

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNA LAÍS MAURICIO DE MIRANDA

ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DO GENE *HLA-E* EM PACIENTES SUBMETIDOS
A TRANSPLANTE RENAL

CURITIBA

2015

BRUNA LAÍS MAURICIO DE MIRANDA

ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DO GENE *HLA-E* EM PACIENTES SUBMETIDOS
A TRANSPLANTE RENAL

Monografia apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Biólogo no curso de graduação em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Valéria Maria Munhoz Sperandio Roxo

Co-orientadora: Dra. Georgia Fernanda Gelmini

CURITIBA

2015

AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar o meu caminho.

Aos meus pais, Sônia e Jeferson, pelo apoio incondicional em todas as etapas da minha vida acadêmica, além do amor, carinho e compreensão em todos os momentos que precisei.

Aos meus familiares e amigos, pelo apoio e momentos de lazer extremamente essenciais e necessários.

À minha orientadora, Profa. Valéria, pela atenção, confiança e amizade.

À minha co-orientadora e grande amiga, Geórgia, presente em todas as etapas do trabalho, auxiliando-me e trazendo-me toda a calma que precisei.

À equipe do LIGH, por me recepcionar tão bem e criar um ótimo ambiente de trabalho.

RESUMO

No Brasil, as principais doenças causadoras de insuficiência renal nas regiões Sudeste e Sul do país são glomerulonefrites, pielonefrites, hipertensão e doenças cardiovasculares, além de diabetes e doenças císticas renais. As doenças renais estão entre as doenças que mais resultam em morte e em incapacidade em diversos países. As técnicas envolvidas no contexto do transplante renal vêm se desenvolvendo ao longo dos anos, ao ponto de atualmente se caracterizarem como procedimentos relativamente comuns, de forma que as taxas de falhas técnicas são muito baixas e a principal barreira para o sucesso do procedimento é a prevenção da rejeição e manutenção do enxerto. Para o sucesso do transplante renal é altamente preconizado que sejam evitadas incompatibilidades HLA, a fim de aprimorar a sobrevivência do enxerto e reduzir a incidência de rejeição aguda e sensibilização às especificidades incompatíveis. O antígeno leucocitário humano HLA-E se expressa em todos os tecidos, em pequenas concentrações, diferentemente de antígenos de classe I clássicos, como HLA-A, HLA-B e HLA-C, e está preferencialmente envolvido na regulação da imunidade inata através da interação com o receptor CD94-NKG2, expressado em abundância, porém sem exclusividade, em células NK que reconhecem HLA-E. No presente estudo, 24 pacientes transplantados renais, 48 pacientes com doença renal crônica e 50 controles saudáveis foram analisados quanto à variabilidade genética do éxon 3 do gene *HLA-E* por sequenciamento. As frequências alélicas e genotípicas foram comparadas entre os três diferentes grupos através da utilização de teste G global ou Qui-Quadrado. As comparações das frequências alélicas entre os três grupos e as comparações dois a dois não revelaram diferenças significativas. Nas comparações das frequências genotípicas, foram observadas diferenças significativas na comparação entre os três grupos ($P= 0,0147$) e nas comparações entre transplantados renais versus renais crônicos e transplantados renais versus controles saudáveis ($P= 0,0085$ e $P= 0,0032$, respectivamente). Futuros estudos são necessários para a ampliação e complementação dos resultados obtidos pelo presente estudo, tendo em vista o pequeno número amostral utilizado assim como para ratificar os resultados de estudos correlatos já publicados.

Palavras-Chave: HLA-E, Transplante Renal, Polimorfismos.

ABSTRACT

In the Southeastern and Southern regions of Brazil, the main diseases that cause kidney failure are glomerulonephritis, pyelonephritis, hypertension and cardiovascular diseases, as well as diabetes and renal cystic diseases. Renal diseases are among the ones that result in death and disability in many countries. The techniques involved in kidney transplantation have been developed over the years, to the point that currently they can be characterized as relatively common procedures, so technical failure rates are very low and the major barrier to the success of the procedure is the prevention and maintenance of graft rejection processes. For success of kidney transplantation HLA mismatches are to be avoided, in order to improve graft survival and reduce the incidence of acute rejection and awareness to incompatible specificities. The human leukocyte antigen HLA-E is expressed in all tissues at low concentrations, differently from class Ia antigens, HLA-A, HLA-B and HLA-C. HLA-E is mainly involved in regulation of innate immunity by interaction with the CD94/NKG2 receptor expressed in abundance, but not exclusively, in NK cells. In this study, 24 kidney transplant patients, 48 patients with chronic kidney disease and 50 healthy controls were analyzed for genetic variability of exon 3 of the *HLA-E* gene by SBT (sequence based typing). Allele and genotype frequencies were compared between the three different groups by the global G test or by the chi-square test. Comparisons of allele frequencies among the three groups and two by two comparisons revealed no significant differences. In the comparisons of genotypic frequencies, significant differences were observed when comparing the three groups ($P = 0.0147$) and in the comparisons of kidney transplant patients versus chronic kidney disease patients and in kidney transplant patients versus healthy controls ($P = 0.0085$ and $P = 0.0032$, respectively). Future studies are necessary to broaden and complement the results observed in the present study, given the small sample size used and to corroborate the results of related studies published elsewhere.

Keywords: HLA-E, Kidney Transplantation, Polymorphisms

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – ESTRUTURA DE UMA MOLÉCULA MHC DE CLASSE I.....	06
FIGURA 2 – ESTRUTURA DE UMA MOLÉCULA MHC DE CLASSE II.....	07
FIGURA 3 – ESTRUTURA DO GENE <i>HLA-E</i>	08
FIGURA 4 – COMPLEXO HLA-E/CD94-NKG2A.....	10
FIGURA 5 – COMPARATIVO DA MEDIANA DA IDADE DOS GRUPOS ESTUDADOS.....	27

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – NÚMERO DE TRANSPLANTES REALIZADOS NO ESTADO DO PARANÁ, DE DOADOR FALECIDO.....	13
TABELA 2 – NÚMERO DE TRANSPLANTES REALIZADOS NO ESTADO DO PARANÁ, DE DOADOR VIVO.....	13
TABELA 3 – DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES TRANSPLANTADOS E SEUS DOADORES.....	28
TABELA 4 – DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE <i>HLA-E</i> NOS GRUPOS ESTUDADOS.....	29
TABELA 5 – DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE <i>HLA-E</i> NOS GRUPOS ESTUDADOS.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SIGLAS

5'UTR – Região 5' não traduzida
(*5' Untranslated Region*)

AMR – Rejeição Mediada por Anticorpos
(*Antibody-Mediated Rejection*)

CD94 – *Cluster of Differentiation 94*

CTS – Estudo Colaborativo de Transplantes
(*Collaborative Transplant Study*)

DNA – Ácido Desoxirribonucleico
(*Deoxyribonucleic Acid*)

dNTP – Desoxirribonucleotídeo

D.O. – Densidade Óptica

DSA – Anticorpos doador-específicos
(*Donor-Specific Antibodies*)

Exo I – Exonuclease I

HLA – Antígeno Leucocitário Humano
(*Human Leukocyte Antigen*)

HUEC – Hospital Universitário Evangélico de Curitiba

IFN – Interferon

Igs – Imunoglobulinas

IMGT – Sistema Internacional de Informação de Imunogenética
(*The International Immunogenetics Information System*)

LIGH – Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade
(*Major Histocompatibility Complex*)

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro
(*Messenger Ribonucleic Acid*)

NK – *Natural Killer*

OR – Razão de Probabilidade
(*Odds Ratio*)

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
(*Polymerase Chain Reaction*)

PCR-SSP – PCR de Primer Único e Específico
(*Single Specific Primer-PCR*)

RDF – Receptor de Doador Falecido

RDV – Receptor de Doador Vivo

SAP – Fosfatase Alcalina de Camarão
(*Shrimp Alkaline Phosphatase*)

SNT – Sistema Nacional de Transplantes

SUS – Sistema Único de Saúde

TCR – Receptor de Células T
(*T Cell Receptor*)

WHO – Organização Mundial de Saúde
(*World Health Organization*)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE (MHC)	3
2.1.1	Moléculas MHC de Classe I	5
2.1.2	Moléculas MHC de Classe II	6
2.2	ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO HUMANO-E: HLA-E	7
2.3	TRANSPLANTE RENAL	12
2.3.1	Incompatibilidade HLA	15
2.3.2	Tipos de Rejeições	17
2.4	TERAPIAS DE IMUNOSSUPRESSÃO PÓS-TRANSPLANTE: CICLOSPORINA VERSUS TACROLIMUS	20
2.5	O TRANSPLANTE RENAL NO BRASIL	21
3	OBJETIVOS	23
4	MATERIAIS E MÉTODOS	24
5	RESULTADOS	27
6	DISCUSSÃO	31
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
8	APÊNDICES	38

1 INTRODUÇÃO

Transplante é a transferência de células, tecidos ou órgãos sólidos entre um doador e um receptor (forma heteróloga) ou do receptor para ele mesmo (forma autóloga), com a intenção de manter a integridade funcional do órgão ou tecido transplantado. O Sistema Nacional de Transplantes (SNT) coordena e regulamenta o Programa Nacional de Transplantes de Órgãos, que provavelmente é um dos maiores programas públicos de transplantes do mundo, com uma logística de alocação de órgãos justa e sem privilégios sociais ou culturais. O número de transplantes cresceu de 920, no ano de 1988 para 4630, no ano de 2010. Em 2011 atingiu o recorde mundial em número de transplantes feitos via Sistema Único de Saúde (SUS), com mais de 23 mil transplantes realizados, tendo o transplante renal um dos maiores índices de crescimento no país (MEDINA-PESTANA *et al.*, 2011; ABTO, 2013).

As técnicas envolvidas no contexto do transplante renal vêm se desenvolvendo ao longo dos anos, ao ponto de atualmente se caracterizar como um procedimento relativamente comum, de forma que as taxas de falhas técnicas são muito baixas e a principal barreira para o sucesso do procedimento é a prevenção da rejeição e manutenção do enxerto. Para o sucesso do transplante renal é altamente preconizado que sejam evitadas incompatibilidades HLA, a fim de aprimorar a sobrevivência do enxerto e reduzir a incidência de rejeição aguda e sensibilização às especificidades incompatíveis. Desta forma, existe um balanço entre os esforços necessários para minimizar as incompatibilidades HLA e a agressividade da abordagem terapêutica imunossupressiva para contrapor a influência do aumento de disparidade HLA. A principal consequência deste último protocolo é o aumento da susceptibilidade para complicações pós-transplante, incluindo infecções e câncer (SHELDON e POULTON, 2006).

