

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas
Área de Concentração: Reumatologia

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMO DE
INSERÇÃO/DELEÇÃO DE 14 PB DO GENE HLA-G NA
EXPRESSÃO CLÍNICA E RESPOSTA TERAPÊUTICA AO
METOTREXATO NA ARTRITE REUMATÓIDE**

Claiton Viegas Brenol

Orientador: Dr. Ricardo Machado Xavier

Tese de Doutorado

2010

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas
Área de Concentração: Reumatologia

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMO DE
INSERÇÃO/DELEÇÃO DE 14 PB DO GENE HLA-G NA
EXPRESSÃO CLÍNICA E RESPOSTA TERAPÊUTICA AO
METOTREXATO NA ARTRITE REUMATÓIDE**

Claiton Viegas Brenol

Orientador: Dr. Ricardo Machado Xavier

Tese de Doutorado

2010

B838a Brenol, Claiton Viegas

Avaliação de polimorfismo de inserção/deleção de 14 PB do gene HLA-G na expressão clínica e resposta terapêutica ao metotrexato na artrite reumatóide / Claiton Viegas Brenol ; orient. Ricardo Machado Xavier. – 2010.

94 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2010.

1. Artrite reumatóide 2. Antígenos HLA 3. Metotrexato 4.

Polimorfismo genético 5. Farmacogenética I. Xavier, Ricardo

Machado II. Título.

NLM: WE 346

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

Dedicado (e em agradecimento) à minha avó Adiles, à minha mãe, ao meu pai, à minha irmã e aos meus demais familiares, pelas palavras de estímulo e apoio carinhosamente proferidas durante a realização dessa tese.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Ricardo Machado Xavier, pela confiança e acolhida como orientador. Por seu profundo conhecimento científico e postura acadêmica, foi e será um modelo para minha formação profissional.

Ao Professor Dr. João Carlos T. Brenol, pela assessoria afetiva e científica e por cultivar e transmitir fundamentais valores ao longo da minha vida, que continuarão sendo os alicerces na busca da minha realização pessoal e profissional.

Ao Prof. Roberto Eichenberg, pelo apoio e incentivo ao longo da minha formação profissional.

Ao Professor Dr. José Artur Bogo Chies, cuja valiosa colaboração científica foi imprescindível para a realização deste trabalho.

Aos bolsistas de iniciação científica, Elissandra Machado Arlindo, Ângela Massignan, Laura Corso Cavalheiro, Lúcia Costa Cabral Fendt, Priscilla Martinelli e Renata Rosa, pelo valioso trabalho e dedicação.

Aos colegas Charles Kohem, Odirlei Monticielo, Tamara Mucenic, Yasser El Badad, Briele Keiserman, Rafael Tesche e Pedro Schneider, pela colaboração no ambulatório de artrite reumatóide do serviço de reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

À coordenadora *senior* Leila Krammer e às secretárias do Serviço de Reumatologia do HCPA, Juliana Nunes e Karen Ramos, pelo apoio e suporte nos trâmites relacionados à defesa da tese.

Aos secretários e à auxiliar de enfermagem, Lorena Koglin, pela ajuda com os pacientes e harmoniosa convivência no ambulatório da zona 16.

À Nicolle, cujo carinho, estímulo e compreensão foram indispensáveis para a conclusão da tese.

À minha mãe Marli, pelo carinho e afeto de sempre incansavelmente dispendidos e que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

À minha irmã Marlise, dindos Sérgio, Maria e Rosa, primos e à toda minha família, pelo apoio e estímulo.

ÍNDICE GERAL

LISTA DE ABREVIATURAS	8
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	10
ABSTRACT / RESUMO	11
ABSTRACT / RESUMO	11
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 ARTRITE REUMATÓIDE	17
2.1.1 <i>Conceito e prevalência da AR</i>	17
2.1.2 <i>Suscetibilidade genética para AR</i>	19
2.1.3 <i>Etiopatogênese da AR</i>	20
2.1.4 <i>Sobrevida na AR</i>	23
2.1.5 <i>Tratamento farmacológico da AR</i>	24
2.1.6 <i>Mecanismos de ação do metotrexato na AR</i>	27
2.1.7 <i>Estudos farmacogenéticos com metotrexato na AR</i>	28
2.2 HLA-G.....	32
2.2.1 <i>Genes do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC)</i>	32
2.2.2 <i>Gene e molécula do HLA-G</i>	33
2.2.3 <i>Regulação e expressão gênica do HLA-G</i>	34
2.2.4 <i>HLA-G e a tolerância imunológica</i>	36
2.2.4.1 <i>Efeitos imunorregulatórios do HLA-G</i>	36
2.2.4.2 <i>HLA-G e células supressoras</i>	38
2.2.4.3 <i>Trogocitose</i>	39
2.2.5 <i>HLA-G: implicações clínicas</i>	41
2.2.5.1 <i>Doenças inflamatórias</i>	42
2.3 HLA-G E A AR.....	48
3 REFERÊNCIAS	52
4 OBJETIVOS DO ESTUDO	69
4.1 OBJETIVO GERAL:	69
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	69
5 ARTIGO CIENTÍFICO	70
6 CONSIDERAÇÕES GERAIS	92
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	93
8 APÊNDICES	97
8.1 PROTOCOLO DO AMBULATÓRIO DE ARTRITE REUMATÓIDE	97
8.2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	100

LISTA DE ABREVIATURAS

- 3' UTR – 3' *untranslated region* - região 3 não traduzida
- AIJ – artrite idiopática juvenil
- APC – *antigen presenting cell* – células apresentadoras de antígenos
- AR – artrite reumatóide
- CMSF - células mononucleares de sangue periférico
- DAS28 – disease activity score – escore de atividade de doença
- DB – Doença de Behçet
- DC – *dendritic cells* - células dendríticas
- DC - doença de Crohn
- DCV – doença cardiovascular
- DK - doença de Kawasaki
- DM1 - diabetes melito tipo 1
- DMCD – droga modificadora do curso de doença
- DNA - *deoxyribonucleic acid* - ácido desoxirribonucléico
- EM - Esclerose Múltipla
- FR – fator reumatóide
- HLA – human leukocyte antigen – antígeno leucocitário humano
- IC – intervalo de confiança
- IFN- α – interferon-alfa
- IFN- γ – interferon-gama
- IL-1 β – interleucina-1-beta
- KIR - *killer cell immunoglobulin-like receptors* - receptores de células assassinas tipo imunoglobulina
- LCR - Líquido cefalorraquidiano
- LES – lúpus eritematoso sistêmico

LILR - *leukocyte immunoglobulin-like receptors* - receptores de leucócitos

tipo imunoglobulina

LPS – lipopolissacarídeos

MHC – major histocompatibility complex – complexo de histocompatibilidade principal

MTX - metotrexato

NK – natural killer cell – célula assassina natural

ON – óxido nítrico

PCR – *polymerase chain reaction* – reação em cadeia de polimerase

PcR – proteína C reativa

PE – pré-eclâmpsia

PV - Pênfigo Vulgar

RC – razão de chances

RCU - retocolite ulcerativa

SNPs - *single nucleotide polymorphisms*

TNF- α – tumor necrosis factor-alfa – fator de necrose tumoral-alfa

VNTR – *variable number of tandem repeats* – número variável de repetições

em tandem

VSG – velocidade de sedimentação globular

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Avaliação inicial do paciente com AR. Fonte: Bértolo, Brenol et al [27].	18
Quadro 2 - Fatores de mau prognóstico na AR. Fonte: Bértolo, Brenol et al [27].	24
Figura 1 - Algoritmo para tratamento da AR. Fonte: Bértolo, Brenol et al [27]	26
Figura 2 - Funções imunorreguladoras mediadas pelo HLA-G, células-alvo e receptores. Fonte: adaptado de Veit, Vianna et al. [81].	37
Tabela 1 - HLA-G em doenças inflamatórias. Fonte: adaptado de Veit, Vianna et al. [81].	46

ABSTRACT / RESUMO

Background: 14-bp insertion/deletion in exon 8 of the HLA-G gene is a potentially functional polymorphism that has been implicated in the response to MTX monotherapy or combination in rheumatoid arthritis (RA) patients.

Objectives: We sought to determine whether the 14-bp insertion/deletion polymorphism in exon 8 of the HLA-G gene is associated with susceptibility to RA, clinical features, or response to MTX therapy.

Methods: We determined the HLA-G 14-bp insertion/deletion polymorphism genotypes in a prospective cohort of 309 consecutive RA patients and 294 healthy controls, and looked for associations between genotype and clinical features of RA. Multivariate analyses were performed to investigate the effect of homozygosity for the -14/-14 bp genotype on changes in DAS28 in response to MTX therapy in a subgroup of 188 RA patients.

Results: Among the 309 RA patients, no correlations were observed between allele or genotype frequencies of the HLA-G gene polymorphism and clinical features, including disease activity scores and functional scores. No significant differences were observed in the genotype and allele frequencies between RA patients and controls. In the subgroup evaluated for clinical response to MTX, we observed a decrease in mean DAS28 over the course of the study. Furthermore, a better response to MTX treatment, measured by adjusted mean of DAS28 change, was observed in those patients with the HLA-G -14/-14-bp genotype, which was not observed among other genotypes.

Conclusion: Homozygosity for the 14 bp deletion polymorphism within exon 8 of the HLA-G gene was associated with a better response to MTX in a prospective cohort of patients with RA. This is a promising genetic marker for predicting response to MTX therapy in RA.

Key words: HLA-G, 14-bp polymorphism, methotrexate, Rheumatoid Arthritis, pharmacogenetics.

RESUMO

Introdução: O polimorfismo de inserção/deleção de 14 pb no éxon 8 do gene HLA-G é uma variante funcional com propriedades anti-inflamatórias, que tem sido associada a melhores respostas à monoterapia ou ao tratamento combinado com metotrexato (MTX) em pacientes com artrite reumatóide (AR).

Objetivo: Determinar se o polimorfismo de 14 pb do gene HLA-G está associado com maior suscetibilidade à doença, com características clínicas e como fator preditivo da resposta à terapia em pacientes portadores de AR tratados com uma estratégia de tratamento intensivo com MTX.

Métodos: Uma coorte prospectiva composta de 309 pacientes consecutivos foi estabelecida entre Junho de 2007 e Dezembro de 2009. Controles caucasianos saudáveis da mesma área geográfica e antecedentes étnicos foram selecionados. Um subgrupo de 188 pacientes com AR anteriormente não submetidos a decisões terapêuticas baseadas em escores de atividade da doença e sem critérios de doença em remissão pelo CDAI (>2.8) foram incluídos na análise de resposta clínica ao MTX (baseada em estratégia intensiva) e seguidos por um período de 14 meses (± 5.29). Pacientes e controles foram genotipados para o polimorfismo de 14 pb por PCR com *primers* específicos para o éxon 8 do gene HLA-G. Uma análise multivariada foi realizada para investigar o efeito da homozigose para a deleção no polimorfismo 14bp do HLA-G sobre as mudanças no DAS28.

Resultados: Entre os 309 pacientes com AR (média de idade 60.6 ± 12.4 anos), não foram observadas diferenças nas frequências alélicas em relação às características clínicas, incluindo escores de atividade e funcionais. Também não foram observadas diferenças significativas nas frequências genotípicas e alélicas entre pacientes com AR e controles. Na análise de resposta clínica do subgrupo de 188 pacientes, medianas e médias dos escores de atividade da doença melhoraram ao final do estudo (DAS28: 5.0 vs. 4.2, $p < 0.001$; respectivamente). A média de incremento da

dose de MTX comparado ao *baseline* foi respectivamente 14.7 mg \pm 4.8 vs. 17.4 mg \pm 4.7 ($p < 0.001$). Em análise multivariada, o modelo foi significativamente associado às mudanças no DAS28 (R^2 ajustado=0.353; $p < 0.001$) ou seja os fatores clínicos incluídos na análise explicaram 35% da variação do DAS28. O modelo apontou os fatores estatisticamente significativos na predição de resposta: valor do DAS28 basal (R^2 semi parcial =0.261; $p < 0.001$), gênero (R^2 semi parcial = 0.034; $p = 0.003$) e a interação entre a homozigose da deleção para 14 pb e o uso do MTX (R^2 semi-parcial = 0.017; $p = 0.031$) como fatores preditivos independentes de resposta. Na análise estratificada pela presença de homozigose para a deleção ou outros genótipos, houve uma tendência para maior variação no DAS28 nos pacientes que utilizaram MTX no subgrupo -/-14-bp HLA-G (-1.4 \pm 0.3 vs. -0.4 \pm 0.5; $p = 0,071$), o que não foi observado entre outros genótipos (-1,1 \pm 0,2 vs. -1,3 \pm 0,4; $p = 0,496$).

Conclusão: A ocorrência de homozigose para deleção de 14 pb no gene HLA-G foi independentemente associada com melhor resposta ao MTX em uma coorte prospectiva de pacientes com AR. Os achados trazem à luz um promissor marcador genético que precisa ser replicado em coortes independentes maiores. Maior número de estudos são necessários para que se possa identificar perfis genéticos capazes de selecionar individualmente os pacientes mais propensos a respostas ótimas ao MTX.

Palavras-Chave: HLA-G, 14 pb polimorfismo, metotrexato, artrite reumatóide, farmacogenética.

1 INTRODUÇÃO

A artrite reumatóide (AR) é uma doença sistêmica inflamatória de etiologia auto-imune [1]. Caracteriza-se basicamente por sinovite crônica, simétrica e erosiva preferencialmente de articulações periféricas e a maioria dos pacientes apresenta fator reumatóide positivo [2]. Com a progressão da doença, os pacientes desenvolvem incapacidade para realização de suas atividades, tanto na vida diária, como na profissional, com impacto econômico significativo para o paciente e para a sociedade [3], incluindo número aumentado de consultas médicas, internações hospitalares e cirurgias ortopédicas [4]. Adicionalmente, pacientes portadores de AR têm uma sobrevida menor do que a da população em geral [5] e a principal causa de morte é a doença cardiovascular (DCV) [6-8]. Quanto à etiopatogênese da AR, apesar de prováveis fatores ambientais deflagrarem o início da doença, a existência do componente genético é clara [9]. Os genes relacionados ao HLA explicam menos de 50% do componente genético da suscetibilidade para a AR [10]. Assim, uma série de genes não relacionada ao HLA (*human leukocyte antigen*) tem sido avaliada quanto à sua associação com a doença.

A droga de primeira linha para o tratamento da AR é o metotrexato (MTX). Sua capacidade de reduzir sinais e sintomas de atividade da AR, e melhora no estado funcional foi demonstrada. Também bloqueia a progressão das lesões radiográficas [11]. Evidências atuais sugerem que o uso de MTX é associado com uma diminuição do risco para eventos cardiovasculares em pacientes com AR. Isto sugere que a redução da inflamação na AR com MTX não só melhora o curso articular da doença, como também o da doença aterosclerótica [12].

O MTX é considerado a droga modificadora do curso de doença (DMCD) melhor tolerada [13]. Mesmo assim, existe grande diversidade na resposta ao MTX, tanto em termos de eficácia, quanto em relação à toxicidade. Atualmente, não existe

nenhum biomarcador confiável para prever a resposta individual ao MTX. Neste contexto, a farmacogenética parece exercer um papel promissor [14]. Diversos estudos de farmacogenética do MTX na AR têm identificado genes que influenciam desfechos de toxicidade e eficácia. Dentre estes podemos destacar o gene do HLA-G.

O HLA-G é uma molécula de HLA classe Ib, expressa na superfície celular ou na forma solúvel (sHLA-G), que desempenha funções importantes na regulação do sistema imunológico através da inibição da atividade de células NK e T citotóxicas (CTL) [15], das respostas de células T CD4 + aloproliferativas [16], e da maturação e função de células apresentadoras de antígenos (APCs – *antigen presenting cells*) [17].

O MTX está implicado no aumento de produção de IL-10 em pacientes portadores de AR e isto se correlaciona com melhor resposta terapêutica [18]. É possível que a IL-10 e o HLA-G ajam em conjunto na imunossupressão de processos inflamatórios *in vivo* e sejam fatores influentes 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 (CMSP) [19, 20].

Munidos destas informações, autores italianos avaliaram a produção de sHLA-G (que possui funções imunomoduladoras similares à de membrana) e IL-10 e sua relação com o polimorfismo de 14bp de HLA-G em em uma coorte retrospectiva de 156 pacientes com AR (tratados ou não com MTX). Houve associação estatisticamente significativa entre as concentrações mais altas de sHLA-G e o genótipo -14/-14 bp. Pacientes que foram responsivos ao MTX (redução de DAS > 0,6 à 1,2; medidos antes e após 6 meses de tratamento com MTX) apresentaram mais frequentemente o genótipo -14/-14 pb do que o grupo não respondedor. Diante dos achados, foi proposto que este polimorfismo possa vir a ser um marcador de resposta terapêutica nas fases iniciais da doença e ressaltaram a necessidade de

confirmação destes dados em estudos prospectivos em diferentes populações [21]. No que concerne à IL-10, embora tenha sido observada correlação estatisticamente significativa entre concentrações desta citocina e níveis de sHLA-G em sobrenadantes de culturas de CMSPs expostas ao MTX, este achado não permaneceu significativo após estratificação por genótipos de +/-14pb HLA-G. Contrapondo o resultado anterior, estudo que incluiu 130 pacientes com AR não evidenciou diferença estatisticamente significativa na distribuição alélica ou genotípica do HLA-G nos escores de DAS28 ($\leq 3,2$ ou $> 3,2$) nos pacientes em uso de MTX [22]. A limitação deste trabalho foi o delineamento transversal. Portanto, o real papel desempenhado pelo polimorfismo de 14 pb da região promotora do gene do HLA-G na resposta terapêutica ao MTX permanece desconhecido.

O objetivo do presente estudo é avaliar as associações das variantes alélicas do polimorfismo de 14 pb do HLA-G com a resposta terapêutica ao MTX e características clínicas em pacientes com AR da região sul do Brasil. Também será avaliada a suscetibilidade para a doença, comparando a prevalência do polimorfismo entre pacientes com AR e controles saudáveis da mesma região geográfica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Artrite reumatóide

2.1.1 Conceito e prevalência da AR

A AR é uma doença sistêmica inflamatória de etiologia auto-imune. Caracteriza-se basicamente por sinovite crônica, simétrica e erosiva, preferencialmente de articulações periféricas, e a maioria dos pacientes apresenta fator reumatóide positivo [2]. Tem uma prevalência de aproximadamente 1% na população brasileira [23], que é similar a da literatura mundial [24]. A taxa de incidência da doença pode estar diminuindo, como demonstrado em uma coorte de base populacional americana acompanhada ao longo dos últimos 40 anos [25]. Tem preferência pelo sexo feminino [26] e tende a surgir a partir da quarta década de vida, com pico de incidência na quinta década [5]. A AR é uma doença bastante heterogênea em termos de severidade e ritmo de progressão da inflamação articular, presença de manifestações extra-articulares e de resposta ao tratamento farmacológico [1]. A avaliação inicial do paciente deve incluir história clínica e exame físico completos, e exames complementares de laboratório e imagem (Quadro 1).

Quadro 1 - Avaliação inicial do paciente com AR. Fonte: Bértolo, Brenol et al [27].

Medidas Subjetivas:

Duração da rigidez matinal.
Intensidade da dor articular.
Limitação da função.

