

Complexo principal de histocompatibilidade - processamento e apresentação antigênica

O Complexo Principal de Histocompatibilidade, CPH, ou MHC ("Major Histocompatibility Complex") tem sido um dos sistemas genéticos mais amplamente estudados em mamíferos, devido à sua relevância em transplantes, controle da resposta imune e associação com doenças. Localizado no braço curto do cromossomo 6 humano (6p21.3), compreende uma região de aproximadamente 4000 Kb, com 224 genes, 128 expressos (57.1%), sendo 51 genes (39,8%) diretamente envolvidos na resposta imune. Fazem parte deste complexo os genes do Sistema HLA ("Human Leukocyte Antigens). Descobertos na superfície de leucócitos por Jean Dausset, em 1958, os produtos dos genes HLA se tornaram conhecidos como antígenos leucocitários, razão pela qual o CPH é muitas vezes referido ao Sistema HLA.

Recentemente, como parte do seqüenciamento de todo o cromossomo 6, a análise do CPH humano foi expandida cobrindo um total de 7600Kb, resultando na identificação de novos genes e caracterizando assim o CPH expandido (xMHC).

Maria Lucia Carnevale Marin

Biomédica. Mestre em Ciências pela FMUSP. Biologista do Laboratório de Imunologia do Instituto do Coração (InCor) do Hospital das Clínicas da FMUSP.

ORGANIZAÇÃO GÊNICA DO CPH

O MHC está, didaticamente, dividido em três regiões: classe I, classe II e classe III. Na região de classe I (aproximadamente 2000Kb), localizada distalmente em relação ao centrômero, estão localizados os genes HLA clássicos histocompatibilidade, HLA-A, B e C, bem como de genes HLA não clássicos, HLA-E, F, G e HFE, MICA e MICB. Na região de classe II, localizada mais ao centro (1000 a 1200 Kb), estão os *loci* HLA-DRA, DRB1-5, DQA1-3, DQB1-2, DPA1, DPB1, DOA, DOB, DMA e DMB. Também nesta região estão localizados vários pseudogenes e os genes LMP1, LMP2, TAP1, TAP2. A região de classe III, localizada entre as de classe I e classe II,