As moléculas HLA (antígenos leucocitários humanos) são expressas na superfície de todas as células nucleadas e apresentam papel fundamental na distinção entre o próprio e não-próprio pelo sistema imunológico. Os antígenos HLA são os veículos utilizados para a apresentação de peptídeos na superfície celular.

Determinantes não-próprios apresentados pelos antígenos HLA podem desencadear uma resposta imunológica apropriada através da interação HLA / receptor de célula T. Em humanos, os genes que codificam para os antígenos HLA localizam-se no braço curto do cromossomo 6 (6p21.3), em uma região denominada Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC). Cada indivíduo herda um bloco (haplótipo) de genes HLA altamente polialélicos de sua mãe e seu pai, tornando mínima a chance de dois indivíduos não aparentados terem haplótipos HLA idênticos. Como os antígenos HLA atuam como marcadores de identidade própria e não-própria dentro do sistema imune, qualquer disparidade HLA pode atuar como um estímulo da resposta imunológica. No caso de disparidade HLA em aloenxertos, a resposta é a iniciação de rejeição celular e/ou mediada por anticorpos (SHELDON e POULTON, 2006; LAPERROUSAZ *et al.* 2012).

O antígeno leucocitário humano HLA-E se expressa em todos os tecidos, em pequenas concentrações, diferentemente de antígenos de classe I clássicos, como HLA-A, HLA-B e HLA-C. Assim como outros antígenos de histocompatibilidade, as moléculas HLA-E apresentam peptídeos de vírus, micobactérias, células tumorais e proteínas de choque térmico. Porém, seu papel mais marcante e diferenciado é a apresentação de peptídeos (nonâmeros) derivados de peptídeos sinais de moléculas HLA de classe I. A primeira evidência de que HLA-E estaria envolvido na regulação da imunidade inata deu-se com a demonstração de que o receptor CD94-NKG2 expressado em abundância, porém sem exclusividade, em células NK reconhecia HLA-E. A família NKG2 compreende isoformas inibidoras (2A e 2B) e ativadoras (2C, 2E e 2H), que ao se complexarem a CD94 são capazes de ampliar sinais mediante ligação com HLA-E (ISHITANI *et al.*, 2006; ANTOUN *et al.*, 2008).

O presente estudo teve como objetivo principal ampliar o estudo da variabilidade do gene *HLA-E* em transplantados renais. A principal justificativa para tal é que sua possível participação na resposta imune inata, tanto no contexto dos transplantes quanto nas infecções, é pouco documentada.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE (MHC)

O Complexo Principal de Histocompatibilidade tem como principal função apresentar antígenos próprios e não próprios ao organismo, na forma de pequenos peptídeos, para as células T. Este complexo foi descoberto primariamente em camundongos (de linhagens endogâmicas) como fator determinante no resultado da aceitação ou rejeição de enxertos de pele. Assim, foi visto que o que causava a rejeição de tais enxertos eram os produtos provenientes de um *locus* genético, o MHC (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008).

Existem dois grupos de produtos do MHC, o MHC de classe I e o MHC de classe II. Os antígenos sintetizados endogenamente são apresentados para as células T pelas moléculas MHC de classe I, enquanto antígenos extracelulares, como bactérias, por exemplo, são endocitados e processados dentro da célula e expostos na membrana às células T pelas moléculas MHC de classe II. As moléculas de classe I, ao apresentarem peptídeos de origem citosólica, são reconhecidas por células T CD8, as quais são citolíticas; já as moléculas de classe II ao apresentarem peptídeos de origem extracelular são reconhecidas por células T CD4, as quais são tidas como auxiliares. É importante lembrar que apesar das duas classes de MHC codificarem para proteínas de estruturas diferentes, estas proteínas são homólogas (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008).

Uma das características mais marcantes dos genes do MHC é o fato de serem os genes mais polimórficos do genoma humano. Outra propriedade que vale ressaltar é o fato de que os genes do MHC são expressos de forma co-dominante, o que significa que cada indivíduo vai expressar tanto os alelos herdados do pai quanto os alelos herdados da mãe, simultaneamente. A vantagem desta expressão co-dominante dos genes HLA, que apresentam alta variabilidade, é o maior número de moléculas MHC disponíveis para ligar diferentes peptídeos e apresentá-los às

células T, enquanto a desvantagem se encontra na dificuldade de se localizar outro indivíduo compatível (com os mesmos alelos) na necessidade de um transplante (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008).

O conjunto de alelos do MHC contidos em cada cromossomo é chamado de haplótipo. O MHC nos humanos inclui os *loci* HLA, um grupo de genes que codificam para glicoproteínas que controlam interações célula-a-célula e regulam respostas imunes (ULBRECHT *et al.*, 1999; STRONG *et al.*, 2002). Em humanos, alguns alelos HLA em diferentes *loci* são herdados em conjunto com frequência bem maior do que se espera em uma distribuição aleatória, fenômeno conhecido como desequilíbrio de ligação (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008).

A estrutura geral das moléculas MHC envolve a presença de uma fenda extracelular, na qual ligam-se os peptídeos e é nela que se localizam os resíduos de aminoácidos polimórficos. Além da fenda, seguem domínios semelhantes a imunoglobulinas (Igs), os quais geralmente não são polimórficos e contêm os sítios de ligação para as moléculas CD4 e CD8 das células T e também um domínio transmembrana e um citoplasmático, responsáveis pela ancoragem da molécula à membrana celular. Cada classe de moléculas MHC possui certas características estruturais únicas, possibilitando a sua identificação (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008).

Os genes HLA, tanto os de classe I quanto os de classe II, possuem o mesmo padrão de organização íntron-éxon, onde o primeiro éxon codifica o peptídeo sinal e cada segmento extracelular (com aproximadamente 90 aminoácidos) é codificado por diferentes éxons. As regiões transmembrana e citoplasmática são codificadas por diversos éxons pequenos (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

Existe uma região localizada dentro do MHC, a qual fica entre a região de classe I e a região de classe II, denominada região de classe III. Nela se encontram diversos genes, os quais não codificam para genes MHC de fato, mas sim para componentes do sistema complemento e várias citocinas importantes e envolvidas na resposta imune (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

2.1.1 Moléculas MHC de Classe I

As moléculas de classe I, mostradas na Figura 1, são formadas por duas cadeias: uma cadeia maior e codificada pelo MHC, chamada de α ; e outra cadeia menor ligada não-covalentemente à cadeia α e que não é codificada pelo MHC, chamada de β 2 microglobulina. Os segmentos aminoterminais da cadeia α (α 1 e α 2) interagem entre si para formar a fenda onde o peptídeo é ligado. A região α 3 possui um domínio Ig e é seguida pelos domínios que ancoram a molécula à membrana, além de ser a região da cadeia α que interage com a subunidade β (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008).

A fenda destas moléculas possui as extremidades fechadas, limitando o tamanho dos peptídeos que a ela se ligam a, no máximo, 11 aminoácidos. Pelo fato da fenda ser formada pelas cadeias α 1 e α 2, são nelas que se encontram os pontos de polimorfismo, contribuindo para a variação na ligação com os pequenos peptídeos. Já a cadeia α 3 possui sua sequência bem conservada, uma vez que é responsável pela ligação com o CD8 das células T e também pela interação já citada com a β 2 microglobulina, a qual também é conservada entre as moléculas de classe I (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008).

A estabilidade da ligação entre a região α 3 e β 2 microglobulina depende da ligação do antígeno proteico à fenda, assim como a ligação do antígeno à fenda é estabilizada pela ligação entre α 3 e β 2 microglobulina. Desta forma, apenas as moléculas que estão de fato carregando algum antígeno são mantidas na superfície da célula (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008).

Em humanos, existem moléculas de classe I clássicas (Ia) e não-clássicas (Ib). As clássicas são expressas em maior quantidade e possuem maior número de polimorfismos em sua sequência quando comparadas às não-clássicas. Dentre as clássicas estão descritas HLA-A, -B e -C; e dentre as não-clássicas estão HLA-E, -F e -G (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008).

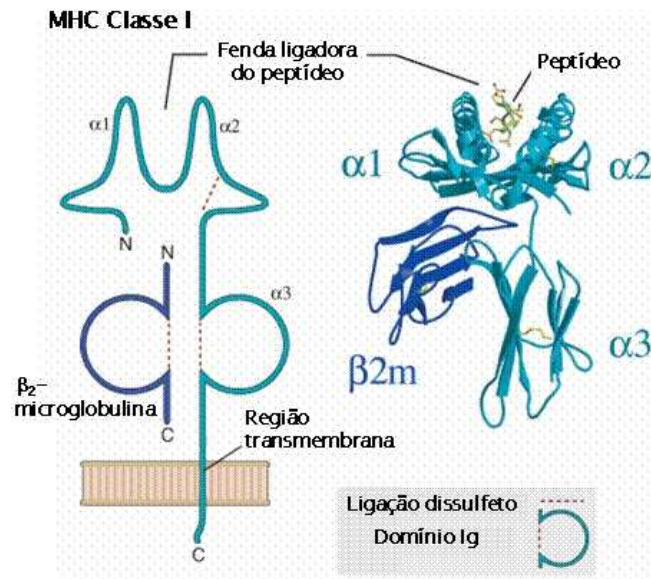


FIGURA 1 – ESTRUTURA DE UMA MOLÉCULA MHC DE CLASSE I (FONTE: ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008).

2.1.2 Moléculas MHC de Classe II

As moléculas de classe II, mostradas na Figura 2, também são formadas por duas cadeias, uma α e uma β , ligadas entre si por ligação não-covalente, sendo que ambas são codificadas pelo MHC. Os segmentos aminoterminais da cadeia α ($\alpha 1$) e β ($\beta 1$) formam a fenda de ligação do peptídeo, e é nessa região que se encontram os resíduos polimórficos, assim como nas moléculas de classe I. A fenda possui suas extremidades abertas, aumentando o limite de tamanho dos peptídeos que se ligam a ela para até 30 aminoácidos. Em humanos, a maior quantidade de polimorfismos das moléculas de classe II se localiza na cadeia β (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008).