Exame físico

Número de articulações inflamadas (contagem de articulações dolorosas e edemaciadas).
Problemas articulares mecânicos: limitação da amplitude de movimento, crepitação, instabilidade e deformidades.
Manifestações extra-articulares.

Laboratório

Hemograma completo.
Velocidade de hemossedimentação e/ou proteína C reativa.
Função renal.
Enzimas hepáticas.
Exame qualitativo de urina.
Fator reumatóide.*
Análise do líquido sinovial.**

Radiografia

Radiografia das articulações das mãos, dos pés e das demais articulações comprometidas.

Outros: #

Avaliação global de atividade da doença feita pelo paciente.
Avaliação global da atividade da doença feita pelo médico.
Questionários de avaliação da capacidade funcional ou qualidade de vida.

*Fator reumatóide: realizado na avaliação inicial para se estabelecer o diagnóstico. Se inicialmente negativo, pode ser repetido 6 a 12 meses após o início de doença. ** Líquido sinovial: se necessário para excluir outras doenças. Pode ser repetido durante o acompanhamento do paciente com reagravamento do quadro, para se afastar artrite séptica.²(D).# Sugere-se a avaliação destes parâmetros subjetivos para acompanhamento do paciente.

Para fins de investigação científica, convencionou-se realizar seu diagnóstico através da associação de manifestações clínicas, radiológicas e laboratoriais, conforme os critérios diagnósticos propostos pelo Colégio Americano de Reumatologia (revisados em 1987) [28]. Atualmente, novos critérios diagnósticos

estão sendo validados por grupos científicos europeus e americanos com o objetivo de identificar pacientes com artrite inflamatória precoce e, em seguida, tratá-los para impedir o desenvolvimento da doença erosiva.

2.1.2 Suscetibilidade genética para AR

Apesar de prováveis fatores ambientais deflagrarem o início da doença, a existência do componente genético na etiopatogênese da AR é clara a partir de observações de um maior risco da doença nos familiares de doentes e de uma concordância maior em gêmeos monozigóticos do que em dizigóticos [9]. A comparação entre as taxas de concordância em gêmeos monozigóticos e a prevalência na população revela que aproximadamente 50 à 60 % na variação de ocorrência da doença é atribuível a fatores genéticos [29, 30].

O antígeno leucocitário humano (HLA – *human leukocyte antigen*) é o fator genético que contribui mais fortemente para o risco de desenvolver AR. Diversos alelos de HLA-DRB1 vêm sendo associados à AR em populações variadas: DRB1*0401, *0404, *0405, *0408, *0101, *0102, *1001, *1402 [9].

A teoria do epítipo compartilhado foi desenvolvida para explicar a suscetibilidade para AR em portadores dos alelos de HLA-DRB1. Os alelos citados anteriormente compartilham uma seqüência de aminoácidos nas posições 70-74 da terceira região hipervariável da cadeia DRβ1. Estes epítipos compartilhados estariam envolvidos diretamente na patogênese da doença por permitir a apresentação de peptídeos artritogênicos à células efectoras [30, 31]. A presença de homozigose para um desses alelos ou a presença simultânea de dois alelos contendo o epítipo compartilhado, particularmente os alelos *0401 e *0404, parece estar fortemente associada com manifestações graves da doença, incluindo nódulos subcutâneos, positividade ao FR e erosões articulares [32].

Os genes relacionados ao HLA explicam menos de 50% do componente genético da suscetibilidade para a AR [10]. Assim, justificadamente uma série de genes não relacionada ao HLA tem sido avaliada quanto à sua associação com a doença. Genes com papel na regulação imunológica e na suscetibilidade para outras doenças auto-imunes foram testados na AR. Dentre os recentes candidatos convincentes, situam-se os genes do antígeno 4 dos linfócitos T citotóxicos (CTLA-4), da proteína 3 induzida por TNF (TNFAI3), do transdutor de sinal e ativação de transcrição 4 (STAT-4), do isótipo 4 da peptidil arginina deaminasase (PADI4) e da proteína tirosina fosfatase N22 (PTPN22). Este último, juntamente com o HLA-DRB1, pode colaborar com metade da contribuição genética para suscetibilidade da AR [33].

2.1.3 Etiopatogênese da AR

A etiologia da AR permanece desconhecida. A marcante herança genética da AR, em combinação com a presença de autoanticorpos que precedem o início das manifestações clínicas em subgrupos de pacientes, apontam para um modelo patogênico no qual o mecanismo de autoimunidade é iniciado e perpetrado bem antes do momento em que o processo inflamatório articular eclode [33]. O estímulo artrítogênico inicial, embora não bem estabelecido, pode ser determinado por fatores hormonais e psicológicos, microtraumas, ou infecções. Quanto aos estímulos infecciosos, estudos conduzidos nas últimas 3 décadas têm vinculado a exposição ao vírus Epstein-Barr (EBV) à patogênese da AR, porém os resultados são inconclusivos. Apesar disto, sabe-se que pacientes portadores de AR tem níveis elevados de anticorpos contra o EBV em comparação à controles saudáveis [34].

O evento inicial da doença é o processo inflamatório iniciado na membrana sinovial com infiltrado de linfócitos e macrófagos. Este pode adquirir uma estrutura similar ao de tecidos linfóides terciários com predomínio de linfócitos T CD4+. A

hiperplasia das células sinoviais, o infiltrado linfocítico e a neoangiogênese levam à formação do *pannus*. O *pannus* é um tecido inflamatório neoformado proveniente da sinóvia que atinge o osso subcondral e, em seguida, a cartilagem articular com destruição progressiva [35]. As perdas focais de osso marginal e subcondral contribuem decisivamente para a morbidade da doença. Estudos em tecidos humanos e provenientes de modelos animais apontam o osteoclasto como a principal célula envolvida neste processo. A ativação e recrutamento de tais células são influenciadas por citocinas e mediadores inflamatórios [36]. Apesar da identificação de mais de 100 diferentes tipos de citocinas, quimiocinas e outros fatores envolvidos na patogênese da AR, o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α – tumoral necrosis factor) continua ocupando lugar de destaque na doença erosiva da articulação através da ativação dos osteoclastos [37].

A produção de citocinas, com balanço predominante para as pró-inflamatórias, tem papel fundamental na iniciação e perpetuação da inflamação crônica na membrana sinovial. A resposta T auxiliar do tipo 1 gera a produção de interferon-gama (IFN- γ) que estimula a liberação de TNF- α , interleucina-1 beta (IL-1 β) e metaloproteinases pelos macrófagos e fibroblastos sinoviais [38]. Além destes mediadores, a IL-17 produzida por linfócitos T também colabora para destruição de colágeno e fomento da produção de IL-6. A IL-17 também pode aumentar a reabsorção óssea por aumentar a ativação dos osteoclastos e diminuir a formação óssea [39]. Estudo prospectivo com duração de 2 anos comprovou que o aumento dos níveis de IL-17 na sinóvia de pacientes com AR podem estar associados com um risco aumentado de progressão radiográfica [40].

Recentemente, as funções desempenhadas pelos linfócitos B têm sido reconhecidas como significativas na patogênese da AR. A migração de células T e B com formação de agregados com estrutura de folículos terciários, a expressão de moléculas co-estimulatórias (CD 154), e a produção aumentada de interleucina 6 e

10, que estimulam linfócitos B, são indicadores da hiperatividade destas células na doença [41].

O tabagismo é um fator de risco bem estabelecido para o desenvolvimento de AR e foi mais prevalente em pacientes com AR que nos controles em 3 estudos. A forte associação entre o tabagismo e a presença de HLA-DRB1 * 0404 ou outros alelos HLA foi observada em pacientes com AR que apresentam anticorpos anti-citrulina (anti-CCP) [42]. A produção de proteínas citrulinadas induzidas pelo tabaco pode servir como promotoras do processo autoimune, possivelmente funcionando como neoantígenos. Como estas proteínas são encontradas em muitos locais de inflamação, não está claro porque os pacientes com AR produzem títulos elevados de anticorpos direcionados contra estas proteínas. Uma hipótese é que essa resposta de anticorpos seja mediada geneticamente.

O papel do anticorpo contra peptídeo citrulinado cíclico (anti-CCP) tanto no risco para o desenvolvimento da AR, quanto no mecanismo de auto-imunidade da doença, ganhou destaque na literatura científica nos últimos anos. Existem evidências de que a presença do anti-CCP precede o início dos sintomas da AR [43] e determina uma doença mais grave [44]. Já com relação à patogenicidade deste auto-anticorpo, foi documentada a presença de peptídeos citrulinados na sinóvia de pacientes com AR [45]. Em 2007, Kallberg et al publicaram estudo que ilustrou de maneira convincente a interação entre fatores genéticos e ambientais no risco para o desenvolvimento de AR. Verificaram que os fatores de risco genéticos HLA-DRB1 e PTPN22, bem como o tabagismo, têm efeito predominante apenas nos pacientes anti-CCP positivos [46]. Diante destes achados, pode se depreender que pacientes anti-CCP positivos apresentam doença com um padrão genético e fenotípico diferenciado, determinando um subgrupo bem caracterizado com repercussões terapêuticas e prognósticas peculiares.

Radicais reativos de oxigênio e nitrogênio também têm papel na patogênese da AR. Radicais reativos de oxigênio, como o superóxido, peróxido de hidrogênio,

radicais hidroxila e ácido hipocloroso, bem como radicais reativos de nitrogênio, como óxido nítrico e peroxinitrito, contribuem significativamente para o dano tecidual [47, 48].

2.1.4 Sobrevida na AR

Pacientes com AR apresentam taxas aumentadas de mortalidade em comparação com a população em geral. Estudo americano demonstrou uma razão de mortalidade padronizada de 1.27 (95% CI 1.13-1.41) [25]. Pacientes portadores de AR têm uma sobrevida menor do que a da população em geral. A expectativa de vida pode decrescer entre 3 e 10 anos, dependendo da severidade e da idade de início da doença [5]. As principais causas de morte descritas são infecções, doenças linfoproliferativas, doença cardiovascular (DCV) e cerebrovascular, complicações gastrintestinais e relacionadas às manifestações sistêmicas da AR [49]. Dentre os fatores preditivos de mortalidade, são incluídos idade avançada, incapacidade funcional, número de articulações acometidas, fator reumatóide positivo, nódulos reumatóides e velocidade de sedimentação globular (VSG) elevada [6, 50-54]. Alguns destes estão claramente associados a um pior prognóstico também do ponto de vista articular (Quadro 2).

Quadro 2 - Fatores de mau prognóstico na AR. Fonte: Bértolo, Brenol et al [27].

- Início da doença em idade mais precoce;
- Altos títulos de fator reumatóide;
- Anti-CCP reagente;
- Velocidade de hemossedimentação e/ou proteína C reativa, persistentemente elevadas;
- Artrite em mais de 20 articulações;
- Comprometimento extra-articular: presença de nódulo reumatóide, Síndrome de Sjögren, episclerite e/ou esclerite, doença pulmonar intersticial, pericardite, vasculite sistêmica e Síndrome de Felty;
- Presença de erosões nos dois primeiros anos da doença (raio X de mãos e pés);

O tratamento adequado da AR pode reduzir tanto a inflamação articular, quanto aquela associada à aterosclerose, podendo assim diminuir a morbidade e mortalidade cardiovascular associada a AR [55]. Evidências atuais indicam que o uso de MTX é associado com um risco reduzido de eventos cardiovasculares em pacientes com AR. Isto sugere que a redução da inflamação na AR obtida com MTX não só melhora o curso articular da doença, como também o da doença aterosclerótica [12].

2.1.5 Tratamento farmacológico da AR

O diagnóstico precoce e o início imediato do tratamento são fundamentais para o controle da atividade da doença e para prevenir incapacidade funcional e lesão articular irreversível. Com a progressão da doença, os pacientes desenvolvem incapacidade para realização de suas atividades, tanto na vida diária, como na

profissional, com impacto econômico significativo para o paciente e para a sociedade [3], incluindo número aumentado de consultas médicas, internações hospitalares e cirurgias ortopédicas [4].

Os objetivos principais do tratamento do paciente com AR são: prevenir ou controlar a lesão articular, prevenir a perda de função e diminuir a dor, tentando maximizar a qualidade de vida destes pacientes (Figura 1) [3]. A droga de primeira linha para o tratamento da AR é o metotrexato (MTX). O MTX é considerado a droga modificadora do curso de doença (DMCD) melhor tolerada [13]. Sua capacidade de reduzir sinais e sintomas de atividade da doença e melhora no estado funcional foi demonstrada. Também bloqueia a progressão das lesões radiográficas. Atualmente vem sendo considerada como fármaco padrão no tratamento da AR [11].

Não havendo resposta clínica com doses máximas toleradas de MTX ou na presença de efeitos adversos, recomenda-se a sua troca ou, preferencialmente, o uso de combinações de DMCDs. Ainda não estão disponíveis marcadores biológicos ou farmacogenéticos adequados para prever a resposta ao MTX. As combinações mais utilizadas são MTX com cloroquina, com sulfasalazina ou a associação destas três drogas. Também se pode considerar a possibilidade de uso de MTX com leflunomida ou MTX com ciclosporina [27].

A terapia imunobiológica na AR é a aplicação farmacológica de anticorpos monoclonais ou receptores solúveis com afinidades específicas que visam atingir um determinado tipo celular ou mediador solúvel, diminuindo o processo inflamatório. Ela está indicada para os pacientes que persistam com atividade da doença, apesar do tratamento com pelo menos dois dos esquemas propostos no parágrafo anterior [27]. Encontram-se disponíveis comercialmente no Brasil os seguintes agentes modificadores da resposta biológica:

- Bloqueadores de TNF- α : Adalimumabe, Etanercepte e Infliximabe.
- Depletors de linfócito B: Rituximabe.

- Moduladores da co-estimulação: Abatacepte.
- Bloqueadores de IL-6: Tocilizumabe.

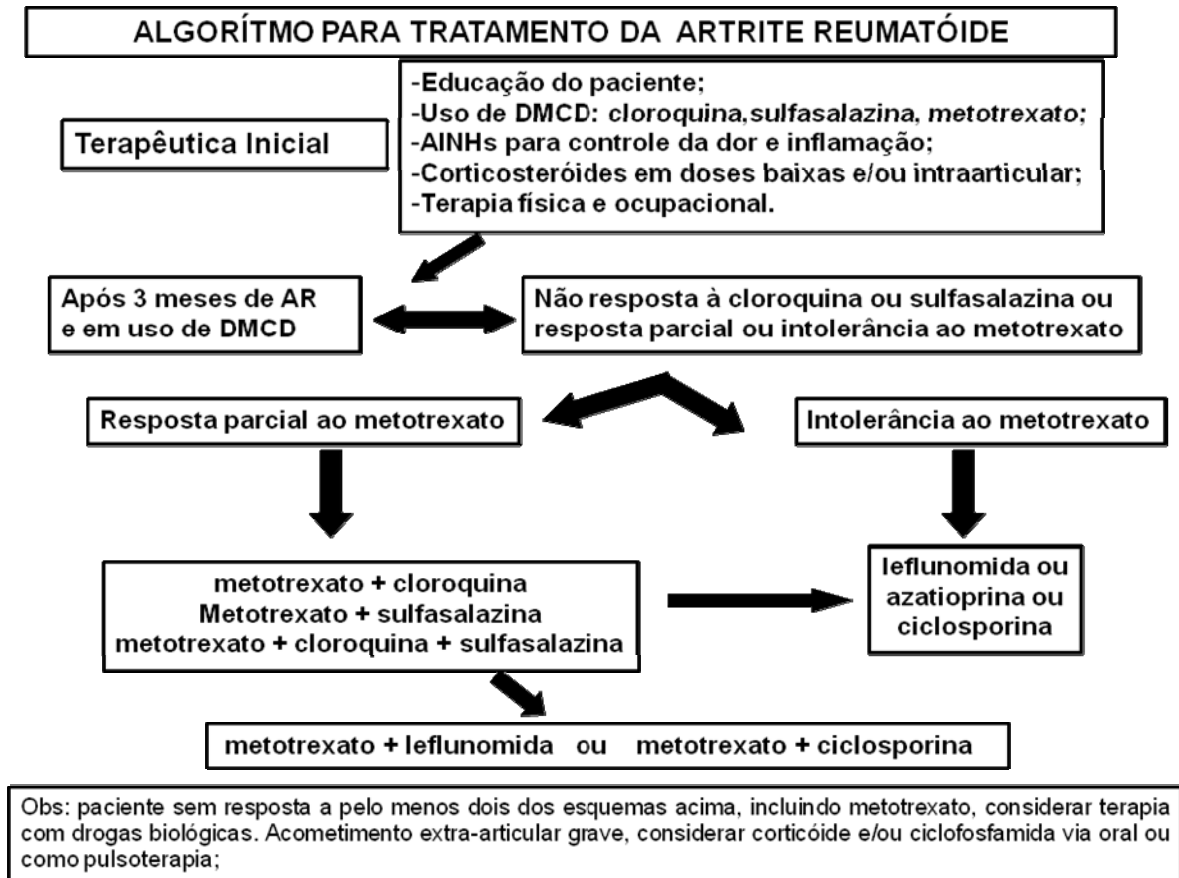


Figura 1 - Algoritmo para tratamento da AR. Fonte: Bértolo, Brenol et al [27]

Estratégias terapêuticas baseadas em metas específicas produzem melhores desfechos clínicos e de capacidade funcional, bem como menor dano estrutural radiológico, em comparação com tratamentos convencionais. Isto foi demonstrado em recente meta-análise publicada na revista de mais alto impacto na área da reumatologia [56]. Nessa meta-análise, foi incluída a nossa coorte de pacientes, onde realizamos uma avaliação prospectiva de 241 pacientes portadores de AR após submetê-los a uma estratégia terapêutica de controle rigoroso da doença com

o objetivo específico de atingir remissão clínica ou ao menos atividade leve de doença (DAS28 < 2,6 ou < 3,2; CDAI < 2,8 ou < 10). Os dados de resposta terapêutica foram coletados após 14 meses de acompanhamento com visitas realizadas ao menos a cada 4 meses. Os achados foram bastante favoráveis à estratégia de controle rigoroso em comparação à visita basal. Houve melhora estatisticamente significativa de contagens de articulações dolorosas e de edemaciadas, de escalas visuais de dor e de saúde global dos pacientes ao final do acompanhamento ($p < 0.05$). Também foram observadas quedas nas médias dos escores de atividade de doença (DAS28 4.64 ± 1.57 vs 3.99 ± 1.45 $p < 0.005$) e uma maior proporção de pacientes foi classificada na categoria de remissão de doença ao final do estudo (DAS28 < 2.6 12.6% vs 20.4% $p < 0.001$; CDAI < 2.8 8.6% vs 14.2% $p < 0.001$) [57].

