células *natural killers* (NK) – e CTL por meio de receptores específicos.^{12,13} Recentemente, sugeriu-se que o papel do HLA-G estaria mais relacionado à produção de mediadores solúveis importantes no sucesso gestacional.¹⁴

Vários mecanismos pelos quais o HLA-G exerce suas funções regulatórias têm sido identificados (Figura 1). Como mencionado anteriormente, o HLA-G é capaz de inibir a atividade citotóxica de células NK e CTL.¹³ Da mesma forma, é capaz de proteger células negativas para HLA de classe I ou tumores alogênicos da imunidade por mediada NK antitumorais.¹⁵ Também foi demonstrado que o HLA-G pode inibir respostas de células T CD4⁺ aloproliferativas,¹⁶ a proliferação de células T e NK,¹⁷ e também agir em células apresentadoras de antígenos (APC, do inglês, *antigen presenting cells*),

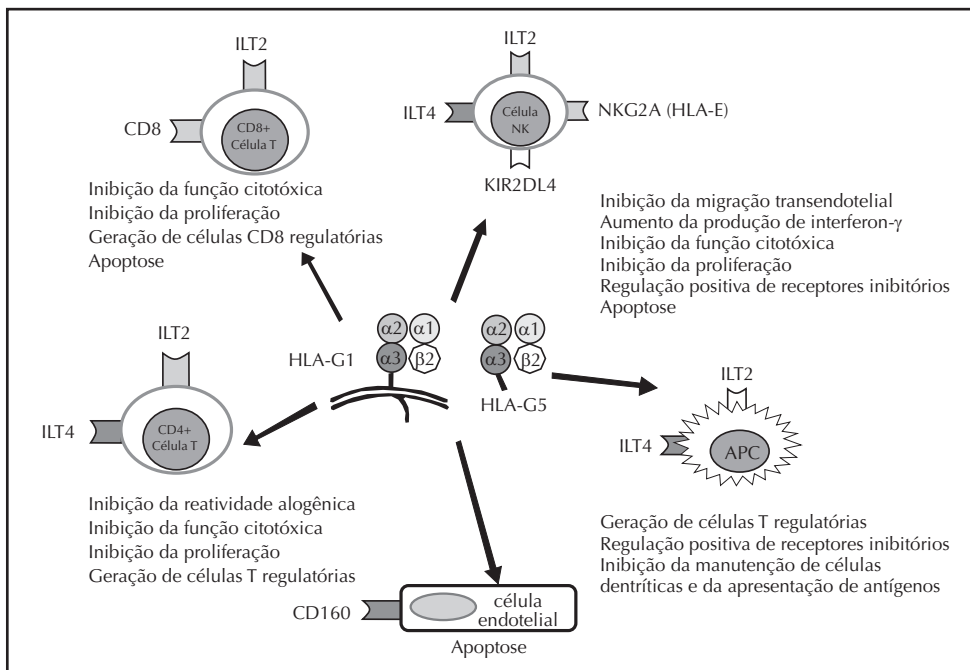


Figura 1
 Funções imunorreguladoras mediadas pelo HLA-G, células-alvo e receptores.
 ILT2 = imunoglobulin-like transcript 2; ILT4 = imunoglobulin-like transcript 4; NKG2A = natural killer, group 2, member A receptor; KIR2DL4 = Killer cell immunoglobulin-like receptor 2DL4.
 Fonte: adaptado de Veit, Vianna, Chies.³

inibindo sua maturação e função.¹⁸ Adicionalmente, o HLA-G pode ser capaz de gerar apoptose em células endoteliais.¹⁹

Existem argumentos convincentes de que o HLA-G desempenha papel importante na regulação do sistema imunológico: (1) o HLA-G é capaz de ligar-se a vários tipos de receptores, alguns dos quais são amplamente distribuídos entre as células imunes; (2) o HLA-G pode exercer efeitos tolerogênicos de longo prazo por meio da geração de células supressoras; e (3) mesmo as células que não transcrevem HLA-G podem tornar-se temporariamente HLA-G-positivas, adquirindo um perfil imunossupressivo por meio de um fenômeno chamado trogocitose (captação intercelular de HLA-G pela incorporação de fragmentos de membrana que expressam essa molécula).³

O HLA-G exerce seus efeitos imunorregulatórios pela ligação a receptores específicos em diferentes tipos de células imunológicas.¹ O complexo de receptor de leucócitos do cromossomo 19 inclui duas famílias de genes polimórficos: receptores de leucócitos tipo imunoglobulina (LILR, do inglês, *leukocyte immunoglobulin like receptors*) e receptores tipo imunoglobulina de células killer (KIR, do inglês, *killer cell immunoglobulin like receptors*). Dentre as moléculas LILR, o LILR1 (ILT2, CD85j, LILRB1) e o LILR2 (ILT4, CD85d, LILRB2) são receptores inibitórios que reconhecem todas as moléculas HLA classe I.²⁰ O LILR1 é expresso pelas células B, algumas células T e NK, e todos os monócitos, enquanto o LILR2 é específico de linhagens mieloides. Existem evidências de que LILRB1 e LILRB2 ligam-se ao HLA-G.^{21,22} Dados recentes mostram que o sítio de ligação a ILT-2 e ILT-4 em dímeros de HLA-G estão mais acessíveis que nos monômeros, resultando em uma

afinidade de ligação 100 vezes maior, corroborando a importância dos dímeros na atividade fisiológica do HLA-G.²³

O receptor KIR2DL4 (CD158d) é um membro da família KIR que também liga HLA-G. Seu gene está localizado no centro do complexo de genes KIR e está presente em todos os haplótipos KIR. A sinalização por esse receptor ocorre de maneira diferente dos receptores LILR: após sua ligação ao receptor, o HLA-G solúvel é internalizado em endossomos. Essa sinalização resulta, de forma interessante, em uma resposta pró-inflamatória e pró-angiogênica, com importantes funções em locais de expressão do ligante, como na interface materno-fetal durante as fases iniciais da gestação.¹⁴

HLA-G e células supressoras

Há evidências crescentes de que, além de seu efeito inibitório direto, o HLA-G possa exercer efeitos tolerogênicos de longo prazo por meio da geração de células supressoras. Várias células supressoras relacionadas ao HLA-G foram identificadas.²⁴

Células T reguladoras HLA-G⁺ estão presentes no sangue periférico em condições fisiológicas. Estas células podem ser CD4⁺ ou CD8⁺, e expressam constitutivamente HLA-G1 em suas superfícies.