As regiões $\alpha 2$ e $\beta 2$ possuem domínios Igs e em geral não têm resíduos polimórficos, sendo assim mais conservadas. O sítio de ligação para o CD4 é no segmento $\beta 2$, e tanto seguindo o segmento $\beta 2$ quanto o $\alpha 2$ se encontram as regiões de ancoragem à membrana (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008).

Da mesma forma que acontece com as moléculas de classe I, só se mantêm expressas na membrana celular as moléculas de classe II que estão de fato carregando um peptídeo em sua fenda (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008).

Em humanos, as moléculas de classe II descritas até então são HLA-DPA, HLA-DPB, HLA-DQA, HLA-DQB, HLA-DRA, HLA-DRB. Um gene DPA codifica para uma cadeia α e um gene DPB codifica para uma cadeia β de uma molécula DP, e o mesmo ocorre para os outros genes acima citados. Normalmente as cadeias α de um determinado *locus* MHC classe II, como o DQ por exemplo, se juntam a cadeias β do mesmo *locus*, sendo raramente observada a junção/união de uma cadeia α de um *locus* à cadeia β de outro *locus* (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008).

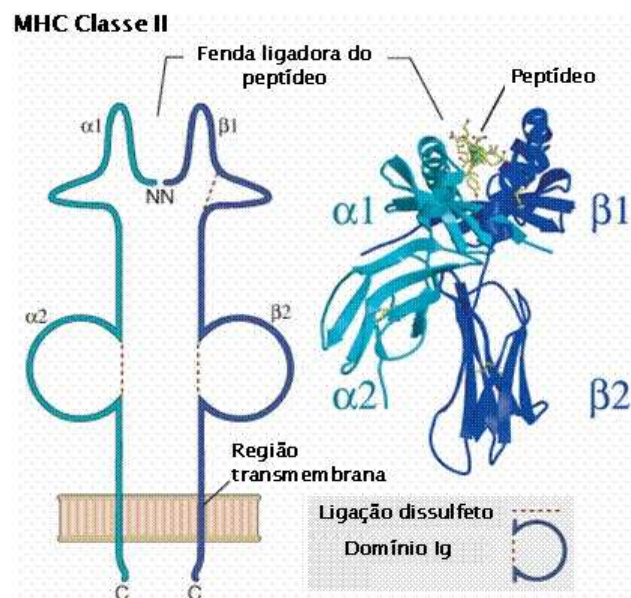


FIGURA 2 – ESTRUTURA DE UMA MOLÉCULA MHC DE CLASSE II (FONTE: ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008).

2.2 ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO HUMANO-E: HLA-E

No final da década de 80, foi identificado um gene *MHC* de classe I distinto daqueles que, até então, haviam sido descritos (*HLA-A*, *-B*, *-C*). Este gene foi nomeado *HLA-E* (KOLLER *et al.*, 1988).

Ao alinhar as sequências do *HLA-E* com os outros genes *HLA* de classe I, foi possível perceber que, apesar da organização de éxons e íntrons ser muito semelhante, claras diferenças eram evidenciadas. Dentre elas está a presença de 3 elementos Alu em *HLA-E* (o primeiro à 5' do códon de iniciação, o segundo presente no íntron 5 e o terceiro na região 3'UTR), a perda de um potenciador na região 5' flanqueadora do gene, a posição dos códons de iniciação e terminação de tradução, e, principalmente, o grande número de substituições de aminoácidos na proteína codificadora de *HLA-E* em posições extremamente conservadas nos genes de *HLA-A*, *-B* e *-C* (Figura 3) (KOLLER *et al.*, 1988).

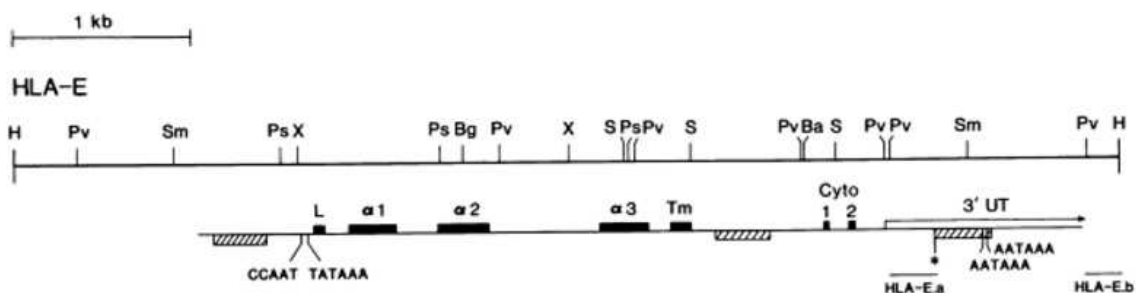


FIGURA 3 – ESTRUTURA DO GENE *HLA-E*: A organização éxon/intron do gene *HLA-E* foi determinada por seqüenciamento de DNA. Os éxons são indicados por barras em relevo e nomeados de acordo com a região da proteína, e que codificam: L = peptídeo líder; $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ = as três regiões extracelulares; Tm = região transmembrana; Cyto 1 e 2 = regiões citoplasmáticas; 3'UT = região 3' não traduzida. Os três elementos ALU em *HLA-E* são indicados por barras listradas inferiores. Os códons de terminação são indicados por (*). O mapa de restrição do gene está apresentado. Os sítios de restrição são indicados como: Ba= BamHI; Bg= BgIII; E= EcoRI; H= HindIII; K= KpnI; Ps= PstI; Pv= PvuII; S= SstI; Sm= Smal; X= XbaI (FONTE: BO DUPONT, 1989).

Apesar da ampla distribuição tecidual de *HLA-E*, os níveis de mRNA encontrados variam muito entre os tecidos e esta variação não está relacionada com a distribuição dos genes *HLA* de classe I clássicos. O maior e mais notável nível foi encontrado em linfócitos T no sangue periférico. Quanto à localização de *HLA-E* no bloco de genes do MHC humano, ele se encontra entre os genes de classe I clássicos *HLA-A* e *HLA-C* (KOLLER *et al.*, 1988).

Aparentemente, assim como para os genes *HLA-A*, *-B* e *-C*, a expressão de *HLA-E* também pode ser induzida por IFN (interferon), uma vez que possui 19 das 23 bases da sequência consenso necessárias, e, dentre estas 19 bases, possui 6 das 7 bases consideradas invariáveis para tanto (KOLLER *et al.*, 1988).

Pode-se dizer que o gene *HLA-E* se apresenta como uma miscelânea dos genes *HLA-A*, *-B* e *-C*, apresentando certas regiões mais parecidas com um e outras com outro. Desta forma, seria possível sugerir uma recombinação não-recíproca, ou até mesmo uma conversão gênica entre *HLA-E* e os outros genes *HLA* de classe I. A taxa de fixação de mutações não é igual para todas as regiões dos genes de classe I, lembrando que a região mais conservada é $\alpha 3$, provavelmente pela necessidade de sua interação com $\beta 2$ -microglobulina (KOLLER *et al.*, 1988).

O alinhamento da sequência de aminoácidos de *HLA-E* com 22 outras sequências de antígenos humanos de classe I, demonstrou que em 52 posições, os resíduos de aminoácidos encontrados em *HLA-E* não são encontrados em nenhum outro antígeno humano de classe I. A maior parte destas substituições é encontrada na região $\alpha 2$. Assim, conclui-se que os resíduos de aminoácidos encontrados em *HLA-E* são únicos desta proteína (KOLLER *et al.*, 1988).

Acredita-se que os genes classe I não clássicos (*HLA-E*, *HLA-F* e *HLA-G*) provavelmente desempenhem um papel especializado na resposta imune. É importante ressaltar que estes genes são distinguidos dos genes de classe I clássicos pelo nível de expressão, como por exemplo, o gene *HLA-E*, o qual é expresso de forma ubíqua (em todos os tecidos), mas em níveis relativos bem menores (ULBRECHT *et al.*, 1999; STRONG *et al.*, 2002).

Dentre os genes não-clássicos, a função da molécula *HLA-E* foi a mais bem elucidada, através da sua interação com os receptores CD94-NKG2 (Figura 4). A CD94 é uma glicoproteína encontrada em células NK e em um subtipo de células T, e forma um heterodímero com as glicoproteínas da família NKG2 (A, B, C, E ou H; sendo A e B isoformas inibitórias; e C, E e H ativadoras). A interação com estes heterodímeros pode aumentar, inibir ou não ter efeito na citotoxicidade mediada por células NK e na produção de citocinas (ULBRECHT *et al.*, 1999; STRONG *et al.*, 2002).

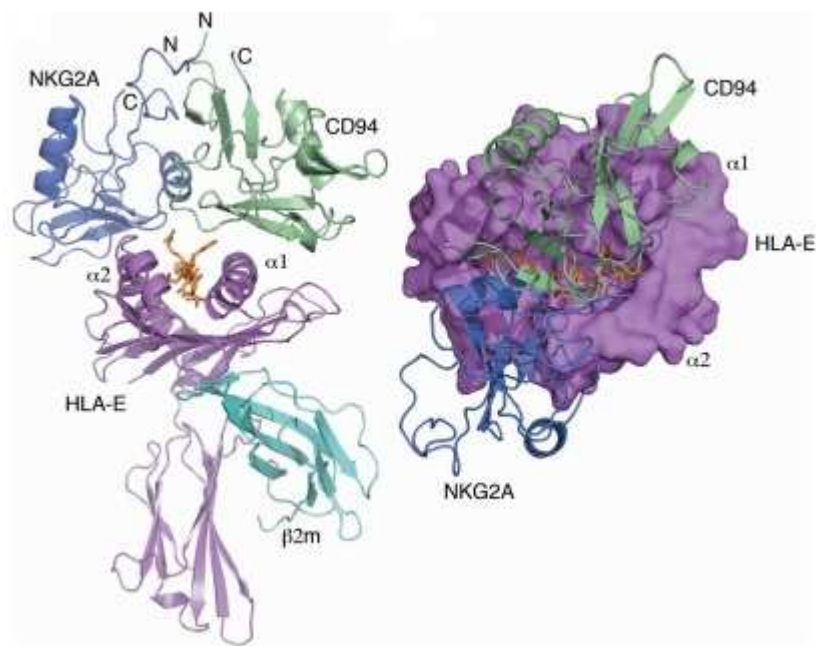


FIGURA 4 - COMPLEXO HLA-E/CD94-NKG2A: NKG2A está representado em azul, enquanto CD94 está em verde; a cadeia pesada de HLA-E está representada em roxo e a $\beta 2$ microglobulina em ciano; em laranja está o peptídeo. A imagem do complexo à esquerda é a visão lateral, enquanto a da direita é a visão de cima do mesmo (FONTE: PETRIE *et al.*, 2008).