2.1.6 Mecanismos de ação do metotrexato na AR

Os mecanismos da ação do MTX na AR e em outras doenças inflamatórias ainda não são completamente compreendidos, porém são conhecidos seus efeitos no metabolismo do ácido fólico, os quais são considerados importantes determinantes da eficácia e toxicidade [58]. O metotrexato é um antimetabólito análogo ao folato que bloqueia a síntese de DNA por meio da inibição da dihidrofolato redutase, conseqüentemente inibindo a proliferação celular, por exemplo, de linfócitos envolvidos no processo inflamatório. O MTX entra na célula por meio de transporte ativo e, uma vez internalizado, é convertido na forma de poliglutamato pela enzima folipoliglutamato sintase. Sob essa forma, o MTX é retido na célula, inibindo as enzimas timidilato sintase e dihidrofolato redutase. Esta última, por sua vez é responsável pela conversão do dihidrofolato em tetrahydrofolato (THF), que por ação da metilene tetrahydrofolato redutase (MTHFR) é convertido em 5-metiltetrahydrofolato, que é doador de carbono para diversas reações celulares

importantes [59-61]. Os efeitos do MTX no metabolismo do folato são fundamentais para determinar sua eficácia e toxicidade no tratamento da AR [14, 61]. Embora a enzima MTHFR não seja diretamente inibida pelo MTX, influencia a atividade do mesmo, devido a sua ação no metabolismo do folato [58].

Além da diminuição da proliferação celular, os efeitos do MTX *in vivo* podem ser mediados pelo aumento da taxa de apoptose das células T, modulação da expressão de moléculas de adesão celular e redução da produção de citocinas, como IL-4, IL-13, TNF- α , IFN- γ e fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor - GM-CSF). O MTX também está implicado no aumento de produção de IL-10 (imunossupressora) em pacientes portadores de AR e isto se correlaciona com melhor resposta terapêutica [18]. Vários relatos indicam que os efeitos do MTX são adicionalmente influenciados por micro-elementos ambientais, como a privação de nucleotídeos ou níveis de glutatona [62]. Há muitos relatos que demonstram que o MTX, direta ou indiretamente, está envolvido na liberação de adenosina endógena, outro mecanismo importante de ação do MTX. Em modelo murino de inflamação, a exposição a baixas doses de MTX se correlacionou com aumento dos níveis de IL-10 [63]. No entanto, a relação entre liberação celular de adenosina mediada pelo MTX e sua eficácia clínica não está muito bem estabelecida [62].

2.1.7 Estudos farmacogenéticos com metotrexato na AR

A farmacogenética é a ciência que estuda a interação dos aspectos farmacológicos de uma droga e um determinado gene. Essa interação pode gerar diferentes respostas inter-individuais. A variabilidade genética pode alterar o metabolismo da droga, seus transportadores e a expressão de receptores [64, 65]. Mais de um terço dos genes humanos apresenta características polimórficas, o que pode afetar a eficácia e segurança no metabolismo de fármacos, quando as

mutações ocorrem em proteínas alvos de drogas, aquelas envolvidas no transporte de drogas ou em enzimas metabolizadoras [66].

Existe grande diversidade na resposta ao MTX nos pacientes portadores de AR, tanto em termos de eficácia, quanto em relação à toxicidade. Atualmente, não existe nenhum biomarcador confiável para prever a resposta de um indivíduo ao MTX. Neste contexto, a farmacogenética parece exercer um papel promissor [14].

Os principais estudos de farmacogenética do MTX na AR focaram inicialmente o papel de genes vinculados ao metabolismo da droga. No que concerne aos estudos de associação do polimorfismo do gene MTHFR com relação à eficácia e toxicidade, os resultados são controversos. Urano et al. [67] realizaram um estudo com 106 pacientes portadores de artrite reumatóide, tratados com MTX. Os resultados mostraram que os portadores do haplótipo C677-C1298 recebiam doses mais baixas do MTX e respondiam melhor ao tratamento em comparação aos pacientes sem esse haplótipo. Já nos pacientes portadores do polimorfismo T677-A1298, observou-se maior frequência de efeitos colaterais, principalmente estomatite e aumento das enzimas hepáticas. Em outro estudo com 236 pacientes com AR, a presença dos genótipos MTHFR 677CT ou 677TT esteve associada a aumento do risco de descontinuação do tratamento com MTX em decorrência de efeitos colaterais, principalmente devido ao aumento de enzimas hepáticas. Os parâmetros estudados para eficácia não apresentaram diferenças significativas entre os pacientes com e sem a mutação [68]. No estudo de Wessels et al., em 2006, os pacientes com genótipo MTHFR 1298AA – 677CC apresentaram grande melhora clínica ao tratamento com MTX, enquanto que a presença do alelo 1298C foi associada a maior toxicidade [69]. No entanto, Kumagai et al. [70] não encontraram relação entre toxicidade ou eficácia do tratamento e os polimorfismos acima. Finalmente, em meta-análise publicada em 2009, 55 publicações relacionadas à farmacogenética do MTX em pacientes com AR foram avaliadas. Para apenas 2 polimorfismos (C677T e A1298C do gene da MTHFR; total de 8 estudos) foram

obtidos dados suficientes para uma meta-análise de associação com toxicidade, e não houve polimorfismo com dados suficientes para realizar uma meta-análise de eficácia. O polimorfismo C677T foi associado com aumento da toxicidade (OR 1,71, IC 95% 1,32-2,21, $p < 0,001$), enquanto A1298C não foi associado com aumento da toxicidade (OR 1,12, IC 95% 0,79-1,6, $p = 0,626$) [71].

Outros polimorfismos relacionados aos genes que codificam as enzimas associadas ao metabolismo do MTX, entre eles o da timidilato sintase (TS), também podem ser responsáveis pela variabilidade interindividual na resposta terapêutica [72]. A TS é uma das enzimas inibidas pelo metotrexato, sendo responsável por catalisar a conversão da deoxiuridilato em deoxitimidilato, pela conversão simultânea do 5,10-metilenetetrahidrofolato em dihidrofolato. A TS é essencial para a provisão de nucleotídeos envolvidos na síntese e reparo de DNA [70]. Sequências de repetições em tandem foram identificadas na região 5'UTR do gene TS. A região promotora do gene é polimórfica e pode conter duas ou três sequências de repetições de 28pb. O polimorfismo com 2 sequências de repetições está relacionado com uma menor expressão da enzima em comparação com a de 3 sequências [73]. Este polimorfismo foi estudado em pacientes japoneses, portadores de AR. Os pacientes homozigotos para o alelo de repetição tripla necessitavam de uma dose maior de MTX quando comparados àqueles que possuíam o alelo de repetição dupla [70]. Outro estudo, realizado por Dervieux et al. [72], mostrou que indivíduos homozigotos para a repetição dupla tinham atividade da doença menor e também uma melhor resposta em comparação com os portadores da repetição tripla. Em recente publicação, o mesmo autor demonstrou que combinações entre variantes alélicas codificadoras de outras enzimas como redutase metileno tetrahidrofolato, gama-glutamil-hidrolase, serina hidroximetiltransferase e inosina-trifosfato pirofosfatase, além da TS, aumentam em até 9 vezes a probabilidade de apresentar toxicidade ao MTX (IC 95%: 3,6-21,9, $P < 0,001$). Estes dados indicam

que também as interações entre genes exercem impacto na toxicidade ao MTX no tratamento da AR [74].

Polimorfismos não relacionados ao metabolismo do MTX também foram estudados. Tolusso et al. avaliaram a influência de polimorfismos dos genes da IL-1 β e antagonista do receptor de IL-1 (IL-1R) na resposta ao MTX em pacientes com AR. Eles observaram uma maior frequência do alelo IL-1RN * 3 em não-responsivos em comparação com os responsivos [75]. Em outro estudo, Ali et al. investigaram a frequência e a distribuição de vários genótipos HLA-DR e HLA-DQ em pacientes com AR tratados com MTX. Seus resultados mostraram que apenas HLA-DRB1 * 03 foi significativamente mais comum entre os não-respondedores [76].

Em conclusão, quando avaliamos em conjunto todos os estudos dedicados à busca de biomarcadores da resposta ao MTX na AR, a farmacogenética parece ser uma eficaz ferramenta capaz de fornecer informações relevantes com potencial influência na tomada de decisão terapêutica [77].

2.2 HLA-G

2.2.1 Genes do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC)

A família do MHC caracteriza-se por uma coleção de genes situados no braço curto do cromossomo 6, na região 6p21.3, englobando mais de 4 Mb de DNA. O *locus* foi identificado e nomeado pelo seu papel na rejeição de tecidos em transplantes alogênicos e também pelo fato de muitos dos genes contidos nessa região (>10%) desempenharem importantes funções imunológicas. Assim, o MHC consiste de antígenos de classe I (A, B, C, E, F e G), de classe II (DR, DQ e DP) e de classe III. Estes últimos também desempenham importantes funções imunológicas. Tanto a resposta mediada por células B (humoral), quanto a mediada por células T (celular) são iniciadas através da interação dessas células com os produtos dos genes do MHC, motivo pelo qual essa molécula representa a linha de frente da resposta imune adaptativa contra patógenos invasores. [78].

Os genes do MHC de classe I tiveram sua função originalmente descrita como a de apresentação de peptídeos antigênicos derivados de proteínas intracelulares para linfócitos T citotóxicos. De fato, esta função é desempenhada por alguns genes desta família de MHCs, como os *HLAs A, B e C*, chamados “clássicos” ou do grupo Ia. Tais genes têm a característica comum de serem altamente polimórficos, amplamente expressos dentro do organismo humano e por direcionarem os linfócitos T citotóxicos para a eliminação de células infectadas por vírus ou outros patógenos intracelulares [78].

Em contrapartida, outros genes desta família parecem não desempenhar esta função, embora muitas das suas funções envolvam imunidade. São os

chamados MHCs “não clássicos” ou do grupo Ib. Esses MHCs possuem poucos alelos (são oligomórficos) em comparação com os genes do grupo Ia e têm sua expressão limitada a poucos tipos de células. Os genes de MHC classe Ib novos estão intimamente relacionados com os genes do grupo Ia. Entre estes genes incluem-se os genes *HLA-F* e *HLA-G*. [79].

2.2.2 Gene e molécula do HLA-G

HLA-G é uma molécula de classe Ib, cuja estrutura se assemelha às clássicas moléculas do HLA de classe I, constituído por três domínios alfa não covalentemente associados à uma cadeia de β 2-microglobulina. No entanto, HLA-G apresenta baixo polimorfismo na sua região codificadora, apresenta um padrão de expressão limitado em condições saudáveis e possui uma característica única entre as moléculas de HLA, que é formar multímeros de HLA-G. Além disso, através de *splicing* alternativo, o gene do HLA-G pode dar origem a sete isoformas de proteínas diferentes. Todas estas características contribuem para o crescente interesse científico nessa molécula, e algumas destas são de vital importância nas funções biológicas do HLA-G [80].

O gene do HLA-G possui 36 alelos descritos até o momento, que codificam 14 proteínas diferentes, em comparação com 673, 1077 e 360 alelos de HLA A, B e C, respectivamente [81]. Esse baixo polimorfismo é distribuído ao longo dos três domínios alfa, enquanto que em moléculas clássicas de HLA está concentrado em torno do sítio de ligação com peptídeos. Este último situa-se mais profundamente na fenda entre os domínios alfa 1 e 2 em comparação com as moléculas do HLA clássico [82]. Estas características especiais do HLA-G tornam improvável que esta molécula desempenhe um papel importante na apresentação de antígenos.

As proteínas do 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 [83]. Dependendo do tipo de célula e condição fisiológica, diferentes isoformas de HLA-G são produzidas [84]. 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 [85]. Devido a uma mutação, o HLA-G possui uma cauda citoplasmática que é menor do que as existentes nos HLA-A, B e C, [86]. Esta 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 clássicas HLA [87].

A expressão do HLA-G é altamente restrita a determinados tecidos: além de ser expresso em tecidos fetais, tais 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 eritróides. No entanto, a expressão de HLA-G pode ser induzida em situações tais como transplantes, doenças inflamatórias, em células tumorais, esclerose múltipla e nas infecções virais [80].

2.2.3 Regulação e expressão gênica do HLA-G

Apesar dos esforços para esclarecer os mecanismos de regulação da expressão do HLA-G, os mecanismos subjacentes à expressão desta molécula permanecem ainda desconhecidos. Desde a descrição de que a expressão do HLA-G é distinta daquela das moléculas clássicas de HLA nas células trofoblásticas, um padrão peculiar de controle de sua expressão gênica foi sugerido. Um indício para as diferenças na expressão protéica em comparação com outros genes de HLA é a região promotora do HLA-G, que apresenta várias diferenças em relação aos promotores dos genes de HLA clássicos (e também para outros HLAs não-clássicos). A região promotora do HLA-G apresenta muitos elementos típicos

suprimidos ou modificados, tornando a expressão do HLA-G irresponsiva a fatores estimuladores de HLA clássico [88]. Além disso, enquanto que nos genes HLA clássicos os elementos promotores estão localizados dentro de 220 pb a montante do códon de iniciação ATG, os elementos reguladores de HLA-G estão localizados em uma região que abrange ~ 1,5 kb a montante do códon de iniciação [89]. Vários fatores podem influir positivamente na expressão do gene HLA-G: IL-10 [19], IFNs [90], GM-CSF [91], glicocorticóides [92] e progesterona [93].

Outra característica marcante da região promotora do HLA-G é seu alto polimorfismo. Até o momento, mais de 30 SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) foram identificados nesta região [81], muitos dos quais dentro ou muito próximos de locais de ligação de fatores de transcrição ou elementos de regulação [94]. Treze haplótipos foram identificados, formados por 27 polimorfismos, em três diferentes grupos étnicos. Estas linhagens diversas de haplótipos, provavelmente, apresentam padrões diferentes de atividade promotora [95]. Ober et al. mostraram que um subconjunto de haplótipos promotores associados com o alelo G * 010101 (G * G * 010101b e 010101c) apresentaram maior atividade promotora do que outro subconjunto (G * 010101a, G * 010301 e G * 010102). Uma maior expressão desses alelos foi associada principalmente a um polimorfismo na posição -725 (rs1233334) [96]. Curiosamente, o alelo-725G foi previamente associado a aborto recorrente [94], contrastando com dados prévios que tinham associado uma menor expressão do HLA-G com taxas de aborto aumentadas [97].

A região 3 não traduzida (3' UTR) também parece desempenhar um papel importante na expressão de HLA-G, principalmente através de mecanismos reguladores pós-transcricionais. 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 seqüência 14pb (*ins*) pode sofrer uma etapa adicional de *splicing* que retira 92 pb da região em que esta seqüência está

localizada. Esta deleção pode influenciar a estabilidade do mRNA, já que as transcrições de HLA-G sem estes 92 bp se mostraram mais estáveis. No entanto, o alelo *ins* mostrou-se menos expresso do que o alelo de deleção (del) em diversas situações [99]. Apesar do polimorfismo de 14 pb ser o mais estudado, ainda não existem evidências robustas de que tenha algum efeito na produção protéica.

2.2.4 HLA-G e a tolerância imunológica

2.2.4.1 Efeitos imunorregulatórios do HLA-G

A expressão de HLA-G foi descrita pela primeira vez no citotrofoblasto e, portanto, os primeiros estudos sobre esta 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. Isto 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-eclâmpsia (PE), têm sido associadas com uma resposta imune Th1 [100]. A etiologia e patogênese da PE envolvem uma combinação de fatores genéticos materno-fetais e imunológicos. Para proteger o feto do sistema imunológico da mãe, impedindo a citólise mediada por célula T, 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 assassinas naturais - *natural killers* (NK) - e células T citotóxicas através de receptores específicos [15, 101].

Vários mecanismos através dos quais o HLA-G exerce suas funções regulatórias têm sido identificados (Figura 2). Como foi mencionado anteriormente, HLA-G é capaz de inibir a atividade citotóxica de células NK e T citotóxicas (CTL) .

Da mesma forma, o HLA-G é capaz de proteger células negativas para HLA de classe I ou tumores alogênicos da imunidade mediada por NK anti-tumorais [102]. Também foi demonstrado que pode inibir respostas de células T CD4 + aloproliferativas [16], a proliferação de células T e NK [103], e também agir em células apresentadoras de antígenos (APCs – *antigen presenting cells*), inibindo a sua maturação e função [17].

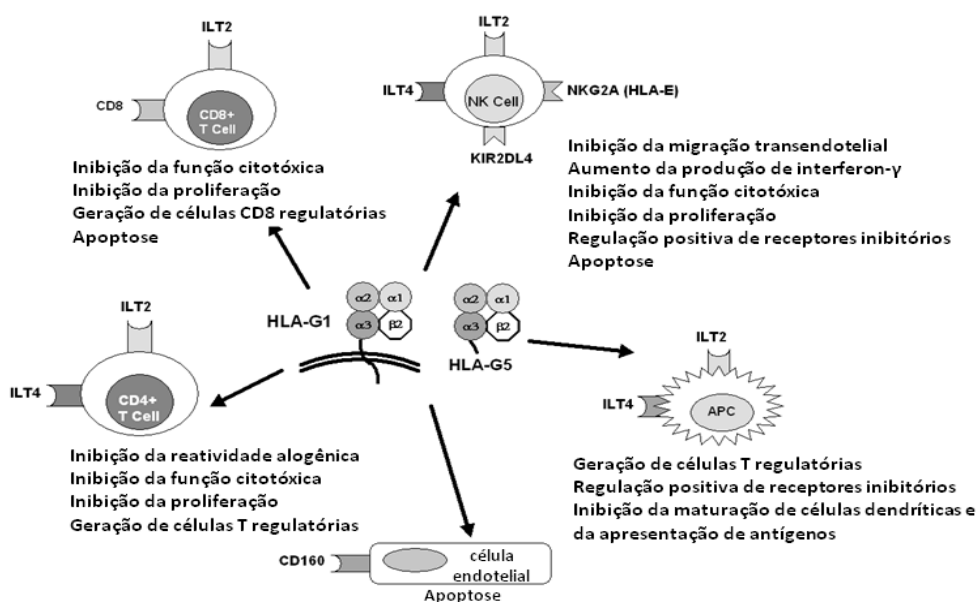


Figura 2 - Funções imunorreguladoras mediadas pelo HLA-G, células-alvo e receptores. Fonte: adaptado de Veit, Vianna et al. [81].

Existem argumentos convincentes de que o HLA desempenhe um papel importante na regulação do sistema imunológico: (i) HLA-G é capaz de se ligar a vários tipos de receptores, alguns dos quais são amplamente distribuídos entre as células imunes; (ii) o HLA-G pode exercer efeitos tolerogênicos de longo prazo através da geração de células supressoras; e (iii) até as células que não transcrevem HLA-G podem tornar-se temporariamente HLA-G +, adquirindo um

perfil supressivo através da trogocitose (captação intercelular de HLA-G pela incorporação de fragmentos de membrana que expressam esta molécula) [81].

O HLA-G exerce seus efeitos imunorregulatórios através da ligação a receptores específicos em diferentes tipos de células imunológicas [104]. O complexo de receptor de leucócitos do cromossomo 19 inclui duas famílias de genes polimórficos: receptores de leucócitos tipo imunoglobulina (LILR - *leukocyte immunoglobulin-like receptors*) e receptores de células assassinas tipo imunoglobulina (KIR - *killer cell immunoglobulin-like receptors*). Dentre as moléculas LILR, LILR1 (ILT-2, CD85j) e LILR2 (ILT4, CD85d) são receptores inibitórios que reconhecem todas as moléculas HLA classe I [105]. LILR1 é expresso pelas células B, algumas células T e NK, e todos os monócitos, enquanto LILR2 é específica de linhagens mielóides. Existem evidências de que LILRB1 e LILRB2 se ligam ao HLA-G [106, 107].

