UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

MARCOS ROBERTO TOVANI PALONE

Caracterização da expressão fisiológica do antígeno leucocitário humano G em órgãos humanos fetais e adultos

RIBEIRÃO PRETO

2019

MARCOS ROBERTO TOVANI PALONE

Caracterização da expressão fisiológica do antígeno leucocitário humano G em órgãos humanos fetais e adultos

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Patologia

Orientadora: Profa. Dra. Leandra Náira Zambelli Ramalho

**RIBEIRÃO PRETO
2019**

Autorizo, exclusivamente, para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese.

Marcos Roberto Tovani Palone

Palone, Marcos Roberto Tovani

Caracterização da expressão fisiológica do antígeno leucocitário humano G em órgãos humanos fetais e adultos/ Marcos Roberto Tovani Palone. Ribeirão Preto, 2019.

69p.; il.; 30cm.

Tese (Doutorado – Patologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Orientadora: Profa. Dra. Leandra Náira Zambelli Ramalho

1. Antígeno leucocitário humano. 2. Gestação.
3. Transplante. 4. Fisiologia. 5. Tolerância imune.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Marcos Roberto Tovani Palone

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto para a obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Patologia

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Prof. Dr. Fernando Chahud

Presidente da Comissão de Pós-Graduação do Programa de Pós-Graduação em
Patologia da FMRP-USP

Data de depósito da tese junto a SPG: ____/____/____

DEDICATÓRIA

Primeiramente a Deus, por estar comigo durante esta jornada e por toda a vida.

A minha família, sempre do meu lado em todos os momentos fornecendo todo o amparo necessário.

AGRADECIMENTOS

A Professora Dra. Leandra Náira Zambelli Ramalho, pelos valiosos ensinamentos e disponibilidade em conduzir o desenvolvimento desta tese, bem como de outras atividades.

A todos os Professores do Câmpus da USP-Ribeirão Preto que contribuíram com o enriquecimento dos meus conhecimentos.

Aos funcionários do laboratório de Patologia Celular e Molecular da FMRP-USP, pelo suporte durante a condução da parte laboratorial da presente tese.

Aos funcionários do Departamento de Patologia e Medicina Legal da FMRP-USP que auxiliaram no andamento das atividades desenvolvidas durante o curso de Doutorado, em especial o funcionário Felipe Denipotte Coelho.

Aos colegas de laboratório, pelo convívio durante estes anos.

RESUMO

Palone MRT. Caracterização da expressão fisiológica do antígeno leucocitário humano G em órgãos humanos fetais e adultos [tese]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2019.

O antígeno leucocitário humano (HLA)-G corresponde a uma molécula não clássica de classe I do complexo principal de histocompatibilidade. Segundo a literatura, tal molécula pode ser expressa em ambos os contextos patológico e fisiológico. Diversos autores têm apresentado evidências acerca do papel do HLA-G na tolerância imune do feto durante a gestação, bem como para o sucesso de alotransplantes. No entanto, até o momento, há poucas informações publicadas a respeito da expressão fisiológica dessa molécula nos diferentes órgãos humanos. Em acréscimo a isso, a participação do HLA-G em eventos fisiológicos é ainda um assunto controverso entre cientistas. Tendo em vista o exposto, o objetivo desse estudo foi investigar a expressão da proteína HLA-G em órgãos fetais durante o progredir da gestação, bem como em órgãos adultos. Trata-se de um estudo descritivo, comparativo, transversal e retrospectivo realizado com base na revisão de prontuários e análise de necropsias/biópsias de diferentes órgãos de fetos e adultos através do método de imunohistoquímica. Os resultados demonstraram a existência de diferença estatística significativa na imunomarcagem da proteína HLA-G em glândulas adrenais ($p=0,0003$), baço ($p=0,0276$), coração ($p=0,0474$), fígado ($p=0,0052$), pulmões ($p=0,0367$), rins ($p=0,0377$) e timo ($p=0,0336$) na comparação entre o primeiro e segundo trimestre gestacional; em glândulas adrenais ($p=0,0329$), baço ($p=0,0095$), pâncreas ($p=0,0009$) e placenta ($p=0,0285$) na comparação entre o segundo e terceiro trimestre gestacional; e no coração ($p=0,0304$), fígado ($p=0,0055$), pulmões ($p=0,0150$) e rins ($p=0,0312$) na comparação entre o terceiro trimestre gestacional e a fase adulta. Foi verificado um aumento na expressão do HLA-G fetal a partir do segundo trimestre gestacional em órgãos como glândulas adrenais, coração, fígado, rins, timo e pulmões. Entretanto, isso não foi uma constante, pois em outros, a exemplo do baço, pâncreas e placenta, não observou-se essa tendência durante o mesmo período. Durante o terceiro trimestre gestacional e a fase adulta evidenciou-se valores mais elevados para a expressão do HLA-G nos rins, e valores bastante inferiores no fígado. A expressão fisiológica do HLA-G embora positiva em todos os órgãos avaliados, nos três trimestres gestacionais e/ou na fase adulta, apresentou diferenças na intensidade e localização nos diferentes órgãos e períodos. Os achados a partir dessa pesquisa certamente representam uma importante contribuição para um melhor entendimento do mecanismo gestacional, assim como da fisiologia do HLA-G em adultos, sobretudo no que concerne o estabelecimento da tolerância imunológica em transplante de órgãos.

Palavras-chave: Antígeno leucocitário humano. Gestação. Transplante. Fisiologia. Tolerância imune.

ABSTRACT

Palone MRT. Characterization of the physiological expression of human leukocyte antigen-G in fetal and adult human organs [thesis]. Ribeirão Preto: Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo; 2019.

Human leukocyte antigen (HLA)-G is a nonclassical class I major histocompatibility complex molecule. According to the literature, this molecule can be expressed in both pathological and physiological contexts. Several authors have presented evidence about the role of HLA-G in the immune tolerance of the fetus during pregnancy, as well as for the success of allotransplants. However, until now, there are very few published data regarding the physiological expression of this molecule in different human organs. Moreover, the role of HLA-G in physiological events is still a controversial subject among scientists. In view of the above, the objective of this study was to investigate the expression of HLA-G protein in fetal organs during the progression of gestation, as well as in adult organs. This was a descriptive, comparative, cross-sectional and retrospective study based on the review of medical records and immunohistochemical analysis of different organs of fetuses and adult people. The results showed a statistically significant difference in the immunostaining of HLA-G protein in adrenal glands ($p = 0.0003$), spleen ($p = 0.0276$), heart ($p = 0.0474$), liver ($p = 0.0367$), kidneys ($p = 0.0377$) and thymus ($p = 0.0336$) in the comparison between the first and second gestational trimesters; in adrenal glands ($p = 0.0329$), spleen ($p = 0.0095$), pancreas ($p = 0.0009$) and placenta ($p = 0.0285$) in the comparison between the second and third gestational trimesters; and in the heart ($p = 0.0304$), liver ($p = 0.0055$), lungs ($p = 0.0150$) and kidneys ($p = 0.0312$) in the comparison between the third gestational trimester and the adult phase. An increase of fetal HLA-G expression was observed from the second gestational trimester in organs such as adrenal glands, heart, liver, kidneys, thymus and lungs. However, this was not a constant finding, since in other organs including spleen, pancreas and placenta, this trend was not observed during the same period. During the third gestational trimester and the adult phase, higher values for HLA-G expression in the kidneys and much lower values in the liver were observed. Although the physiological expression of HLA-G has been positive in all evaluated organs (in the three gestational trimesters and/or in adulthood), it showed differences in its intensity and location in the different organs and periods. The findings from this research certainly represent an important contribution to a better understanding of the gestational mechanism, as well as on the physiology of HLA-G in adults, especially regarding the establishment of immunological tolerance in organ transplantation.

Keywords: Human leukocyte antigen. Pregnancy. Transplantation. Physiology. Immune tolerance.

LISTA DE ABREVIATURAS

HLA - Antígeno leucocitário humano

MHC - Complexo principal de histocompatibilidade

Fator B - Componente C3 pró-ativador

TNF α e β – Fatores de necrose tumoral alfa e beta

Hsp 70 - Proteína do choque térmico

Receptor ILT-2 - Receptor inibitório transcrito tipo imunoglobulina – 2

Receptor ILT- 4 - Receptor inibitório transcrito tipo imunoglobulina – 4

Células do tipo NK – Células do tipo *natural killer*

SERPAT HCFMRP-USP - Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

TMA – *Tissue microarray*

Solução PBS - Solução salina tamponada com fosfato (PBS)

DAB - Diaminobenzidina

H&DAB – Hematoxilina e diaminobenzidina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Componentes das subdivisões de genes codificadores de moléculas HLA	14
Figura 2- Classificação e estrutura das isoformas da proteína HLA-G	18
Figura 3- Células e órgãos fetais nos quais ocorre expressão fisiológica do HLA-G	19
Figura 4- Células e órgãos adultos nos quais ocorre expressão fisiológica do HLA-G	22
Figura 5- Representação gráfica dos valores da imunomarcação da proteína HLA-G em glândulas adrenais	32
Figura 6- Fotomicrografias representativas da expressão da proteína HLA-G em glândulas adrenais de fetos e adultos	33
Figura 7- Representação gráfica dos valores da imunomarcação da proteína HLA-G no baço	34
Figura 8- Fotomicrografias representativas da expressão da proteína HLA-G no baço de fetos e adultos	35
Figura 9- Fotomicrografias representativas da expressão da proteína HLA-G na região da polpa vermelha do baço	35
Figura 10- Representação gráfica dos valores da imunomarcação da proteína HLA-G no coração.....	37
Figura 11- Fotomicrografias representativas da expressão da proteína HLA-G no coração de fetos e adultos	37
Figura 12- Fotomicrografias representativas da variação de imunomarcação da proteína HLA-G em corações do grupo G1	38
Figura 13- Representação gráfica dos valores da imunomarcação da proteína HLA-G no fígado.....	39
Figura 14- Fotomicrografias representativas da expressão da proteína HLA-G no fígado de fetos e adultos	40
Figura 15- Fotomicrografias representativas da variação de imunomarcação da proteína HLA-G em fígados do grupo G1	41
Figura 16- Representação gráfica dos valores da imunomarcação da proteína HLA-G no pâncreas.....	42