A expressão de HLA-E na superfície celular depende da disponibilidade de algum dos diversos tipos de peptídeos (nonâmeros) conservados provenientes da sequência sinal de outras moléculas classe I disponíveis, incluindo HLA-A, -B, -C e -G. Havendo a disponibilidade de algum peptídeo deste tipo, o complexo HLA-E/peptídeo estará pronto para interagir com o heterodímero CD94-NKG2, mas a interação é afetada pelo nonâmero disponível ligado ao HLA-E (ULBRECHT *et al.*, 1999; STRONG *et al.*, 2002).

As moléculas não-clássicas estão sujeitas a uma pressão seletiva diferente da pressão das moléculas clássicas, e por isso exibem menor número de polimorfismos em suas sequências, ao contrário do que ocorre nas moléculas HLA Ia. Desta forma, o gene *HLA-E* possui um número pequeno de alelos descritos, onde dois destes alelos, *E*01:01* e *E*01:03*, que são mais frequentemente observados em diferentes populações, são diferenciados por apresentarem ou arginina ou glicina na posição 107 da estrutura da proteína (domínio $\alpha 2$), respectivamente. Ambos os alelos são encontrados com frequências praticamente iguais dentre as diversas populações, o que sugere a possível ação de seleção balanceadora em HLA-E para a manutenção

desses dois alelos. Porém, este tipo de seleção implica na existência de diferenças funcionais entre esses dois alelos (ULBRECHT *et al.*, 1999; STRONG *et al.*, 2002).

Funcionalmente é observado um maior nível de expressão do alelo *E*01:03* em células humanas transfectadas em camundongos quando comparado ao alelo *E*01:01*, independente do tipo de peptídeo ligado. Essa observação foi confirmada por uma análise comparativa dos níveis de expressão de *HLA-E* em células normais, o que depende em certo nível das sequências sinais (peptídeo sinal) dos genes de classe I disponíveis, sendo o alelo *E*01:03* expresso em níveis significativamente maiores (ULBRECHT *et al.*, 1999; STRONG *et al.*, 2002).

Como um dos requisitos necessários para o dobramento de uma molécula classe I funcional, o peptídeo possui a habilidade de alterar a formação do complexo através da energia de ligação disponível por meio da sua interação com a cadeia pesada, para estabilizar o dobramento desta molécula. Assim, a afinidade por peptídeos é indiretamente refletida na eficiência de dobramento do complexo. A afinidade relativa da cadeia pesada do alelo *E*01:03* por peptídeos é intensamente maior do que a do alelo *E*01:01*. Porém, estruturalmente, a plataforma de ligação de *HLA-E* com o peptídeo (domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$) se mostrou essencialmente igual dentro do rigor das análises, mesmo considerando os diferentes alelos e os diversos tipos de peptídeos disponíveis. Desta forma, a estrutura não fornece uma explicação para a diferença de estabilidade entre os dois alelos (ULBRECHT *et al.*, 1999; STRONG *et al.*, 2002).

A qualidade relativa do ajuste do peptídeo dentro da fenda de ligação é bem correlacionada com as diferenças na estabilidade térmica e com os níveis de expressão na superfície celular mensurados nos complexos *HLA-E* com diferentes peptídeos. Sendo assim, cada alelo demonstra afinidades distintas com peptídeos distintos, de forma que se correlacione com as diferenças na estabilidade dos alelos. Apesar de todas estas diferenças entre os alelos do gene *HLA-E*, além de não alterar a estrutura da molécula, a substituição de glicina por arginina (ou vice-versa) na posição 107 não interfere na interação entre *HLA-E* e o heterodímero CD94/NKG2 (ULBRECHT *et al.*, 1999; STRONG *et al.*, 2002).

O nível de seleção atuante sobre o *locus HLA-E* para balancear esses alelos na população não está bem claro, porém duas possibilidades podem ser

consideradas. Em um estudo realizado por Li *et al.* em 2001, foi constatado que peptídeos derivados de TCR podem ser ligados e apresentados por HLA-E, e, conseqüentemente a probabilidade de que estes peptídeos apontem para uma ligação diferencial entre os dois alelos de *HLA-E* se mostra plausível. Em outro estudo, evidências de que peptídeos derivados de patógenos podem ser apresentados por HLA-E, tornam possível imaginar que a seleção para a manutenção de ambos os alelos possa estar agindo a nível de regulação em células T periféricas, a nível de reconhecimento imune mediado por patógenos, ou em ambos os níveis (ULBRECHT *et al.*, 1998; ULBRECHT *et al.*, 1999; STRONG *et al.*, 2002).

Quanto à sua função na resposta imune inata e adaptativa sabe-se que, apesar da natureza inflexível da cadeia pesada e da restrição observada na fenda de ligação com o peptídeo, a molécula HLA-E atua como um ligante presente em ambos os sistemas, capaz de produzir respostas inibitórias através da interação com CD94-NKG2A, assim como respostas ativadoras através da interação com CD94-NKG2C e TCR. Em casos de infecções virais, o balanço entre sinais inibitórios e ativadores pode ser alterado. Portanto, qualquer imunoterapia visando à modulação da resposta imune via HLA-E deve atentar à complexa interação destes sinais para que a mesma seja efetiva (SULLIVAN *et al.*, 2008).

2.3 TRANSPLANTE RENAL

A era moderna dos transplantes renais começou em 1960, com a introdução da azatioprina (fármaco imunossupressor). Dentro de poucos anos, a importância da compatibilidade sanguínea e HLA foi reconhecida e como consequência muitos transplantes foram vetados (HIGGINS *et al.*, 2014).

Nos anos seguintes, a rejeição mediada por linfócitos T tornou-se alvo de investigação, o que resultou na eliminação da maioria das perdas de enxertos dadas por esta causa. Recentemente, as terapias necessárias para a prevenção da rejeição mediada por células T são relativamente simples. Desta forma,

principalmente nos últimos 10 anos, o foco tanto de clínicos, quanto de cientistas e da indústria, passou a ser o desenvolvimento de novos tratamentos para evitar as rejeições mediadas por anticorpos (do inglês, *antibody-mediated rejection: AMR*) (HIGGINS *et al.*, 2014).

Em um levantamento realizado pela Secretaria de Estado da Saúde do Estado do Paraná através da Central Estadual de Transplantes, foram observados dados de doações efetuadas no período de janeiro de 2011 até setembro de 2015. Desta forma, foi possível visualizar a diferença na quantidade de transplantes realizados a partir de órgãos provenientes de doadores falecidos e de doadores vivos, além da proporção de transplantes renais dentro do total de transplantes de órgãos e tecidos efetuados no Estado (Tabela 1 e Tabela 2).

TABELA 1 - Número de transplantes renais realizados no estado do Paraná, de doador falecido, nos anos de 2011, 2012, 2013, 2014 e de janeiro à setembro do ano de 2015, e número total de transplantes de órgãos sólidos realizados no mesmo período.

	2011	2012	2013	2014	2015	Total
Rins	147	207	240	196	238	1028
Total	235	316	362	306	369	1588

Adaptado de: Dados de Doações e Transplantes (2011, 2012, 2013, 2014 e 2015) - Central Estadual de Transplantes do Paraná.

TABELA 2 - Número de transplantes renais realizados no estado do Paraná, de doador vivo, nos anos de 2011, 2012, 2013, 2014 e de janeiro à setembro do ano de 2015, e número total de transplantes de órgãos sólidos realizados no mesmo período.

	2011	2012	2013	2014	2015*	Total
Rins	215	175	174	178	114	856
Total	427	389	412	394	272	1894

Adaptado de: Dados de Doações e Transplantes (2011, 2012, 2013, 2014 e 2015) - Central Estadual de Transplantes do Paraná.

A partir destes dados, nota-se que, apesar do grande número de transplantes renais provenientes de doadores vivos, as doações realizadas a partir de doadores falecidos são mais representativas. É possível ainda, observar que o transplante de

tecido renal é o mais efetuado frente ao total geral de transplantes no Estado, ao considerar apenas as doações a partir de doadores cadáveres.

Em um estudo realizado no Brasil, foi demonstrado que as principais doenças causadoras de insuficiência renal nas regiões sudeste e sul do país são glomerulonefrites, pielonefrites, hipertensão e doenças cardiovasculares, além de diabetes e doenças císticas renais (GUERRA JUNIOR *et al.*, 2010).

As doenças renais estão entre as doenças que mais resultam em morte e em incapacidade em diversos países. As enfermidades renais mais graves podem ser divididas em duas categorias: insuficiência renal aguda e insuficiência renal crônica. No caso da aguda, os rins subitamente param de funcionar por completo ou quase por completo. Na crônica, ocorre a perda progressiva da função de um grande número de néfrons, a ponto de diminuir aos poucos a função renal como um todo (GUYTON e HALL, 2002).

Existem três possíveis causas gerais da insuficiência renal aguda: diminuição de suprimento sanguíneo para os rins, anormalidades do próprio rim, e obstruções do sistema coletor urinário. Nesta última, vale ressaltar que os principais agentes causadores de obstruções fora dos rins são os cálculos renais, compostos por cálcio, uratos ou cistina. Quando a insuficiência aguda é moderada, seu principal efeito se encontra na retenção de água no sangue e no líquido extracelular, enquanto que na insuficiência aguda grave, o principal efeito é a anúria completa (ausência de urina) (GUYTON e HALL, 2002).