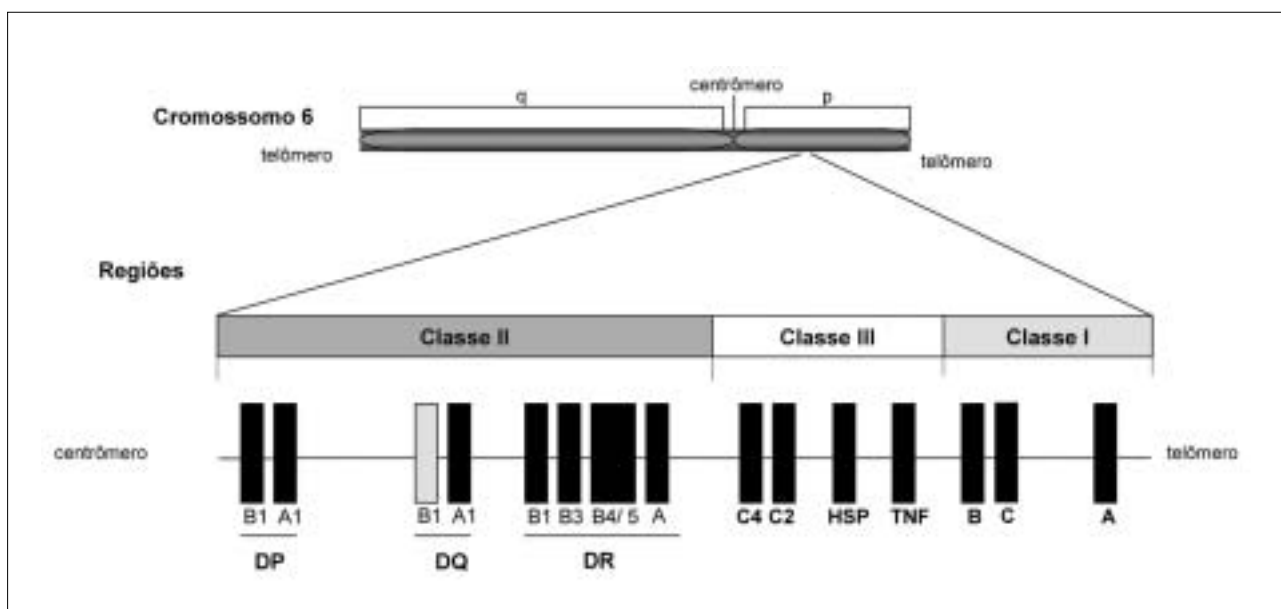


Figura 1 - Representação esquemática do CPH, no braço curto do cromossomo 6 humano.

contém, entre outros, os genes que codificam para componentes do sistema complemento (C2, C4A, C4B), fator B (Bf) e para a enzima 21-hidroxilase. Os genes que codificam para as proteínas de choque térmico Hsp70, fator de necrose tumoral α (TNF- α) e linfotóxicas α (LTA) e β (LTB), estão mapeados entre o complemento e as regiões de classe I (Figura 1). Grande parte dos genes na região do CPH se localiza próximo uns dos outros, sendo frequentemente herdados em bloco, constituindo haplótipos, resultando no fenômeno de desequilíbrio de ligação.

MOLÉCULAS HLA: CLASSE I E II

As moléculas HLA de classe I são codificadas pelos genes HLA-A, B e C. São glicoproteínas de 44-49 kDa, formadas por três domínios extracelulares, $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$, um domínio transmembranário e um domínio citoplasmático. Esta cadeia α pesada se encontra associada a uma cadeia leve, solúvel, de 12 kDa, denominada $\beta 2$ -microglobulina, que é codificada fora do MHC, no cromossomo 15. A maior parte do polimorfismo da molécula está localizada nos domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$ que formam uma estrutura em α -hélice que se apóia em uma plataforma laminar (folheto β), resultando numa fenda no topo da superfície da molécula que serve de sítio de ligação para peptídeos. As moléculas HLA de classe I são expressas na quase totalidade das células nucleadas.

As moléculas HLA classe II são heterodímeros com uma cadeia α (32-34kD) e uma β (28-29kD), cada uma com 4 domínios: domínio de ligação ao peptídeo ($\alpha 1$ e $\beta 1$), domínios imunoglobulina-like ($\alpha 2$ e $\beta 2$), um domínio transmembranário e um citoplasmático. Os genes HLA-DRB1, -DQA1 e -DPA1 codificam para a cadeia α das moléculas DR, DQ e DP e os genes HLA-DRB1, -DQB1 e -DPB1 codificam para as suas respectivas cadeias β . Alguns indivíduos expressam ainda uma quarta molécula denominada DR52, DR53 ou DR51, na qual a cadeia DR α (não polimórfica) é a mesma presente nas moléculas HLA-DR e a cadeia β é codificada pelo gene DRB3, DRB4 ou DRB5, respectivamente. As moléculas HLA classe II apresentam uma expressão tissular mais restrita, sendo expressas em linfócitos B, células dendríticas, monócitos e linfócitos T ativados.

Essas moléculas são altamente polimórficas, com vários alelos nos *loci* A, B, C, DR, DQ e DP. São considerados alelos as formas alternativas de cada gene, indicando a alteração de um ou mais nucleotídeos na sua seqüência, sem haver, necessariamente, troca de aminoácido. Cada conjunto de alelos encontrados em um único cromossomo é denominado de haplótipo e, herdados um do pai e outro da mãe, os alelos HLA são ex-

pressos de forma co-dominante, todos juntos na superfície de uma única célula.