Figura 17- Fotomicrografias representativas da expressão da proteína HLA-G no pâncreas de fetos e adultos	43
Figura 18- Fotomicrografias representativas da diferença de expressão da proteína HLA-G no pâncreas de fetos e adultos	44
Figura 19- Representação gráfica dos valores da imunomarcação da proteína HLA-G em pulmões	45
Figura 20- Fotomicrografias representativas da expressão da proteína HLA-G em pulmões de fetos	46
Figura 21- Representação gráfica dos valores da imunomarcação da proteína HLA-G em rins.....	47
Figura 22- Fotomicrografias representativas da expressão da proteína HLA-G em rins de fetos e adultos	48
Figura 23- Fotomicrografias representativas da diferença de expressão da proteína HLA-G em rins de fetos e adultos	49
Figura 24- Representação gráfica dos valores da imunomarcação da proteína HLA-G no timo.....	50
Figura 25- Fotomicrografias representativas da expressão da proteína HLA-G no timo de fetos.....	51
Figura 26- Fotomicrografia representativa da diferença de expressão da proteína HLA-G no timo de fetos nas áreas cortical e medular	51
Figura 27- Fotomicrografias representativas da variação de imunomarcação da proteína HLA-G em timos do grupo G1	52
Figura 28- Representação gráfica dos valores da imunomarcação da proteína HLA-G na placenta	53
Figura 29- Fotomicrografias representativas da expressão da proteína HLA-G em placentas de fetos	54
Figura 30- Fotomicrografia representativa da expressão da proteína HLA-G em vesículas na placenta.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores da imunomarcção para a proteína HLA-G em glândulas adrenais durante o período gestacional e fase adulta.....	31
Tabela 2 - Valores da imunomarcção para a proteína HLA-G no baço durante o período gestacional e fase adulta.....	33
Tabela 3 - Valores da imunomarcção para a proteína HLA-G no coração durante o período gestacional e fase adulta.....	36
Tabela 4 - Valores da imunomarcção para a proteína HLA-G no fígado durante o período gestacional e fase adulta.....	38
Tabela 5 - Valores da imunomarcção para a proteína HLA-G no pâncreas durante o período gestacional e fase adulta.....	41
Tabela 6 - Valores da imunomarcção para a proteína HLA-G em pulmões durante o período gestacional e fase adulta.....	45
Tabela 7 - Valores da imunomarcção para a proteína HLA-G em rins durante o período gestacional e fase adulta.....	47
Tabela 8 - Valores da imunomarcção para a proteína HLA-G no timo durante o período gestacional	49
Tabela 9 - Valores da imunomarcção para a proteína HLA-G na placenta durante o período gestacional	52

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1. Sistema HLA	14
2.2. HLA-G: definição e estrutura.....	16
2.3. HLA-G: fisiologia	17
2.4. Expressão fisiológica do HLA-G em células e órgãos fetais	19
2.5. HLA-G durante a gestação: mecanismo	20
2.6. Expressão fisiológica do HLA-G em adultos	20
2.7. Controvérsias em torno da expressão fisiológica do HLA-G em órgãos humanos fetais e adultos	23
3. JUSTIFICATIVA.....	25
4. OBJETIVOS.....	26
4.1. Objetivo geral.....	26
4.2. Objetivos específicos	26
5. CASUÍSTICA E MÉTODOS	27
5.1. Coleta de dados para as amostras	27
5.2. Órgãos avaliados	27
5.3. Critérios de Inclusão	27
5.4. Critérios de Exclusão	28
5.5. Grupos de estudo.....	28
5.6. Etapa laboratorial: Imunohistoquímica das biópsias e necropsias	28
5.7. Análise da expressão da proteína HLA-G.....	30
5.8. Forma de análise dos resultados	30
6. RESULTADOS.....	31
6.1. Adrenais.....	31
6.2. Baço.....	33

6.3. Coração	36
6.4. Fígado	38
6.5. Pâncreas	41
6.6. Pulmões	44
6.7. Rins	46
6.8. Timo	49
6.9. Placenta	52
7. DISCUSSÃO	55
8. CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS	65
ANEXO	69

1. INTRODUÇÃO

O antígeno leucocitário humano (HLA) vem sendo, na atualidade, alvo de importantes estudos em todo o mundo, dado sua característica tolerogênica com potencial para imunossupressão de diversos tipos celulares, somado ainda às suas propriedades anti-inflamatórias (REBMANN et al., 2014).

Inicialmente detectado no citotrofoblasto extraviloso da interface materno-fetal (GERAGHTY; KOLLER; ORR, 1987), o HLA do tipo G (HLA-G) tem demonstrado implicações fisiológicas importantes relacionadas com a tolerância imunológica gestacional (REBMANN et al., 2014), contribuindo inclusive com a implantação do embrião humano (FANCHIN et al., 2007).

A expressão fisiológica dessa molécula tem também sido associada com uma melhor aceitação de transplantes de aloenxertos, com base em mecanismos que modulam uma resposta imune alogênica capaz de induzir tolerância (REBMANN et al., 2014).

Todavia, até o momento, a expressão fisiológica do HLA-G foi descrita na literatura envolvendo apenas algumas poucas células e órgãos humanos fetais e adultos (CURIGLIANO et al., 2013; BOEGEL et al., 2018). Além disso, a contribuição fisiológica dessa molécula tanto para a gestação (BHALLA et al., 2006; DAHL; HVIID, 2012) quanto para o sucesso de alotransplantes (REBMANN et al., 2014) constitui-se ainda em assunto de grande controvérsia entre pesquisadores.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Sistema HLA

Em humanos, os genes que codificam as moléculas HLA encontram-se agrupados em 3 regiões, as quais são subdivididas em classes denominadas I, II e III (Figura 1), com base em suas respectivas localizações no braço curto do cromossomo 6. Todos esses genes são componentes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (DONADI, 2000).

CLASSE I	CLASSE II	CLASSE III
Genes: HLA-A, B, C, E, F, G, H, J, K e L	Genes: HLA-DRA; DRB1-9; DQA1,2; DQB1,3; DOA, DOB, DMA; DMB; DPA1,2; DPB1,2; TAP1,2; LMP2,7 e MICA-E	Genes: C4A, C4B, o fator B, enzimas 21-hidroxilase (21B,21A), a proteína do choque térmico (Hsp 70) e os fatores de necrose tumoral TNF α e β

Figura 1 - Componentes das subdivisões de genes codificadores de moléculas HLA. Fonte: DONADI (2000).

Na classe I, estão incluídos os *loci* (Figura 1), que podem ser encontrados em diversos tecidos, uma vez que codificam as moléculas clássicas de histocompatibilidade presentes em praticamente todas as células nucleadas (HLA-A, B e C), sendo ditas moléculas clássicas de classe Ia. São também incluídos nessa classe, genes que apresentam capacidade de codificação restrita de moléculas presentes em alguns tecidos específicos, tais como aqueles que constituem tecidos fetais e placentários (HLA-E, F e G), recebendo nesse caso a denominação de moléculas não clássicas de classe Ib. Além disso, outros genes dessa classe podem atuar ainda como pseudogenes, não codificando proteínas (HLA-H, J, K e L)

(DONADI, 2000). Destaca-se que em contraste com as funções das moléculas HLA de classe Ia, as moléculas de classe Ib, em especial o HLA-G, estão relacionadas com funções imunomoduladoras e tolerogênicas, com papel em todo o decorrer do processo gestacional, desde a concepção até a determinação do peso de nascimento da criança (PERSSON et al., 2017).

As moléculas HLA de classe I, por sua vez, correspondem a heterodímeros, cuja composição engloba a existência de uma cadeia pesada α , contendo os domínios $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$, em associação não covalente com a $\beta 2$ -microglobulina, não polimórfica, codificada por gene situado no cromossomo 15 (DONADI, 2000).

A subdivisão de classe II é composta por genes que codificam as moléculas clássicas de histocompatibilidade de classe II (Figura 1). Vale salientar que os produtos dos genes HLA-DR, DQ e DP estão envolvidos na rejeição contra enxertos assim como na apresentação de peptídeos aos receptores dos linfócitos T. As moléculas de classe II da mesma forma que as de classe I são heterodiméricas, no entanto compostas por uma cadeia α e uma β , unidas não covalentemente, ambas codificadas por genes do MHC (DONADI, 2000).

Na subdivisão de classe III, são considerados como integrantes alguns genes que codificam componentes do sistema do complemento além de outros componentes (Figura 1) (DONADI, 2000).

Cabe mencionar aqui que, o termo moléculas de histocompatibilidade refere-se à glicoproteínas de superfície. Em comum tais moléculas apresentam três porções, a citosólica, que se encontra voltada para o interior da célula e tem por função a transdução de sinais intracelulares; a transmembrana, a qual promove a manutenção da molécula acoplada à camada bilipídica e; a extracelular, a maior

delas, relacionada com a apresentação de peptídeos citosólicos/endógenos às células T (DONADI, 2000).

Com relação às principais funções desempenhadas e características, tem-se que as moléculas de classe I atuam sobre a apresentação de peptídeos endógenos/virais às células T CD8 positivas com alto grau de polimorfismo, ao passo que as moléculas de classe II participam da apresentação de peptídeos às células CD4 positivas com limitado polimorfismo (DONADI, 2000).

2.2. HLA-G: definição e estrutura

O HLA-G é uma proteína não clássica de classe I do MHC composta por 7 íntrons e 8 éxons que codificam uma cadeia pesada. O éxon 1 é responsável pela codificação do peptídeo sinal. Os éxons 2,3 e 4 atuam respectivamente sobre os domínios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$, enquanto que os éxons 5 e 6 tem papel sobre o domínio transmembrana e codificação do domínio citoplasmático da cadeia pesada (DONADI et al., 2011).

A cadeia pesada do HLA-G está associada de modo não covalente a β_2 – microglobulina, com o domínio citoplasmático reduzido a 6 aminoácidos, em razão da presença de um códon de parada no início do éxon 6 (DONADI et al., 2011).

Há pelo menos 7 isoformas proteicas do HLA-G sintetizadas por meio de edição alternativa do transcrito primário, classificadas em 2 categorias: isoformas de membrana e solúveis (Figura 2) (DONADI et al., 2011; CURIGLIANO et al., 2013).

2.3. HLA-G: fisiologia

A inibição promovida pelo HLA-G ocorre por meio de ligação aos receptores inibitórios transcritos tipo imunoglobulinas (ILT) 2, presentes em células linfoides e mielomonocíticas; ILT4, expresso em células dendríticas, macrófagos e monócitos; e também em receptores *killer* do tipo imunoglobulina, expressos em células do tipo *natural killer* (NK). O HLA-G pode interagir diretamente com diferentes subpopulações de células imunogênicas e induzir a manutenção da tolerância em diferentes fases da resposta imune, tal como na diferenciação, proliferação, citólise e secreção de citocinas (CURIGLIANO et al., 2013).