2.2.4.2 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 através da geração de células supressoras. Várias células supressoras relacionadas ao HLA-G foram identificadas [108]. 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 através de fatores solúveis que incluem sHLA-G, mas não IL-10 ou TGF- β . Sua ocorrência foi identificada também em locais de inflamação [109]. Células T HLA-G⁺ também podem ser induzidas por meio de aloestimulação e produzir HLA-G5 solúvel e, em raras ocasiões, HLA-G1 [110]. Embora sua origem seja obscura, estas 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 APCs HLA-G1 +. Essas células eram hiporresponsivas e inibiram a proliferação de células T autólogas. Elas não são caracterizadas por um fenótipo particular, e seus mecanismos de ação são ainda desconhecidos, mas, apesar do HLA-G ser diretamente responsável pela sua indução, elas não exercem suas funções de regulação através do HLA-G [111, 112]. Células dendríticas (DC – dendritic cells) 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 [113]. APCs também podem expressar HLA-G em condições patológicas. Essas células foram identificadas em tecidos transplantados, em tumores, doenças inflamatórias e infecções virais [114, 115]. Elas são capazes de bloquear a reatividade de células T e induzir células T supressoras [115], e parecem ter um papel prognóstico na leucemia linfocítica crônica [116]. Células-tronco mesenquimais (MSC – *mesenchymal stem cells*) da medula óssea são células multipotentes, capazes de se diferenciar em várias linhagens e que possuem fortes propriedades imunomoduladoras. Recentemente, foi demonstrado que o HLA-G é fator determinante para as funções imunomoduladoras das MSCs [117].

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 estas células possam desempenhar o mesmo papel nas mesmas situações.

2.2.4.3 Trogocitose

Trogocitose é uma forma de contato entre células que leva a troca de partes de membranas e moléculas associadas. No entanto, durante a trogocitose, todas as moléculas contidas dentro de 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 foram realizados em células T de murinos e mostraram que células T CD4⁺ e CD8⁺, respectivamente, podem adquirir moléculas do MHC de Classe II e Classe I de APCs de uma forma antígeno específica [118, 119]. Recentemente, a trogocitose de HLA-DR, CD80 e HLA-G1 de APCs por células T foi descrita em seres humanos, e mostrou seguir as mesmas regras dos modelos murinos [103, 120, 121]. Então, as células T que adquirem HLA-DR e CD80, após sofrerem estímulo de maneira antígeno-específica, comportam-se como APCs [121], enquanto que a aquisição de HLA-G1 torna-as irresponsivas [103]. Isso pode constituir uma forma eficiente de modulação do sistema imunológico.

De fato, foi demonstrado que HLA-G1 pode ser adquirido por células tumorais a partir de células NK ativadas através de trogocitose, e isso pode ser um mecanismo de escape imunológico para células tumorais originalmente HLA-G negativas [103]. Quase todas as células NK ativadas podem adquirir níveis detectáveis de HLA-G1 em poucos minutos por mecanismo dependente de contato entre células. Diferentemente de células que expressam HLAG1, a expressão de HLA-G1 adquirido na superfície é temporária nas células NK, uma vez que estas células não transcrevem HLA-G. Funcionalmente, as células NK que adquirem HLA-G1 param de proliferar, já não são mais citotóxicas, e se comportam 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 por bloqueio de HLA-G1 ou seu receptor LILR1 na superfície das NK [81].

2.2.5 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 gestação, oncologia, transplantes de órgãos e doenças inflamatórias.

A importância do HLA-G foi primeiramente destacada em estudos sobre a implantação do embrião humano, que é um processo complexo que requer a capacidade de se implantar no útero e uma receptividade endometrial adequada. Todas as evidências indicam que durante este 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 semi-alogênico 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 [122, 123]. Também o polimorfismo de deleção/inserção de 14 pb esteve implicado em complicações na gestação, como pré-eclampsia (PE) e abortos de repetição [124, 125].

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 [126], um

considerável número de trabalhos evidenciando a transcrição do gene e expressão da proteína HLA-G em lesões neoplásicas tem sugerido que isto representaria uma proteção para as células malignas da citólise por células NK [127]. Assim, a expressão do HLA-G favoreceria o desenvolvimento do tumor, ao alterar a imunidade citotóxica. Finalmente, tal molécula poderia constituir-se num marcador tumoral e em potencial alvo terapêutico que poderia ser bloqueado ou eliminado [128].

No contexto dos transplantes, a expressão de HLA-G pode ser benéfica e promover a tolerância aos enxertos. A expressão de HLA-G foi amplamente estudada em pacientes após transplantes de coração [84] rim [129], fígado [112] e fígado-rim [111, 112]. Nestas populações, aqueles que expressaram HLA-G no enxerto ou plasma apresentaram aceitação do enxerto significativamente melhor. Linhas de pesquisa apontam que o HLA-G poderia ser empregado como agente terapêutico tolerogênico, se administrado como terapia alternativa e/ou complementar [130].

2.2.5.1 Doenças inflamatórias

A expressão do HLA-G em doenças inflamatórias é uma área relativamente recente de pesquisa. Nos primeiros estudos, a expressão de HLA-G foi avaliada nas fibras musculares em diferentes miopatias inflamatórias [131], na dermatite atópica [132] e na psoríase [133]. Com base nos achados de que o HLA-G poderia desviar respostas T *helper* para o tipo Th2 [134], foi levantada a hipótese de que o HLA-G seria uma molécula protetora nas respostas inflamatórias. Desde então, numerosos estudos têm sido realizados, cujos resultados são sumarizados na Tabela 1.

Um achado interessante a respeito da doença inflamatória intestinal é que a expressão do HLA-G foi observada na retocolite ulcerativa (RCU) em biópsias intestinais, mas não na doença de Crohn (DC), o que constitui uma diferença potencial entre as duas doenças [135]. A associação genética entre o alelo de deleção de 14 pb e RUC foi descrita, indicando que este alelo pode constituir um fator de risco para esta doença inflamatória intestinal. O mesmo estudo também relatou um aumento da frequência do alelo em pacientes portadores de DC que se submeteram à ressecção ileocecal, sugerindo que o alelo HLA-G também pode ter um papel no curso da DC [136].

A rinite alérgica é um bom exemplo da expressão de HLA-G com a expressão de um fenômeno Th2. Níveis elevados de sHLA-G foram detectados em portadores de rinite alérgica sazonal e perene, e uma forte correlação entre a gravidade clínica e sHLA-G foi observada [137, 138].

O HLA-G também tem sido estudado na Esclerose Múltipla (EM). EM é uma doença inflamatória desmielinizante auto-imune do sistema nervoso central. HLA-G é fortemente expressado em lesões de EM e em áreas com inflamação linfocítica e monocítica [139]. A síntese de sHLA-G intratecal e no líquido cefalorraquidiano (LCR) foi superior nos pacientes com EM em comparação com controles. Os níveis de HLA-G foram diretamente correlacionados com os níveis de IL-10 e marcadores de melhor prognóstico [140, 141]. Além do mais, a expressão do HLA-G mostrou-se aumentada em pacientes após o tratamento com interferon- β , um importante agente imunomodulador usado no tratamento da EM. HLA-G derivado de monócitos, a principal fonte de HLA-G na EM, foi capaz de inibir tanto a produção de citocinas de Th1 (IFN- γ , IL-2), quanto de Th2 (IL-10) por células T CD4 autólogas ativadas [139]. Outro estudo abordou a possível influência genética de polimorfismos de HLA-G sobre a esclerose múltipla, mas não foram observadas diferenças significativas para os polimorfismos analisados [142].

Outros estudos de associação entre diferentes doenças e o HLA-G apresentaram resultados controversos. Em estudos de varredura genômica (*genome wide scan*) em asma, o gene de HLA-G foi marcado como um gene de susceptibilidade em quatro amostras independentes [143], mas esses resultados não foram replicados em um segundo estudo [144]. Polimorfismos na região promotora e também na UTR 3' foram implicados na suscetibilidade à asma [145]. Mais estudos tentando caracterizar expressão do HLA-G geraram resultados conflitantes na asma atópica com achados divergentes com relação à produção de sHLA-G neste grupo de pacientes [146, 147].

Atualmente, estudos de varredura genômica (*genome wide scan*) estão ganhando cada vez mais destaque na investigação e descoberta de alelos e regiões relacionadas à suscetibilidade genética para doenças auto-imunes. Uma análise genética completa da região do MHC, utilizando um conjunto de dados gerados com 2965 marcadores genéticos ao longo do MHC em 2321 famílias com membros portadores de diabetes melito tipo 1 (DM1) colocou o HLA-G na lista principal de genes candidatos para a susceptibilidade à DM1. Quatro SNPs próximos ao locus do HLA-G foram identificados como marcadores de risco para DM1, sugerindo que um bom mapeamento do gene do HLA-G, bem como da região circunjacente, poderia trazer resultados promissores na DM1 [148]. Um estudo semelhante, analisando 2360 SNPs dentro da região do MHC em 92 pacientes com doença de Kawasaki (DK), relatou o HLA-G como locus candidato único para uma associação significativa com esta vasculite [149].

O polimorfismo de 14-bp 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 sarcoidose [150] e na doença de Behçet (DB) [151], enquanto que o alelo de deleção foi relatado como um fator de risco para miocardiopatia dilatada idiopática [152] e para o pêfigo vulgar (PV) [153]. A

expressão de HLA-G na pele de pacientes com PV, foi recentemente relatada [154]. No entanto, estes resultados devem ser replicados em futuros trabalhos.

Além da DK e DB, outras doenças reumatológicas foram avaliadas em relação ao HLA-G, como o lúpus eritematoso sistêmico (LES) e a AR. No LES, publicações têm demonstrado resultados diversos: um estudo relatou níveis mais elevados de HLA-G no plasma dos pacientes [155], enquanto outro relatou níveis mais baixos [156]. Este último estudo também relatou uma associação genética com o polimorfismo de 14-bp, na qual o genótipo *ins/ins* foi um fator de risco para o desenvolvimento do LES. No entanto, este resultado não foi replicado em pesquisa desenvolvida no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no qual foi observado um aumento na frequência do genótipo heterozigoto [157]. É possível que o ambiente e/ou fatores étnicos tenham contribuído para estes resultados conflitantes. Na esclerose sistêmica, a expressão do HLA-G foi relatada em biópsias de pele em pacientes brasileiros, e esta expressão foi associada com uma menor frequência de úlceras vasculares cutâneas, telangiectasias e poliartrite e com uma melhora de sobrevida [158].

Tabela 1 - HLA-G em doenças inflamatórias. Fonte: adaptado de Veit, Vianna et al. [81].

<i>Doença</i>	<i>Tipo de estudo</i>	<i>N</i>	<i>Material</i>	<i>Expressão de HLA-G</i>	<i>Desfecho</i>	<i>Polimorfismo</i>	<i>Alelo Genotipo</i>	<i>Refs.</i>
Rinite alérgica de – perene	Expressão	25	Soro	Maior - correlação com severidade	-	-	-	[138]
Rinite alérgica- sasonal	Expressão	60	Soro	Maior - correlação com severidade	-	-	-	[137]
Asma	Genético	867 ^a	-	-	suscetibilidade (GWS)	Locus de HLA-G	Associação positiva	[143]
	Genético	936 ^b	-	-	suscetibilidade	2 SNPs para HLA-G	Nenhuma associação	[144]
	Genético	180	-	-	suscetibilidade se a mãe for afetada	-1306 (rs1736936) +1489 (rs1130356) pb 14 (rs1704) +3142 (rs1063320)	AA - protetor Nenhuma associação Ins/ins - protetor GG - protetor	[145]
	Expressão	53	Plasma	Maior em pacientes atópicos	-	-	-	[146]
	Expressão	20	PBMC	Menor (após estimulação com LPS)	-	-	-	[147]
Asma (induzida por isocianato)	Expressão	20	PBMC	Maior (sem estimulação dos LPS)	-	-	-	[159]
Dermatite atópica	Expressão	9	Pele	Presente	-	-	-	
Doença de Behçet	Genético	312	-	-	suscetibilidade	múltiplo	G*010101 - proteção	[151]
Doença celíaca	Expressão	24	Intestino delgado	Presente - sHLA-G	-	-	-	[160]
Miocardiopatia dilatada idiopática	Genético	117	-	-	-	pb 14 (rs1704)	Del	[152]
Doença inflamatória intestinal	Expressão	43	Cólon	DC – ausente; RCU - presente	-	-	-	[135]
	Expressão	28	PBMC	DC – presente; RCU - ausente	-	-	-	[161]
	Genético	628	-	-	CD - resecção ileocecal	pb 14 (rs1704)	Ins	[136]
Miopia inflamatória	Expressão	20	Músculo	Presente	-	-	-	[131]
Artrite idiopática juvenil	Genético	106	-	-	suscetibilidade	pb 14 (rs1704)	Del (Fêmeas)	[162]
Doença de Kawasaki	Genético	92	-	-	suscetibilidade	GWS	Locus de HLA-G	[149]
Esclerose múltipla	Expressão	50	CSF	Presente - 42% dos pacientes	-	-	-	[140]
	Expressão	17	Monócitos (sangue)	Mais baixo Aumentado após tratamento com INF- α	-	-	-	[139]
	Expressão	69	Intratecal	Mais freqüente	-	-	-	[141]

			CSF	Mais freqüente em RM estável	-	-	-	
	Genético	698	Soro	Diminuído na EM estável	-	-	-	
			-	-	suscetibilidade	-725 (rs1233334) *105N (rs41557518) pb 14 (rs1704) pb 14 (rs1704)	Nenhuma associação Nenhuma associação Nenhuma associação Del	[142]
Pênfigo vulgar	Genético	24	-	-	-	-	-	[153]
	Expressão	ND	Pele	Presente	-	-	-	[154]
Artrite reumatóide	Expressão	106	Soro	Diminuído	-	-	-	[163]
				Correlacionado positivamente ao epítipo compartilhado				
	Expressão	30	PBMC	Aumentado após uso de MTX	-	-	-	[21]
	Genético	156	-	-	suscetibilidade	pb 14 (rs1704)	Nenhuma associação	[21]
	Genético	130	-	-	resposta ao MTX	pb 14 (rs1704)	Del/Del	
	Genético	265	-	-	resposta ao MTX	pb 14 (rs1704)	Nenhuma associação	[22]
	Genético	186	-	-	suscetibilidade	pb 14 (rs1704)	Nenhuma associação	[162]
Sarcoidose	Genético	47	-	-	resposta ao MTX	pb 14 (rs1704)	Nenhuma associação	[164]
					suscetibilidade	múltiplo	alleles 14bp-containing (NS)	[150]
	Expressão	ND	Granulomas	Rara e fraca	-	-	-	
Choque septic	Expressão	64	Plasma	Aumentado	-	-	-	[165]
				Mais elevado nos sobreviventes				
Lupus eritematoso sistêmico	Expressão	50	Soro Lymphocytes	Maior	-	-	-	[155]
	Expressão	130	Plasma	Maior	-	-	-	
	Genético	200	-	Menor	-	-	-	[156]
	Genético	293	-	-	suscetibilidade	pb 14 (rs1704)	Ins	
Esclerose Sistêmica	Genético	293	-	-	suscetibilidade	pb 14 (rs1704)	Ins/Del	[157]
	Expressão	21	Pele	Presente - 57% dos pacientes	-	-	-	[158]
				Associado com o melhor prognóstico				
Diabetes Tipo 1	Genético	2321 ^c	-	-	suscetibilidade	GWS	Locus de HLA-G	[148]

^a Famílias de 4 amostras diferentes ^b crianças de 2 amostras diferentes ^c famílias; DC - doença de Chron; LCR - Líquido Cerebrospinal; E - Epitopes GWS - varredura genômica; LPS - lipopolissacarídeos; RM - ressonância magnética; EM - esclerose

múltipla; MTX - Metotrexato; ND - não determinado; NS - não significativo; PBMC - células mononucleares do sangue periférico; RCU - retocolite ulcerativa.

2.3 HLA-G e a AR

O número de estudos versando sobre a prevalência e expressão de polimorfismos de HLA-G também é limitado na AR. Em recente publicação, Verbruggen et al. identificaram níveis plasmáticos menores de HLA-G em pacientes com AR em comparação com indivíduos saudáveis. Assim, num primeiro momento se concluiria que os níveis baixos de sHLA-G verificados nestes pacientes traduziriam uma incapacidade de suprimir o surgimento de células autorreativas, facilitando a instalação de uma doença auto-imune. 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 susceptibilidade da AR, enquanto que os níveis aumentados no grupo de pacientes com fatores de mau prognóstico representariam mecanismos de defesa secundários eclodidos após o início e perpetuação da inflamação [163].

Até o momento, tentativas de encontrar uma associação genética entre polimorfismos do HLA-G e susceptibilidade para AR não obtiveram sucesso [21, 162]. Em 2008, nosso grupo publicou estudo de casos e controles que incluiu 265 pacientes com AR e 356 controles saudáveis que foram genotipados para o polimorfismo de 14 bp 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. Neste estudo também foram incluídos 106 pacientes portadores de Artrite Idiopática Juvenil (AIJ). Curiosamente,

observamos uma associação significativa entre o alelo de deleção e susceptibilidade para AIJ em meninas em comparação com controles do mesmo sexo (0.743 e 0.576, respectivamente, $P < 0.001$). Os resultados suscitam que tais doenças tenham elementos fisiopatogênicos diferentes entre si [162].

Outro campo de investigação relacionado aos polimorfismos de 14bp de HLA-G com potencial aplicabilidade na prática terapêutica dos pacientes com AR é a farmacogenética. O MTX, principal DMCD, está implicado no aumento de produção de IL-10 em pacientes portadores de AR e isto se correlaciona com melhor resposta terapêutica [18]. 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 (CMSP) [19, 20].

A estreita relação entre as moléculas de HLA-G e IL-10 também pode ser ilustrada pelo trabalho de Rizzo et al. [166]. Nesse estudo, realizado em culturas de CMSPs 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 se associa com transcritos de mRNAs menos estáveis e menor produção de sHLA-G, maiores níveis de IL-10 seriam necessários para secreção destas 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 destes achados, os mesmos autores avaliaram a produção de sHLA-G e IL-10 e sua relação com o polimorfismo de 14bp de HLA-G em 156 pacientes com AR (tratados ou não com MTX). CMSPs de indivíduos hígidos e pacientes portadores de AR não tratados previamente com MTX foram expostas a diferentes

concentrações de MTX e a produção 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 bp. Pacientes que foram responsivos ao MTX (redução de DAS > 0,6 à 1,2; medidos antes e após 6 meses de tratamento com MTX) apresentaram mais frequentemente o genótipo -14/-14 pb que o grupo não respondedor. Apesar do resultado consistente, o carácter retrospectivo e as baixas doses utilizadas de MTX (dose média 10,5 mg/semana) podem ter sido limitações relevantes. É amplamente aceite que o metotrexato oral deva ser iniciado com 10-15 mg/semana, com o escalonamento de 5 mg cada 2-4 semanas até 20-30 mg / semana, dependendo da resposta clínica e tolerabilidade [167]. Adicionalmente, ao verificar que a produção de sHLA-G esteve correlacionada à resposta terapêutica, os autores propuseram que este polimorfismo possa vir a ser um marcador de resposta terapêutica nas fases iniciais da doença e ressaltaram a necessidade de confirmação destes dados em estudos prospectivos em diferentes populações [21].