Células T HLA-G1⁺ são hiporresponsivas e medeiam suas funções supressoras por meio de fatores solúveis que incluem sHLA-G, mas não IL-10 ou TGF-B. Sua ocorrência foi identificada também em locais de inflamação.²⁵

Células T HLA-G⁺ também podem ser induzidas por meio de aloestimulação e produzir HLA-G5 solúvel e, em raras ocasiões,

HLA-G1.²⁶ Embora sua origem seja obscura, essas células são supressivas e limitam a aloproliferação de células T CD4 autólogas.

Células T reguladoras induzidas por HLA-G foram descritas pela primeira vez *in vitro* após estimulação alogênica por APC HLA-G1⁺. Essas células eram hiporresponsivas e inibiram a proliferação de células T autólogas. Elas não são caracterizadas por um fenótipo em particular, e seus mecanismos de ação ainda são desconhecidos. Apesar de o HLA-G ser diretamente responsável por sua indução, elas não exercem suas funções de regulação pelo HLA-G.^{27,28} Células dendríticas tolerogênicas induzidas por HLA-G são amadurecidas na presença de tetrâmeros de HLA-G, condição na qual sua capacidade de estimulação é muito reduzida. Além disso, essas células são capazes de induzir a geração de células CD4⁺ C25⁺ CTLA4⁺ e células T reguladoras produtoras de IL-10.²⁹

APC também podem expressar HLA-G em condições patológicas. Essas células foram identificadas em tecidos transplantados, em tumores, doenças inflamatórias e infecções virais.^{30,31} Elas são capazes de bloquear a reatividade de células T e induzir células T supressoras,³¹ e parecem ter um papel prognóstico na leucemia linfocítica crônica.³² Células-tronco mesenquimais (MSC, do inglês, *mesenchymal stem cells*) da medula óssea são células multipotentes, capazes de se diferenciar em várias linhagens e com fortes propriedades imunomoduladoras. Recentemente foi demonstrado que o HLA-G é fator determinante para as funções imunomoduladoras das MSC.³³

Em conclusão, células regulatórias dependentes de HLA-G têm origens bastante diferentes, repercutindo em diversos modos de indução, fenótipos e mecanismos de ação. Assim, é muito pouco provável que todas essas células possam desempenhar o mesmo papel nas mesmas situações.

Trogocitose

A trogocitose é uma forma de contato entre células que leva à troca de partes de membranas e moléculas associadas. No entanto, durante a trogocitose todas as moléculas contidas em certa área da membrana são transferidas, incluindo algumas que não participam da comunicação intercelular e que acabam sendo transferidas inespecificamente. A maioria dos estudos sobre trogocitose foi realizada em células T de murinos, e mostrou que células T CD4⁺ e CD8⁺, respectivamente, podem adquirir moléculas do MHC de Classe II e Classe I de APC de uma forma antígeno específica.^{34,35} Recentemente, a trogocitose de HLA-DR, CD80 e HLA-G1 de APC por células T foi descrita em seres humanos, e mostrou seguir as mesmas regras dos modelos murinos.^{17,36,37} Então, as células T que adquirem HLA-DR e CD80, após sofrerem estímulo de maneira antígeno-específica, comportam-se como APC,³⁷ enquanto a aquisição de HLA-G1

torna-as irresponsivas.¹⁷ Isso pode constituir uma forma eficiente de modulação do sistema imunológico.

De fato, foi demonstrado que o HLA-G1 pode ser adquirido por células tumorais a partir de células NK ativadas por trogocitose, e isso pode ser um mecanismo de escape imunológico para células tumorais originalmente HLA-G negativas.¹⁷ Quase todas as células NK ativadas podem adquirir níveis detectáveis de HLA-G1 em poucos minutos por mecanismo dependente de contato entre células. Diferente de células que expressam HLA-G1, a expressão de HLA-G1 adquirido na superfície é temporária nas células NK, uma vez que elas não transcrevem HLA-G. Funcionalmente, as células NK que adquirem HLA-G1 param de proliferar, já não são mais citotóxicas, e comportam-se como células supressoras capazes de inibir as funções de outras células NK. Todas essas propriedades funcionais ocorrem devido ao HLA-G1 adquirido, e poderiam ser anuladas pelo bloqueio de HLA-G1 ou de seu receptor LILR1 na superfície das NK.³

HLA-G – IMPLICAÇÕES CLÍNICAS

Os novos aspectos da biologia do HLA-G, como as funções altamente inibitórias de seus multímeros, de células reguladoras e da trogocitose, são críticos para o entendimento da relevância desta molécula em condições patológicas e devem ajudar a projetar estratégias diagnósticas e terapêuticas mediadas pelo HLA-G em variadas áreas da medicina, como obstetrícia, oncologia, transplantes de órgãos e doenças inflamatórias.