O HLA-G pode, além disso, por meio de mecanismos indiretos, exercer atividade imunossupressora, induzindo a expressão de proteínas HLA-E não clássicas de HLA classe I, que se ligam diretamente aos peptídeos derivados do HLA-G (REBMANN et al., 2014). Desse modo, o HLA-E é capaz de ligar-se ao receptor inibitório CD94/NKG2A, presentes nas células NK e em linfócitos T, inibindo a citólise (IWASZKO; BOGUNIA-KUBIK, 2011; GOODEN; VAN, 2012).

ISOFORMAS DE MEMBRANA	ESTRUTURA
HLA-G 1	Estrutura similar ao de proteínas HLAs clássicas, associada a $\beta 2$ – microglobulina e a um nanopeptídeo, contendo os três domínios globulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$, e $\alpha 3$).
HLA-G 2	Não apresenta o domínio $\alpha 2$ e é codificada pelo éxon 3.
HLA-G 3	Desprovida dos domínios $\alpha 2$ e $\alpha 3$, sendo codificada pelos éxons 3 e 4.
HLA-G 4	Não possui o domínio $\alpha 3$ e é codificada pelo éxon 4.
ISOFORMAS SOLÚVEIS	ESTRUTURA
HLA-G 5	Apresenta os mesmos domínios globulares que o HLA-G 1 (é o seu homólogo solúvel), com bloqueio da tradução do domínio transmembrana (éxon 5) e uma cauda de 21 aminoácidos específicos relacionados com sua solubilidade.
HLA-G 6	Tem os mesmos domínios globulares que o HLA-G 2 (é o seu homólogo solúvel), com similaridade com o HLA-G 5 quanto ao restante da estrutura.
HLA-G 7	Possui apenas um domínio, o $\alpha 1$, e manutenção de 2 aminoácidos codificados pelo íntron 2, com desprovimento do éxon 7 em todos os transcritos alternativos.

Figura 2 - Classificação e estrutura das isoformas da proteína HLA-G.

Fonte: Adaptado de DONADI et al. (2011) e CURIGLIANO et al. (2013).

2.4. Expressão fisiológica do HLA-G em células e órgãos fetais

Atualmente, a expressão fisiológica de HLA-G em órgãos fetais tem sido descrita envolvendo apenas células amnióticas, precursores eritróides e citotrofoblastos (CAROSELLA et al., 2008a; CURIGLIANO et al., 2013) (Figura 3).

Em 1990, Kovats et al. verificaram por meio do uso da técnica de eletroforese uma expressão mais intensa do HLA-G em citotrofoblastos durante o primeiro trimestre gestacional, seguida por uma redução considerável dessa expressão no terceiro trimestre. Os resultados desse estudo sugeriram que a expressão dessa molécula estaria sujeita ao estágio de desenvolvimento gestacional (KOVATS et al., 1990). Tais achados foram confirmados mais tardiamente por Zhu et al. (2012).

Menier et al. (2004), além disso, verificaram de forma inesperada, expressão do HLA-G em células em contato próximo com vasos em proliferação associados aos citotrofoblastos, bem como no lúmen de vasos diferenciados (MENIER et al., 2004).

Figura 3 - Células e órgãos fetais nos quais ocorre expressão fisiológica do HLA-G.

Fonte: Adaptado de Curigliano et al. (2013).

2.5. HLA-G durante a gestação: mecanismo

Durante a gestação, período no qual a expressão do HLA-G nas células trofoblásticas é elevada, tem sido proposto que a isoforma HLA-G 1 inibe a função citolítica de células NK uterinas e periféricas por meio de ligação a receptores inibitórios de superfície celular. Com isso, as células citotrofoblásticas passariam a ser protegidas pelo HLA-G do processo de citólise a ser desencadeado por células NK decíduais e periféricas de origem alogênica ou semialogênica. Pode ocorrer também inibição de linfócitos TCD8+, conhecidos como linfócitos T citolíticos, por meio de interação direta com os receptores inibitórios ILT2 ou ILT4 (CURIGLIANO et al., 2013).

Recentemente foi descoberto por Ferreira et al. (2016) o mecanismo que controla a expressão específica da proteína HLA-G na interface materno-fetal, por meio da identificação de um *looping* de cromatina de longo alcance mediado por fatores de transcrição nuclear trofoblástico. É o *Enhancer* L, que controla a expressão do HLA-G, funcionando como potencializador do tipo específico de célula que circula no promotor dessa molécula (FERREIRA et al., 2016).

2.6. Expressão fisiológica do HLA-G em adultos

Em 1999, Mattet et al. reportaram a ocorrência de expressão fisiológica do HLA-G no timo tanto de camundongos quanto de humanos. Por meio de análise imunohistoquímica, esses autores observaram expressão do HLA-G restrita à porção medular do timo de humanos adultos. Esses resultados, que indicaram ineditamente expressão dessa molécula em outro órgão além da placenta, foram confirmados pelos métodos de ELISA e imunofluorescência (MALLET et al., 1999).

Com o objetivo de entender melhor os mecanismos que promovem a sobrevida do aloenxerto corneano, Le Discorde, Moreau, Sabatier et al. conduziram um estudo no ano de 2003 para verificação da ocorrência de expressão do HLA-G na córnea. Os resultados obtidos por meio de análise imunohistoquímica de córneas criopreservadas demonstrou coloração imunohistoquímica positiva para o uso dos anticorpos monoclonais anti-HLA-G, anti-HLA-A, B e C e anti-HLA classe I. Essa imunomarcção positiva foi obtida para ceratócitos, células epiteliais e células endoteliais de córneas humanas saudáveis e patológicas, o que indicou a presença do HLA-G, bem como de outras proteínas HLA de classe I. Além disso, esses resultados puderam ser confirmados por meio de detecção do HLA-G em córneas normais por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase. Em vista disso, passou-se a ser sugerido que a expressão dessa molécula deve ter relação com a manutenção do status imune privilegiado desse órgão (LE DISCORDE et al., 2003).

Em 2004, outra equipe de pesquisadores descreveu pela primeira vez a expressão do HLA-G na linhagem eritróide primitiva. Nesse caso, foi detectada a presença da isoforma solúvel HLA-G 5 na linhagem eritropoietica em todos os órgãos que sustentam ambas as eritropoieses primitiva e definitiva, incluindo a aorta, gônada, mesonefros, fígado, baço e medula óssea, envolvendo tanto células eritróides primitivas do saco vitelino como células endoteliais dos vasos em desenvolvimento. Nessa oportunidade foi também verificada expressão dessa molécula em células eritróides da medula óssea de um adulto de 82 anos (MENIER et al., 2004).

Mais recentemente, em 2006, Cirulli, Zalatan and McMaster observaram a expressão do HLA-G no pâncreas de adultos, contudo com expressão restrita às

ilhas de Langerhans. Segundo esses autores, a expressão dessa molécula seria regulada em resposta ao crescimento e estímulos inflamatórios, de modo que o HLA-G poderia associar-se a um subgrupo de grânulos contendo insulina, além de ser transportada para a superfície celular em resposta a estímulos secretórios (CIRULLI et al., 2006).

A Figura 4 mostra alguns órgãos e células de adultos, nos quais a expressão fisiológica do HLA-G tem sido verificada.

Figura 4 - Células e órgãos adultos nos quais ocorre expressão fisiológica do HLA-G.
Fonte: Adaptado de Curigliano et al. (2013).

Em 2018, Boegel et al. detectaram por meio de um estudo genômico expressão do HLA-G também na glândula pituitária e testículos, que da mesma forma que os demais órgãos citados acima são ditos imunoprivilegiados. De acordo com esses autores, a baixa expressão de moléculas clássicas de HLA classe I, juntamente com a falta de componentes imunoproteassoma e ocorrência de regulação positiva do HLA-G, podem ser elementos chave para a manutenção da tolerância desses órgãos imunologicamente privilegiados (BOEGEL et al., 2018).

2.7. Controvérsias em torno da expressão fisiológica do HLA-G em órgãos humanos fetais e adultos

Vale salientar que na interface materno-fetal, os HLAs de classe II estão ausentes em condições de normalidade, o que é bastante importante para a proteção do feto durante a gestação. A indução desses antígenos de classe II na placenta pode levar ao aborto por meio da resposta imune materna sobre os órgãos susceptíveis anteriormente protegidos (ATHANASSAKIS et al., 1995).

Fora isso, no tecido abortado esses antígenos são os principais componentes de uma via, que causa diversas alterações no organismo materno, a exemplo de baixos níveis de hematócrito, produção elevada de Imunoglobulina G e aumento do número de glóbulos brancos (ATHANASSAKIS et al., 1995).

Em acréscimo, tem-se que além do HLA-G, outros HLAs de classe IB, como o HLA-E, também são expressos na interface materno-fetal, e igualmente parecem induzir supressão do sistema imune da gestante. No entanto ainda não há um consenso a respeito disso, posto a existência de achados como o de Dahl e Hviid (2012), que observaram baixa expressão dessas proteínas nessa interface, em especial da proteína HLA-G, sendo que a expressão delas não seria fundamental para a gravidez, estando o HLA-G relacionado até mesmo com a infertilidade (DAHL; HVIID, 2012).

Ainda em outro estudo, ao avaliar a expressão das proteínas HLA-G e HLA-E na comparação entre gestações normais e abortos recorrentes, observou-se expressão do HLA-G apenas nos trofoblastos extravilosos, enquanto que o HLA-E foi encontrado no sinciciotrofoblasto, células mesenquimais vilosas, trofoblasto extraviloso e em vários tipos de células decíduas; contudo confinado apenas ao

citoplasma. Para ambas as proteínas não foram encontradas diferenças no padrão de expressão entre as gestações normais e os abortos recorrentes (BHALLA et al., 2006).

3. JUSTIFICATIVA

Levando-se em conta uma possível relação do HLA-G com a tolerância fisiológica gestacional (AMODIO et al., 2016), melhor aceitação de transplantes (REBMANN et al., 2014), e a existência de quantidade escassa de informações sobre a expressão fisiológica dessa molécula, considera-se tais temas parcialmente elucidados nesse âmbito.