Contrapondo o resultado anterior, existem 2 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 [22]. Os pacientes apresentavam AR de longa duração (duração média de 10 anos) e foram expostos a doses adequadas de MTX (dose média de 16,6 mg / semana, em não-respondedores). Diferentemente do trabalho de Rizzo et al. [21], a limitação deste trabalho foi o delineamento transversal. Além deste 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 [168].

Em 2010, Kooloos et al. publicaram estudo com desenho prospectivo incluindo 186 pacientes portadores de RA e virgens de MTX [164]. Um dos critérios de inclusão foi a duração dos sintomas menor do que 2 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 6 meses de tratamento (boa resposta clínica), caso contrário, os indivíduos foram considerados não-respondedores. Além de +/-14 pb HLA-G, outros polimorfismos funcionais testados foram DHFR 829C> T, ABCB1 3435C> T, ITPA IVS2 A 21 C> IMPDH2 787 C> T, TGFB1 869 T> C e TLR4 896 A > G. Por fim, nenhuma associação significativa destas variantes com eficácia foram encontrados.

Em comparação com o estudo com resultados positivos, estes estudos contraditórios podem refletir as diferenças interétnicas nas frequências do polimorfismo estudado [169], 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 [170]. 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 14pb do gene HLA-G pode ser um potencial marcador de resposta ao MTX. Esta hipótese é reforçada pelas conseqüências funcionais da interação da 14bp-polimorfismo 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 deste polimorfismo ainda não foi bem estabelecido para prever a resposta terapêutica ao MTX na AR, achados positivos necessitam ser replicados em coortes independentes. Futuros estudos são necessários para a identificação de perfis genéticos capazes de selecionar os pacientes que são mais propensos a resposta adequada ao MTX.

3 REFERÊNCIAS

1. Worthington, J., *Investigating the genetic basis of susceptibility to rheumatoid arthritis*. J Autoimmun, 2005. **25 Suppl**: p. 16-20.
2. Kelley, W.N., Ruddy, S., Sledge, C.B. eds., *Textbook of Rheumatology*. 5 ed. 1997, Philadelphia: WB Saunders.
3. *Guidelines for the management of rheumatoid arthritis: 2002 Update*. Arthritis Rheum, 2002. **46**(2): p. 328-46.
4. Kvien, T.K., *Epidemiology and burden of illness of rheumatoid arthritis*. Pharmacoeconomics, 2004. **22**(2 Suppl 1): p. 1-12.
5. Alamanos, Y. and A.A. Drosos, *Epidemiology of adult rheumatoid arthritis*. Autoimmun Rev, 2005. **4**(3): p. 130-6.
6. Prior, P., et al., *Cause of death in rheumatoid arthritis*. Br J Rheumatol, 1984. **23**(2): p. 92-9.
7. Mutru, O., et al., *Cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis*. Cardiology, 1989. **76**(1): p. 71-7.
8. Myllykangas-Luosujarvi, R., et al., *Cardiovascular mortality in women with rheumatoid arthritis*. J Rheumatol, 1995. **22**(6): p. 1065-7.
9. Barton, A. and W. Ollier, *Genetic approaches to the investigation of rheumatoid arthritis*. Curr Opin Rheumatol, 2002. **14**(3): p. 260-9.
10. Wordsworth, P. and J. Bell, *Polygenic susceptibility in rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 1991. **50**(6): p. 343-6.
11. Saag, K.G., et al., *American College of Rheumatology 2008 recommendations for the use of nonbiologic and biologic disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2008. **59**(6): p. 762-84.

12. Westlake, S.L., et al., *The effect of methotrexate on cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature review*. Rheumatology (Oxford), 2009. **49**(2): p. 295-307.
13. Suarez-Almazor, M.E., et al., *Methotrexate for rheumatoid arthritis*. Cochrane Database Syst Rev, 2000(2): p. CD000957.
14. Ranganathan, P., *An update on methotrexate pharmacogenetics in rheumatoid arthritis*. Pharmacogenomics, 2008. **9**(4): p. 439-51.
15. Rouas-Freiss, N., et al., *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): p. 11520-5.
16. Riteau, B., et al., *HLA-G inhibits the allogeneic proliferative response*. J Reprod Immunol, 1999. **43**(2): p. 203-11.
17. Horuzsko, A., et al., *Maturation of antigen-presenting cells is compromised in HLA-G transgenic mice*. Int Immunol, 2001. **13**(3): p. 385-94.
18. Rudwaleit, M., 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): p. 311-4.
19. Moreau, P., et al., *IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes*. Int Immunol, 1999. **11**(5): p. 803-11.
20. Kanai, T., et al., *Soluble HLA-G influences the release of cytokines from allogeneic peripheral blood mononuclear cells in culture*. Mol Hum Reprod, 2001. **7**(2): p. 195-200.
21. Rizzo, R., et al., *HLA-G 14-bp polymorphism regulates the methotrexate response in rheumatoid arthritis*. Pharmacogenet Genomics, 2006. **16**(9): p. 615-23.
22. Stamp, L.K., 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): p. 154-5.
23. Marques Neto, J.F., Gonsalves, H.T. et al., *Estudo multicêntrico da prevalência da Artrite Reumatóide do adulto em amostras da população brasileira*. Revista Brasileira de Reumatologia, 1993. **33**: p. 169-73.
 24. Wolfe, A.M., *The epidemiology of rheumatoid arthritis: a review. I. Surveys*. Bull Rheum Dis, 1968. **19**(2): p. 518-23.
 25. Doran, M.F., et al., *Trends in incidence and mortality in rheumatoid arthritis in Rochester, Minnesota, over a forty-year period*. Arthritis Rheum, 2002. **46**(3): p. 625-31.
 26. Marsden, P.A., et al., *Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene*. J Biol Chem, 1993. **268**(23): p. 17478-88.
 27. Bértolo, M.B., et al., *Atualização do consenso brasileiro no diagnóstico e tratamento da artrite reumatóide*. Revista Brasileira de Reumatologia, 2007. **47**: p. 151-159.
 28. Arnett, F.C., et al., *The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1988. **31**(3): p. 315-24.
 29. MacGregor, A.J., et al., *Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins*. Arthritis Rheum, 2000. **43**(1): p. 30-7.
 30. van der Helm-van Mil, A.H., J.Z. Wesoly, and T.W. Huizinga, *Understanding the genetic contribution to rheumatoid arthritis*. Curr Opin Rheumatol, 2005. **17**(3): p. 299-304.
 31. Gregersen, P.K., J. Silver, and R.J. Winchester, *The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of*

- susceptibility to rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 1987. **30**(11): p. 1205-13.
32. MacGregor, A., et al., *HLA-DRB1*0401/0404 genotype and rheumatoid arthritis: increased association in men, young age at onset, and disease severity*. *J Rheumatol*, 1995. **22**(6): p. 1032-6.
 33. Pratt, A.G., J.D. Isaacs, and D.L. Matthey, *Current concepts in the pathogenesis of early rheumatoid arthritis*. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2009. **23**(1): p. 37-48.
 34. Balandraud, N., J. Roudier, and C. Roudier, *Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis*. *Autoimmun Rev*, 2004. **3**(5): p. 362-7.
 35. Harris, E.D., *Rheumatoid Arthritis*. 1997, Philadelphia: WB Saunders.
 36. Goldring, S.R., *Pathogenesis of bone erosions in rheumatoid arthritis*. *Curr Opin Rheumatol*, 2002. **14**(4): p. 406-10.
 37. Miossec, P., *An update on the cytokine network in rheumatoid arthritis*. *Curr Opin Rheumatol*, 2004. **16**(3): p. 218-22.
 38. Klimiuk, P.A., et al., *Production of cytokines and metalloproteinases in rheumatoid synovitis is T cell dependent*. *Clin Immunol*, 1999. **90**(1): p. 65-78.
 39. Chabaud, M., et al., *IL-17 derived from juxta-articular bone and synovium contributes to joint degradation in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Res*, 2001. **3**(3): p. 168-77.
 40. Kirkham, B.W., et al., *Synovial membrane cytokine expression is predictive of joint damage progression in rheumatoid arthritis: a two-year prospective study (the DAMAGE study cohort)*. *Arthritis Rheum*, 2006. **54**(4): p. 1122-31.
 41. Dorner, T. and G.R. Burmester, *The role of B cells in rheumatoid arthritis: mechanisms and therapeutic targets*. *Curr Opin Rheumatol*, 2003. **15**(3): p. 246-52.

42. Klareskog, L., et al., *A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination*. *Arthritis Rheum*, 2006. **54**(1): p. 38-46.
43. Nielen, M.M., et al., *Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors*. *Arthritis Rheum*, 2004. **50**(2): p. 380-6.
44. Meyer, O., et al., *Serial determination of cyclic citrullinated peptide autoantibodies predicted five-year radiological outcomes in a prospective cohort of patients with early rheumatoid arthritis*. *Arthritis Res Ther*, 2006. **8**(2): p. R40.
45. Masson-Bessiere, C., et al., *The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin*. *J Immunol*, 2001. **166**(6): p. 4177-84.
46. Kallberg, H., et al., *Gene-gene and gene-environment interactions involving HLA-DRB1, PTPN22, and smoking in two subsets of rheumatoid arthritis*. *Am J Hum Genet*, 2007. **80**(5): p. 867-75.
47. Bauerova, K. and A. Bezek, *Role of reactive oxygen and nitrogen species in etiopathogenesis of rheumatoid arthritis*. *Gen Physiol Biophys*, 1999. **18 Spec No**: p. 15-20.
48. Filippin, L.I., et al., *Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis*. *Clin Exp Immunol*, 2008. **152**(3): p. 415-22.
49. Brenol, C.V., et al., *[Rheumatoid arthritis and atherosclerosis]*. *Rev Assoc Med Bras*, 2007. **53**(5): p. 465-70.
50. Wolfe, F., et al., *The mortality of rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 1994. **37**(4): p. 481-94.
51. Wallberg-Jonsson, S., M.L. Ohman, and S.R. Dahlqvist, *Cardiovascular morbidity and mortality in patients with seropositive rheumatoid arthritis in Northern Sweden*. *J Rheumatol*, 1997. **24**(3): p. 445-51.

52. Kvalvik, A.G., M.A. Jones, and D.P. Symmons, *Mortality in a cohort of Norwegian patients with rheumatoid arthritis followed from 1977 to 1992*. Scand J Rheumatol, 2000. **29**(1): p. 29-37.
53. Symmons, D.P., et al., *Longterm mortality outcome in patients with rheumatoid arthritis: early presenters continue to do well*. J Rheumatol, 1998. **25**(6): p. 1072-7.
54. Navarro-Cano, G., et al., *Association of mortality with disease severity in rheumatoid arthritis, independent of comorbidity*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(9): p. 2425-33.
55. Dixon, W.G. and D.P. Symmons, *What effects might anti-TNFalpha treatment be expected to have on cardiovascular morbidity and mortality in rheumatoid arthritis? A review of the role of TNFalpha in cardiovascular pathophysiology*. Ann Rheum Dis, 2007. **66**(9): p. 1132-6.
56. Knevel, R., et al., *Current evidence for a strategic approach to the management of rheumatoid arthritis with disease-modifying antirheumatic drugs: a systematic literature review informing the EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis. **69**(6): p. 987-94.
57. Brenol, C.V., et al., *Daily practice feasibility and effectiveness of tight control of disease activity in the treatment of rheumatoid arthritis: optimizing the use of traditional disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs)*, in *Ann Rheum Dis*. 2008: Paris. p. 163.
58. Ranganathan, P., et al., *Single nucleotide polymorphism profiling across the methotrexate pathway in normal subjects and patients with rheumatoid arthritis*. Pharmacogenomics, 2004. **5**(5): p. 559-69.
59. Krajcinovic, M. and A. Moghrabi, *Pharmacogenetics of methotrexate*. Pharmacogenomics, 2004. **5**(7): p. 819-34.
60. Hider, S.L., I.N. Bruce, and W. Thomson, *The pharmacogenetics of methotrexate*. Rheumatology (Oxford), 2007. **46**(10): p. 1520-4.

61. Ranganathan, P., *Pharmacogenetics of therapies in rheumatoid arthritis*. Drugs Today (Barc), 2005. **41**(12): p. 799-814.
62. Wessels, J.A., T.W. Huizinga, and H.J. Guchelaar, *Recent insights in the pharmacological actions of methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis*. Rheumatology (Oxford), 2008. **47**(3): p. 249-55.
63. Montesinos, M.C., A. Desai, and B.N. Cronstein, *Suppression of inflammation by low-dose methotrexate is mediated by adenosine A2A receptor but not A3 receptor activation in thioglycollate-induced peritonitis*. Arthritis Res Ther, 2006. **8**(2): p. R53.
64. Iyer, L. and M.J. Ratain, *Pharmacogenetics and cancer chemotherapy*. Eur J Cancer, 1998. **34**(10): p. 1493-9.
65. Wolf, C.R., G. Smith, and R.L. Smith, *Science, medicine, and the future: Pharmacogenetics*. BMJ, 2000. **320**(7240): p. 987-90.
66. Veenstra, D.L., M.K. Higashi, and K.A. Phillips, *Assessing the cost-effectiveness of pharmacogenomics*. AAPS PharmSci, 2000. **2**(3): p. E29.
67. Urano, W., et al., *Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene were associated with both the efficacy and the toxicity of methotrexate used for the treatment of rheumatoid arthritis, as evidenced by single locus and haplotype analyses*. Pharmacogenetics, 2002. **12**(3): p. 183-90.
68. van Ede, A.E., et al., *The C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: a genetic risk factor for methotrexate-related elevation of liver enzymes in rheumatoid arthritis patients*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(11): p. 2525-30.
69. Wessels, J.A., et al., *Efficacy and toxicity of methotrexate in early rheumatoid arthritis are associated with single-nucleotide polymorphisms in genes coding for folate pathway enzymes*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(4): p. 1087-95.
70. Kumagai, K., et al., *Polymorphisms in the thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase genes and sensitivity to the low-dose*

- methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis*. *Int J Mol Med*, 2003. **11**(5): p. 593-600.
71. Fisher, M.C. and B.N. Cronstein, *Metaanalysis of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms affecting methotrexate toxicity*. *J Rheumatol*, 2009. **36**(3): p. 539-45.
72. Dervieux, T., et al., *Polyglutamation of methotrexate with common polymorphisms in reduced folate carrier, aminoimidazole carboxamide ribonucleotide transformylase, and thymidylate synthase are associated with methotrexate effects in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2004. **50**(9): p. 2766-74.
73. Horie, N., et al., *Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase*. *Cell Struct Funct*, 1995. **20**(3): p. 191-7.
74. Dervieux, T., et al., *Gene-gene interactions in folate and adenosine biosynthesis pathways affect methotrexate efficacy and tolerability in rheumatoid arthritis*. *Pharmacogenet Genomics*, 2009.
75. Tulusso, B., et al., *IL-1B and IL-1RN gene polymorphisms in rheumatoid arthritis: relationship with protein plasma levels and response to therapy*. *Pharmacogenomics*, 2006. **7**(5): p. 683-95.
76. Ali, A.A., et al., *Polymorphism of HLA-DR and HLA-DQ in rheumatoid arthritis patients and clinical response to methotrexate--a hospital-based study*. *J Pak Med Assoc*, 2006. **56**(10): p. 452-6.
77. Bansard, C., et al., *Can rheumatoid arthritis responsiveness to methotrexate and biologics be predicted?* *Rheumatology (Oxford)*, 2009. **48**(9): p. 1021-8.
78. Rhodes, D.A. and J. Trowsdale, *Genetics and molecular genetics of the MHC*. *Rev Immunogenet*, 1999. **1**(1): p. 21-31.
79. Rodgers, J.R. and R.G. Cook, *MHC class Ib molecules bridge innate and acquired immunity*. *Nat Rev Immunol*, 2005. **5**(6): p. 459-71.

80. Veit, T.D. and J.A. Chies, *Tolerance versus immune response -- microRNAs as important elements in the regulation of the HLA-G gene expression*. *Transpl Immunol*, 2009. **20**(4): p. 229-31.
81. Veit, T.D., V. Vianna, and J.A. Chies, *HLA-G - From Fetal Tolerance to a Regulatory Molecule in Inflammatory Diseases*. *Curr Immunol Rev*, 2010. **6**(1): p. 1-15.
82. Clements, C.S., et al., *Structural studies on HLA-G: implications for ligand and receptor binding*. *Hum Immunol*, 2007. **68**(4): p. 220-6.
83. Carosella, E.D., et al., *HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance*. *Adv Immunol*, 2003. **81**: p. 199-252.
84. Lila, N., et al., *Implication of HLA-G molecule in heart-graft acceptance*. *Lancet*, 2000. **355**(9221): p. 2138.
85. Paul, P., 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): p. 1138-49.
86. Geraghty, D.E., B.H. Koller, and H.T. Orr, *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): p. 9145-9.
87. Park, B., et al., *The truncated cytoplasmic tail of HLA-G serves a quality-control function in post-ER compartments*. *Immunity*, 2001. **15**(2): p. 213-24.
88. Gobin, S.J. and P.J. van den Elsen, *Transcriptional regulation of the MHC class Ib genes HLA-E, HLA-F, and HLA-G*. *Hum Immunol*, 2000. **61**(11): p. 1102-7.
89. Solier, C., et al., *HLA-G unique promoter region: functional implications*. *Immunogenetics*, 2001. **53**(8): p. 617-25.
90. Lefebvre, S., et al., *A specific interferon (IFN)-stimulated response element of the distal HLA-G promoter binds IFN-regulatory factor 1 and mediates*

- enhancement of this nonclassical class I gene by IFN-beta.* J Biol Chem, 2001. **276**(9): p. 6133-9.
91. Amiot, L., et al., *HLA-G class I gene expression in normal and malignant hematopoietic cells.* Hum Immunol, 1998. **59**(8): p. 524-8.
 92. Moreau, P., et al., *Glucocorticoid hormones upregulate levels of HLA-G transcripts in trophoblasts.* Transplant Proc, 2001. **33**(3): p. 2277-80.
 93. Yie, S.M., R. Xiao, and C.L. Librach, *Progesterone regulates HLA-G gene expression through a novel progesterone response element.* Hum Reprod, 2006. **21**(10): p. 2538-44.
 94. Ober, C., et al., *Variation in the HLA-G promoter region influences miscarriage rates.* Am J Hum Genet, 2003. **72**(6): p. 1425-35.
 95. Tan, Z., A.M. Shon, and C. Ober, *Evidence of balancing selection at the HLA-G promoter region.* Hum Mol Genet, 2005. **14**(23): p. 3619-28.
 96. Ober, C., et al., *The miscarriage-associated HLA-G -725G allele influences transcription rates in JEG-3 cells.* Hum Reprod, 2006. **21**(7): p. 1743-8.
 97. Aldrich, C., et al., *Linkage disequilibrium and age estimates of a deletion polymorphism (1597DeltaC) in HLA-G suggest non-neutral evolution.* Hum Immunol, 2002. **63**(5): p. 405-12.
 98. Rousseau, P., et al., *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): p. 1005-10.
 99. Hviid, T.V., et al., *HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels.* Immunogenetics, 2003. **55**(2): p. 63-79.
 100. Wilczynski, J.R., *Th1/Th2 cytokines balance--yin and yang of reproductive immunology.* Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2005. **122**(2): p. 136-43.
 101. Hofmeister, V. and E.H. Weiss, *HLA-G modulates immune responses by diverse receptor interactions.* Semin Cancer Biol, 2003. **13**(5): p. 317-23.