A importância do HLA-G foi primeiramente destacada em estudos sobre a implantação do embrião humano, um processo complexo que requer uma receptividade endometrial adequada e a capacidade de se implantar no útero. Todas as evidências indicam que durante esse processo várias adaptações no sistema imune materno são necessárias para permitir o estabelecimento de uma gravidez viável. A relação entre o HLA-G e a implantação do embrião humano é o ponto de partida fundamental na tolerância imunológica do feto semialogênico pela mãe. Em condições fisiológicas, a forte expressão de HLA-G pelo trofoblasto invasivo pode, em parte, explicar a manutenção do feto semialogênico durante a gestação. Vários estudos têm sugerido a importância da expressão de HLA-G materna durante a clivagem e o desenvolvimento embrionário e do feto.^{38,39} Também o papel de polimorfismos genéticos, como o polimorfismo de deleção/ inserção de 14 pb (14 pb-rs1704), localizado na região 3' UTR do gene, esteve implicado em complicações na gestação, como PE e abortos de repetição.^{40,41}

Outras situações nas quais as moléculas de HLA-G estão envolvidas com desfechos clínicos são os transplantes de órgãos e a oncologia. Desde a primeira descrição da expressão do HLA-G por células tumorais, em 1998,⁴² um considerável número de trabalhos evidenciando a transcrição do gene e a expressão da proteína HLA-G em lesões neoplásicas tem sugerido que isso representaria uma proteção para as células malignas da citólise por células NK.⁴³ Assim, a expressão do HLA-G favoreceria o desenvolvimento do tumor, ao alterar a imunidade citotóxica. Finalmente, tal molécula poderia ser um marcador tumoral e em potencial alvo terapêutico que poderia ser bloqueado ou eliminado.⁴⁴

No contexto dos transplantes, a expressão de HLA-G pode ser benéfica e promover tolerância aos enxertos. A expressão de HLA-G foi amplamente estudada em pacientes após transplantes de coração,⁷ rim,⁴⁵ fígado²⁸ e

fígado-rim.^{27,28} Nessas populações, aqueles que expressaram HLA-G no enxerto ou plasma apresentaram aceitação significativamente melhor do enxerto. Linhas de pesquisa apontam que o HLA-G poderia ser empregado como agente terapêutico tolerogênico, se administrado como terapia alternativa e/ou complementar.⁴⁶

Doenças reumatológicas e HLA-G

A expressão do HLA-G em doenças inflamatórias e autoimunes é uma área relativamente recente de pesquisa. Nos primeiros estudos, a expressão de HLA-G foi avaliada nas fibras musculares em diferentes miopatias inflamatórias,⁴⁷ na dermatite atópica⁴⁸ e na psoríase.⁴⁹ Com base nos achados de que o HLA-G poderia desviar respostas T *helper* para o tipo Th2,⁵⁰ levantou-se a hipótese de que o HLA-G seria uma molécula protetora nas respostas inflamatórias. Desde então, numerosos

Tabela 1
HLA-G em doenças reumatológicas

Doença	Tipo de estudo	n	Material	Expressão de HLA-G	Desfecho estudado	Polimorfismo	Alelo/genótipo associado	Ref.
Doença de Behçet	Genético	312	—	—	Suscetibilidade	Vários	G*010101 - proteção	54
Miopatia inflamatória	Expressão	20	Músculo	Presente	—	—	—	47
AIJ	Genético	106	—	—	Suscetibilidade	pb 14 (rs1704)	del (meninas)	64
Doença de Kawasaki	Genético	92	—	—	Suscetibilidade	GWS	Lócus do HLA-G	52
Artrite reumatoide	Expressão	106	Soro	Diminuído Correlacionado positivamente ao epítipo compartilhado	—	—	—	62
	Expressão	30	PBMC	Aumentado após uso de MTX	—	—	—	63
	Genético	156	—	—	Suscetibilidade	pb 14 (rs1704)	NA	63
	Genético	—	—	—	Resposta ao MTX	pb 14 (rs1704)	del/del	—
	Genético	130	—	—	Resposta ao MTX	pb 14 (rs1704)	NA	71
	Genético	265	—	—	Suscetibilidade	pb 14 (rs1704)	NA	64
Sarcoidose	Genético	186	—	—	Resposta ao MTX	pb 14 (rs1704)	NA	73
	Genético	47	—	—	Suscetibilidade	Vários pb 14 (rs1704)	Alelos contendo 14 pb (NS)	53
LES	Expressão	ND	Granulomas	Rara e fraca	—	—	—	—
	Expressão	50	Soro	Maior	—	—	—	58
			Linfócitos	Maior	—	—	—	—
	Expressão	130	Plasma	Menor	—	—	—	59
	Genético	200	—	—	Suscetibilidade	pb 14 (rs1704)	ins	—
	Genético	293	—	—	Suscetibilidade	pb 14 (rs1704)	ins/del	60
Esclerose sistêmica	Expressão	21	Pele	Presente em 57% dos pacientes Associado com o melhor prognóstico	—	—	—	61

AIJ = artrite idiopática juvenil; GWS = varredura genômica; LES = lúpus eritematoso sistêmico; LPS = lipopolissacarídeo; MTX = metotrexato; NA = nenhuma associação; ND = não determinado; NS = não significativo; PBMC = células mononucleares do sangue periférico; Ref. = referência.

Fonte: Adaptado de Veit, Wianna, Chies.³

estudos têm sido realizados na área da reumatologia, cujos resultados estão resumidos na Tabela 1.