A partir disso, levanta-se a hipótese de expressão dessa e de outras moléculas de classe IB em outros órgãos fetais e de adultos, o que sem dúvida pode contribuir para avanços importantes acerca do papel fisiológico desempenhado pelo HLA-G.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Investigar a expressão da proteína HLA-G em órgãos fetais com o progredir da gestação, bem como em órgãos adultos.

4.2. Objetivos específicos

- Descrever o padrão de imunomarcção da proteína HLA-G em glândulas adrenais, baço, coração, fígado, pâncreas, pulmões e rins de fetos e adultos; e no timo e placenta de fetos.
- Quantificar a expressão da proteína HLA-G nesses órgãos;
- Comparar a expressão da proteína HLA-G entre os diferentes grupos a serem avaliados.

5. CASUÍSTICA E MÉTODOS

Foi realizado um estudo descritivo, comparativo, transversal e retrospectivo por meio de revisão de prontuários e análise de necropsias/biópsias de diferentes órgãos de fetos e adultos sob guarda do Setor de Arquivo do Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (SERPAT HCFMRP-USP). O projeto de pesquisa desse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HCFMRP-USP (Anexo).

5.1. Coleta de dados para as amostras

A coleta de dados para a composição das amostras contemplou a revisão de prontuários eletrônicos nas dependências do SERPAT HCFMRP-USP, compreendendo os anos entre 2010 e 2017.

5.2. Órgãos avaliados

A presente pesquisa envolveu a análise da expressão da proteína HLA-G nos seguintes órgãos: glândulas adrenais, baço, coração, fígado, pâncreas, pulmões, rins, timo e placenta.

5.3. Critérios de Inclusão

Foram incluídos na pesquisa fetos com idade gestacional a partir de 9 semanas e adultos com idade a partir de 18 anos, compreendendo em ambos os casos indivíduos dos gêneros masculino e feminino.

5.4. Critérios de Exclusão

Cortes histológicos de órgãos de fetos e adultos com mumificação, maceração grau II ou superior, malformações e doenças sistêmicas e/ou imunológicas previamente relacionadas na literatura com alterações na expressão do HLA-G (CURIGLIANO et al., 2013); além de casos de abortos recorrentes e de pré-eclâmpsia.

5.5. Grupos de estudo

Os grupos avaliados foram:

- Grupo G1: constituído por biópsias e necropsias de fetos com idade gestacional correspondente ao primeiro trimestre gestacional.
- Grupo G2: constituído por necropsias de fetos com idade gestacional correspondente ao segundo trimestre gestacional.
- Grupo G3: constituído por necropsias de fetos com idade gestacional correspondente ao terceiro trimestre gestacional.
- Grupo G4: constituído por necropsias de adultos.

5.6. Etapa laboratorial: Imunohistoquímica das biópsias e necropsias

A identificação da expressão da proteína HLA-G foi realizada através do método de imunohistoquímica para antígenos nos cortes histológicos dos órgãos mencionados anteriormente. Inicialmente foram realizadas marcações com caneta hidrográfica em cada lâmina para demarcar as áreas de interesse. Após, comparando-se as áreas marcadas nas lâminas com os blocos de parafina, foram realizados cortes com caneta de TMA para montagem do bloco receptor. A partir

disso, foram preparadas lâminas tratadas com solução de Poli-L-Lisina 0,1% (Sigma-Aldrich™, Inc, MO, USA). Em seguida os processos de diafanização e desidratação foram conduzidos, com uso de xilol e álcool absoluto. Após, procedeu-se à recuperação antigênica dos cortes histológicos com tampão citrato 10mmol, pH 6.0 aquecidos em panela a vapor (Steamer), durante 40 minutos na temperatura de 95°C. A seguir, decorrido 20 minutos do esfriamento das lâminas à temperatura ambiente, foi realizada a primeira lavagem com solução salina tamponada com fosfato (PBS) 15mM de azida de sódio, pH 7.4. O passo seguinte consistiu de bloqueio da peroxidase endógena dos cortes, com uso de bloqueador do Kit Spring® Reveal, por 15 minutos e lavagem com solução PBS. Após, foi realizado o bloqueio de proteínas utilizando o bloqueador do Kit Reveal por 10 minutos, seguido por aspiração. O anticorpo primário utilizado foi o Anti-HLA-G Purified, 0,1mg, clone MEM – G/2 (EXBIO, Vestec u Prahy, Czech Republic), o qual reconhece a cadeia pesada livre de isoformas do HLA-G. Esse anticorpo primário foi incubado nas amostras por 1 hora a temperatura ambiente em câmara úmida. Depois disso, realizou-se a incubação com o componente complement do Kit Reveal por 5 minutos. Posteriormente, foram realizadas aspiração e aplicação do polímero conjugado - enzima horseradish peroxidase do Kit Reveal - por 10 minutos. Após, foram feitas lavagem com PBS e a revelação da reação com uso de substrato cromógeno 3,3 diaminobenzidina (DAB) (Biocare Medical, LLC, CA, USA). Os passos finais realizados foram o de contra coloração com hematoxilina, lavagem com água amoniacal, hidratação e montagem.

Foram utilizados cortes de timo humano para controle positivo da imunomarcagem do HLA-G, e cortes de fígado de ratos para controle negativo.

5.7. Análise da expressão da proteína HLA-G

Para determinar o percentual de imunomarcação positiva para a proteína HLA-G foram obtidas, para cada caso, com o auxílio de um microscópio com câmera de vídeo acoplada, imagens de 10 campos utilizando-se lente de aumento 40X. Essas imagens foram analisadas com uso do software ImageJ e classificadas conforme segue:

- Negativa: marcação $\leq 5,99\%$;
- Positiva: quando foi superior a esse valor:
 - Expressão leve: marcação de 6% até 25,99%;
 - Expressão moderada: marcação de 26-49,99%;
 - Expressão elevada: marcação superior a 50%;

5.8. Forma de análise dos resultados

A análise estatística e construção de gráficos foram realizadas com uso do software Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Associações para a média da expressão da proteína HLA-G entre os diferentes grupos foram determinadas pelo teste não paramétrico de Mann Whitney (2 grupos). Todos os testes foram bicaudais, e os valores de $p < 0,05$ considerados significativos.

6. RESULTADOS

Os resultados obtidos, referentes à expressão da proteína HLA-G em glândulas adrenais, baço, coração, fígado, pâncreas, pulmões, rins, timo e placenta dos grupos G1, G2 G3 e G4, são apresentados a seguir.

6.1. Adrenais

Observou-se expressão moderada da proteína HLA-G nos cortes de glândulas adrenais dos grupos G1, G3 e G4, enquanto que no grupo G2 essa expressão foi elevada (Tabela 1).

Tabela 1 - Valores da imunomarcação para a proteína HLA-G em glândulas adrenais durante o período gestacional e fase adulta

Adrenais		Média ± DP	MED	Variação
Grupo	G1 (n= 8)	37,67 ± 5,79	38,73	29,52 – 44,60
	G2 (n= 11)	51,24 ± 3,80	51,76	43,83 – 61,07
	G3 (n= 18)	48,82 ± 4,34	49,69	37,20 – 58,94
	G4 (n= 7)	47,54 ± 2,10	46,97	43,75 – 51,11

DP= desvio padrão; **MED**= mediana.

A análise estatística demonstrou existência de diferença significativa entre os valores da média de imunomarcação para a proteína HLA-G em glândulas adrenais na comparação entre os grupos G1 e G2, e G2 e G3 (teste Mann Whitney, $p = 0,0003$; $p = 0,0329$). Na comparação entre os grupos G3 e G4 não foi encontrada diferença estatística significativa (teste Mann Whitney, $p = 0,7110$) (Figura 5).

1º= primeiro trimestre gestacional; **2º**= segundo trimestre gestacional; **3º**= terceiro trimestre gestacional; **A**= adultos.

Figura 5 - Representação gráfica dos valores da imunomarcção da proteína HLA-G em glândulas adrenais, expressos como média $\pm$ erro padrão da média para os grupos G1, G2, G3 e G4. Os asteriscos representam significância estatística.

Nos quatro grupos avaliados a imunomarcção da proteína HLA-G em cortes de glândulas adrenais ocorreu predominantemente na membrana e citoplasma de células parenquimatosas tanto da zona cortical quanto medular (Figuras 6A, 6B, 6C e 6D). Por meio de observação subjetiva, foi também possível notar maior intensidade de expressão dessa proteína no espaço intersticial de glândulas adrenais dos grupos G2, G3 e G4 (Figuras 6B, 6C e 6D).

Figura 6 - Fotomicrografias representativas da expressão da proteína HLA-G em glândulas adrenais de fetos (A- G1, B- G2, C- G3) e adultos (D- G4). As áreas com coloração marrom indicam expressão dessa proteína (H&DAB, aumento de 40x).

6.2. Baço

Nos cortes de baço dos grupos G1, G2 e G3 verificou-se expressão moderada da proteína HLA- G. No grupo G4 foi observada expressão elevada dessa proteína (Tabela 2).

Tabela 2 - Valores da imunomarcção para a proteína HLA-G no baço durante o período gestacional e fase adulta.

	Baço	Média $\pm$ DP	MED	Variação
Grupo	G1 (n= 8)	47,45 $\pm$ 3,59	49,06	42,45 – 51,23
	G2 (n= 14)	44,20 $\pm$ 1,59	43,17	34,73 – 50,99
	G3 (n= 18)	46,83 $\pm$ 3,61	48,16	34,26 – 54,91
	G4 (n= 7)	50,59 $\pm$ 4,38	49,79	41,91 – 58,60

DP= desvio padrão; **MED**= mediana.

Houve diferença estatística significativa entre os valores da média de imunomarcação para a proteína HLA-G no baço na comparação entre os grupos G1 e G2, e G2 e G3 (teste Mann Whitney, $p = 0,0276$; $p = 0,0095$). Todavia, não foi encontrada diferença estatística significativa na comparação entre os grupos G3 e G4 (teste Mann Whitney, $p = 0,1723$) (Figura 7).

1º= primeiro trimestre gestacional; **2º**= segundo trimestre gestacional; **3º**= terceiro trimestre gestacional; **A**= adultos.

Figura 7 - Representação gráfica dos valores da imunomarcação da proteína HLA-G no baço, expressos como média $\pm$ erro padrão da média para os grupos G1, G2, G3 e G4. Os asteriscos representam significância estatística.

Na análise dos cortes de baço, foi verificada a ocorrência de imunomarcação da proteína HLA-G nos quatro grupos desse estudo envolvendo as duas regiões desse órgão, as polpas branca e vermelha. Na região da polpa branca a imunomarcação ocorreu na membrana e citoplasma de linfócitos, bem como envolvendo o espaço intersticial (Figuras 8A, 8B, 8C e 8D).