102. Rouas-Freiss, N., et al., *HLA-G in cancer: a way to turn off the immune system*. Semin Cancer Biol, 2003. **13**(5): p. 325-36.
103. LeMaout, J., 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): p. 2040-8.
104. Hughes, A.L. and M. Nei, *Evolution of the major histocompatibility complex: independent origin of nonclassical class I genes in different groups of mammals*. Mol Biol Evol, 1989. **6**(6): p. 559-79.
105. Borges, L. and D. Cosman, *LIRs/ILTs/MIRs, inhibitory and stimulatory Ig-superfamily receptors expressed in myeloid and lymphoid cells*. Cytokine Growth Factor Rev, 2000. **11**(3): p. 209-17.
106. Shiroishi, M., 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): p. 16412-7.
107. Willcox, B.E., L.M. Thomas, and P.J. Bjorkman, *Crystal structure of HLA-A2 bound to LIR-1, a host and viral major histocompatibility complex receptor*. Nat Immunol, 2003. **4**(9): p. 913-9.
108. Carosella, E.D., et al., *HLA-G-dependent suppressor cells: Diverse by nature, function, and significance*. Hum Immunol, 2008. **69**(11): p. 700-7.
109. Feger, U., 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): p. 568-77.
110. Le Rond, S., 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): p. 649-60.

111. Le Rond, S., 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): p. 3266-76.
112. Najj, A., et al., *CD3+CD4^{low} and CD3+CD8^{low} are induced by HLA-G: novel human peripheral blood suppressor T-cell subsets involved in transplant acceptance*. Blood, 2007. **110**(12): p. 3936-48.
113. Ristich, V., et al., *Tolerization of dendritic cells by HLA-G*. Eur J Immunol, 2005. **35**(4): p. 1133-42.
114. Pangault, C., et al., *Lung macrophages and dendritic cells express HLA-G molecules in pulmonary diseases*. Hum Immunol, 2002. **63**(2): p. 83-90.
115. Creput, C., 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): p. 587-94.
116. Nuckel, H., et al., *HLA-G expression is associated with an unfavorable outcome and immunodeficiency in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2005. **105**(4): p. 1694-8.
117. Selmani, Z., et al., *HLA-G is a crucial immunosuppressive molecule secreted by adult human mesenchymal stem cells*. Transplantation, 2009. **87**(9 Suppl): p. S62-6.
118. Huang, J.F., et al., *TCR-Mediated internalization of peptide-MHC complexes acquired by T cells*. Science, 1999. **286**(5441): p. 952-4.
119. Hudrisier, D., et al., *Cutting edge: CTLs rapidly capture membrane fragments from target cells in a TCR signaling-dependent manner*. J Immunol, 2001. **166**(6): p. 3645-9.
120. Game, D.S., N.J. Rogers, and R.I. Lechler, *Acquisition of HLA-DR and costimulatory molecules by T cells from allogeneic antigen presenting cells*. Am J Transplant, 2005. **5**(7): p. 1614-25.

121. Tatari-Calderone, Z., et al., *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): p. 6162-9.
122. Yao, Y.Q., D.H. Barlow, and I.L. Sargent, *Differential expression of alternatively spliced transcripts of HLA-G in human preimplantation embryos and inner cell masses*. J Immunol, 2005. **175**(12): p. 8379-85.
123. Menezo, Y., K. Elder, and S. Viville, *Soluble HLA-G release by the human embryo: an interesting artefact?* Reprod Biomed Online, 2006. **13**(6): p. 763-4.
124. Tripathi, P., et al., *Role of 14-bp deletion in the HLA-G gene in the maintenance of pregnancy*. Tissue Antigens, 2004. **64**(6): p. 706-10.
125. Goldman-Wohl, D.S., et al., *Lack of human leukocyte antigen-G expression in extravillous trophoblasts is associated with pre-eclampsia*. Mol Hum Reprod, 2000. **6**(1): p. 88-95.
126. Paul, P., 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): p. 4510-5.
127. Bukur, J., et al., *Functional role of human leukocyte antigen-G up-regulation in renal cell carcinoma*. Cancer Res, 2003. **63**(14): p. 4107-11.
128. Sebti, Y., et al., *Expression of functional soluble human leucocyte antigen-G molecules in lymphoproliferative disorders*. Br J Haematol, 2007. **138**(2): p. 202-12.
129. Qiu, J., et al., *Soluble HLA-G expression and renal graft acceptance*. Am J Transplant, 2006. **6**(9): p. 2152-6.
130. Carosella, E.D., et al., *Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule*. Blood, 2008. **111**(10): p. 4862-70.

131. Wiendl, H., et al., *Muscle fibers in inflammatory myopathies and cultured myoblasts express the nonclassical major histocompatibility antigen HLA-G*. *Ann Neurol*, 2000. **48**(4): p. 679-84.
132. Khosrotehrani, K., et al., *HLA-G expression in atopic dermatitis*. *J Invest Dermatol*, 2001. **117**(3): p. 750-2.
133. Aractingi, S., 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): p. 71-7.
134. Carosella, E.D., et al., *HLA-G: a shield against inflammatory aggression*. *Trends Immunol*, 2001. **22**(10): p. 553-5.
135. Torres, M.I., et al., *Expression of HLA-G in inflammatory bowel disease provides a potential way to distinguish between ulcerative colitis and Crohn's disease*. *Int Immunol*, 2004. **16**(4): p. 579-83.
136. Glas, J., 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*. *Int Immunol*, 2007. **19**(5): p. 621-6.
137. Ciprandi, G., et al., *Soluble serum HLA-G and HLA-A, -B, -C molecules in patients with seasonal allergic rhinitis exposed to pollens*. *Int Immunopharmacol*, 2009. **9**(9): p. 1058-62.
138. Ciprandi, G., et al., *Soluble HLA-G molecule in patients with perennial allergic rhinitis*. *Int Arch Allergy Immunol*, 2009. **150**(3): p. 278-81.
139. Mitsdoerffer, M., et al., *Monocyte-derived HLA-G acts as a strong inhibitor of autologous CD4 T cell activation and is upregulated by interferon-beta in vitro and in vivo: rationale for the therapy of multiple sclerosis*. *J Neuroimmunol*, 2005. **159**(1-2): p. 155-64.
140. Fainardi, E., 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.* J Neuroimmunol, 2003. **142**(1-2): p. 149-58.
141. Fainardi, E., et al., *Intrathecal synthesis of soluble HLA-G and HLA-I molecules are reciprocally associated to clinical and MRI activity in patients with multiple sclerosis.* Mult Scler, 2006. **12**(1): p. 2-12.
142. Kroner, A., et al., *The genetic influence of the nonclassical MHC molecule HLA-G on multiple sclerosis.* Hum Immunol, 2007. **68**(5): p. 422-5.
143. Nicolae, D., et al., *Fine mapping and positional candidate studies identify HLA-G as an asthma susceptibility gene on chromosome 6p21.* Am J Hum Genet, 2005. **76**(2): p. 349-57.
144. Hersh, C.P., et al., *Comprehensive testing of positionally cloned asthma genes in two populations.* Am J Respir Crit Care Med, 2007. **176**(9): p. 849-57.
145. Tan, Z., et al., *Allele-specific targeting of microRNAs to HLA-G and risk of asthma.* Am J Hum Genet, 2007. **81**(4): p. 829-34.
146. Tahan, F. and T. Patiroglu, *Plasma soluble human leukocyte antigen G levels in asthmatic children.* Int Arch Allergy Immunol, 2006. **141**(3): p. 213-6.
147. Rizzo, R., et al., *Defective production of soluble HLA-G molecules by peripheral blood monocytes in patients with asthma.* J Allergy Clin Immunol, 2005. **115**(3): p. 508-13.
148. Eike, M.C., et al., *Conditional analyses on the T1DGC MHC dataset: novel associations with type 1 diabetes around HLA-G and confirmation of HLA-B.* Genes Immun, 2009. **10**(1): p. 56-67.
149. Kim, J.J., et al., *Genetic variants in the HLA-G region are associated with Kawasaki disease.* Hum Immunol, 2008. **69**(12): p. 867-71.
150. Hviid, T.V., et al., *HLA-G polymorphisms and HLA-G expression in sarcoidosis.* Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis, 2006. **23**(1): p. 30-7.

151. Park, K.S., et al., *HLA-E*0101 and HLA-G*010101 reduce the risk of Behcet's disease*. Tissue Antigens, 2007. **69**(2): p. 139-44.
152. Lin, A., 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): p. 427-31.
153. Gazit, E., et al., *HLA-G is associated with pemphigus vulgaris in Jewish patients*. Hum Immunol, 2004. **65**(1): p. 39-46.
154. Yari, F., et al., *Expression of HLA-G in the skin of patients with pemphigus vulgaris*. Iran J Allergy Asthma Immunol, 2008. **7**(1): p. 7-12.
155. Rosado, S., et al., *Expression of human leukocyte antigen-G in systemic lupus erythematosus*. Hum Immunol, 2008. **69**(1): p. 9-15.
156. Rizzo, R., 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): p. 520-9.
157. Veit, T.D., et al., *Association of the HLA-G 14 bp polymorphism with systemic lupus erythematosus*. Lupus, 2009. **18**(5): p. 424-30.
158. Wastowski, I.J., et al., *HLA-G expression in the skin of patients with systemic sclerosis*. J Rheumatol, 2009. **36**(6): p. 1230-4.
159. Mapp, C.E., et al., *Soluble human leucocyte antigen-G and interleukin-10 levels in isocyanate-induced asthma*. Clin Exp Allergy, 2009. **39**(6): p. 812-9.
160. Torres, M.I., et al., *New advances in coeliac disease: serum and intestinal expression of HLA-G*. Int Immunol, 2006. **18**(5): p. 713-8.
161. Rizzo, R., 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): p. 100-5.
162. Veit, T.D., et al., *Association of the HLA-G 14-bp insertion/deletion polymorphism with juvenile idiopathic arthritis and rheumatoid arthritis*. Tissue Antigens, 2008. **71**(5): p. 440-6.

163. Verbruggen, L.A., et al., *Soluble HLA-G in rheumatoid arthritis*. Hum Immunol, 2006. **67**(8): p. 561-7.
164. Kooloos, W.M., et al., *Functional polymorphisms and methotrexate treatment outcome in recent-onset rheumatoid arthritis*. Pharmacogenomics. **11**(2): p. 163-75.
165. Monneret, G., et al., *Soluble human leukocyte antigen-G5 in septic shock: marked and persisting elevation as a predictor of survival*. Crit Care Med, 2007. **35**(8): p. 1942-7.
166. Rizzo, R., et al., *The HLA-G genotype is associated with IL-10 levels in activated PBMCs*. Immunogenetics, 2005. **57**(3-4): p. 172-81.
167. Katchamart, W., et al., *Predictors for remission in rheumatoid arthritis patients: A Systematic review*. Arthritis Care Res (Hoboken).
168. Kooloos, W.M., et al., *Pharmacogenetics in treatment of rheumatoid arthritis*. Curr Pharm Des. **16**(2): p. 164-75.
169. van der Ven, K., et al., *HLA-G polymorphisms: ethnic differences and implications for potential molecule function*. Am J Reprod Immunol, 1998. **40**(3): p. 145-57.
170. Risch, N.J., *Searching for genetic determinants in the new millennium*. Nature, 2000. **405**(6788): p. 847-56.

4 OBJETIVOS DO ESTUDO

4.1 *Objetivo geral:*

Estudar a distribuição alélica e genotípica do polimorfismo de 14 pb do HLA-G numa coorte de pacientes com AR e controles normais.

4.2 *Objetivos específicos:*

- 1) Estudar as associações das variantes alélicas do polimorfismo de 14 pb do HLA-G com a resposta terapêutica ao MTX em pacientes com AR.
- 2) Comparar as frequências alélicas e genotípicas de polimorfismo de 14 pb do HLA-G em pacientes e controles e calcular a razão de chances (*odds ratio*) da presença do alelo de inserção para o desenvolvimento de AR.
- 3) Estudar as associações das variantes alélicas do polimorfismo de 14 pb do HLA-G com dados demográficos, presença de fator reumatóide, idade do diagnóstico da AR e presença de doença erosiva.
- 4) Estudar as associações das variantes alélicas do polimorfismo de 14 pb do HLA-G com grau de atividade inflamatória de doença, capacidade funcional e manifestações extra-articulares em pacientes com AR.

5 ARTIGO CIENTÍFICO

HLA-G 14-bp insertion/deletion polymorphism modulates MTX therapeutic effect in a cohort of patients with rheumatoid arthritis.

^{1,2}Claiton Viegas Brenol, ³Tiago Degani Veit, , ⁴Priscila Martineli, ⁵João Carlos Tavares Brenol , ⁶José Artur Bogo Chies, ⁵Ricardo Machado Xavier.

¹Rheumatology Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil

²Post-Graduation Program in Medical Sciences, UFRGS, Porto Alegre, Brazil.

³Post-Graduation Program in Genetics and Molecular Biology, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

⁴ Medical School student, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

⁵ Department of Internal Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

⁶ Genetics Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

From the Division of Rheumatology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Study partially funded by FIPE/HCPA (Fund of Incentive to Research at Hospital de Clínicas de Porto Alegre).

Address for correspondence:

Ricardo M. Xavier, M.D., PhD

Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Ramiro Barcelos 2350/ sala 645

Porto Alegre/RS – 90035-003

E-mail:rmaxavier@hcpa.ufrgs.br

Short running title: HLA-G 14-bp polymorphism in RA and response to MTX treatment.

ABSTRACT

Objectives: We sought to determine whether the 14-bp insertion/deletion polymorphism in exon 8 of the HLA-G gene is associated with susceptibility to RA, clinical features, or response to MTX therapy.

Methods: We determined the HLA-G 14-bp insertion/deletion polymorphism genotypes in a prospective cohort of 309 consecutive RA patients and 294 healthy controls, and looked for associations between genotype and clinical features of RA. Multivariate analyses were performed to investigate the effect of homozygosity for the -14/-14 bp genotype on changes in DAS28 in response to MTX therapy in a subgroup of 188 RA patients.

Results: Among the 309 RA patients, no correlations were observed between allele or genotype frequencies of the HLA-G gene polymorphism and clinical features, including disease activity scores and functional scores. No significant differences were observed in the genotype and allele frequencies between RA patients and controls. In the subgroup evaluated for clinical response to MTX, we observed a decrease in mean DAS28 over the course of the study. Furthermore, a better response to MTX treatment, measured by adjusted mean of DAS28 change, was observed in those patients with the HLA-G -14/-14-bp genotype, which was not observed among other genotypes.

Conclusion: Homozygosity for the 14 bp deletion polymorphism within exon 8 of the HLA-G gene was associated with a better response to MTX in a prospective cohort of patients with RA. This is a promising genetic marker for predicting response to MTX therapy in RA.

Key words: HLA-G, 14-bp polymorphism, methotrexate, Rheumatoid Arthritis, pharmacogenetics.

INTRODUCTION

Rheumatoid Arthritis (RA) is a chronic systemic inflammatory disease that can lead to joint deformities and permanent physical disability. Onset is likely triggered by environmental factors in susceptible individuals. While genes of the human leukocyte antigen (HLA) system are clearly implicated in the etiology and pathogenesis of RA, they explain less than 50% of the genetic contribution to disease susceptibility [1]. Moreover, HLA-DRB1, notably the *0401 and *0404 alleles, is associated with a more severe phenotype in RA [2]. Consequently, a considerable number of potential candidate non-HLA related genes have been investigated, but none improved the prediction of the development of RA compared to prediction using clinical risk factors alone in patients with undifferentiated arthritis [3].

Treatment of RA with disease modifying agents (DMARDs) is the cornerstone of RA therapy to avoid joint deformity and permanent physical disability. Methotrexate (MTX), a folate antagonist, is recognized worldwide as a relatively safe and cost-effective first-line drug in RA management, although up to one-third of patients fail to respond to MTX treatment, either because of inefficacy or adverse events [4]. Variability in clinical response to MTX has led to a search for predictive markers that could be used to individualize and optimize RA therapy. Many pharmacogenetic studies are based upon a gene's hypothetical relation to the mechanism of MTX or to the inflammatory process in RA [5].

In recent years, a convincing body of scientific evidence has indicated that the expression of human leukocyte antigen-G (HLA-G), a non-classical major histocompatibility complex (MHC) class I molecule, plays a role in regulation of inflammation in autoimmune diseases [6]. Polymorphisms in this gene, therefore, are

reasonable candidates for susceptibility and pharmacogenetics studies in RA. The HLA-G gene is well conserved, having few polymorphisms. Alternative splicing allows the expression of both membrane-bound and soluble isoforms [7]. One HLA-G gene polymorphism, a 14 bp insertion/deletion in exon 8 of the gene, might play a role in mRNA stability [8]. Functionally, the +14bp (insertion) allele is associated with lower HLA-G mRNA levels and, to some extent, with lower levels of soluble HLA-G (sHLA-G), which is thought to have anti-inflammatory properties [9,10]. Recent studies demonstrate that HLA-G is induced during the course of inflammatory conditions such as myositic lesions [11], psoriatic lesions on skin [12], atopic dermatitis [13], and multiple sclerosis [14].

Only a small number of studies have investigated HLA-G polymorphisms and their association with rheumatic diseases. There have been no concrete studies linking genetic variations in HLA-G and susceptibility to RA [15,16]. Still, one report found that patient response to MTX was influenced by the HLA-G 14-bp insertion/deletion genotype, with those homozygous for the deletion (-14/-14 bp genotype) having the most favorable outcomes [16]. However, these results were not reproduced in two other studies [17,18]. The hypothesis that MTX acts synergistically with this deletion is based on reports that increased anti-inflammatory IL-10 serum levels are related to an improved clinical result with MTX [19,20] and that IL-10 modulates HLA-G expression [21]. Previous work tested the effect of IL-10 on HLA-G gene transcription and protein expression in peripheral blood monocytes, showing that IL-10 can up-regulate HLA-G cell surface expression in this cell type. Induction of HLA-G expression by IL-10 may thus play a role in down-regulation of the immune response [22].

In the present work, we assessed the frequencies of the HLA-G 14-bp insertion/deletion polymorphism in a cohort of RA patients and looked for associations between genotype and clinical features of the disease. We also tested

the hypothesis that the homozygous -14/-14 bp genotype is associated with better clinical response to MTX alone or in combination with other DMARDs.

MATERIALS AND METHODS

Patients and controls

Between June 2007 and December 2009, we evaluated a total of 309 consecutive patients, over 18 years of age, diagnosed according to the American College of Rheumatology's criteria for the classification of Rheumatoid Arthritis (RA) [23], as well as 294 healthy individuals from the same geographical area (Rio Grande do Sul, Brazil) as a control group. Patients having another connective tissue disease, other than secondary Sjögren syndrome, were excluded. Patients were followed at the Rheumatology Outpatient Clinic of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The disease activity score (DAS) and health assessment questionnaire (HAQ) [24] were assessed during study period. At each visit, clinical assessment consisted of swollen joint counts (SJC) and tender joint counts (TJC) at 28 joints, pain visual analogue scale (VAS), evaluator global assessment (EGA) and patient global assessment (PGA) of disease activity by VAS, HAQ, morning stiffness (MS) and erythrocyte sedimentation rate (ESR).