A distribuição dos alelos varia em diferentes populações, levando à maior freqüência de indivíduos heterozigotos. O extenso polimorfismo das moléculas HLA parece ter sido selecionado por pressões evolutivas para proteger o organismo contra estratégias de evasão de patógenos, sendo crucial para a especificidade de ligação e apresentação de peptídeos, interação com TCR e conseqüente função dessas moléculas na resposta imune. Uma mesma molécula HLA é capaz de se ligar a um grande número de peptídeos. Normalmente os peptídeos diferem em suas seqüências, mas compartilham dois ou três resíduos de aminoácidos (seqüência motivo) que são importantes na ligação com resíduos "âncoras" na molécula HLA e que são definidos pelos alelos individuais de cada indivíduo ("bolsões" de ligação com o peptídeo).

FUNÇÃO DAS MOLÉCULAS HLA — PROCESSAMENTO E APRESENTAÇÃO DE ANTÍGENOS

A principal função das moléculas HLA é apresentar peptídeos antigênicos aos linfócitos T, gerando uma resposta imune específica. Para que os linfócitos sejam ativados é necessário que haja o reconhecimento simultâneo, pelo receptor de célula T (RCT), do peptídeo antigênico junto com a molécula de histocompatibilidade própria presente na superfície celular, fenômeno este chamado de restrição ao MHC. A formação do complexo peptídeo-HLA requer que a proteína seja degradada em peptídeo através de uma seqüência de eventos denominada processamento do antígeno.

Existem duas vias de processamento e apresentação antigênica: endógena (ou citosólica) e exógena (ou endocítica). A via endógena é usada para a apresentação de moléculas presentes no citoplasma da célula, sejam elas proteínas celulares normais que são continuamente degradadas e substituídas por outras, como proteínas tumorais ou, ainda, proteínas virais ou bacterianas produzidas em células infectadas. Grande parte da degradação protéica citoplasmática é realizada por um complexo de proteases multicatalíticas chamado proteassoma. Antes de sofrerem proteólise estas proteínas se ligam à proteína ubiquitina, facilitando seu reconhecimento pelos sistemas de degradação. Os peptídeos gerados são então transportados para o retículo endoplasmático (RE) por uma proteína heterodimérica chamada TAP (Transportadores Associados com Processamento), codificada pelos genes TAP1 e TAP2, e que está presente na membrana do RE. TAP1 e TAP2 transportam eficientemente peptídeos de 8-13 aminoácidos. O destino final dos peptídeos gerados deve ser a união com a molécula

HLA de classe I. Como qualquer outra proteína, a cadeia α e a cadeia β 2-microglobulina da molécula de classe I são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso, sendo que sua estabilidade só ocorre quando houver a ligação do peptídeo na fenda da molécula. O processo de "montagem" da molécula envolve várias etapas com participação de chaperonas (calnexina, calreticulina e tapasina). Uma vez associada ao peptídeo, e agora estável, a molécula classe I migra, através do Complexo de Golgi, para a superfície celular, para sua apresentação para os linfócitos T CD8 citotóxicos.

Na via exógena (ou endocítica) de processamento e apresentação de antígenos os peptídeos são apresentados pelas moléculas HLA de classe II. As células apresentadoras de antígenos (APCs) internalizam o antígeno por fagocitose e/ou endocitose (mediada por receptores). Uma vez internalizado o antígeno é degradado em peptídeos dentro de uma via de processamento endocítico. As vesículas endocíticas iniciais (endossomas iniciais) fusionam-se com vesículas maiores que vão acidificando-se e ativando proteases, dando início a degradação dos antígenos em peptídeos menores. Posteriormente, movem-se para os endossomos tardios que, finalmente, fusionam-se com os lisossomos. Dentro dos compartimentos endossomais o antígeno é degradado em peptídeos de 13-18 resíduos, os quais irão se unir às moléculas HLA de classe II que estão sendo sintetizadas no RE rugoso e são transportadas em vesículas para fusionarem-se aos endossomos. Durante a biossíntese da molécula de classe II o heterodímero de cadeia alfa e beta se une no sítio de ligação com peptídeos, a uma outra cadeia chamada invariante (Ii), prevenindo a união de peptídeos endógenos ainda no RE. A Ii é posteriormente clivada, deixando um fragmento peptídico ligado à fenda da molécula HLA de classe II, chamado CLIP (*class II-associated invariant chain peptide*), possivelmente prevenindo a ligação prematura do peptídeo. A molécula HLA-DM (classe II não-clássica) tem a função de remover o CLIP da fenda para posterior ligação do peptídeo. As moléculas HLA, agora já com peptídeo ligado e ainda nos endossomos, são transportadas para a superfície celular para serem apresentadas aos linfócitos T CD4+.