Figura 8 - Fotomicrografias representativas da expressão da proteína HLA-G no baço de fetos (A- G1, B- G2, C- G3) e adultos (D- G4). As áreas com coloração marrom indicam expressão dessa proteína (H&DAB, aumento de 40x).

Na região da polpa vermelha a imunomarcação foi observada em células endoteliais dos sinusóides esplênicos e nos cordões de Billroth (Figuras 9A e 9B).

Figura 9 - Fotomicrografias representativas da expressão da proteína HLA-G na região da polpa vermelha do baço. As áreas com coloração marrom indicam expressão dessa proteína (H&DAB, aumento de 10x em A e de 40x em B).

6.3. Coração

Nos cortes de coração verificou-se expressão moderada da proteína HLA-G em todos os grupos avaliados. No entanto o grupo G1 apresentou uma grande variação na média de imunomarcção, em comparação aos demais grupos (Tabela 3).

Tabela 3 - Valores da imunomarcção para a proteína HLA-G no coração durante o período gestacional e fase adulta

Coração		Média $\pm$ DP	MED	Variação
Grupo	G1 (n= 10)	36,44 $\pm$ 15,89	42,57	2,10 – 55,68
	G2 (n= 17)	48,88 $\pm$ 2,68	49,67	44,47 – 61,93
	G3 (n= 17)	48,13 $\pm$ 1,48	48,97	41,63 – 54,67
	G4 (n= 10)	42,04 $\pm$ 5,59	44,22	27,98 – 49,07

DP= desvio padrão; **MED**= mediana.

Foi verificada diferença estatística significativa entre os valores da média de imunomarcção para a proteína HLA-G no coração na comparação entre os grupos G1 e G2, e G3 e G4 (teste Mann Whitney, $p = 0,0474$; $p = 0,0304$). Entretanto, não foi encontrada diferença estatística significativa na comparação entre os grupos G2 e G3 (teste Mann Whitney, $p = 0,8986$) (Figura 10).

1º= primeiro trimestre gestacional; **2º**= segundo trimestre gestacional; **3º**= terceiro trimestre gestacional; **A**= adultos.

Figura 10 - Representação gráfica dos valores da imunomacação da proteína HLA-G no coração, expressos como média $\pm$ erro padrão da média para os grupos G1, G2, G3 e G4. Os asteriscos representam significância estatística.

Nos quatro grupos avaliados a imunomacação da proteína HLA-G em cortes de coração, quando presente, ocorreu predominantemente na membrana e citoplasma de fibras musculares estriadas cardíacas (Figuras 11A, 11B, 11C e 11D).

Figura 11 - Fotomicrografias representativas da expressão da proteína HLA-G no coração de fetos (A- G1, B- G2, C- G3) e adultos (D- G4). As áreas com coloração marrom indicam expressão dessa proteína (H&DAB, aumento de 40x).

Diferente dos demais, no grupo G1 foi verificado casos contendo desde áreas com imunomacação negativa (Figura 12A) até áreas com expressão elevada dessa proteína (Figura 12 B).

Figura 12 - Fotomicrografias representativas da variação de imunomarcção da proteína HLA-G em corações do grupo G1 (A e B). As áreas com coloração marrom indicam expressão dessa proteína, enquanto que as áreas com ausência dessa coloração correspondem a regiões sem expressão da proteína (H&DAB, aumento de 40x).

6.4. Fígado

Verificou-se expressão moderada da proteína HLA-G nos cortes de fígado de todos os grupos avaliados. Todavia, no grupo G1 evidenciou-se uma maior variação na média de imunomarcção dessa proteína em relação aos outros grupos (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores da imunomarcção para a proteína HLA-G no fígado durante o período gestacional e fase adulta

Fígado		Média $\pm$ DP	MED	Variação
Grupo	G1 (n= 11)	35,60 $\pm$ 9,10	39,30	14,00 – 46,98
	G2 (n= 16)	47,54 $\pm$ 3,79	47,25	41,30 – 58,00
	G3 (n= 18)	48,16 $\pm$ 3,16	47,30	41,40 – 58,55
	G4 (n= 6)	32,07 $\pm$ 7,03	30,57	21,37 – 42,78

DP= desvio padrão; **MED**= mediana.

A análise estatística demonstrou existência de diferença significativa entre os valores da média de imunomarcção para a proteína HLA-G no fígado na comparação entre os grupos G1 e G2, e G3 e G4 (teste Mann Whitney, $p = 0,0052$; $p = 0,0055$). Na comparação entre os grupos G2 e G3 não foi verificada diferença estatística significativa (teste Mann Whitney, $p = 0,7093$) (Figura 13).

1º= primeiro trimestre gestacional; **2º**= segundo trimestre gestacional; **3º**= terceiro trimestre gestacional; **A**= adultos.

Figura 13 - Representação gráfica dos valores da imunomarcção da proteína HLA-G no fígado, expressos como média $\pm$ erro padrão da média para os grupos G1, G2, G3 e G4. Os asteriscos representam significância estatística.

Nos cortes de fígado de todos os grupos avaliados, a imunomarcção da proteína HLA-G quando presente ocorreu envolvendo preponderantemente a membrana e citoplasma de hepatócitos localizados em diferentes áreas, independente da relação deles com o trato portal, ou seja, incluindo hepatócitos das zonas 1, 2 e 3 (Figuras 14A, 14B, 14C e 14D).

Figura 14 - Fotomicrografias representativas da expressão da proteína HLA-G no fígado de fetos (A- G1, B- G2, C- G3) e adultos (D- G4). As áreas com coloração marrom indicam expressão dessa proteína (H&DAB, aumento de 40x).

Por outro lado, no grupo G1 foram observados casos com imon marcação bastante variável, sendo que alguns apresentavam áreas com imunom marcação negativa (Figura 15A) e outros áreas com expressão elevada dessa proteína (Figura 15B).

Figura 15 - Fotomicrografias representativas da variação de imunomarcção da proteína HLA-G em fígados do grupo G1 (A e B). As áreas com coloração marrom indicam expressão dessa proteína, enquanto que as áreas com ausência dessa coloração correspondem a regiões sem a expressão da proteína (H&DAB, aumento de 40x).

6.5. Pâncreas

Foi verificada expressão moderada da proteína HLA-G nos cortes de pâncreas dos quatro grupos avaliados (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores da imunomarcção para a proteína HLA-G no pâncreas durante o período gestacional e fase adulta

Pâncreas		Média ± DP	MED	Variação
Grupo	G1 (n= 6)	37,79 ± 5,00	39,27	27,40 – 43,95
	G2 (n= 7)	41,28 ± 1,02	40,76	38,97 – 43,01
	G3 (n= 12)	37,71 ± 1,28	36,77	31,17 – 41,70
	G4 (n= 4)	38,14 ± 3,01	38,95	32,12 – 42,53

DP= desvio padrão; **MED**= mediana.

Não houve diferença significativa entre os valores da média de imunomarcção para a proteína HLA-G no pâncreas na comparação entre os grupos

G1 e G2, e G3 e G4 (teste Mann Whitney, $p = 0,2974$; $p = 0,8602$). Porém, na comparação entre os grupos G2 e G3 foi verificada diferença estatística significativa (teste Mann Whitney, $p = 0,0009$) (Figura 16).

1º= primeiro trimestre gestacional; **2º**= segundo trimestre gestacional; **3º**= terceiro trimestre gestacional; **A**= adultos.

Figura 16- Representação gráfica dos valores da imunomarcacão da proteína HLA-G no pâncreas, expressos como média $\pm$ erro padrão da média para os grupos G1, G2, G3 e G4. O asterisco representa significância estatística.

Na análise dos cortes de pâncreas dos quatro grupos avaliados foi observada imunomarcacão da proteína HLA-G tanto na porção exócrina quanto endócrina desse órgão, incluindo a membrana, citoplasma de células acinares, células secretoras das ilhotas de Langerhans e espaço intersticial (Figuras 17A, 17B, 17C e 17D).

Figura 17 - Fotomicrografias representativas da expressão da proteína HLA-G no pâncreas de fetos (A- G1, B- G2, C- G3) e adultos (D- G4). As áreas com coloração marrom indicam expressão dessa proteína (H&DAB, aumento de 40x).

Foi verificado também, por meio de observação subjetiva, predominância de imunomarcagem da proteína HLA-G envolvendo as ilhotas de Langerhans em cortes de pâncreas de fetos (Figuras 18A e 18B), enquanto que nos de adultos tal predileção não ocorreu (Figura 18C).

Figura 18 - Fotomicrografias representativas da diferença de expressão da proteína HLA-G em pâncreas de fetos (A e B) e adultos (C). As áreas com coloração marrom indicam expressão dessa proteína (H&DAB, aumento de 20x em A e C, e aumento de 40x em B).

6.6. Pulmões

Evidenciou-se a ocorrência de expressão moderada da proteína HLA-G em cortes de pulmões durante todo o período gestacional (grupos G1, G2 e G3) e na fase adulta (grupo G4). Embora o grupo G1 tenha apresentado uma grande variação na média de imunomarcção dessa proteína, os casos com valores muito baixos ou até mesmo indicativos de imunomarcção negativa foram pontuais (Tabela 6).

Tabela 6 - Valores da imunomarcção para a proteína HLA-G em pulmões durante o período gestacional e fase adulta

Pulmões		Média $\pm$ DP	MED	Variação
Grupo	G1 (n= 8)	33,30 $\pm$ 13,36	33,30	6,08 – 41,68
	G2 (n= 11)	39,80 $\pm$ 4,27	40,83	34,81 – 51,45
	G3 (n= 13)	42,97 $\pm$ 5,04	42,09	25,37 – 50,47
	G4 (n= 6)	33,82 $\pm$ 5,12	33,82	26,36 – 40,75

DP= desvio padrão; **MED**= mediana.

Foi demonstrada existência de diferença significativa entre os valores da média de imunomarcção para a proteína HLA-G em pulmões na comparação entre os grupos G1 e G2, e G3 e G4 (teste Mann Whitney, $p = 0,0367$; $p = 0,0150$). Contudo, na comparação entre os grupos G2 e G3 não foi encontrada diferença estatística significativa (teste Mann Whitney, $p = 0,8453$) (Figura 19).

1º= primeiro trimestre gestacional; **2º**= segundo trimestre gestacional; **3º**= terceiro trimestre gestacional; **A**= adultos.