Na insuficiência renal crônica, não aparecem sintomas clínicos graves antes da depleção de, pelo menos, 70% de néfrons funcionais. Existe uma ampla variedade de enfermidades que podem levar a insuficiência crônica, sendo o resultado final semelhante: a diminuição no número de néfrons funcionais. Dentre as possíveis doenças causadoras deste tipo de insuficiência, se encontram a glomerulonefrite e a pielonefrite. A glomerulonefrite crônica pode ser causada por qualquer doença que provoque inflamação ou lesão das alças capilares nos glomérulos dos rins. É uma doença lentamente progressiva, começando na maioria dos casos com o acúmulo de complexos antígeno-anticorpo precipitados na membrana glomerular, tendo como consequência inflamações, espessamento da membrana e invasão do glomérulo por tecido fibroso, tornando-os incapazes de

filtrar líquidos. Já a pielonefrite é uma lesão intersticial renal causada por infecção bacteriana. As bactérias podem atingir os rins através da corrente sanguínea ou ao ascenderem a partir do trato urinário inferior. A pielonefrite é iniciada na medula renal, afetando sua função e comprometendo a capacidade de concentrar a urina. Se a duração desta doença for prolongada, a lesão por ela causada não se limitará apenas aos glomérulos, e atingirá outras estruturas renais, podendo ocasionar a perda de grande parte do tecido renal funcional levando a insuficiência renal crônica (GUYTON e HALL, 2002).

2.3.1 Incompatibilidade HLA

Anticorpos direcionados contra enxertos têm sido reconhecidos como uma grande barreira, a qual dificulta o melhoramento ao acesso de pacientes ao transplante e a sobrevivência do aloenxerto pós-transplante (HIGGINS *et al.*, 2014).

Anticorpos HLA doador-específicos (do inglês, *donor-specific HLA antibodies*: DSA) podem ser pré-formados ou desenvolvidos *de novo* após um transplante. Transplantes realizados na presença de anticorpos HLA pré-formados (HLA incompatível) podem ter resultados aceitáveis, quando o enxerto é extraído de doador vivo, mas para tanto, é imprescindível que a prova cruzada da citotoxicidade dependente do complemento, feita na avaliação pré-transplante, tenha apresentado resultado negativo (HIGGINS *et al.*, 2011). Entretanto, não basta simplesmente realizar o transplante com prova cruzada negativa, sem saber quais são os anticorpos HLA pré-formados. Assim, em casos de altos níveis de DSA, a remoção de anticorpos e a indução à imunossupressão são de extrema importância (HIGGINS *et al.*, 2014; GUPTA *et al.*, 2008).

Transplantes feitos com anticorpos HLA pré-formados, apresentam melhores resultados a partir de doadores vivos, uma vez que há tempo para a remoção efetiva de anticorpos, e também pelo fato do enxerto estar mais “preparado” para lidar com o ataque de anticorpos logo após o transplante (HIGGINS *et al.*, 2014; HIGGINS *et al.*, 2011).

Em alguns países são realizados transplantes com incompatibilidade sanguínea ABO. No Japão, este tipo de transplante tem apresentado resultados tão bons quanto em transplantes ABO compatíveis. Já no Reino Unido e nos Estados Unidos, os resultados são opostos, sendo que os transplantes renais ABO incompatíveis parecem ter aumentado o risco de rejeição aguda (HIGGINS *et al.*, 2014).

Com a melhora nos protocolos de imunossupressão, iniciou-se um extenso debate sobre a avaliação da compatibilidade HLA versus o tempo de isquemia fria para o direcionamento do enxerto. Em um estudo realizando essa avaliação logística, onde um rim foi transplantado dentro de uma mesma cidade (localmente) e outro foi enviado para outra cidade, foi verificado que o transporte de rins provenientes de doadores falecidos estava relacionado com um maior risco de falha do enxerto durante o primeiro ano pós-transplante. Este pode ser considerado um argumento contra o compartilhamento de rins entre centros de transplantes visando atingir a melhor compatibilidade HLA possível (MANGE *et al.*, 2001; SÜSAL e OPELZ, 2013).

Dentre estudos adicionais que foram realizados para avaliar compatibilidade HLA e logística, resultados obtidos pelo CTS (do inglês, *Collaborative Transplant Study*), apontaram que um menor tempo de isquemia fria do enxerto não anula o efeito da incompatibilidade HLA. Estes achados sugerem que a troca da importância da compatibilidade HLA em função de se conseguir um menor tempo de isquemia do enxerto pode ser perigosa e contra-indicada (SÜSAL e OPELZ, 2013).

Devido à necessidade de terapias de imunossupressão e de anti-rejeição mais potentes, pode-se esperar que a incompatibilidade HLA tenha alguma relação com um maior risco de infecções. Em um estudo de associação avaliada pelo CTS, a incompatibilidade HLA se mostrou significativamente relacionada com óbitos, apesar de o enxerto estar funcionando, em função de infecções ou doenças cardiovasculares (SÜSAL e OPELZ, 2013; OPELZ e DÖHLER, 2012).

Doações de rins a partir de doadores vivos resultam em melhores taxas de sobrevivência de enxertos pouco compatíveis do que aquelas provenientes de doadores falecidos e com enxertos compatíveis. É importante ressaltar que mesmo em transplantes envolvendo doadores vivos, a compatibilidade HLA é relevante, pois

um transplante renal a partir de um doador vivo para um irmão HLA-idêntico possui uma melhor sobrevivência do enxerto do que em um transplante nas mesmas condições para um irmão HLA- haploidêntico (SÜSAL e OPELZ, 2013). Como os genes *HLA* são herdados “em blocos” denominados haplótipos (um haplótipo materno e outro paterno), são considerados HLA-idênticos os indivíduos que herdaram de seus pais exatamente os mesmos haplótipos, cujos alelos são idênticos para todos os genes HLA, enquanto indivíduos HLA-haploidênticos são aqueles que possuem apenas um haplótipo, dos dois blocos possíveis, idêntico.

Apesar de, no geral, as taxas de sobrevivência de enxerto terem melhorado muito nos últimos 25 anos, a sensibilização do receptor com relação às células B (anticorpos) ainda representa uma das principais barreiras nos transplantes renais. Rejeições humorais prematuras ou tardias mediadas por células B normalmente levam a danos renais, os quais podem resultar em rejeição crônica (SÜSAL e OPELZ, 2013).

2.3.2 Tipos de Rejeições

A rejeição mediada por anticorpos (AMR) é a principal causa de lesões em aloenxertos renais. Sabe-se que anticorpos HLA doador-específicos (DSA) pré-formados ou *de novo* podem causar tipos comuns de rejeição, como AMR crônica ou AMR aguda (BARTEL *et al.*, 2011; TERASAKI, 2003; COLVIN, 2007). A AMR normalmente tem um prognóstico pior e requer uma terapia diferente daquela utilizada na rejeição aguda mediada por células T (COLVIN, 2007).

O diagnóstico de AMR aguda ou crônica, de acordo com a classificação de Banff (Apêndice 1), se baseia na presença de critérios morfológicos distintos, além de critérios diagnósticos imunohistológicos e/ou sorológicos. Antígenos HLA são considerados alvos primários de rejeição (BARTEL *et al.*, 2011).

2.3.2.1 Rejeição Aguda

A rejeição aguda caracteriza-se pela presença de lesões vasculares e parenquimatosas causadas pela reação de células T e anticorpos contra o enxerto, sendo iniciada, normalmente, depois da primeira semana pós-transplante. É diferenciada da rejeição hiperaguda uma vez que a segunda é reconhecida pela formação de trombos nos vasos do enxerto minutos ou horas após o contato dos vasos sanguíneos do enxerto e do doador, sendo causada por anticorpos pré-formados do receptor que se ligam a antígenos presentes no endotélio do doador (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008).

É amplamente conhecido que a pré-sensibilização iniciada por um transplante prévio, gestações e/ou transfusões sanguíneas representam o principal fator de risco ao desenvolvimento de rejeição aguda (TERASAKI, 2003; GUPTA *et al.*, 2008). Para lidar com este tipo de rejeição, diversas estratégias foram implementadas e se provaram eficientes no tratamento de AMR aguda, enquanto a AMR crônica continua sendo um desafio terapêutico (BARTEL *et al.*, 2011).

Uma variedade de protocolos de tratamentos anti-humorais tem se mostrado efetiva na reversão de quadros de AMR aguda. A maioria dos protocolos publicados é baseada na aplicação de uma série de terapias de aférese (plasmaférese e imunoadsorção) para diminuir a quantidade de aloantígenos circulantes, havendo um forte indício do papel de terapias extracorporais na depleção de anticorpos como algo significativo no tratamento de rejeição aguda (BARTEL *et al.*, 2011; LEFAUCHEUR *et al.*, 2009).

Outros estudos sugerem a eficiência de altas doses de imunoglobulina intravenosa no tratamento de rejeições, uma vez que foi observada redução efetiva nos níveis de anticorpos anti-HLA e a reversão no quadro de rejeição após a aplicação das altas doses (BARTEL *et al.*, 2011; JORDAN *et al.*, 1998).

Apesar da necessidade de estudos complementares para confirmação, novos dados demonstram que a inibição da ativação do sistema complemento pode ser

efetiva na prevenção ou reversão em episódios de AMR aguda (BARTEL *et al.*, 2011).

2.3.2.2 Rejeição Crônica

A rejeição crônica é definida por fibrose e anormalidades vasculares, as quais podem representar reações de hipersensibilidade tardia crônica nas paredes dos vasos (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008).

Os resultados frente à possibilidade de uma resposta crônica devido a uma nova produção de anticorpos anti-HLA ou a uma produção persistente de DSA pré-formados são menos encorajadores (HIGGINS *et al.*, 2014). Apesar disso, alguns estudos demonstraram níveis persistentes de DSA seguido de desensibilizações e transplantes realizados com sucesso, o que é controverso levando em consideração a sua reatividade pós-transplante já comprovada (BARTEL *et al.*, 2011; BARTEL *et al.*, 2010; GLOOR *et al.* 2004).

A rejeição crônica mediada por anticorpos (do inglês, *chronic antibody-mediated rejection: CAMR*) não é atribuída aos anticorpos ABO. Desta forma, pode-se afirmar que há diferença entre transplantes ABO incompatíveis e transplantes HLA incompatíveis. E quando há rejeição crônica em enxertos ABO incompatíveis, ela parece ser causada pela simultânea presença de anticorpos HLA (HIGGINS *et al.*, 2014).

A relevância clínica da rejeição crônica é demonstrada por estudos que sugerem o papel de lesões mediadas por anticorpos como principal causa da perda do aloenxerto renal em longo prazo (BARTEL *et al.*, 2011; EINECKE *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2002).