HLA E DOENÇAS

Análises para suscetibilidade genética a doenças são realizadas em famílias com indivíduos afetados (estudos de ligação) ou em estudos populacionais (estudos de associação). Estes estudos buscam identificação do alelo(s) de suscetibilidade nos indivíduos doentes comparando com a população sadia. Através desta comparação pode obter-se o valor do risco relativo (RR), variá-

vel que mede quantas vezes a suscetibilidade a uma doença aumenta na presença do alelo HLA. É importante salientar que o alto desequilíbrio de ligação na região gênica do HLA dificulta a identificação da associação primária à doença.

As moléculas HLA não distinguem entre peptídeos derivados de proteínas próprias e não próprias, elas simplesmente ligam peptídeos que se "fixam" eficientemente na sua fenda, evitando-se desta forma o desencadeamento de respostas auto-ímmunes. Este reconhecimento do próprio e não próprio deve ocorrer pelo receptor da célula T (RCT) que se dá durante sua maturação no timo, processo denominado de educação tímica (tolerância central). No timo, os linfócitos T devem interagir com moléculas HLA de classe I ou de classe II que apresentam diversos peptídeos de origem endógena (próprios). A falta de ligação ou uma ligação muito forte levará à indução de morte programada e à deleção da célula. Apenas os linfócitos capazes de reconhecer as moléculas HLA, juntamente com peptídeos próprios, com afinidade intermediária sofrerão maturação (CD4+ ou CD8+) e serão liberados para a circulação, onde sofrerão ainda mecanismos de tolerância periférica. Fatores que quebrem esses mecanismos de tolerância podem resultar na presença de linfócitos T com afinidade a antígenos próprios, desencadeando processos de doenças auto-ímmunes. Diante do relevante papel das moléculas HLA na seleção tímica e apresentação antigênica, estas moléculas são consideradas alvos importantes para o estudo de suscetibilidade genética a doenças.

Os mecanismos para o desencadeamento das doenças auto-ímmunes não estão totalmente esclarecidos. Sabe-se que tanto fatores genéticos como ambientais estão envolvidos. A forte associação observada do HLA-B27 e espondilite anquilosante, com RR em algumas populações maiores que 150, fazem desta molécula quase que um fator necessário para o desenvolvimento desta doença. Dentre os possíveis mecanismos envolvidos estão: 1) a hipótese do peptídeo artritogênico (peptídeos virais ou bacterianos mimetizando proteínas próprias são apresentados por HLA-B27 e reconhecidos por linfócitos T CD8+); 2) a hipótese do mimetismo molecular (mimetismo entre certas regiões da molécula HLA-B27 com epitopos bacterianos); 3) reconhecimento não clássico da molécula HLA-B27 (homodímeros da cadeia β , com cisteína (Cys) na posição 67, reconhecidos por linfócitos T CD4+ ao invés dos linfócitos T CD8+); 4) resposta inflamatória não associada à apresentação de antígenos em que o acúmulo de moléculas HLA-B27 "mal-formadas" que levariam a uma resposta de estresse com sinalização para produção de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1 e IL-6.

Na artrite reumatóide (AR) estudos populacionais realizados em diferentes etnias identificaram como principais alelos: DRB1*0401, DRB1*0404, DRB1*0405, DRB1*0101 e DRB1*1402. As moléculas HLA codificadas por esses genes compartilham uma seqüência conservada de aminoácidos nas posições 70-74, definida como "epitopo compartilhado de suscetibilidade". Alguns trabalhos mostraram também a presença de anticorpos antiproteína citrulinada abrangendo 50-70% dos pacientes. Estudo recente descreve que o tabagismo, associado à presença dos epitopos compartilhados, funcionaria como fator de risco para pacientes com anticorpos anticitrulina, levando à reações imunes específicas a proteínas citrulinadas que, ao longo dos anos, poderiam causar artrite.