Figura 19- Representação gráfica dos valores da imunomarcção da proteína HLA-G em pulmões, expressos como média $\pm$ erro padrão da média para os grupos G1, G2, G3 e G4. Os asteriscos representam significância estatística.

Foi observada imunomarcação da proteína HLA-G na membrana e citoplasma de pneumócitos I e II, bem como no espaço intersticial durante os três períodos gestacionais (Figuras 20A, 20B e 20C). No entanto, em cortes de pulmões adultos a expressão dessa proteína foi mais restrita aos pneumócitos (Figura 20D).

Figura 20 - Fotomicrografias representativas da expressão da proteína HLA-G em pulmões de fetos (A- G1, B- G2, C- G3). As áreas com coloração marrom indicam expressão dessa proteína (H&DAB, aumento de 40x).

6.7. Rins

Nos rins a expressão da proteína HLA-G nos quatro grupos avaliados foi moderada (Tabela 7).

Tabela 7 - Valores da imunomarcção para a proteína HLA-G em rins durante o período gestacional e fase adulta

Rins		Média $\pm$ DP	MED	Variação
Grupo	G1 (n= 7)	35,54 $\pm$ 7,54	37,02	21,47 – 45,13
	G2 (n= 16)	45,28 $\pm$ 2,70	45,41	41,15 – 49,40
	G3 (n= 16)	45,47 $\pm$ 2,34	45,44	33,23 – 49,92
	G4 (n= 7)	49,68 $\pm$ 2,28	50,36	43,97 – 55,37

DP= desvio padrão; **MED**= mediana.

Houve diferença estatística significativa entre os valores da média de imunomarcção para a proteína HLA-G em rins na comparação entre os grupos G1 e G2, e G3 e G4 (teste Mann Whitney, $p = 0,0377$; $p = 0,0312$). Não foi encontrada diferença estatística significativa neste caso somente na comparação entre os grupos G2 e G3 (teste Mann Whitney, $p = 0,5003$) (Figura 21).

1º= primeiro trimestre gestacional; **2º**= segundo trimestre gestacional; **3º**= terceiro trimestre gestacional; **A**= adultos.

Figura 21- Representação gráfica dos valores da imunomarcção da proteína HLA-G em rins, expressos como média $\pm$ erro padrão da média para os grupos G1, G2, G3 e G4. Os asteriscos representam significância estatística.

Em todos os grupos avaliados, a imunomarcacão da proteína HLA-G localizou-se na membrana e citoplasma de células glomerulares e tubulares de ambas as zonas, cortical e medular (Figuras 22A, 22B, 22C e 22D).

Figura 22 - Fotomicrografias representativas da expressão da proteína HLA-G em rins de fetos (A- G1, B- G2, C- G3) e adultos (D- G4). As áreas com coloração marrom indicam expressão dessa proteína (H&DAB, aumento de 40x).

Contudo, por meio de observação subjetiva, na zona cortical de rins de fetos foi observada imunomarcacão menos acentuada envolvendo as células glomerulares renais em comparação com os túbulos existentes. Já, na zona medular houve uma similaridade na imunomarcacão entre os diferentes tipos de túbulos renais (Figura 23A). Em rins de adultos essa diferença não foi evidenciada (Figura 23B).

Figura 23 - Fotomicrografias representativas da diferença de expressão da proteína HLA-G em rins de fetos (A) e adultos (B). As áreas com coloração marrom indicam expressão dessa proteína (H&DAB, aumento de 20x).

6.8. Timo

A expressão da proteína HLA-G em cortes de timo foi leve durante o primeiro trimestre gestacional (grupo G1), enquanto que se mostrou moderada para o segundo e terceiro trimestres gestacionais (grupos G2 e G3). Adicionalmente, foi observada a ocorrência de grande variação da média de imunomarcagem dessa proteína durante o primeiro trimestre gestacional (Tabela 8).

Tabela 8 - Valores da imunomarcagem para a proteína HLA-G no timo durante o período gestacional

	Timo	Média ± DP	MED	Variação
Grupo	A (n= 15)	18,53 ± 7,06	17,81	5,68 – 31,14
	B (n= 6)	29,46 ± 6,87	29,28	19,44 – 43,92
	C (n= 12)	33,65 ± 4,84	33,19	24,23 – 41,58

DP= desvio padrão; **MED**= mediana.

A análise estatística demonstrou existência de diferença estatística significativa entre os valores da média de imunomarcação para a proteína HLA-G no timo na comparação entre os grupos G1 e G2 (teste Mann Whitney, $p = 0,0336$). No entanto, não foi encontrada diferença estatística significativa na comparação entre os grupos G2 e G3 (teste Mann Whitney, $p = 0,3464$) (Figura 24).

1º= primeiro trimestre gestacional; **2º**= segundo trimestre gestacional; **3º**= terceiro trimestre gestacional.

Figura 24 - Representação gráfica dos valores da imunomarcação da proteína HLA-G no timo, expressos como média $\pm$ erro padrão da média para os grupos G1, G2, G3 e G4. O asterisco representa significância estatística.

A imunomarcação da proteína HLA-G quando presente em cortes de timo, pôde ser visualizada como predominante no espaço intersticial, embora tenha sido também evidenciada a imunomarcação no citoplasma e membrana de células reticulares epiteliais e de linfócitos T com uma menor representatividade (Figuras 25A, 25B, 25C e 25D).

Figura 25 - Fotomicrografias representativas da expressão da proteína HLA-G no timo de fetos (A- G1, B- G2, C- G3). As áreas com coloração marrom indicam expressão dessa proteína (H&DAB, aumento de 40x).

Por meio de observação subjetiva, foi possível ainda constatar a ocorrência de imunomarcacão mais intensa na zona medular desse órgão em comparação com a área cortical (Figura 26).

Figura 26 - Fotomicrografia representativa da diferença de expressão da proteína HLA-G no timo de fetos nas áreas cortical e medular. As áreas com coloração marrom indicam expressão dessa proteína (H&DAB, aumento de 10x).

Diferente dos demais, no grupo G1 foi verificado casos contendo áreas com imunomarcção negativa (Figura 27A) e outros apresentando áreas com expressão elevada da proteína HLA-G (Figura 27B).

Figura 27- Fotomicrografias representativas da variação de imunomarcção da proteína HLA-G em timos do grupo G1 (A e B). As áreas com coloração marrom indicam expressão dessa proteína, enquanto que as áreas com ausência dessa coloração correspondem a regiões sem a expressão da proteína (H&DAB, aumento de 40x).

6.9. Placenta

Nos cortes de placenta houve expressão moderada da proteína HLA-G durante os três trimestres gestacionais (grupos G1, G2 e G3) (Tabela 9).

Tabela 9 - Valores da imunomarcção para a proteína HLA-G na placenta durante o período gestacional

Placenta		Média ± DP	MED	Variação
Grupo	G1 (n= 7)	34,55 ± 2,76	35,77	25,20 – 37,93
	G2 (n= 5)	38,75 ± 3,81	40,00	33,29 – 45,32
	G3 (n= 5)	28,75 ± 3,66	27,21	24,32 – 35,75

DP= desvio padrão; **MED=** mediana.

Foi verificada ausência de diferença significativa entre os valores da média de imunomarcção para a proteína HLA-G na placenta na comparação entre os grupos G1 e G2 (teste Mann Whitney, $p = 0,1592$). Na comparação entre os grupos G2 e G3 foi encontrada diferença estatística significativa (teste Mann Whitney, $p = 0,0285$) (Figura 28).

1º= primeiro trimestre gestacional; **2º**= segundo trimestre gestacional; **3º**= terceiro trimestre gestacional.

Figura 28 - Representação gráfica dos valores da imunomarcção da proteína HLA-G na placenta, expressos como média $\pm$ erro padrão da média para os grupos G1, G2, G3 e G4. O asterisco representa significância estatística.

Nos cortes de placenta houve imunomarcção positiva da proteína HLA-G nos três grupos avaliados, com maior intensidade envolvendo a membrana e citoplasma de células citotrofoblásticas extravilosas (Figuras 29A, 29B e 29C).

Figura 29 - Fotomicrografias representativas da expressão da proteína HLA-G na placenta de fetos (A- G1, B- G2, C- G3). As áreas com coloração marrom indicam expressão dessa proteína (H&DAB, aumento de 40x).

Além disso, a imunomarcação pôde também ser observada em regiões da placenta que continham vesículas (Figura 30).

Figura 30 - Fotomicrografia representativa da expressão da proteína HLA-G em vesículas na placenta. A seta aponta a localização de algumas dessas vesículas. As áreas com coloração marrom indicam expressão dessa proteína (H&DAB, aumento de 40x).

7. DISCUSSÃO

De maneira inédita, foi investigada nesse estudo a caracterização da expressão da proteína HLA-G em diversos órgãos humanos, possibilitando a obtenção de um panorama geral da significância dessa molécula tanto no período fetal/gestacional quanto na vida adulta.

Na literatura, até o momento, a expressão do HLA-G em condições fisiológicas tem sido reportada em tecidos e órgãos adultos incluindo apenas o timo, córnea, ilhotas pancreáticas, células precursoras endoteliais, eritroblastos, macrófagos, células dendríticas (CURIGLIANO et al., 2013), glândula pituitária e testículos (BOEGEL et al., 2018). Em tecidos e órgãos fetais tal expressão apresenta uma descrição ainda mais restrita envolvendo apenas células amnióticas, citotrofoblastos e precursores eritróides (CURIGLIANO et al., 2013).

Os resultados do presente estudo, por sua vez, trazem novas e importantes contribuições nessa matéria, visto que pôde ser evidenciada a ocorrência de expressão positiva da proteína HLA-G em todos os órgãos avaliados tanto no período fetal quanto na fase adulta, mesmo com a ocorrência de variação na intensidade de expressão dessa molécula. Em face disso são discutidas adiante questões relevantes relacionadas com esses achados.

Apesar da existência de conclusões divergentes na literatura acerca do papel da expressão fisiológica do HLA-G durante a gestação (DAHL; HVIID, 2012; PERSSON, et al, 2017) os achados dessa pesquisa corroboram vários estudos científicos realizados em diversas partes do mundo, os quais suportam evidências de que tal molécula deve apresentar funções imunomoduladoras e tolerogênicas

essenciais para a ocorrência do mecanismo fisiológico molecular gestacional (FERREIRA et al., 2017; PERSSON et al., 2017).