Nos últimos anos, tornou-se evidente que a rejeição crônica representa a principal causa de lesões em aloenxertos e perdas em transplantes. Os estudos acerca deste tipo de rejeição são limitados pelo pequeno número amostral, sendo

necessário um maior número para a comprovação da eficiência dos protocolos de tratamento (BARTEL *et al.*, 2011).

2.4 TERAPIAS DE IMUNOSSUPRESSÃO PÓS-TRANSPLANTE: CICLOSPORINA VERSUS TACROLIMUS

No Brasil, existem protocolos de medicamentos recomendados para a manutenção do transplante renal, e estes medicamentos são liberados para os pacientes nestas circunstâncias pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Os protocolos mais comuns envolvem ciclosporina junto à azatioprina e corticosteroides, sendo que a azatioprina pode ser substituída por micofenolato mofetil ou sirolimus, e a ciclosporina pode ser substituída pelo tacrolimus (GUERRA JUNIOR *et al.*, 2010).

Como os medicamentos são oferecidos pela saúde pública aos pacientes, os gastos com remédios e procedimentos aos quais cada paciente é submetido são levados em consideração. Para tal, foi realizado um estudo avaliando os protocolos de imunossupressão, dividindo os pacientes em dois grupos: aqueles que tiveram protocolos com combinações envolvendo a ciclosporina e sem ter em momento algum o uso do tacrolimus, e aqueles que tiveram protocolos com combinações envolvendo o tacrolimus sem ter em momento algum o uso da ciclosporina. Desta forma tornou-se possível avaliar qual dos medicamentos teria o melhor custo-benefício (GUERRA JUNIOR *et al.*, 2010).

Quanto ao custo dos medicamentos exclusivamente, os pacientes tratados com tacrolimus exibiram um gasto (mediano total) maior durante o acompanhamento quando comparados aos pacientes tratados com ciclosporina, independentemente do tipo de doador (vivo ou falecido). Foi observado também que no grupo dos pacientes tratados com tacrolimus houve um maior gasto hospitalar por paciente, enquanto que no grupo da ciclosporina o que chamou atenção foi um maior gasto com outros medicamentos imunossupressores utilizados simultaneamente, o que não foi necessário no grupo do tacrolimus (GUERRA JUNIOR *et al.*, 2010).

Não há disponível na literatura confirmação das vantagens imunossupressoras do tacrolimus, apesar de ser apresentado como uma inovação terapêutica melhor que a ciclosporina e, por isso, ser mais caro. O fato é que ambos podem beneficiar o paciente da mesma forma: reduzindo a chance de quadros de rejeição aguda (GUERRA JUNIOR *et al.*, 2010).

2.5 O TRANSPLANTE RENAL NO BRASIL

A insuficiência renal crônica é a principal causa da necessidade de transplantes renais no Brasil, os quais começaram a ser realizados na década de 60. O transplante renal é tido como o procedimento mais efetivo para os pacientes com doença renal crônica no país, já que possibilita uma melhor qualidade e maior expectativa de vida ao paciente. A maioria dos pacientes submetidos a transplante renal é do sexo masculino (GUERRA JUNIOR *et al.*, 2010; ALBUQUERQUE *et al.*, 2010).

Grande parte dos transplantes realizados na região nordeste do Brasil são de enxertos provenientes de doadores cadáveres, apesar de o número de doadores vivos, em geral, parentes dos pacientes, não ser baixo (ALBUQUERQUE *et al.*, 2010). Já nas regiões Sudeste e Sul do país, o tipo de transplante mais comum é de doadores vivos (GUERRA JUNIOR *et al.*, 2010). As vantagens de se receber um enxerto de doadores vivos são inúmeras, dentre elas estão o maior tempo de sobrevida tanto do órgão/tecido doado quanto do paciente receptor, além do menor tempo de isquemia fria do enxerto que, uma vez retirado do corpo do doador, já é transplantado para o paciente.

Na literatura existem alguns estudos de associação envolvendo a variabilidade genética de *HLA-E* e variáveis preditivas (tempo livre de doença, sobrevida do enxerto e do paciente, por exemplo) do resultado do transplante, porém nenhum estudo no contexto do transplante renal (TAMOUZA *et al.*, 2006; LUDAJIC *et al.*, 2009; DANZER *et al.*, 2009; RAVINDRANATH *et al.*, 2011;

HOSSEINI *et al.*, 2013; PABÓN *et al.*, 2014; MOSSALLAN *et al.*, 2015). Portanto, a investigação da variabilidade genética deste gene no contexto do transplante renal se mostra de extrema importância, tendo em vista o fato de provavelmente haver expressão de *HLA-E* no tecido renal, uma vez que estudos determinaram que o mesmo possui expressão ubíqua. Além disso, outros estudos afirmam a existência de uma possível influência do genótipo de *HLA-E* no resultado do transplante de medula óssea, sendo o genótipo *E*01:03*01:03* considerado benéfico. Desta forma, se já existem estudos envolvendo os genes *HLA* clássicos no transplante renal, não há motivo para excluir os genes não-clássicos deste tipo de estudo.

3 OBJETIVOS

Determinar os genótipos de *HLA-E* em pacientes transplantados renais, pacientes com doença renal crônica e controles saudáveis;

Estimar e comparar as frequências alélicas e genotípicas de *HLA-E* observadas no grupo paciente (transplantados renais e renais crônicos) e grupo controle;

Comparar os resultados obtidos pelo presente estudo com dados disponíveis na literatura.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado um estudo caso-controle, composto por uma amostra de 24 pacientes transplantados renais recrutados no Hospital Universitário Evangélico de Curitiba (HUEC). Todos estes indivíduos participantes assinaram o termo de consentimento. Os dados clínicos de todos os recrutados foram separados entre receptores de doadores vivos (RDV) e receptores de doadores falecidos (RDF), e incluíam: idade e gênero de receptores e doadores, peso, altura, hábito de fumar, número de gestações anteriores e filhos para as pacientes mulheres, tipagem sanguínea e Fator Rh, transfusões sanguíneas anteriores, transplantes prévios, diálise e duração pré-transplante, terapia de imunossupressão adotada, rejeição aguda presumida e doenças de base.

A amostra de pacientes com doença renal crônica foi constituída por 50 indivíduos.

A amostra controle foi constituída por 48 indivíduos saudáveis não relacionados aos pacientes (sem nenhum parentesco). Estas amostras foram selecionadas atendendo a critérios de mesmo grupo étnico, etário e sócio-econômico da amostra paciente.

O estudo contou com a aprovação do Comitê de Ética (Protocolo CEP-Sociedade Evangélica Beneficente de Curitiba - Parecer 253.540) de consentimento para participação do estudo e para a coleta de sangue periférico. A realização da pesquisa e demais análises foram conduzidas no LIGH (Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade) do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná.

A extração das amostras foi realizada através do método “*salting-out*”, que possibilita a obtenção de DNA de alto peso molecular e consiste, basicamente, no rompimento mecânico e/ou enzimático dos tecidos, extração das proteínas e ácidos graxos pela ação de solventes orgânicos e precipitação do DNA com etanol (JOHN et al., 1990, modificado por LAHIRI e NURNBERGER Jr, 1991). A concentração de DNA das amostras foi quantificada pela leitura da densidade ótica (D.O.), utilizando-

se o espectrofotômetro Nanodrop. A diluição das amostras foi feita utilizando-se água Mili-Q, até a obtenção da concentração desejada para a PCR.

Após a diluição das amostras, foi realizada a amplificação dos éxons 2 a 3 pela metodologia de PCR-SSP resultando em um produto de 985 pares de base, que foi elaborada através da metodologia proposta por ANTOUN *et al.*, 2008 e COOK *et al.*, 2003 com pequenas modificações. Para a PCR foram utilizados os seguintes *primers*:

Forward: 5' GGGGTCGGGATGGAAACGGC 3'

Reverse: 5' TGAGGTCTGTCAGCTGTGGG 3'

O volume total de reação foi de 25µL consistindo em 1X PCR tampão (70mM Tris-HCl pH8.8, 20 mM (NH₄)₂SO₄), 1,4 mM MgCl₂, 0,45 mM de cada dNTPs, 2,25 unidades de Taq DNA-polymerase Platinum (Invitrogen, Carlshad, CA), 50 ng de DNA genômico, e 10 pMol de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores acima citados. O ciclo inicial de denaturação foi conduzido a 94 °C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30s, 68°C durante 30s e 72°C por 1 minuto, e uma etapa de extensão final a 72°C durante 7 minutos.

Após a amplificação, o produto de PCR foi purificado com Exonuclease I (Exo I) e Fosfatase Alcalina de Camarão (SAP), conforme protocolo abaixo, para isolar os fragmentos de PCR: Produto de PCR 6,0 µl, 1 µl de Exo I 10U, 2 µl de SAP 2U e 1 µl Tampão SAP 4X. O ciclo inicial da purificação foi conduzido a 37°C por 1 hora, seguido de um novo ciclo a 85°C durante 15 minutos para inativar a atividade da exonuclease.

O produto purificado correspondente aos éxons 2 e 3 de HLA-E foi sequenciado usando o Kit Big Dye Terminator 3.1 (Applied Biosystems) e o sequenciador ABI PRISM 3130 Analisador Genético (Applied Biosystems, CA, USA). Os *primers* utilizados durante a reação de sequenciamento foram os mesmos que foram utilizados na reação de PCR (*forward* e *reverse*).

Os dados do sequenciamento obtidos para os éxons 2 e 3 foram visualizados com a ajuda do software Sequencing Analysis (Applied Biosystems). Cada amostra foi alinhada com as sequências genômicas de alelos oficiais (reconhecidos pela WHO e pelo Sistema de Informação Internacional de Imunogenética – IMGT) e cada polimorfismo único de nucleotídeos (SNP) detectado foi individualmente anotado.

Deste modo será possível identificar os dois alelos presentes em cada indivíduo. Após esta etapa os dados foram analisados estatisticamente.