Atualmente, estudos de varredura genômica estão ganhando cada vez mais destaque na investigação e na descoberta de alelos e regiões relacionadas à suscetibilidade genética para doenças autoimunes. Em estudo de varredura genômica que analisou 2360 SNPs dentro da região do MHC em 92 pacientes com doença de Kawasaki (DK), uma vasculite sistêmica da infância de causa desconhecida,⁵¹ encontrou-se o HLA-G como único locus candidato para uma associação significativa com essa vasculite.⁵²

O polimorfismo de 14 pb foi estudado em outras situações, e tem sido associado a várias doenças – o alelo de inserção tinha sido observado com maior frequência em pacientes com sarcoidose⁵³ e na doença de Behçet (DB),⁵⁴ enquanto o alelo de deleção foi relatado como um fator de risco para miocardiopatia dilatada idiopática⁵⁵ e para o pênfigo vulgar (PV).⁵⁶ A expressão de HLA-G na pele de pacientes com PV foi recentemente relatada.⁵⁷ No entanto, esses resultados devem ser replicados em futuros trabalhos.

Além da DK e da DB, outras doenças reumatológicas foram avaliadas em relação ao HLA-G, como o lúpus eritematoso sistêmico (LES) e a artrite reumatoide (AR). No LES, publicações têm demonstrado resultados diversos: um estudo relatou níveis mais elevados de HLA-G no plasma dos pacientes,⁵⁸ enquanto outro relatou níveis mais baixos.⁵⁹ Esse último estudo também relatou uma associação genética com o polimorfismo de 14 pb, na qual o genótipo *ins/ins* foi um fator de risco para o desenvolvimento do LES. No entanto, esse resultado não foi replicado em pesquisa desenvolvida no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, onde foi observado um aumento na frequência do genótipo heterozigoto.⁶⁰

Na esclerose sistêmica, a expressão do HLA-G foi relatada em biópsias de pele em pacientes brasileiros, e associada a menor frequência de úlceras vasculares cutâneas, telangiectasias e poliartrite, e com melhora de sobrevida.⁶¹

O número de estudos versando sobre prevalência e expressão de polimorfismos de HLA-G também é limitado na AR. Em recente publicação, Verbruggen *et al.*⁶² identificaram níveis plasmáticos menores de HLA-G em pacientes com AR em comparação com indivíduos saudáveis. Assim, em um primeiro momento, seria concluído que os baixos níveis de sHLA-G verificados nesses pacientes traduziriam uma incapacidade de suprimir o surgimento de células autorreativas, facilitando a instalação de uma doença autoimune. De maneira peculiar, no grupo de pacientes portadores de epítomos compartilhados do complexo HLA associados à doença, especialmente HLA-DRB1*01, 04 e 10, foram detectados níveis mais altos de

sHLA-G. Tais níveis correlacionaram-se positivamente com parâmetros de atividade de doença, como proteína C-reativa e número de articulações edemaciadas. Os autores postularam que baixo sHLA-G poderia contribuir para a suscetibilidade da AR, enquanto níveis aumentados no grupo de pacientes com fatores de mau prognóstico representariam mecanismos de defesa secundários eclodidos após o início e a perpetuação da inflamação.⁶²

Até o momento, tentativas de encontrar uma associação genética entre polimorfismos do HLA-G e suscetibilidade para AR não obtiveram sucesso.^{63,64} Em 2008, nosso grupo publicou estudo de casos e controles que incluiu 265 pacientes com AR e 356 controles saudáveis genotipados para o polimorfismo de 14 pb de HLA-G. Nenhuma diferença nas frequências alélicas e genóticas foram observadas entre pacientes e controles. Em análise transversal, também não encontramos correlação entre características da doença (manifestações extra-articulares, subluxação atlanto-axial, escores de atividade clínica e funcional e tempo de doença) e o genótipo. Nesse estudo também foram incluídos 106 pacientes portadores de artrite idiopática juvenil (AIJ). Curiosamente, observamos uma associação significativa entre o alelo de deleção e suscetibilidade para AIJ em meninas em comparação com controles do mesmo gênero (0,743 e 0,576, respectivamente, $P < 0,001$). Os resultados sugerem que tais doenças têm elementos fisiopatogênicos diferentes entre si.⁶⁴

Outro campo de investigação relacionado aos polimorfismos de 14 pb de HLA-G com potencial aplicabilidade na prática terapêutica dos pacientes com AR é a farmacogenética. O metotrexato (MTX), principal droga modificadora do curso da doença (DMCD),⁶⁵ está implicado no aumento de produção de IL-10 em pacientes portadores de AR, e tal fato correlaciona-se com melhor resposta terapêutica.⁶⁶ É possível que a IL-10 e o HLA-G ajam em conjunto na imunossupressão de processos inflamatórios *in vivo* e sejam fatores importantes na suscetibilidade e no curso de doenças inflamatórias. A IL-10 induz a expressão de HLA-G na superfície de monócitos e, por sua vez, o sHLA-G parece estimular a expressão de IL-10 em células mononucleares de sangue periférico (PBMC).^{67,68}

A estreita relação entre as moléculas de HLA-G e IL-10 também pode ser ilustrada pelo trabalho de Rizzo *et al.*⁶⁹ Nesse estudo, realizado em culturas de PBMC ativadas com lipopolissacarídeos (LPS), os maiores níveis de IL-10 foram observados no genótipo +14/+14, e os menores no genótipo -14/-14. A secreção de HLA-G5/sHLA-G1 foi precedida pela expressão de IL-10, o que pode indicar uma retroalimentação autócrina. Tendo em vista que o genótipo +14/+14 associa-se com transcritos de mRNA menos estáveis e menor produção

de sHLA-G, maiores níveis de IL-10 seriam necessários para a secreção dessas moléculas, em comparação com o genótipo -14/-14. Assim, os autores demonstraram, pela primeira vez, diferenças funcionais ligadas ao polimorfismo de HLA-G em nível celular.