The patient's disease activity was measured by DAS28 (disease activity score utilizing the 28 joint count) and CDAI (clinical disease activity index), using the following formulas [25,26]: $DAS28 = (0.56 \times TJC^{1/2}) + (0.28 \times SJC^{1/2}) + (0.7 \times \ln [ESR]) + (0.014 \times PGA [in mm])$, and $CDAI = TJC + SJC + EGA [cm] + PGA [cm]$. Patients had their medical records reviewed for further clinical and radiographic data. Clinical data included atlantoaxial subluxation and extra-articular (EA) manifestations (rheumatoid nodules, amyloidosis, vasculitis, pneumonitis and episcleritis). Erosive disease was characterized by the presence of erosions in any of the hands and feet x-rays.

To assess the effect of the HLA-G 14-bp insertion/deletion polymorphism on MTX response, a subgroup of 188 consecutive patients with active disease (CDAI > 2.8) under routine care from the patient cohort were selected. Patients were followed prospectively for a mean of 14 months (\pm 5.29 months), with evaluations by a rheumatologist every 3-4 months until 4 visits were completed. Patients were submitted to therapeutic decisions based on disease activity scores at each visit. Treatment was adjusted based on the DAS28, aiming at remission (DAS28 < 2.6) or at least low disease activity (DAS28 < 3.2). At every visit, patients with persisting disease activity received an escalation of their treatment according to a step-up intensive strategy. Protocol for escalation of disease-modifying antirheumatic therapy was defined as follows: patients on sulfasalazine (SSZ) or MTX monotherapy had dose raised until maximum tolerated (SSZ increasing to target dose of 3000 mg per day; MTX increasing to target dose of 25 mg per week); patients on optimal doses of antimalarial drugs (hydroxychloroquine 400 mg or chloroquine diphosphate 250 mg per day) or SSZ monotherapy had MTX added or scheme was switched to triple therapy; patients on optimal doses of MTX had leflunomide added to treatment. Parenteral MTX was used only in cases of intolerance to oral doses. In cases of adverse drug events, MTX was maintained at the highest tolerated dose. If MTX was ineffective or not tolerated at all, the patient was treated with other DMARD. At every visit, adverse events, use of steroids, DMARD switch, or dosage modifications due to side effects or lack of efficacy were recorded. Some patients with severe disease (DAS28 > 5.1) were prescribed anti-TNF alpha, after which, scores were no longer recorded.

This study was approved by the Ethics Committee in Research of the HCPA and all participants gave informed consent.

PCR amplification of exon 8 of the HLA-G gene and genotyping DNA was isolated from peripheral blood cells using a salting out method [27]. HLA-G genotyping was performed as previously described [28]. Briefly, 100 ng of genomic

DNA was amplified in a 25 µl reaction, with final concentrations as follows: 1X PCR buffer, 0.2 mM dNTP 0.2, 1.5 mM MgCl₂, 0.75 U Taq DNA polymerase, and 10 pmol of each primer (GE14HLA-G – 5'- GTGATGGGCTGTTTAAAGTGTCAC C, RHG4 – 5'- GGAAGGAATGCAGTTCAGCATGA). Thermocycling conditions were 94 C for 2 m, 35 cycles of 94 C for 30 s, 64 C for 60 s and 72 C for 60 s, with a final extension at 72 C for 10 minutes. The amplified PCR products were visualized using 6% polyacrylamide gel stained with ethidium bromide. The amplicon sizes were 224 bp for the +14-bp (insertion) allele and 210 bp for the -14-bp (deletion) allele.

Statistical analysis:

HLA-G genotypic frequencies were compared to Hardy–Weinberg expectations using Chi-Square tests. HLA-G allelic frequencies and HLA-G genotypes of RA patients and controls were compared using the Chi-square test (with Yates correction when necessary) or Fisher's Exact Test. Relative risks were estimated by the odds ratio (OR). Group comparisons for other categorical variables were analyzed by Chi-square test. Group comparisons for continuous variables were analyzed by one-way ANOVA, paired Student's t-tests, or Wilcoxon's rank sum test. The cumulative inflammatory burden was estimated by the time integrated DAS28, calculated using area under the curve (AUC) [29].

For clinical response analysis, the primary outcome measure was change in DAS28 between baseline and visit 4. Multivariate analyses using analysis of covariance (ANCOVA) were performed to investigate the effect of homozygosity for the -14 bp HLA-G allele and MTX use on changes in DAS28. For the purposes of this analysis, the recorded DAS28 on visit 4 were used whether patients had discontinued DMARD therapy or not. In addition to gender and age, analyses were adjusted for known clinical predictors of response [30] such as RA duration, baseline ESR, DAS28, HAQ, number of concurrent DMARDs, MTX dose, and corticosteroid use. Variables were tested using a Kolmogorov-Smirnov test and none of them required transformation to reach normality. The significance level was set at $\alpha = 0.05$

(two-tailed) and all statistical analyses were performed with SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and winPEPI [31].

RESULTS

Clinical features and HLA-G genotypes

Physical and clinical characteristics of the 309 RA patients are given in Table 1. We observed no significant differences in the genotype and allele frequencies of the HLA-G 14-bp insertion/deletion polymorphism between RA patients and controls ($p = 0.744$ and 0.683 , respectively) (Table 2). Both control and RA patient groups were in Hardy-Weinberg equilibrium (data not shown). We then investigated whether the HLA-G 14-bp insertion/deletion polymorphism had any correlation with RA clinical features. There was no relationship between HLA-G alleles and clinical features evaluated in this study. No significant differences were observed among the AUC or means for DAS28 or HAQ scores for each genotype (Table 1).

Clinical response to MTX treatment and correlation with HLA-G genotype

A subgroup of 188 RA patients was followed for a mean of 14 months to evaluate clinical response to MTX treatment aimed at reduction of DAS28. Disease activity and treatment characteristics are presented in Table 3. In the final visit, 15 patients did not have ESR data to calculate final DAS28 score. We observed a general decrease in disease activity scores over the course of the study. The mean DAS28 value decreased from 5.0 to 4.2 ($p < 0.001$). The median values of individual parameters of disease activity were statistically significantly improved compared to baseline, except for ESR (Table 3).

Treatment characteristics during the study were comparable in most drug choices and combinations (Table 3). The percentage of patients using MTX was not statistically significantly different between baseline (78.7%) and final (83.5%) visit ($p = 0.292$), however the mean MTX dose in mg increased over the course of the study from 14.7 to 17.4 ($p < 0.001$). By the end of follow-up, 31 (16.5%) patients were not

on MTX treatment, because achieved remission with another DMARD. None of the patients discontinued MTX due to adverse events. Additional difference in DMARD treatment observed over the course of the study were percentage of patients using leflunomide (5% at baseline vs. 22% at final visit; $p < 0.001$).

For the clinical response analysis, a preliminary model were constructed using gender, age, RA duration, baseline DAS28 and HAQ, number of concurrent DMARDs, MTX and corticosteroid use as independent variables, with changes in DAS28 as dependent variable and used to identify independent predictors of response to intervention. The constructed model was significantly associated with DAS28 reduction (*adjusted* $R^2 = 0.343$; $p < 0.001$) and the only clinical independent predictor of response was baseline DAS28 (*semi-partial* $R^2 = 0.231$; $p < 0.001$). Thus, in subsequent analysis, adjustments were made for baseline DAS28.

To evaluate the existence of an interaction between the homozygosity for the HLA-G 14 bp deletion allele (-14/-14 genotype) and MTX use, the presence of homozygosity for the HLA-G 14 bp deletion allele (-14/-14 genotype) and MTX use were added to the model as independent variables together with gender. Age and baseline DAS28 were maintained as covariates. The model was not only statistically significantly associated with DAS28 change (*adjusted* $R^2 = 0.353$; $p < 0.001$), but it also correlated with baseline DAS28 (*semi-partial* $R^2 = 0.261$; $p < 0.001$), gender (*semi-partial* $R^2 = 0.034$; $p = 0.003$), and the interaction between -14/-14 genotype and MTX use (*semi-partial* $R^2 = 0.017$; $p = 0.031$) as independent predictors of response (Table 4). To assess the effects of MTX use in DAS28 response for each genotype, the same analysis was conducted with stratification by the presence of the -14/-14 genotype. Gender, MTX use, age and baseline DAS28 were included as independent variables. In the subgroup with the -14/-14 genotype, there was a trend for a more pronounced reduction in DAS28 among MTX treated patients (-1.4 ± 0.3 vs. -0.4 ± 0.5 ; $p = 0.071$). This enhanced MTX effect was not observed in the other genotypes (see Table 4 for details).

DISCUSSION

In the present study, we observed an association between the homozygosity -14/-14 HLA-G genotype and response to a MTX treatment intensive strategy aimed at decreasing disease activity score (DAS28) in RA patients. This is the first report of a positive interaction between this polymorphism and MTX response in a RA prospective cohort. It is worth emphasizing that this cohort only included patients not treated with this strategy before and that overall, most patients, regardless of HLA-G genotype, had a decrease in disease activity scores at the end of the study compared to baseline. Since the authors conducted the study within a standard clinical setting, the CDAI score was used as the inclusion criteria, because it is generally more available at the moment of the visit [32]. The disease activity score steered treatment approach is currently being used successfully worldwide and is supported by numerous studies [33]. Thus, the intervention in our study was a treat-to-target strategy using MTX as the anchor drug, instead of MTX monotherapy or combination, which bring findings closer to daily practice.

Other than genetics as factors for drug response, demographic and clinical characteristics of patients are important in association studies [5]. In order to better clarify the role of the interaction of MTX use and homozygosity for the HLA-G 14 bp deletion allele, a multivariate modeling approach adjusted for potential confounding factors was used. In order to investigate association between DAS28 change and baseline factors, a preliminary model were constructed adjusting for known predictors of response, such as gender, age, RA duration, baseline ESR, DAS28 and HAQ, number of concurrent DMARDs, and MTX and corticosteroid use. In that model, only baseline activity score and gender were independently associated with MTX response. Unexpectedly, HAQ scores were not an independent factor for MTX response in our cohort, which was not in accordance with previous works [30] and might reflect the presence of long standing RA in most patients in the cohort.

In this study, we chose to use change in DAS28 from baseline, rather than European League Against Rheumatism (EULAR) response criteria, to assess treatment effectiveness. This continuous endpoint enhanced the ability of the study to detect an association between the HLA-G polymorphism and MTX response and had been used in other RA pharmacogenetic studies [34]. The multivariate analysis explained approximately 1/3 of the variance in drug response and pointed out the statistically significant effects of baseline DAS28, gender, and the interaction between homozygosity for the HLA-G 14 bp deletion and MTX use as independent predictors of response. When population was stratified by genotype, we observed a trend in adjusted means of DAS28 change discriminated by MTX use in the subgroup of those with the -14/-14 bp genotype, which did not occur in the other genotypes. These results suggest that MTX effect may be boosted in those homozygous for the HLA-G 14 bp deletion polymorphism.

The data in the models only account for a small proportion of the changes in the DAS28 compared to baseline, therefore, it is likely that other genetic and clinical factors act in concert with the HLA-G polymorphism in determining outcome in RA. Indeed, pharmacogenetics is comparable to the genetics of complex diseases. In both cases, several proteins are involved in drug response, and variations in several genes all contribute to the overall variability observed clinically [35].

One prior study has also reported an association between MTX treatment response and the HLA-G 14 bp insertion/deletion polymorphism [16], observing a higher frequency of the -14/-14 bp genotype in the MTX responder group. Although these results are in accordance with ours, there are several differences between studies, such as treatment strategy and duration of disease. Contrary to our results, there are two studies that reported no association between MTX response and the HLA-G gene 14 bp insertion/deletion polymorphism [17,18]. In addition to variations in study design, these conflicting studies may reflect ethnic differences in the populations in which the polymorphism was studied [36]. Background factors (genetic

and otherwise) among different populations can modify the expression of a gene and lead to different levels of association [37]. Moreover, clinical end-points are not standardized in pharmacogenetics studies in RA, making them hardly comparable.

We must point out certain methodological issues that influence the interpretation of the present results. We included patients with active RA irrespective of ongoing MTX use at baseline, rather than MTX-naïve only, which could have caused a bias toward the inclusion of MTX non-responders. If this occurred, it would generate a bias against our hypothesis (eg. harder to achieve therapeutic response in active patients previously exposed to MTX). Still, we think this would be a major problem in assessing side effects of MTX, which does not pertain to the scope of this work, because most patients demonstrating adverse events would have had discontinued drug before entering the study. Another possible limitation of this study is related to the statistical analysis. Since this is the first prospective study focusing exclusively on the interaction between the HLA-G gene 14 bp insertion/deletion polymorphism and MTX response in RA, no adjustments for multiple testing using the Bonferroni method were made. In this case, the chance of our results being a false-positive (type 1 error) are not negligible and the observed association between the -14/-14 bp genotype and MTX therapeutic response should remain a hypothesis requiring validation in larger cohorts. However, lack of sufficient power to draw definitive conclusions is shared by most pharmacogenetics studies in RA [17], and the systematic application of conservative correction tests may jeopardize the identification of modest effects of potential biomarkers in this emerging field of rheumatology.

Finally, the HLA-G gene 14 bp insertion/deletion polymorphism does not seem to be implicated in susceptibility to RA, as no differences were observed between genotype and allele frequencies among the RA patients cohort and controls. No associations with disease phenotype, such as EA manifestations or disease activity scores, were found either. This finding is in accordance with previous results [15,16].

Despite this, we cannot rule out the possibility of involvement of other HLA-G gene polymorphisms with RA, since mechanisms underlying HLA-G expression remain largely unknown.

In summary, we observed that homozygosity for the HLA-G gene 14-bp deletion polymorphism was independently associated with a better response to MTX in a prospective cohort of patients with RA. Future studies of larger cohorts may lead to the identification of genetic profiles that allow optimal response to MTX.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Prof. Mario Wagner for very helpful suggestions concerning statistical analysis.

REFERENCES

1. Wordsworth P, Bell J. Polygenic susceptibility in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1991;50:343-6.
2. MacGregor A, Ollier W, Thomson W, Jawaheer D, Silman A. Hla-dr**1***0401/0404 genotype and rheumatoid arthritis: Increased association in men, young age at onset, and disease severity. *J Rheumatol* 1995;22:1032-6.
3. van der Helm-van Mil AH, Toes RE, Huizinga TW. Genetic variants in the prediction of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*
4. Hider SL, Bruce IN, Thomson W. The pharmacogenetics of methotrexate. *Rheumatology (Oxford)* 2007;46:1520-4.
5. Kooloos WM, Huizinga TW, Guchelaar HJ, Wessels JA. Pharmacogenetics in treatment of rheumatoid arthritis. *Curr Pharm Des*;16:164-75.
6. Baricordi OR, Stignani M, Melchiorri L, Rizzo R. Hla-g and inflammatory diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2008;7:67-74.

7. LeMaout J, Le Discorde M, Rouas-Freiss N, et al. Biology and functions of human leukocyte antigen-g in health and sickness. *Tissue Antigens* 2003;62:273-84.
8. Rousseau P, Le Discorde M, Mouillot G, Marcou C, Carosella ED, Moreau P. The 14 bp deletion-insertion polymorphism in the 3' ut region of the hla-g gene influences hla-g mrna stability. *Hum Immunol* 2003;64:1005-10.
9. Veit TD, Vianna V, Chies JA. Hla-g - from fetal tolerance to a regulatory molecule in inflammatory diseases. *Curr Immunol Rev* 2010;6:1-15.
10. Hviid TV, Hylenius S, Rorbye C, Nielsen LG. Hla-g allelic variants are associated with differences in the hla-g mrna isoform profile and hla-g mrna levels. *Immunogenetics* 2003;55:63-79.
11. 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;48:679-84.
12. Aractingi S, Briand N, Le Danff C, et al. Hla-g and nk receptor are expressed in psoriatic skin: A possible pathway for regulating infiltrating t cells? *Am J Pathol* 2001;159:71-7.
13. Khosrotehrani K, Le Danff C, Reynaud-Mendel B, Dubertret L, Carosella ED, Aractingi S. Hla-g expression in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2001;117:750-2.
14. Wiendl H, Feger U, Mittelbronn M, et al. Expression of the immune-tolerogenic major histocompatibility molecule hla-g in multiple sclerosis: Implications for cns immunity. *Brain* 2005;128:2689-704.
15. Veit TD, Vianna P, Scheibel I, et al. Association of the hla-g 14-bp insertion/deletion polymorphism with juvenile idiopathic arthritis and rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 2008;71:440-6.
16. Rizzo R, Rubini M, Govoni M, et al. Hla-g 14-bp polymorphism regulates the methotrexate response in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenet Genomics* 2006;16:615-23.

17. 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*;11:163-75.
18. Stamp LK, O'Donnell JL, Chapman PT, 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;68:154-5.
19. Rudwaleit M, Yin Z, Siegert S, 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;59:311-4.
20. Seitz M, Zwicker M, Wider B. Enhanced in vitro induced production of interleukin 10 by peripheral blood mononuclear cells in rheumatoid arthritis is associated with clinical response to methotrexate treatment. *J Rheumatol* 2001;28:496-501.
21. Rizzo R, Hviid TV, Stignani M, et al. The hla-g genotype is associated with il-10 levels in activated pbmcs. *Immunogenetics* 2005;57:172-81.
22. Moreau P, Adrian-Cabestre F, Menier C, et al. Il-10 selectively induces hla-g expression in human trophoblasts and monocytes. *Int Immunol* 1999;11:803-11.
23. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. The american rheumatism association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315-24.
24. Ferraz MB, Oliveira LM, Araujo PM, Atra E, Tugwell P. Crosscultural reliability of the physical ability dimension of the health assessment questionnaire. *J Rheumatol* 1990;17:813-7.
25. Prevoo ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995;38:44-8.

26. Aletaha D, Smolen J. The simplified disease activity index (sdai) and the clinical disease activity index (cdai): A review of their usefulness and validity in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2005;23:S100-8.
27. Lahiri DK, Nurnberger JI, Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of hmw DNA from blood for rflp studies. *Nucleic Acids Res* 1991;19:5444.
28. Hviid TV, Hylenius S, Hoegh AM, Kruse C, Christiansen OB. Hla-g polymorphisms in couples with recurrent spontaneous abortions. *Tissue Antigens* 2002;60:122-32.
29. Matthews JN, Altman DG, Campbell MJ, Royston P. Analysis of serial measurements in medical research. *BMJ* 1990;300:230-5.
30. 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)*
31. Abramson JH. Winpepi (pepi-for-windows): Computer programs for epidemiologists. *Epidemiol Perspect Innov* 2004;1:6.
32. Aletaha D, Smolen JS. The simplified disease activity index (sdai) and clinical disease activity index (cdai) to monitor patients in standard clinical care. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2007;21:663-75.
33. Schoels M, Knevel R, Aletaha D, et al. Evidence for treating rheumatoid arthritis to target: Results of a systematic literature search. *Ann Rheum Dis*;69:638-43.
34. Potter C, Hyrich KL, Tracey A, et al. Association of rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide positivity, but not carriage of shared epitope or ptpn22 susceptibility variants, with anti-tumour necrosis factor response in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2009;68:69-74.