Com relação à análise estatística, as frequências genóticas foram obtidas por contagem direta e comparadas com as frequências esperadas, segundo o Teorema de Hardy-Weinberg, com o auxílio do programa ARLEQUIN 3.1, que utiliza o método de Guo e Thompson (1992). As frequências alélicas e genóticas foram comparadas entre os grupos pelo método de χ^2 (qui-quadrado) ou teste G com o uso do programa gratuito BioEstat. Para as comparações com resultados significativos ($P < 0,05$), valores de Odds Ratio (OR) com Intervalo de Confiança de 95% com auxílio do método de Woolf, (1955) foram calculados. Foram consideradas significativas as associações com $P \leq 0,05$ e como próximas ao limiar de significância (tendência) os valores de $P > 0,05$ e $\leq 0,10$. O Odds Ratio (OR) é uma razão de probabilidade muito próxima ao risco relativo que exprime quantas vezes o caráter em estudo é mais frequente entre portadores de um determinado fator (um alelo específico do gene HLA-E, por exemplo) do que entre aqueles que não possuem o mesmo fator.

5 RESULTADOS

No grupo dos pacientes transplantados, a mediana da idade foi igual à 49 anos e no grupo dos pacientes com doença renal crônica, a mediana apresentou valor igual à 50 anos. Já no grupo controle, a mediana da idade foi igual à 29 anos. Na Figura 5, está graficamente apresentado o comparativo da mediana da idade dos pacientes transplantados, pacientes renais crônicos e controles.

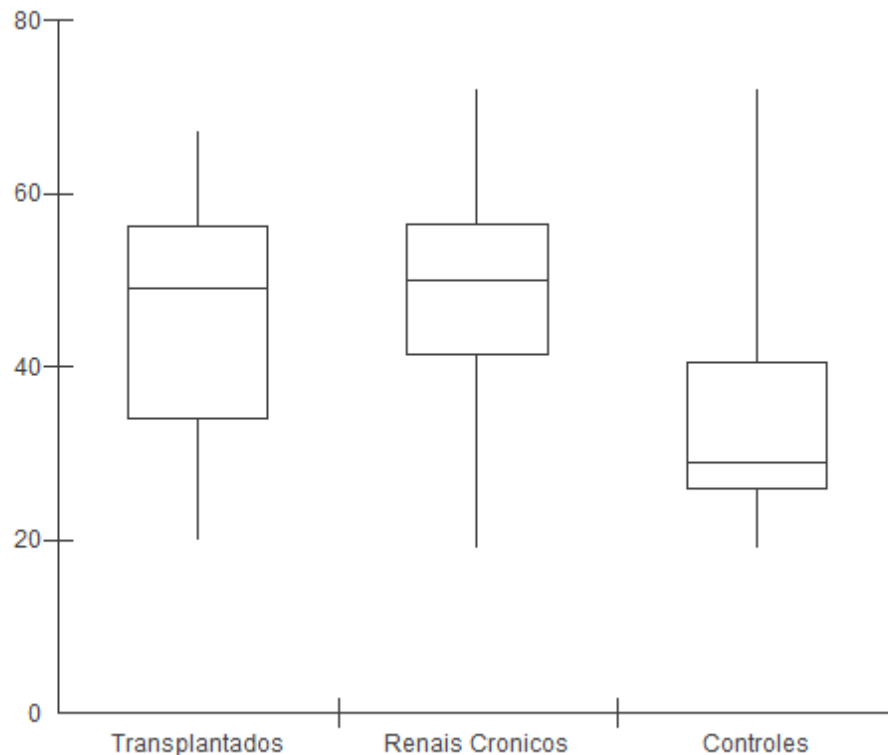


FIGURA 5 – COMPARATIVO DA MEDIANA DA IDADE DE 24 PACIENTES TRANSPLANTADOS, 48 PACIENTES RENAI CRÔNICOS, E 50 CONTROLES SAUDÁVEIS. A idade está apresentada em anos.

Os dados clínicos coletados dos pacientes submetidos a transplante renal e de seus respectivos doadores são apresentados na Tabela 3.

A distribuição dos genótipos de *HLA-E* nos controles saudáveis e nos pacientes com doença renal crônica se encontrava em equilíbrio de Hardy-Weinberg, com valores de $P=0,58086$ e $P=0,76823$, respectivamente. No grupo dos

pacientes transplantados a distribuição dos genótipos não se encontrava em equilíbrio, sendo observados neste grupo somente dois dos três genótipos possíveis, homocigotos para o alelo *E*01:01* e heterocigotos *E*01:01*01:03* ($P= 0,01983$).

TABELA 3 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS

Número de pacientes, n (%)	24
Mulheres	11 (45,83)
Homens	13 (54,17)
Idade média ± Desvio Padrão (alcance)	
Pacientes	45,75 ±14,29 (20 - 67)
Doadores	43,33 ±11,64 (25 - 62)
Sexo (paciente/doador), n (%)	
F/F	6 (25)
F/M	5 (20,8)
M/F	10 (41,7)
M/M	3 (12,5)
Hábito de Fumar, n (%)	
Fumantes	2 (8,3)
Não Fumantes	17 (70,83)
Ex Fumantes	5 (20,83)
Gestações e Número de filhos	
Mulheres que engravidaram	9
Gestações / paciente (média ± desvio padrão)	3 ± 2,45
Número de filhos / paciente (média ± desvio padrão)	2,875 ± 2,29
Tipagem ABO, n (%)	
O+	15 (62,5)
A+	7 (29,17)
AB+	1 (4,17)
B-	1 (4,17)
Transfusões, n (%)	
Já recebeu	12 (50)
Não recebeu	12 (50)
Doença de Base, n (%)	
IRC	8 (33,33)
GNC	2 (8,33)
GNC + IRC	8 (33,33)
GNC + IRC + Pielonefrite	1 (4,17)

F: feminino; M: masculino; IRC: insuficiência renal crônica; GNC: glomerulonefrite crônica.

Os éxons 2 e 3 foram amplificados pela metodologia de PCR e posteriormente sequenciados, mas apenas as sequências obtidas para o éxon 3 foram apropriadas, enquanto aquelas obtidas para o éxon 2 não foram satisfatórias e excluídas das análises. A sequência completa obtida para o éxon 3 foi analisada para cada amostra, de forma a contemplar todos os polimorfismos já conhecidos e descritos, além de investigar novos polimorfismos. Não foram encontrados novos pontos de polimorfismos nem variações nos sítios já conhecidos, com exceção do polimorfismo no nucleotídeo 382 A/G (códon 107).

As distribuições das frequências alélicas do gene *HLA-E* entre os diferentes grupos são mostradas na Tabela 4. A comparação realizada entre pacientes transplantados renais, pacientes com doença renal crônica e controles saudáveis não apresentou diferença significativa ($P= 0,2947$, teste G global). As comparações entre transplantados renais versus renais crônicos, transplantados renais versus controles saudáveis, e renais crônicos versus controles saudáveis também não apresentaram diferenças significativas ($P= 0,4345$, $P= 0,1656$, $P= 0,5528$, respectivamente).

TABELA 4 - DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE *HLA-E* NOS GRUPOS PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS (n= 24), PACIENTES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA (n= 48), E CONTROLES SAUDÁVEIS (n= 50)

Alelos	Transplantados Renais ^a	Renais Crônicos ^b	Controles Saudáveis ^c
	n (%)	n (%)	n (%)
<i>E*01:01</i>	31 (64,58)	54 (56,25)	51 (51,00)
<i>E*01:03</i>	17 (35,42)	42 (43,75)	49 (49,00)
Total	48	96	100

NOTA: COMPARAÇÕES POR TESTE G GLOBAL: ^{a x b x c}, $P= 0,2947$; ^{a x b}, $P= 0,4345$; ^{a x c}, $P= 0,1656$; ^{b x c}, $P= 0,5528$.

Considerando as frequências genotípicas (Tabela 5), a comparação realizada entre pacientes transplantados renais, pacientes com doença renal crônica e controles saudáveis, apresentou diferença significativa ($P= 0,0147$, teste G global).

Nas comparações entre transplantados renais versus renais crônicos, e transplantados renais versus controles saudáveis, também foram observadas diferenças significativas, com valores P iguais a 0,0085 e 0,0032, respectivamente. A comparação entre pacientes renais crônicos versus controles saudáveis não apresentou diferença significativa ($P=0,7803$).

TABELA 5 - DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DO *HLA-E* NOS PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS (n= 24), PACIENTES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA (n= 48) E CONTROLES SAUDÁVEIS (n= 50).

Genótipos	Transplantados Renais ^a	Renais Crônicos ^b	Controles Saudáveis ^c
	n (%)	n (%)	n (%)
<i>E*01:01*01:01</i>	7 (29,17)	16 (33,33)	14 (28,0)
<i>E*01:01*01:03</i>	17 (70,83)	22 (45,83)	23(46,0)
<i>E*01:03*01:03</i>	0 (0)	10 (20,83)	13 (26,0)
Total	24	48	50

NOTA: COMPARAÇÕES POR TESTE G GLOBAL: ^{A x B x C}, $P=0,0147$; ^{A x B}, $P=0,0085$; ^{A x C}, $P=0,0032$; ^{B x C}, $P=0,7803$.

6 DISCUSSÃO

Os estudos envolvendo *HLA-E* no contexto do transplante de órgãos sólidos são raros. Entretanto, existem na literatura dados de trabalhos nos quais foram estudados os polimorfismos de *HLA-E* em grupos de pacientes submetidos a transplante de células-tronco hematopoiéticas. Este tipo de estudo tem se mostrado extremamente importante, uma vez que os genótipos *HLA-E* do doador e do paciente parecem estar associados à qualidade de vida do paciente no pós-transplante.

Neste estudo, 24 pacientes transplantados renais, 48 pacientes com doença renal crônica e 50 controles saudáveis foram analisados quanto à variabilidade genética do gene *HLA-E*. Foram realizadas comparações das frequências alélicas e genotípicas entre os três grupos estudados.

Na comparação das frequências alélicas entre os três grupos ($P= 0,2947$), e nas comparações dois a dois ($P= 0,4345$; $P= 0,1656$; $P= 0,5528$), não foram encontradas diferenças significativas. Nas comparações das frequências genotípicas, foram observadas diferenças significativas na comparação entre os três grupos ($P= 0,0147$) e nas comparações entre transplantados renais versus renais crônicos e transplantados renais versus controles saudáveis ($P= 0,0085$; $P= 0,0032$, respectivamente), já que não havia nenhum paciente pertencente ao grupo de transplantados com o genótipo homozigoto $E^*01:03$.