Diante desses achados, os mesmos autores avaliaram a produção de sHLA-G e IL-10 e sua relação com o polimorfismo de 14 pb de HLA-G em 156 pacientes com AR (tratados ou não com MTX). As células mononucleares de sangue periférico de indivíduos hígidos e pacientes portadores de AR não tratados previamente com MTX foram expostas a diferentes concentrações de MTX, e as produções de IL-10 e sHLA-G foram dosadas por ensaios imunoenzimáticos. O MTX claramente induziu a produção de sHLA-G, e houve associação estatisticamente significativa entre as concentrações mais altas de sHLA-G e o genótipo -14/-14 pb. Pacientes responsivos ao MTX [(redução do escore de atividade da doença (DAS, do inglês *Disease Activity Score*) > 0,6–1,2; medidos antes e após seis meses de tratamento com MTX] apresentaram mais frequentemente o genótipo -14/-14 pb que o grupo não respondedor. Apesar do resultado consistente, o caráter retrospectivo e as baixas doses utilizadas de MTX (dose média 10,5 mg por semana) podem ter sido limitações relevantes. É amplamente aceito que o MTX oral deva ser iniciado com 10–15 mg por semana, com o escalonamento de 5 mg a cada 2–4 semanas, até 20–30 mg por semana, dependendo da resposta clínica e da tolerabilidade.⁷⁰ Adicionalmente, ao verificar que a produção de sHLA-G esteve correlacionada à resposta terapêutica, os autores propuseram que esse polimorfismo possa vir a ser um marcador de resposta terapêutica nas fases iniciais da doença. Eles ressaltaram a necessidade de confirmação desses dados em estudos prospectivos em diferentes populações.⁶³

Contrapondo o resultado anterior, há dois trabalhos com resultados negativos. Estudo que incluiu 130 pacientes com AR não evidenciou diferença estatisticamente significativa na distribuição alélica ou genotípica nos escores de DAS28 ($\leq 3,2$ ou $> 3,2$) nos pacientes em uso de MTX.⁷¹ Os pacientes apresentavam AR de longa duração (média de 10 anos) e foram expostos a doses adequadas de MTX (dose média de 16,6 mg por semana, em não respondedores). Diferente do trabalho de Rizzo *et al.*,⁶³ a limitação deste trabalho foi o delineamento transversal. Além desse aspecto, o tamanho da amostra teve poder estatístico suficiente apenas para detectar uma diferença muito grande nas taxas de resposta entre os grupos de genótipos (30%). Por outro lado, a falta de poder suficiente para tirar conclusões definitivas é compartilhada pela maioria dos estudos de farmacogenética na AR.⁷²

Em 2010, Kooloos *et al.*⁷³ publicaram estudo com desenho prospectivo incluindo 186 pacientes portadores de RA e virgens de MTX. Um dos critérios de inclusão foi a duração dos sintomas menor que dois anos. Os dados foram obtidos a partir de uma subcoorte dos pacientes que participaram do estudo multicêntrico *Behandelstrategieën voor Reumatoïde Artritis* (BeSt). Os pacientes respondedores foram definidos como aqueles que estavam recebendo MTX e tinham um DAS de até 2,4 após seis meses de tratamento (boa resposta clínica); caso contrário, os indivíduos foram considerados não respondedores. Além da inserção/deleção de 14 pb do gene HLA-G, foram testados polimorfismos funcionais em seis outros genes: DHFR (dihidrofolato redutase) 829C>T, ABCB1 (*transmembrane transporter ATP-binding cassette B1*) 3435C>T, ITPA (*inosine triphosphate pyrophosphatase*) IVS2 + 21A>C, IMPDH2 (*inosine-5-monophosphate dehydrogenase 2*) 787C>T, TGFB1 869T>C e TLR4 896A>G. Por fim, nenhuma associação significativa dessas variantes com eficácia do MTX foi encontrada.

Em comparação com o único estudo com resultados positivos, os resultados contrários obtidos em outros estudos podem refletir as diferenças interétnicas nas frequências do polimorfismo estudado,⁷⁴ o que pode influenciar o poder de estudos de associação. Outros fatores diversos (genéticos e outros), influentes em diferentes populações, podem modificar a expressão de um gene e levar a diferentes níveis de associação.⁷⁵ Além disso, os desfechos ainda não são padronizados em estudos de farmacogenética na AR, tornando-os dificilmente comparáveis.

Resumindo, a homozigose para a deleção de 14 pb do gene HLA-G pode ser um potencial marcador de resposta ao MTX. Esta hipótese é reforçada pelas consequências funcionais da interação do polimorfismo de 14 pb de HLA-G e MTX mediada por IL-10, bem como pela existência de estudo clínico com resultado positivo na literatura. Uma vez que o real papel desse polimorfismo ainda não foi bem estabelecido para prever a resposta terapêutica ao MTX na AR, achados positivos precisam ser replicados em coortes independentes. Futuros estudos são necessários para a identificação de perfis genéticos capazes de selecionar os pacientes mais propensos à resposta adequada ao MTX.

CONCLUSÃO

É cada vez mais evidente que a molécula HLA-G pode ser capaz de exercer ação direta e sustentada no sistema imunológico por meio de seus efeitos imunorregulatórios, indução de células supressoras e trogocitose. Assim, torna-se uma candidata em potencial para exercer influência na expressão

clínica de diversas doenças reumatológicas. Embora vários estudos tenham apontado para a associação de polimorfismos ou mesmo níveis plasmáticos de HLA-G com diversas situações clínicas, incluindo a modulação de resposta terapêutica, é prudente ressaltar que os resultados ainda são controversos, e que mais trabalhos científicos são necessários para comprovar suas potenciais propriedades.