Ainda outro mecanismo proposto para a patogênese da AR é o do mimetismo molecular. Células T periféricas ativadas por antígenos exógenos reconheceriam antígenos próprios na sinóvia. O colágeno tipo II, proteoglicanos e glicoproteínas de cartilagem têm sido apontados como os alvos endógenos da reatividade cruzada. Como candidatos exógenos, estão as proteínas retrovirais e as HSP ("heat shock proteins"), especificamente as HSP-70 de micobactérias, com alta homologia com as HSP humanas.

É importante salientar que outros polimorfismos, em genes não-HLA, mas localizados dentro do CPH, também têm sido descritos em associação com doenças reumatológicas, dentre eles o gene Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) e o gene MICA.

IDENTIFICAÇÃO DO POLIMORFISMO HLA

A tipificação dos genes HLA pode ser realizada por métodos sorológicos ou moleculares. No método sorológico (citotoxicidade dependente de complemento) são utilizados anti-soros anti-HLA específicos frente aos linfócitos do indivíduo, que funcionam como fonte antigênica. Porém, o método sorológico vem sendo substituído, especialmente para tipificação de HLA classe II, por métodos moleculares. A maioria destes métodos são

baseados em reação de polimerização em cadeia (PCR), utilizando sondas ("primers") específicas que diferenciam alelos ou grupos de alelos. Existem métodos moleculares de baixa resolução, que apresentam resultados equivalentes ao sorológico e que definem grupos de alelos. Os métodos de alta resolução permitem definir com precisão os alelos propriamente ditos. Existem ainda os métodos de resolução intermediária, identificando alguns alelos e/ou grupos de alelos. A nomenclatura HLA foi assim estabelecida por um Comitê Internacional: os dois primeiros dígitos referem-se às tipificações sorológicas (ou ao grupo de alelos) e os dois dígitos seguintes, a especificidade alélica. Desta forma, a molécula HLA-B27 é codificada pelo gene HLA-B*27 que contém, por exemplo, os alelos HLA-B*2701 e B*2705. Para os genes de classe II, podemos ter, por exemplo, a tipificação do gene HLA-DRB1*04, que contém alelos DRB1*0401, *0402. Devido à presença de vários genes para as cadeias β (B) de HLA-DR, cada *locus* receberá o seu número correspondente: HLA- DRB1*0401, DRB3*0101, DRB4*0101 e DRB5*0101. O seqüenciamento gênico, método de alta resolução, também é empregado na identificação do polimorfismo HLA.

BIBLIOGRAFIA SUGERIDA

1. de Castro JA. HLA-B27 and the pathogenesis of spondyloarthropathies. *Immunol Lett.* 2007; 15;108(1):27-33.
2. Faé KC, Drigo SA, Goldberg AC. Associação entre antígenos HLA e doenças específicas. In *Diagnóstico e Tratamento*. Lopes AC, Editor. São Paulo: Manole, 2006, v. 1, p. 356-363.
3. Klareskog L, Padyukov L, Ronnelid J, Alfredsson L. Genes, environment and immunity in the development of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Immunol.* 2006;18(6):650-5.
4. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. *Kuby Immunology*. W.H. Freeman and Company, New York, USA, 2000. 4 ed. 173p.
5. Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med.* 2000; 7, 343(10):702-9.
6. Klein J, Sato A. The HLA system. Second of two parts. *N Engl J Med.* 2000;14, 343(11):782-6.
7. Steinsson K, Alarcon-Riquelme ME. Genetic aspects of rheumatic diseases. *Scand J Rheumatol.* 2005; 34(3):167-77.
8. Thorsby E, Lie BA. HLA associated genetic predisposition to autoimmune diseases: Genes involved and possible mechanisms. *Transpl Immunol.* 2005;14(3-4):175-82.