De acordo com o que foi observado durante a realização desse trabalho, no período fetal outros órgãos, igualmente ao que ocorre na placenta, também expressam o HLA-G. Nesse sentido, é bem provável que haja ação coadjuvante dessa molécula envolvendo um maior número de órgãos fetais do que o descrito até então por outros cientistas, visando contribuir para ocorrência da tolerância imunológica gestacional (CURIGLIANO et al., 2013).

Diante disso, é também sugerida a existência de outros mecanismos complementares para a atuação fisiológica do HLA-G durante a gestação, para além da interação que ocorre no útero por meio dos receptores inibitórios de superfície celular. Vale mencionar que nesse último caso, esse processo inclui basicamente a inibição de linfócitos T citotóxicos, citólise de células NK e ativação de fagócitos mononucleares com atividade supressiva, com produção de grande quantidade de citocinas anti-inflamatórias (HUNT et al., 2005; CURIGLIANO et al., 2013).

Outro ponto relevante é a ocorrência de um aumento na expressão do HLA-G fetal a partir do segundo trimestre gestacional em órgãos tais como glândulas adrenais, coração, fígado, rins, timo e pulmões. Todavia, isso não é uma constante, pois em outros órgãos, a exemplo do baço, pâncreas e placenta, não se observou essa tendência durante o mesmo período. Além disso, embora tenha sido constatada uma média de expressão positiva dessa molécula em todos os grupos e períodos avaliados, as análises realizadas indicam diferenças na variação da intensidade de expressão para cada órgão em função do período temporal, quer seja na vida fetal ou adulta.

Na execução desse estudo, foi também verificada uma diferença temporal no pico de expressão do HLA-G comparado com o descrito na literatura para a placenta. Segundo Kovats et al. (1990) e Zhu et al. (2012) esse pico ocorreria durante o primeiro trimestre da gestação. Todavia, na presente pesquisa a ocorrência dessa variação na expressão foi constatada no segundo trimestre gestacional. A justificativa para esse achado pode estar relacionada com a existência de um hiato de tempo até que os órgãos fetais iniciem a produção máxima de HLA-G durante a gestação. É possível de se pensar adicionalmente em diferenças de antigenicidade ou mesmo da própria capacidade de resposta imune em células fetais que expressam essa molécula.

Quanto à expressão positiva do HLA-G observada em diversos órgãos fetais, tem-se a seguinte evidência para suportar esses achados. Tal molécula pode ser secretada nos fluídos corporais tanto na forma solúvel livre quanto como parte do conteúdo de vesículas extracelulares, de modo que em condições fisiológicas as células citotrofoblásticas têm a capacidade de secretar esse tipo de vesícula, exercendo com isso efeito imunossupressor associado à modulação do ambiente fetal (REBMANN et al., 2016). Nesse estudo, isso pode ser confirmado pelas formações vesiculares identificadas em cortes de placenta analisados (Figura 30).

Complementarmente a isso, há a questão da composição diferencial dessas vesículas extracelulares, ao passo que alguns componentes podem potencializar a função do HLA-G. Tais vesículas podem também propiciar interação com células alvo que não possuem a expressão superficial de receptores específicos do HLA-G, o que deve contribuir em algum grau para a tolerância gestacional. Além disso, as vesículas extracelulares contendo HLA-G possibilitam interação direta dessa

molécula com diferentes tipos celulares, bem como sua entrada no interior de células. A internalização do HLA-G pode introduzir novas vias ou ainda receptores cognatos desconhecidos, por meio dos quais o HLA-G contribui para a comunicação intracelular (REBMANN et al., 2016). Logo, isso deve tratar-se de um evento adicional durante a gestação, dado que embora as circulações materna e fetal sejam independentes, na presente pesquisa a expressão do HLA-G foi observada não apenas nos trofoblastos deciduais maternos, mas também nos coriônicos (sinciciotrofoblastos), os quais também podem ter a mesma capacidade secretora.

Em adição, no caso dos adultos tem-se que as células tronco-mesenquimais teriam essa mesma propriedade (secreção de vesículas extracelulares) (REBMANN et al., 2016). Em vista disso, é prudente levar em conta que nem todos os órgãos avaliados nesse estudo devem ter expressado originalmente o HLA-G. Em alguns órgãos essa expressão pode ter sido resultado total ou parcial da internalização celular dessa molécula via vesículas extracelulares.

Quanto aos demais resultados, vale destacar que, considerando a ausência de diferença estatística significativa para os valores da média de imunomarcção da proteína HLA-G na comparação entre o terceiro trimestre gestacional e a fase adulta para o baço ($p=0,1723$), glândulas adrenais ($p=0,7110$) e pâncreas ($p=0,8602$), bem como a existência de significância estatística ($p=0,0312$) indicando valores mais elevados para a expressão dessa proteína nos rins durante a fase adulta, e valores bastante inferiores no fígado ($p=0,0055$) durante esse mesmo período, algumas hipóteses podem ser levantadas.

Primeira hipótese, o baço é um órgão parenquimatoso, ricamente vascularizado, localizado no quadrante superior esquerdo do abdômen, geralmente

paralelo à curvatura maior do estômago e tipicamente coberto pela 9ª a 11ª costela. Corresponde a um órgão intraperitoneal, que apresenta duas importantes ligações ligamentares, uma que o une à grande curvatura do estômago e outra ao rim esquerdo, denominadas respectivamente de ligamentos gastroesplênico e esplenorrenal (EULER; SCHINDERA, 2017). Histologicamente, sua morfologia é caracterizada pela presença de uma cápsula constituída basicamente de fibras elásticas e musculares lisas, além de um parênquima composto principalmente por nódulos linfóides que formam a chamada polpa branca, submersa em uma massa de cordões separados por sinusóides venosos, conhecida como polpa vermelha (CHADBURN, 2000).

Dentre todos os órgãos linfóides de humanos o baço equivale ao maior deles. Apesar de não ser essencial para a sobrevivência, destaca-se como um dos principais órgãos envolvidos na resposta imune, com envolvimento em diversas funções dentre as quais estão incluídas a hematopoese (principalmente durante o período fetal), a regulação da população eritrocitária, filtração e fagocitose, remodelamento das séries das células da linhagem vermelha, remoção das inclusões intraeritrocitárias, atuação como reservatório de eritrócitos, bem como no metabolismo de ferro e no desempenho de funções imunológicas (CHADBURN, 2000; EULER; SCHINDERA, 2017).

Contudo, vale ressaltar que ao nascimento a morfologia histológica do baço mostra-se imatura. Nessa fase pode ser observada basicamente a presença de pequenos folículos linfóides ou centros germinativos. O início da maturidade desse órgão ocorre por volta de um ano de vida, concomitante com um gradual aumenta

de seu peso. É durante a puberdade que o baço atinge o seu tamanho máximo (EULER; SCHINDERA, 2017).

O timo, por sua vez, é uma pequena glândula localizada no mediastino anterior, cuja função primordial consiste na produção de linfócitos T (GOLDSTEIN; MACKAY, 2016; PEARSE, 2017). Caracteristicamente, esse órgão consiste de dois lobos formados durante o período embrionário e que mais tardiamente são interligados por tecido conjuntivo. Histologicamente, o timo é envolvido por uma cápsula de tecido conjuntivo frouxo e é dividido em lóbulos por septos dessa cápsula. Os lóbulos apresentam um córtex externo repleto de linfócitos e uma porção medular (GOLDSTEIN; MACKAY, 2016).

As células tronco linfocíticas, atraídas por sinais quimiotáticos tímicos, migram da medula óssea para o timo e ocupam os espaços presentes nesse órgão, extremamente ramificado. Embora o seu peso relativo máximo seja alcançado no fim do período fetal, é na puberdade que o peso máximo absoluto é atingido. No entanto, com o avanço da idade, há uma involução do órgão, de modo que os timócitos vão sendo gradativamente substituídos por células adiposas. Acredita-se que esse processo esteja relacionado com a ausência de sinais químicos que mantêm as células tímicas em atividade e multiplicação (GOLDSTEIN; MACKAY, 2016).

Levando-se em conta as particularidades e analogias existentes entre esses dois órgãos (baço e timo), pode ser deduzido que a ausência de diferença significativa verificada nessa pesquisa com relação à expressão do HLA-G entre baço de adultos e de fetos durante o terceiro trimestre gestacional esteja associado

com uma transferência mesmo que parcial do papel de proteção imune do timo (atrofiado em adultos) para o baço.

Segunda hipótese, o conceito de que até então determinados órgãos adultos que constitutivamente expressam HLA-G deveriam ser considerados imunoprivilegiados deve ser ampliado, posto que a expressão fisiológica do HLA-G foi confirmada em órgãos adicionais, quer seja por meio de expressão direta ou indireta (secundária por meio de internalização) dessa molécula, como é o caso do baço, glândulas adrenais e rins. Os achados no pâncreas de adultos corroboram estudos anteriores (CURIGLIANO et al., 2013).

Terceira hipótese, de acordo com os resultados da presente pesquisa, a expressão do HLA-G em rins de adultos deve ser mais elevada do que em fetos. Esse dado é de grande importância, visto que no contexto dos transplantes, a expressão dessa molécula pode ser benéfica e promover tolerância aos órgãos enxertados (PABÓN et al., 2014).

Convém também mencionar que, a expressão do HLA-G tem sido amplamente estudada em pacientes submetidos a transplantes de coração (LAZARTE et al., 2018), pulmão, rim, fígado e fígado-rim ou rim-pâncreas combinado (CAROSELLA et al., 2008b). Nessas populações, aqueles que expressaram HLA-G no enxerto ou plasma apresentaram aceitação significativamente melhor do enxerto (REBMANN et al., 2014).

Em complemento a isso, nesse estudo indiferentemente da existência ou não de diferença significativa nos valores da média de imunomarcção da proteína HLA-G, os cortes de órgãos adultos tais como o coração, fígado, rins, pâncreas e pulmões apresentaram expressão dessa proteína na mesma faixa de classificação

ou superior, o que sugere continuidade ou aumento dos níveis de expressão fisiológica do HLA-G durante essa fase da vida, de modo a favorecer o sucesso do transplante desses órgãos, caso seja necessário.

Quarta hipótese, o fígado pode ser considerado um órgão linfóide primário durante a vida fetal, dada sua importância no desenvolvimento do sistema imunológico através da hematopoese primária, tal como na placenta, mesmo que transitoriamente (TAVIAN; PÉAULT, 2005). Os achados do presente estudo indicam maior expressão do HLA-G nesse órgão no período fetal em comparação com a fase adulta, o que pode sugerir um papel importante (CRISPE, 2009; ROUILLER, 2013), porém menos relevante do fígado no mecanismo de defesa dos adultos.