REFERENCES

REFERÊNCIAS

- Hughes AL, Nei M. Evolution of the major histocompatibility complex: independent origin of nonclassical class I genes in different groups of mammals. *Mol Biol Evol* 1989; 6(6):559–79.
- Veit TD, Chies JA. Tolerance versus immune response – microRNAs as important elements in the regulation of the HLA-G gene expression. *Transpl Immunol* 2009; 20(4):229–31.
- Veit TD, Vianna V, Chies JA. HLA-G – From fetal tolerance to a regulatory molecule in inflammatory diseases. *Curr Immunol Rev* 2010; 6(1):1–15.
- Clements CS, Kjer-Nielsen L, McCluskey J, Rossjohn J. Structural studies on HLA-G: implications for ligand and receptor binding. *Hum Immunol* 2007; 68(4):220–6.
- Rousseau P, Le Discorde M, Mouillot G, Marcou C, Carosella ED, Moreau P. The 14 bp deletion-insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. *Hum Immunol* 2003; 64(11):1005–10.
- Carosella ED, Moreau P, Le Maoult J, Le Discorde M, Dausset J, Rouas-Freiss N. HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. *Adv Immunol* 2003; 81:199–252.
- Lila N, Carpentier A, Amrein C, Khalil-Daher I, Dausset J, Carosella ED. Implication of HLA-G molecule in heart-graft acceptance. *Lancet* 2000; 355(9221):2138.
- Paul P, Cabestre FA, Ibrahim EC, Lefebvre S, Khalil-Daher I, Vazeux G *et al.* Identification of HLA-G7 as a new splice variant of the HLA-G mRNA and expression of soluble HLA-G5, -G6, and -G7 transcripts in human transfected cells. *Hum Immunol* 2000; 61(11):1138–49.
- Geraghty DE, Koller BH, Orr HT. A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84(24):9145–9.
- Park B, Lee S, Kim E, Chang S, Jin M, Ahn K. The truncated cytoplasmic tail of HLA-G serves a quality-control function in post-ER compartments. *Immunity* 2001; 15(2):213–24.
- Wilczyński JR. Th1/Th2 cytokines balance – yin and yang of reproductive immunology. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005; 122(2):136–43.
- Hofmeister V, Weiss EH. HLA-G modulates immune responses by diverse receptor interactions. *Semin Cancer Biol* 2003; 13(5):317–23.
- Rouas-Freiss N, Gonçalves RM, Menier C, Dausset J, Carosella ED. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(21):11520–5.
- Rajagopalan S. Endosomal signaling and a novel pathway defined by the natural killer receptor KIR2DL4 (CD158d). *Traffic* 2010; 11(11):1381–90.
- Rouas-Freiss N, Moreau P, Menier C, Carosella ED. HLA-G in cancer: a way to turn off the immune system. *Semin Cancer Biol* 2003; 13(5):325–36.
- Riteau B, Menier C, Khalil-Daher I, Sedlik C, Dausset J, Rouas-Freiss N *et al.* HLA-G inhibits the allogeneic proliferative response. *J Reprod Immunol* 1999; 43(2):203–11.
- LeMaoult J, Caumartin J, Daouya M, Favier B, Le Rond S, Gonzalez A *et al.* Immune regulation by pretenders: cell-to-cell transfers of HLA-G make effector T cells act as regulatory cells. *Blood* 2007; 109(5):2040–8.
- Horuzsko A, Lenfant F, Munn DH, Mellor AL. Maturation of antigen-presenting cells is compromised in HLA-G transgenic mice. *Int Immunol* 2001; 13(3):385–94.
- Fons P, Chabot S, Cartwright JE, Lenfant F, L'Faqihi F, Giustiniani J *et al.* Soluble HLA-G1 inhibits angiogenesis through an apoptotic pathway and by direct binding to CD160 receptor expressed by endothelial cells. *Blood* 2006; 108(8):2608–15.
- Borges L, Cosman D. LIRs/ILTs/MIRs, inhibitory and stimulatory Ig-superfamily receptors expressed in myeloid and lymphoid cells. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000; 11(3):209–17.
- Shiroishi M, Kuroki K, Rasubala L, Tsumoto K, Kumagai I, Kurimoto E *et al.* Structural basis for recognition of the nonclassical MHC molecule HLA-G by the leukocyte Ig-like receptor B2 (LILRB2/LIR2/ILT4/CD85d). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(44):16412–7.
- Willcox BE, Thomas LM, Bjorkman PJ. Crystal structure of HLA-A2 bound to LIR-1, a host and viral major histocompatibility complex receptor. *Nat Immunol* 2003; 4(9):913–9.
- Shiroishi M, Kuroki K, Ose T, Rasubala L, Shiratori I, Arase H *et al.* Efficient leukocyte Ig-like receptor signaling and crystal structure of disulfide-linked HLA-G dimer. *J Biol Chem* 2006; 281(15):10439–47.
- Carosella ED, HoWangYin KY, Favier B, LeMaoult J. HLA-G-dependent suppressor cells: Diverse by nature, function, and significance. *Hum Immunol* 2008; 69(11):700–7.
- Feger U, Tolosa E, Huang YH, Waschbisch A, Biedermann T, Melms A *et al.* HLA-G expression defines a novel regulatory T-cell subset present in human peripheral blood and sites of inflammation. *Blood* 2007; 110(2):568–77.
- Le Rond S, Le Maoult J, Créput C, Menier C, Deschamps M, Le Friec G *et al.* Alloreactive CD4+ and CD8+ T cells express the immunotolerant HLA-G molecule in mixed lymphocyte reactions: in vivo implications in transplanted patients. *Eur J Immunol* 2004; 34(3):649–60.
- Le Rond S, Azéma C, Krawice-Radanne I, Durrbach A, Guettier C, Carosella ED *et al.* Evidence to support the role of HLA-G5 in allograft acceptance through induction of immunosuppressive/regulatory T cells. *J Immunol* 2006; 176(5):3266–76.
- Naji A, Le Rond S, Durrbach A, Krawice-Radanne I, Créput C, Daouya M *et al.* CD3+CD4low and CD3+CD8low are induced by HLA-G: novel human peripheral blood suppressor T-cell subsets involved in transplant acceptance. *Blood* 2007; 110(12):3936–48.
- Ristich V, Liang S, Zhang W, Wu J, Horuzsko A. Tolerization of dendritic cells by HLA-G. *Eur J Immunol* 2005; 35(4):1133–42.
- Pangault C, Le Friec G, Caulet-Maugendre S, Léna H, Amiot L, Guilloux V *et al.* Lung macrophages and dendritic cells express HLA-G molecules in pulmonary diseases. *Hum Immunol* 2002; 63(2):83–90.