35. Johnson JA, Lima JJ. Drug receptor/effector polymorphisms and pharmacogenetics: Current status and challenges. *Pharmacogenetics* 2003;13:525-34.
36. 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;40:145-57.
37. Risch NJ. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature* 2000;405:847-56.

Table 1. Demographic and clinical features of 309 patients with RA and genotypic distribution of the 14 bp polymorphism of HLA-G.*

Characteristics	RA patients				P§
	Total n=309 (%)	Genotypic distribution among RA patients			
		+14bp/+14bp n=55 (%)	+14bp/-14bp n=153 (%)	-14bp/-14bp n=101 (%)	
Female	249 (80.6)	41 (74.5)	121 (79.1)	87 (86.1)	0.174
Age, years #	60.6 ± 12.4	62.9 ± 12.4	59.4 ± 12.0	61.2 ± 13.0	0.184
Age of diagnosis #	45.9 ± 7.4	47.3 ± 12.6	44.1 ± 13.7	44.77 ± 13.7	0.080
Duration of diagnosis #	14.7 ± 7.4	15.6 ± 6.7	15.3 ± 7.7	13.4 ± 7.3	0.09
RF positivity	267 (86.4)	50 (90.9)	127 (83.0)	90 (89.1)	0.214
Erosions	273 (88.3)	46 (83.6)	138 (90.2)	89 (88.1)	0.428
Atlantoaxial subluxation	32 (10.6)	9 (16.4)	17 (11.4)	6 (6.1)	0.128
Rheumatoid nodules	64 (21.2)	15 (27.3)	28 (18.8)	21 (21.4)	0.420
EA manifestations	83 (27.5)	19 (34.5)	39 (26.2)	25 (25.5)	0.428
DAS28 (AUC) #	46.9 ± 15.7	46.2 ± 15.7	46.6 ± 15.9	47.6 ± 15.3	0.850
HAQ (AUC) #	14.7 ± 10.0	14.3 ± 9.5	14.4 ± 9.3	15.4 ± 11.2	0.755
DAS28 #	3.9 ± 1.3	3.8 ± 1.3	3.8 ± 1.3	4.0 ± 1.3	0.750
HAQ #	1.2 ± 0.75	1.19 ± 0.8	1.2 ± 0.8	1.2 ± 0.7	0.944

*Data are presented as number (percentage) of patients, except when indicated otherwise. §

Comparisons between each genotypic group using Chi-square test or ANCOVA). # Values are presented as mean (standard deviation). RF, rheumatoid factor, EA, extraarticular; DAS28, disease activity score; HAQ, Health Assessment Questionnaire; RA, rheumatoid arthritis.

Table 2. Frequencies of the genotypes and alleles of the 14bp polymorphism of HLA-G in patients with rheumatoid arthritis (RA) and controls.*

Variables	RA patients	Control subjects	P (Overall) §	OR (95% CI) §	P
Genotypes	n=309 (%)	n=294 (%)			
+14bp/+14bp	55 (17.8)	53 (18.03)		-	-
+14bp/-14bp	153 (49.51)	137 (46.6)		1.08 (0.68 – 1.72)	0.83
-14bp/-14bp	101 (32.69)	104 (29.4)	0.744	0.94 (0.57 – 1.53)	0.87
Alleles	n=618 (%)	n=588 (%)			
+14bp	263 (42.56)	243 (41.33)			
-14bp	355 (57.44)	345 (58.67)	0.683	0.95 (0.75 – 1.20)	0.71

*Data are presented as number (percentage). § Chi-square test.

Table 3. Clinical features of patients with RA in baseline and after MTX based treat-to-target strategy.¥

	RA patients n=188		P§
	Baseline	Visit 4	
Clinical characteristics			
CDAI †	21.3 (12.0-30.2)	12.8 (6.0-22.4)	<0.001*
DAS28 #	5.0 ± 1.4	4.2 ± 1.4	<0.001*
Swollen joint count †	4.00 (1.0-8.0)	2.00 (0.0-4.0)	<0.001*
Tender joint count †	8.00 (2.0-12.0)	3.0 (1.0-9.0)	<0.001*
Erythrocyte sedimentation rate †	26.0 (14.0-39.0)	23.0 (12.0-40.8)	0.218
Physician's assessment of disease activity †	40.0 (18.0-61.0)	30.0 (12.0-56.0)	0.02*
Patient's assessment of disease activity †	45.0 (23.0-75.0)	38.0 (20.0-62.0)	0.01*
Patient's assessment of pain †	54.0 (30.0-77.0)	49.0 (28.0-75.0)	0.007*
Treatment characteristics			
MTX no. (%)	148 (78.7)	157 (83.5)	0.292
Mean MTX dosage (mg) #	14.7 ± 4.8	17.4 ± 4.7	<0.001*
Concurrent DMARD treatment. no. (%)	82 (43.6)	88 (46.8)	0.604
Antimalarial drugs	51 (27.1)	37 (19.7)	0.113
Sulfasalazine	9 (4.8)	7 (3.7)	0.799
Triple therapy	17 (9.0)	22 (11.7)	0.499
Leflunomide	5 (2.7)	22 (11.7)	<0.001*
MTX monotherapy no. (%)	66 (35.1)	69 (36.7)	0.830
Other DMARDs monotherapy no. (%)	34 (18.1)	24 (12.7)	0.198
No DMARDs no. (%)	6 (3.2)	7 (3.7)	1.000
Low-dose corticosteroid treatment, no. (%)	113 (60.1)	118 (72.7)	0.672
Corticosteroid dose (mg) †	5.0 (0-10.0)	5.0 (0-10.0)	0.039*

¥ Data are presented as number (percentage) of patients, except when indicated otherwise. § Paired T test, Mann-Whitney's test, or χ^2 test. † Values are presented with median, percentiles 25 and 75. # Data are presented with mean and standard deviation. *P < 0.05.

Table 4. Multivariate analyses for disease activity scores changes.

Genotypes	Mean DAS28 change		P*
	MTX treated	Non-MTX treated	
-14bp/-14bp ¶¶	n=55 -1.4±0.3	n=7 -0.4±0.5	0.071
Others ¶¶	n=99 -1.1 ±0.2	n=12 -1.3 ±0.4	0.496
All ¥	n=154 -1.2 ±0.1	n=19 -0.7 ±0.3	0.155

Data are presented as means±SE. * P values for “MTX use” as predictor of response; ¶¶ P significance and adjusted means were obtained in ANCOVA model stratified by the presence of homozygosis for deletion in the HLA-G 14 pb polymorphism with sex, and MTX use as factors and age and baseline DAS28 as covariates; ¥ P significance and adjusted means were obtained in the ANCOVA model adding homozygosis for deletion in the HLA-G 14 pb polymorphism as factor without stratification.

6 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Neste trabalho verificamos que a ocorrência de homozigose para deleção de 14 pb no gene HLA-G foi independentemente associada com melhor resposta ao MTX em uma coorte prospectiva de pacientes com AR do sul do Brasil. Os achados trazem à luz um promissor marcador genético que precisa ser replicado em coortes independentes maiores. Maior número de estudos é necessário para que se possam identificar perfis genéticos capazes de selecionar individualmente os pacientes mais propensos a respostas ótimas ao MTX.

Com relação à suscetibilidade e fenótipos, não encontramos associação estatisticamente significativa do polimorfismo de inserção/deleção de 14 pb de HLA-G com dados demográficos ou manifestações clínicas, tais como doença extra-articular, erosões e atividade inflamatória da doença. Também não verificamos um risco maior de desenvolver AR naqueles pacientes portadores de alelos variantes.

A linha de pesquisa de imunogenética da AR será mantida no ambulatório do serviço de reumatologia do HCPA. Novos projetos dentro da própria instituição estão em andamento em parceria com o Departamento de Genética da UFRGS. Também estamos participando de um projeto multicêntrico em nível nacional com a participação de 8 universidades que tem plano de estabelecer um banco de material genético que seja representativo da população brasileira.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente tese de doutorado é fruto de trabalho desenvolvido no ambulatório de artrite reumatóide do serviço de reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre criado como parte das atividades do mestrado do autor com o auxílio de professores, colegas e bolsistas de iniciação científica da Faculdade de Medicina da UFRGS. A dissertação foi defendida no programa de pós-graduação em ciências médicas da UFRGS em 2006, sob orientação do Prof. Ricardo Machado Xavier. Desde então, os dados coletados da coorte de pacientes gerada possibilitaram a realização de 3 teses de mestrado e a atual tese de doutorado. Desde 2007, o doutorando foi autor/co-autor de 10 publicações internacionais e diversos trabalhos científicos apresentados em congressos nacionais e internacionais.

O atual trabalho científico é parte de linha de pesquisa denominada de “Imunogenética das doenças reumatológicas” desenvolvida em parceria com o grupo de pesquisa do Prof. José Artur Chies do Departamento de Genética da UFRGS. Esta colaboração possibilitou a constituição de um banco de material genético de pacientes portadores de AR e vem sendo utilizado em projetos interinstitucionais no estado e no país.

Artigos publicados pelo durante o programa de pós-graduação:

1: Scherer S, de Souza TB, de Paoli J, Brenol CV, Xavier RM, Brenol JC, Chies JA, Simon D. Matrix metalloproteinase gene polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 2010 Jan;30(3):369-73. Epub 2009 Jun 6. PubMed PMID:19504098.

2: de Souza TB, Mentz EF, Brenol CV, Xavier RM, Brenol JC, Chies JA, Simon D. Association between the aggrecan gene and rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2008 Dec;35(12):2325-8. Epub 2008 Nov 1. PubMed PMID: 19004047.

3: Souza LS, Machado SH, Brenol CV, Brenol JC, Xavier RM. Growth velocity and interleukin 6 concentrations in juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol.* 2008 Nov;35(11):2265-71. Epub 2008 Oct 1. PubMed PMID: 18843772.

4: Brenol CV, Chies JA, Brenol JC, Monticielo OA, Franciscatto P, Birriel F, Neves AG, Xavier RM. Endothelial nitric oxide synthase T-786C polymorphism in rheumatoid arthritis: association with extraarticular manifestations. *Clin Rheumatol.* 2009 Feb;28(2):201-5. Epub 2008 Oct 2. PubMed PMID: 18830734.

5: Oliveira PG, Brenol CV, Edelweiss MI, Brenol JC, Petronilho F, Roesler R, Dal-Pizzol F, Schwartzmann G, Xavier RM. Effects of an antagonist of the bombesin/gastrin-releasing peptide receptor on complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. *Peptides.* 2008 Oct;29(10):1726-31. Epub 2008 Jun 12. PubMed PMID: 18590783.

6: Veit TD, Vianna P, Scheibel I, Brenol CV, Brenol JC, Xavier RM, Delgado-Cañedo A, Gutierrez JE, Brandalize AP, Schuler-Faccini L, Chies JA. Association of the HLA-G 14-bp insertion/deletion polymorphism with juvenile idiopathic arthritis and rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens.* 2008 May;71(5):440-6. Epub 2008 Mar 10.

Erratum in: *Tissue Antigens*. 2008 Aug;72(2):185. Brenol, Claiton [corrected to Brenol, Claiton Viegas]. PubMed PMID: 18331529.

7: Oliveira PG, Brenol CV, Edelweiss MI, Meurer L, Brenol JC, Xavier RM. Subcutaneous inflammation (panniculitis) in tibio-tarsal joint of rats inoculated with complete Freund's adjuvant. *Clin Exp Med*. 2007 Dec;7(4):184-7. Epub 2008 Jan 11. PubMed PMID: 18188533.

8: Kohem CL, Brenol JC, Xavier RM, Bredemeier M, Brenol CV, Dedavid e Silva TL, de Castilhos Mello A, Cañedo AD, Neves AG, Chies JA. The chemokine receptor CCR5 genetic polymorphism and expression in rheumatoid arthritis patients. *Scand J Rheumatol*. 2007 Sep-Oct;36(5):359-64. PubMed PMID: 17963165.

9: Brenol CV, Monticielo OA, Xavier RM, Brenol JC. [Rheumatoid arthritis and atherosclerosis]. *Rev Assoc Med Bras*. 2007 Sep-Oct;53(5):465-70. Review. Portuguese. PubMed PMID: 17952359.

10. Bértolo, M.B., Brenol C.V., et al., Atualização do consenso brasileiro no diagnóstico e tratamento da artrite reumatóide. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 2007. 47: p. 151-159. (revista indexada LILACS)

11. Brenol C.V., Chies J.A.B., Brenol, J.C.T., Xavier, R.M. Role of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) polymorphisms in cardiovascular disease and rheumatoid

arthritis: comment on the article by Gonzalez-Gay et al. Clin Exp Rheumatol (aceito para publicação).

APENDICES

7.1 PROTOCOLO DO AMBULATÓRIO DE ARTRITE

REUMATÓIDE

PRIMEIRA CONSULTA Data : __ / __ / ____ COLETOU DNA? Data : __ / __ / ____

Identificação:

Nome: _____

Pront: _____ / ____

Cor: 1branco 2negro 3 amarelo

Sexo: 1M 2F DN: __ / __ / ____

Idade: _____

Dados da AR:

Início dos sintomas : ____ / ____ mês / ano

Data do diagnóstico: ____ / ____ mês / ano

Critérios Diagnósticos Preenchidos:

Critérios revisados de Classificação da Artrite Reumatóide do Colégio Americano de Reumatologia (ACR)1987 (21).

- 1) Rigidez matinal: Rigidez matinal periarticular ou articular com duração de pelo menos uma hora antes da melhora máxima possível;
- 2) Artrite em 3 ou mais áreas articulares: pelo menos três áreas articulares devem apresentar artrite ou o derrame articular observados por um médico. As 14 áreas possíveis são: direitas ou esquerdas: IFP, MCF, punho, cotovelo, joelho, tornozelo, e MTF.
- 3) Artrite nas articulações das mãos em pelo menos uma das seguintes áreas: punho, MCF ou IFP com inflamação
- 4) Artrite simétrica: Comprometimento simultâneo das mesmas áreas articulares (como definidas em 2) em ambos os lados do corpo (o comprometimento bilateral de IFP, MCF, o MTF é aceitável sem simetria absoluta.

- 5) Nódulos reumatóides: Nódulos subcutâneos sobre as proeminências ósseas, ou superfícies extensoras ou em regiões periarticulares, observados por um médico.
- 6) Fator reumatóide sérico positivo.
- 7) Alterações ao exame radiográfico: alterações típicas da AR nas mãos ou punhos, incluindo erosões ou osteopenia periarticular.

Para a classificação de um paciente como portador de AR é necessária a presença de quatro dos sete critérios. Os critérios 1 a 4 devem estar presentes durante pelo menos quatro semanas. Os pacientes com outros diagnósticos clínicos não são excluídos.

IFP: interfalangeana proximal, MCF: metacarpofalangeana, MTF: metatarsofalangeana.

HAQ: _____ DAS28: _____

Fator Reumatóide: 1 positivo 2 negativo persistentemente positivo 1 S 2 N

Título mais alto: _____ (nefelometria) _____ (látex)

Classe Funcional da AR:

- I. capacidade para atividades diárias usuais
- II. capacidade para auto-cuidados e atividades no trabalho, mas limitado no lazer
- III. capacidade para auto-cuidados, as limitado no trabalho e lazer
- IV. limitação nos auto-cuidados

Manifestações Extra-Articulares:

vasculite pele () vasculite sistêmica () nódulos reumatóides () Felty () Amiloidose ()
) pneumonite () episclerite () pericardite () subluxação atlanto-axial ()

Tratamento Farmacológico Prévio:

- 1) glicocorticóide: 1S 2N dose: _____ período: _____
- 2) metotrexato: 1S 2N dose: _____ período: _____

- 3) difosfato de cloroquina: 1S 2N dose: período:
- 4) hidroxicloroquina: 1S 2N dose: período:
- 5) sulfasalazina: 1S 2N dose: período:
- 6) azatioprina: 1S 2N dose: período:
- 7) leflunomide: 1S 2N dose: período:
- 8) biológico: 1S 2N qual? Período:
- 9) AINE : 1 S 2 N Período:

Suspendeu por:

Falha () () () ()

Toxicidade

() Qual ? _____

() Qual ? _____

() Qual ? _____

() Qual ? _____

A – Maculopatia

B – Hepática

C – Hematológica

D – Infecção

E – Renal

F – Gastrointestinal

7.2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO

AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMO DE INSERÇÃO/DELEÇÃO DE 14 PB DO GENE HLA-G NA EXPRESSÃO CLÍNICA E RESPOSTA TERAPÊUTICA AO METOTREXATO NA ARTRITE REUMATÓIDE

POR QUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO REALIZADO?

Os portadores de artrite reumatóide necessitam de marcadores genéticos que indiquem qual a melhor opção de tratamento para cada paciente. Isto é de grande importância com relação ao metotrexato, que é a droga mais usada nesta doença.

Este estudo está sendo realizado para tentar identificar os fatores genéticos que determinam melhor resposta ao tratamento em pessoas com artrite.

DE QUE CONSTA O ESTUDO?

Será coletada uma amostra de sangue. O exame de sangue será destinado à avaliação genética e só será utilizado para a análise genética do trabalho em questão. O uso dessa parte do sangue para quaisquer outras finalidades é vetado. Serão realizados história clínica, questionário para verificação da capacidade de função das articulações e exame físico, bem como coletados exames laboratoriais para avaliar a resposta ao tratamento.

QUAIS SÃO AS VANTAGENS EM PARTICIPAR DESTE ESTUDO?

1. Avaliar a atividade da doença de cada paciente, permitindo ajustes para um melhor controle da mesma.
2. Colaborar para o avanço e progresso do conhecimento sobre a artrite reumatóide e sobre seu tratamento.

QUAIS SÃO AS DESVANTAGENS EM PARTICIPAR DESTE ESTUDO?

1. Comparecer ao hospital
2. Realizar punção venosa para coleta de sangue, podendo causar dor temporária e coleção de sangue na pele (equimose ou hematoma)

DADOS RELATIVOS À PROTEÇÃO DO PACIENTE

- A. Os dados coletados neste estudo são confidenciais, e não serão revelados dados que permitam identificar os pacientes em hipótese alguma.
- B. A adesão ao estudo é voluntária, ou seja, cada paciente é livre para decidir não participar.
- C. A decisão de não participar não interferirá no acompanhamento normal dos pacientes no Ambulatório, na Emergência nem na Internação do Hospital de Clínicas
- D. O paciente é livre para desistir em qualquer momento do estudo, sem necessidade de fornecer justificativa.

COMPREENSÃO E AUTORIZAÇÃO

Tendo compreendido as informações do presente termo de consentimento e concordado com elas, assinala com um X apenas uma das opções abaixo:

() Autorizo o uso dos dados desta pesquisa para análise genética do polimorfismo de 14 pb do gene do HLA-G e avaliação da atividade da doença.

Paciente: _____

Registro: _____ Assinatura: _____

Pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Porto Alegre, ____ de _____ de 200__.

Pesquisadores responsáveis: Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier

Tel: (051) 3359 8340; FAX: (051) 3331 3834

Claiton Brenol

Tel: (051) 9916 6026

Comitê de Pesquisa e Ética em Saúde:

Telefone: (051) 3359 8304