No caso dos pulmões, a diminuição observada no valor da média de expressão do HLA-G em adultos provavelmente está associada com a diferença existente entre a morfologia dos pulmões de fetos e adultos. Em adultos os espaços alveolares são mais amplos (LESLIE; WICK, 2018), o que indica uma menor densidade celular por campo para a detecção de imunomarcacão por meio do software utilizado.

Vale destacar também a ocorrência de diferença na localização da imunomarcacão entre o pâncreas de fetos e adultos. Enquanto que no período fetal a expressão do HLA-G ocorreu com maior intensidade nas ilhotas de Langerhans, na fase adulta essa predileção foi menos evidente. A razão disso poderia ter alguma relação com o processo de envelhecimento e mudança na prioridade de funções do órgão, bem como com alterações na sua morfologia. Recentemente Boegel et al. (2018) evidenciaram expressão fisiológica do HLA-G restrita às ilhotas pancreáticas, o que não corrobora os achados do presente estudo.

Por fim, um contraponto existente na literatura que pode ser mais bem esclarecido com base nos resultados desse estudo diz respeito ao papel do HLA-G como um possível biomarcador prognóstico para distinguir tumores malignos de benignos em diferentes órgãos, tais como pulmões, fígado e pâncreas. Diversos trabalhos sugerem que essa molécula poderia servir como um marcador para a sensibilidade do tumor à quimioterapia, prognóstico em estágios avançado da doença e desfecho clínico (CURIGLIANO et al., 2013; LIN; YAN, 2015; KHODABANDEH SHAHRAKI et al., 2018). Entretanto, em razão dos achados obtidos nessa pesquisa, os quais indicam expressão fisiológica do HLA-G com intensidade moderada nesses e em outros órgãos durante a fase adulta, deve ser prudente a recomendação de cautela e execução de novos estudos sobre uma eventual utilidade dessa molécula como um biomarcador tumoral. Nesse sentido, a obtenção de valores bem definidos correspondentes à intensidade de expressão fisiológica do HLA-G e de cada uma de suas isoformas num dado órgão nas diferentes fases da vida, bem como na presença da doença benigna e maligna, é elemento chave para um estabelecimento preciso de quaisquer diferenças significativas entre essas condições, caso realmente ocorram. As evidências desse estudo, sem dúvida, são um importante ponto de partida para uma redefinição desses conceitos.

8. CONCLUSÃO

A expressão fisiológica do HLA-G foi positiva em todos os órgãos avaliados nos três trimestres gestacionais e na fase adulta. Além disso, o mesmo ocorreu na avaliação do timo e da placenta durante a gestação. Houve, entretanto, diferenças na intensidade e localização da expressão dessa molécula nos diferentes órgãos e períodos avaliados.

Em vista desses achados, esse estudo certamente representa uma importante contribuição para um melhor entendimento acerca do mecanismo da gestação, bem como da fisiologia do HLA-G em adultos, sobretudo no que diz respeito ao estabelecimento de tolerância imune a transplantes. A partir disso, abrem-se perspectivas para uma série de novas pesquisas, que com uso de outras metodologias poderão elucidar questões adicionais relacionadas tanto à participação dessa molécula em eventos fisiológicos quanto patológicos.

REFERÊNCIAS

AMODIO, G. et al. Association of genetic variants in the 3' UTR of HLA-G with recurrent pregnancy loss. **Human Immunol**, pii: S0198-8859(16)30150-1, 2016. [Epub ahead of print]

ATHANASSAKIS, I. et al. Placental tissue from human miscarriages expresses class II HLA-DR antigens. **Am J Reprod Immunol**, v. 34, n. 5, p. 281-287, 1995.

BHALLA, A. et al. Comparison of the expression of human leukocyte antigen (HLA)-G and HLA-E in women with normal pregnancy and those with recurrent miscarriage. **Reproduction**, v. 131, n. 3, p. 583-589, 2006.

BOEGEL, S. et al. HLA and proteasome expression body map. **BMC Med Genomics**, v. 11, n. 1, p. 36, 2018.

CAROSELLA, E. D. et al. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. **Blood**, v. 111, n. 10, p. 4862-4870, 2008a.

CAROSELLA, E. D. et al. HLA-G-dependent suppressor cells: diverse by nature, function, and significance. **Hum Immunol**, v. 69, n. 11, p. 700-707, 2008b.

CHADBURN, A. The spleen: anatomy and anatomical function. **Seminars Hematol**, v.37 , n. 1 (Suppl. 1), p. 13-21, 2000.

CIRULLI, V. et al. The class I HLA repertoire of pancreatic islets comprises the nonclassical class Ib antigen HLA-G. **Diabetes**, v. 55, n. 5, p. 1214-1222, 2006.

CRISPE, I. N. The liver as a lymphoid organ. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 147-163, 2009.

CURIGLIANO, G. et al. Molecular pathways: human leukocyte antigen G (HLA-G). **Clin Cancer Res**, v. 19, n. 20, p. 5564-5571, 2013.

DAHL, M.; HVIID, T. V. Human leucocyte antigen class Ib molecules in pregnancy success and early pregnancy loss. **Human Reprod Update**, v. 18, n. 1, p. 92-109, 2012.

DONADI, E. A. Como entender a nomenclatura e os mecanismos de associação entre os antígenos e os alelos de histocompatibilidade com as doenças. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 33, n. 1, p. 7-18, 2000.

DONADI, E. A. et al. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. **Cell Mol Life Sci**, v. 68, n. 3, p. 369-395, 2011.

EULER, A.; SCHINDERA, S. T. **Spleen**. In: Medical radiology. Springer, Berlin, Heidelberg, 2017.

FANCHIN, R. et al. Implication of HLA-G in human embryo implantation. **Hum Immunol**, v. 68, n. 4, p. 259-263, 2007.

FERREIRA, L. M. R. et al. A distant trophoblast-specific enhancer controls HLA-G expression at the maternal–fetal interface. **Proc Natl Acad Sci**, v. 113, n. 19, p. 5364-5369, 2016.

FERREIRA, L. M. R. et al. HLA-G: at the interface of maternal–fetal tolerance. **Trends Immunol**, v. 38, n. 4, p. 272-286, 2017.

GERAGHTY, D. E.; KOLLER, B. H.; ORR, H. T. A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. **Proc Natl Acad Sci**, v. 84, n. 24, p. 9145-9149, 1987.

GOLDSTEIN, G.; MACKAY, I. R. **The human thymus**. Elsevier, 2016.

GOODEN, M. J. M.; VAN HALL, T. Infiltrating CTLs are bothered by HLA-E on tumors. **Oncoimmunology**, v. 1, n. 1, p. 92-93, 2012.

HUNT, J. S. et al. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. **FASEB J**, v. 19, n. 7, p. 681-693, 2005.

IWASZKO, M.; BOGUNIA-KUBIK, K. The role of HLA-E polymorphism in immunological response. **Postepy Hig Med Dosw (Online)**, v. 65, p. 616-626, 2011.

KHODABANDEH SHAHRAKI, P. et al. Prognostic value of HLA-G in malignant liver and pancreas lesions. **Iran J Immunol**, v. 15, n. 1, p. 28-37, 2018.

KOVATS, S. et al. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. **Science**, v. 248, n. 4952, p. 220-223, 1990.

LAZARTE, J. et al. 10-Year Experience with HLA-G in heart transplantation. **Hum Immunol**, v. 79, n. 8, p. 587-593, 2018.

LE DISCORDE, M. et al. Expression of HLA-G in human cornea, an immune-privileged tissue. **Hum Immunol**, v. 64, n. 11, p. 1039-1044, 2003.

LESLIE, K. O.; WICK, M. R. Lung anatomy. In: **Practical pulmonary pathology: a diagnostic approach**. 3ed. Elsevier, 2018. p. 1-14. e2.

LIN, A.; YAN, W-H. Human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression in cancers: roles in immune evasion, metastasis and target for therapy. **Mol Med**, v. 21, n. 1, p. 782-791, 2015.

MALLET, V. et al. HLA-G in the human thymus: a subpopulation of medullary epithelial but not CD83+ dendritic cells expresses HLA-G as a membrane-bound and soluble protein. **Int Immunol**, v. 11, n. 6, p. 889-898, 1999.

MENIER, C. et al. Erythroblasts secrete the nonclassical HLA-G molecule from primitive to definitive hematopoiesis. **Blood**, v. 104, n. 10, p. 3153-3160, 2004.

PABÓN, M. A. et al. Impact of human leukocyte antigen molecules E, F, and G on the outcome of transplantation. **Transplant Proc.** v. 46, n. 9, p. 2957-2965, 2014.

PEARSE, G. Thymus. In: **Immunopathology in Toxicology and Drug Development.** Humana Press, Cham, 2017. p. 1-35.

PERSSE, G. et al. HLA class Ib in pregnancy and pregnancy-related disorders. **Immunogenetics**, v. 69, n. 8-9, p. 581-595, 2017.

REBMANN, V. et al. HLA-G as a tolerogenic molecule in transplantation and pregnancy. **J Immunol Res**, v. 2014, 2014.

REBMANN, V. et al. The potential of HLA-G-bearing extracellular vesicles as a future element in HLA-G immune biology. **Front Immunol**, v. 7, p. 173, 2016.

ROUILLER, C. (Ed.). **The liver: morphology, biochemistry, physiology.** Academic Press, 2013.

TAVIAN, M.; PÉAULT, B. The changing cellular environments of hematopoiesis in human development in utero. **Exp Hematol**, v. 33, n. 9, p. 1062-1069, 2005.

ZHU, X. et al. Expression of human leukocyte antigen-G during normal placentation and in preeclamptic pregnancies. **Hypertens Pregnancy**, v. 31, n. 2, p. 252-260, 2012.

ANEXO

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 15 de setembro de 2016

Ofício nº 3177/2016
CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **"CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE HLA-G EM ÓRGÃOS FETAIS"**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 436ª Reunião Ordinária realizada em 12/09/2016 e enquadrado na categoria: APROVADO, bem como a solicitação de dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com o Processo HCRP nº 12221/2016.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 466/12 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente,

DRª. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores
MARCOS ROBERTO TOVANI PALONE
PROF.DR.FERNANDO SILVA RAMALHO(Orientador)
Depto. de Patologia e Medicina Legal