31. Créput C, Durrbach A, Menier C, Guettier C, Samuel D, Dausset J *et al.* Human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression in biliary epithelial cells is associated with allograft acceptance in liver-kidney transplantation. *J Hepatol* 2003; 39(4):587–94.
32. Nüchel H, Rebmann V, Dürig J, Dührsen U, Grosse-Wilde H. HLA-G expression is associated with an unfavorable outcome and immunodeficiency in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2005; 105(4):1694–8.
33. Selmani Z, Naji A, Gaiffe E, Obert L, Tiberghien P, Rouas-Freiss N *et al.* HLA-G is a crucial immunosuppressive molecule secreted by adult human mesenchymal stem cells. *Transplantation* 2009; 87(9 Suppl):S62–6.
34. Huang JF, Yang Y, Sepulveda H, Shi W, Hwang I, Peterson PA *et al.* TCR-Mediated internalization of peptide-MHC complexes acquired by T cells. *Science* 1999; 286(5441):952–4.
35. Hudrisier D, Riond J, Mazarguil H, Gairin JE, Joly E. Cutting edge: CTLs rapidly capture membrane fragments from target cells in a TCR signaling-dependent manner. *J Immunol* 2001; 166(6):3645–9.
36. Game DS, Rogers NJ, Lechler RI. Acquisition of HLA-DR and costimulatory molecules by T cells from allogeneic antigen presenting cells. *Am J Transplant* 2005; 5(7):1614–25.
37. Tatari-Calderone Z, Semnani RT, Nutman TB, Schlom J, Sabzevari H. Acquisition of CD80 by human T cells at early stages of activation: functional involvement of CD80 acquisition in T cell to T cell interaction. *J Immunol* 2002; 169(11):6162–9.
38. Yao YQ, Barlow DH, Sargent IL. Differential expression of alternatively spliced transcripts of HLA-G in human preimplantation embryos and inner cell masses. *J Immunol* 2005; 175(12):8379–85.
39. Ménéz Y, Elder K, Viville S. Soluble HLA-G release by the human embryo: an interesting artefact? *Reprod Biomed Online* 2006; 13(6):763–4.
40. Tripathi P, Abbas A, Naik S, Agrawal S. Role of 14-bp deletion in the HLA-G gene in the maintenance of pregnancy. *Tissue Antigens* 2004; 64(6):706–10.
41. Goldman-Wohl DS, Ariel I, Greenfield C, Hochner-Celnikier D, Cross J, Fisher S *et al.* Lack of human leukocyte antigen-G expression in extravillous trophoblasts is associated with pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 2000; 6(1):88–95.
42. Paul P, Rouas-Freiss N, Khalil-Daher I, Moreau P, Riteau B, Le Gal FA *et al.* HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(8):4510–5.
43. Bukur J, Rebmann V, Grosse-Wilde H, Luboldt H, Ruebben H, Drexler I *et al.* Functional role of human leukocyte antigen-G up-regulation in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63(14):4107–11.
44. Sebti Y, Le Maux A, Gros F, De Guibert S, Pangault C, Rouas-Freiss N *et al.* Expression of functional soluble human leukocyte antigen-G molecules in lymphoproliferative disorders. *Br J Haematol* 2007; 138(2):202–12.
45. Qiu J, Terasaki PI, Miller J, Mizutani K, Cai J, Carosella ED. Soluble HLA-G expression and renal graft acceptance. *Am J Transplant* 2006; 6(9):2152–6.
46. Carosella ED, Favier B, Rouas-Freiss N, Moreau P, Lemaoult J. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. *Blood* 2008; 111(10):4862–70.
47. Wiendl H, Behrens L, Maier S, Johnson MA, Weiss EH, Hohlfeld R. Muscle fibers in inflammatory myopathies and cultured myoblasts express the nonclassical major histocompatibility antigen HLA-G. *Ann Neurol* 2000; 48(4):679–84.
48. Khosrotehrani K, Le Danff C, Reynaud-Mendel B, Dubertret L, Carosella ED, Aractingi S. HLA-G expression in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2001; 117(3):750–2.
49. Aractingi S, Briand N, Le Danff C, Viguier M, Bachelez H, Michel L *et al.* HLA-G and NK receptor are expressed in psoriatic skin: a possible pathway for regulating infiltrating T cells? *Am J Pathol* 2001; 159(1):71–7.
50. Carosella ED, Moreau P, Aractingi S, Rouas-Freiss N. HLA-G: a shield against inflammatory aggression. *Trends Immunol* 2001; 22(10):553–5.
51. Almeida RG, Goldenzon AV, Rodrigues MC, Sztajn bok FR, Elsas MI, Oliveira SK. Perfil da doença de Kawasaki em crianças encaminhadas para dois serviços de reumatologia pediátrica do Rio de Janeiro, Brasil. *Rev Bras Reumatol* 2010; 50(5):529–38.
52. Kim JJ, Hong SJ, Hong YM, Kim S, Kang MJ, Kim KJ *et al.* Genetic variants in the HLA-G region are associated with Kawasaki disease. *Hum Immunol* 2008; 69(12):867–71.
53. Hviid TV, Milman N, Hylenius S, Jakobsen K, Jensen MS, Larsen LG. HLA-G polymorphisms and HLA-G expression in sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2006; 23(1):30–7.
54. Park KS, Park JS, Nam JH, Bang D, Sohn S, Lee ES. HLA-E*0101 and HLA-G*010101 reduce the risk of Behçet’s disease. *Tissue Antigens* 2007; 69(2):139–44.
55. Lin A, Yan WH, Xu HH, Tang LJ, Chen XF, Zhu M *et al.* 14 bp deletion polymorphism in the HLA-G gene is a risk factor for idiopathic dilated cardiomyopathy in a Chinese Han population. *Tissue Antigens* 2007; 70(5):427–31.
56. Gazit E, Slomov Y, Goldberg I, Brenner S, Loewenthal R. HLA-G is associated with pemphigus vulgaris in Jewish patients. *Hum Immunol* 2004; 65(1):39–46.
57. Yari F, Zavarán Hosseini A, Nemat Gorgani M, Khorramizadeh MR, Mansouri P, Kazemnejad A. Expression of HLA-G in the skin of patients with pemphigus vulgaris. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2008; 7(1):7–12.
58. Rosado S, Perez-Chacon G, Mellor-Pita S, Sanchez-Vegazo I, Bellas-Menendez C, Citores MJ *et al.* Expression of human leukocyte antigen-G in systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol* 2008; 69(1):9–15.
59. Rizzo R, Hviid TV, Govoni M, Padovan M, Rubini M, Melchiorri L *et al.* HLA-G genotype and HLA-G expression in systemic lupus erythematosus: HLA-G as a putative susceptibility gene in systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 2008; 71(6):520–9.
60. Veit TD, Cordero EA, Mucenic T, Monticciolo OA, Brenol JC, Xavier RM *et al.* Association of the HLA-G 14 bp polymorphism with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2009; 18(5):424–30.
61. Wastowski JJ, Sampaio-Barros PD, Amstalden EM, Palomino GM, Marques-Neto JF, Crispim JC *et al.* HLA-G expression in the skin of patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2009; 36(6):1230–4.
62. Verbruggen LA, Rebmann V, Demanet C, De Cock S, Grosse-Wilde H. Soluble HLA-G in rheumatoid arthritis. *Hum Immunol* 2006; 67(8):561–7.

63. Rizzo R, Rubini M, Govoni M, Padovan M, Melchiorri L, Stignani M *et al.* HLA-G 14-bp polymorphism regulates the methotrexate response in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenet Genomics* 2006; 16(9):615–23.
64. Veit TD, Vianna P, Scheibel I, Brenol CV, Brenol JC, Xavier RM *et al.* Association of the HLA-G 14-bp insertion/deletion polymorphism with juvenile idiopathic arthritis and rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 2008; 71(5):440–6.
65. Bértolo MB, Brenol CV, Schainberg CG, Neubarth F, Lima FACd, Laurindo IM *et al.* Atualização do consenso brasileiro no diagnóstico e tratamento da artrite reumatoide. *Rev Bras Reumatol* 2007; 47(3):151–9.
66. Rudwaleit M, Yin Z, Siegert S, Grolms M, Radbruch A, Braun J *et al.* Response to methotrexate in early rheumatoid arthritis is associated with a decrease of T cell derived tumour necrosis factor alpha, increase of interleukin 10, and predicted by the initial concentration of interleukin 4. *Ann Rheum Dis* 2000; 59(4):311–4.
67. Moreau P, Adrian-Cabestre F, Menier C, Guiard V, Gourand L, Dausset J *et al.* IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. *Int Immunol* 1999; 11(5):803–11.
68. Kanai T, Fujii T, Kozuma S, Yamashita T, Miki A, Kikuchi A *et al.* Soluble HLA-G influences the release of cytokines from allogeneic peripheral blood mononuclear cells in culture. *Mol Hum Reprod* 2001; 7(2):195–200.
69. Rizzo R, Hviid TV, Stignani M, Balboni A, Grappa MT, Melchiorri L *et al.* The HLA-G genotype is associated with IL-10 levels in activated PBMCs. *Immunogenetics* 2005; 57(3–4):172–81.
70. Katchamart W, Johnson S, Lin HJ, Phumethum V, Salliot C, Bombardier C. Predictors for remission in rheumatoid arthritis patients: A Systematic review. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2010; 62(8):1128–43.
71. Stamp LK, O'Donnell JL, Chapman PT, Barclay ML, Kennedy MA, Frampton CM *et al.* Lack of association between HLA-G 14 bp insertion/deletion polymorphism and response to long-term therapy with methotrexate response in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2009; 68(1):154–5.
72. Kooloos WM, Huizinga TW, Guchelaar HJ, Wessels JA. Pharmacogenetics in treatment of rheumatoid arthritis. *Curr Pharm Des* 2010; 16(2):164–75.
73. Kooloos WM, Wessels JA, van der Straaten T, Allaart CF, Huizinga TW, Guchelaar HJ. Functional polymorphisms and methotrexate treatment outcome in recent-onset rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics* 2010; 11(2):163–75.
74. van der Ven K, Skrablin S, Ober C, Krebs D. HLA-G polymorphisms: ethnic differences and implications for potential molecule function. *Am J Reprod Immunol* 1998; 40(3):145–57.
75. Risch NJ. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature* 2000; 405(6788):847–56.