Diversos estudos apontam que, no transplante de medula óssea (células-tronco hematopoiéticas), o genótipo $HLA-E^*01:03^*01:03$ parece estar relacionado com um menor risco do desenvolvimento da doença do enxerto versus hospedeiro, além de menor mortalidade e maior tempo livre de doença (TAMOUZA *et al.*, 2006; PABÓN *et al.*, 2014). Alguns estudos demonstram os efeitos positivos deste genótipo quando presente em doadores (LUDAJIC *et al.*, 2009), em receptores (DANZER *et al.*, 2009), e outros quando há compatibilidade *HLA-E* entre doador e receptor (HOSSEINI *et al.*, 2013).

No estudo realizado por Danzer *et al.* (2009), é proposta uma possível explicação para o fato de que, quando o doador possui genótipo $HLA-E^*01:01^*01:01$, exista maior risco de infecções severas por bactérias, aumentando o

risco de morte para o receptor. Como o alelo *HLA-E*01:01*, diferentemente do *E*01:03*, é dependente do processamento das moléculas HLA Ia, que são pouco expressas em células endoteliais, o alelo *E*01:01* é alvo preferencial de células NK / células T + receptor CD94/NKG2A (receptor inibitório), que potencialmente resultaria em uma lesão tecidual mediada pela citotoxicidade destas células na região do transplante.

Os resultados obtidos neste trabalho divergem das informações presentes na literatura, uma vez que não foi observado nenhum paciente transplantado renal genótipo homozigoto *E*01:03*01:03*. Futuros estudos são necessários para a ampliação e complementação dos resultados obtidos pelo presente estudo, tendo em vista o pequeno número amostral utilizado e para ratificar os resultados de estudos correlatos já publicados. Considerando o número crescente de transplantes renais no Brasil, a realização de outros estudos neste contexto é de extrema importância, visando melhorar a compreensão dos fatores imunogenéticos envolvidos neste processo na tentativa de prevenir episódios de rejeição. Este estudo, que pertence a um projeto maior sobre a variabilidade genética de genes *HLA* no contexto do transplante renal, terá seguimento visando aumentar o número amostral, realizar o monitoramento pós-transplante e enriquecer os dados clínicos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

ALBUQUERQUE, J. G.; LIRA, A. L. B. C.; LOPES, M. V. O. Fatores preditivos de diagnósticos de enfermagem em pacientes submetidos ao transplante renal. **Revista Brasileira de Enfermagem**, Brasília, v. 63, n. 1, p. 98-103, 2010.

Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos - ABTO (Brasil). **Dados Numéricos da doação de órgãos e transplantes realizados por estado e instituição no período: JANEIRO / MARÇO - 2013**. Registro Brasileiro de Transplantes – RBT. Ano XIX - no 1. Disponível em: <www.abto.org.br>. Acesso em: 13 fev. 2015.

ANTOUN, A.; JOBSON, S.; COOK, M.; MOSS, P.; BRIGGS, D. Ethnic variability in human leukocyte antigen-E haplotypes. **Tissue Antigens**, v. 73, p. 39-45, 2008.

AYRES, M.; AYRES, M.JR; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A.S. Bioestat – **Aplicações Estatísticas nas áreas das Ciências da Saúde**. Belém, 2005.

BARTEL, G.; WAHRMANN, M.; REGELE, H.; KIKIC, Z.; FISCHER, G.; DRUML, W.; MÜHLBACHER, F.; BÖHMIG, A. Peritransplant immunoadsorption for positive crossmatch deceased donor kidney transplantation. **American Journal of Transplantation**, v. 10, p. 2033-2042, 2010.

BARTEL, G.; SCHWAIGER, E.; BÖHMIG, G. A. Prevention and treatment of alloantibody-mediated kidney transplant rejection. **Transplant International**, v. 24, p. 1142-1155, 2011.

DUPONT, B. **Immunobiology of HLA**. Vol. II. New York, Springer Science + Business Media New York, 1989.

COLVIN, R. B. Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis. **American Society of Nephrology**, v. 18, p. 1046-1056, 2007.

COOK, M.A.; MOSS, P.A.H.; BRIGGS, D.C. The distribution of 13 killer-cell immunoglobulin-like receptor loci in UK blood donors from three ethnic groups. **European Journal of Immunogenetics**, v. 30, p. 213-221, 2003.

Dados de doações e transplantes: Janeiro à Setembro (2011, 2012, 2013, 2014, 2015). Disponível em: <<http://www.saude.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=2929>>. Acesso em: 26/10/2015.

DANZER, M.; POLIN, H.; PRÖLL, J. *et al.* Clinical significance of HLA-E*0103 homozygosity on survival after allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. **Transplantation**, v. 88, n. 4, p. 528-532, 2009.

EINECKE, G.; SIS, B.; REEVE, J.; MENGEL, M.; CAMPBELL, P. M.; HIDALGO, L. G.; KAPLAN, B.; HALLORAN, P. F. Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure. **American Journal of Transplantation**, v. 9, p. 2520-2531, 2009.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S.; **Arlequin ver. 3.1: An integrated software package for population genetics data analysis**. Evolutionary Bioinformatics Online, vol. 1, p. 47-50.

GLOOR, J. M.; DeGOEY, S.; PLOEGER, N.; GEBEL, H.; BRAY, R.; MOORE, S. B.; DEAN, P. G.; STEGALL, M. D. Persistence of low levels of alloantibody after desensitization in crossmatch-positive living-donor kidney transplantation. **Transplantation**, v. 78, n. 2, p. 221-227, 2004.

GUERRA JUNIOR, A. A.; ACÚRCIO, F. A.; ANDRADE, E. I. G.; CHERCHIGLIA, M. L.; CESAR, C. C.; QUEIROZ, O. V.; SILVA, G. D. Ciclosporina *versus* tacrolimus no transplante renal no Brasil: uma comparação de custos. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 1, p. 163-174, 2010.

GUO, S.; THOMPSON, E. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, Washington, v. 48, n. 2, p. 361-372, 1992.

GUPTA, A.; IVESON, V.; VARAGUNAM, M.; BODGER, S.; SINNOTT, P.; THURASINGHAM, R. C. Pretransplant donor-specific antibodies in cytotoxic negative crossmatch kidney transplants: are they relevant? **Transplantation**, v. 85, n. 8, p. 1200-1204, 2008.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

HIGGINS, R. M.; LOWE, D.; HATHAWAY, M. *et al.* HLA antibody incompatible renal transplantation: excellent medium-term outcomes with negative cytotoxic crossmatch. **Transplantation**, v. 92, n. 8, p. 900-906, 2011.

HIGGINS, R. M.; DAGA, S.; MITCHELL, D. A. Antibody-incompatible kidney transplantation in 2015 and beyond. **Nephrology Dialysis Transplantation**, p. 1-7, 2014.

HOSSEINI, E.; SCHWARER, A. P.; JALALI, A.; GHASEMZADEH, M. The impact HLA-E polymorphisms on relapse following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Leukemia Research**, v. 37, p. 516-519, 2013.

ISHITANI, A.; SAGESHIMA, N.; HATAKE, K. The involvement of HLA-E and -F in pregnancy. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 69, p. 101-113, 2006.

JOHN, S. W. M.; WEITZNER, G.; ROZEN, R.; SCRIVER, C. R. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocyte. **Nucleic Acids Research**, London, v. 19, n. 2, p. 408, 1990.

JORDAN, S. C.; QUARTEL, A. W.; CZER, L. S. C. *et al.* Posttransplant therapy using high-dose human immunoglobulin (intravenous gammaglobulin) to control acute humoral rejection in renal and cardiac allograft recipients and potential mechanism of action1. **Transplantation**, v. 66, n. 6, p. 800-805, 1998.

KOLLER, B. H.; GERAGHTY, D. E.; SHIMIZU, Y.; DeMARS, R.; ORR, H. T. *HLA-E* A novel HLA class I gene expressed in resting T lymphocytes. **The Journal of Immunology**, v. 141, n. 3, p. 897-904, 1988.

LAHIRI, D.K. NURBERGER, J.R. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 5444, 1991.

LAPERROUSAZ, S., TIERCY, J.M., LACRAZ, S.F. HLA and non-HLA polymorphisms in renal transplantation. **Swiss Medical Weekly**, v. 142, p. 1-12, 2012.

LEE, P.; TERASAKI, P. I.; TAKEMOTO, S. T.; LEE, P.; HUNG, C.; CHEN, Y.; TSAI, A.; LEI, H. All chronic rejection failures of kidney transplants were preceded by the development of HLA antibodies. **Transplantation Brief Communications**, v. 74, n. 8, p. 1192-1194, 2002.

LEFAUCHEUR, C.; NOCHY, D.; ANDRADE, J.; VERINE, J.; GAUTREAU, C.; CHARRON, D.; HILL, G. S.; GLOTZ, D.; SUBERBIELLE-BOISSEL, C. Comparison of combination plasmapheresis/IVIg/anti-CD20 versus high-dose IVIg in the treatment of antibody-mediated rejection. **American Journal of Transplantation**, v. 9, p. 1099-1107, 2009.

LUDAJIC, K.; ROSENMAYR, A.; FAÉ, I.; FISCHER, G. F.; BALAVARCA, Y.; BICKEBÖLLER, H. *et al.* Association of HLA-E polymorphism with the outcome of hematopoietic stem-cells transplantation with unrelated donors. **Transplantation**, v. 88, n. 10, p. 1227-1228, 2009.

MANGE, K. C.; CHERIKH, W. S.; MAGHIRANG, J.; BLOOM, R. D. A comparison of the survival of shipped and locally transplanted cadaveric renal allografts. **The New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 17, p. 1237-1242, 2001.

MEDINA-PESTANA, J. O.; GALANTE, N. Z.; TEDESCO-SILVA, H. Jr.; HARADA, K.M.; GARCIA, V. D.; ABBUD-FILHO, M.; CAMPOS, H. H.; SABBAGA, E. O contexto do transplante renal no Brasil. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 472-484, 2011.

MOSSALLAM, G. I.; FATTAH, R. A.; EL-HADDAD, A.; MAHMOUD, K. HLA-E polymorphism and clinical outcome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in Egyptian patients. **Human Immunology**, v. 76, p. 161-165, 2015.

OPELZ, G.; DÖHLER, B. Association of HLA mismatch with death with a functioning graft after kidney transplantation: a Collaborative Transplant Study report. **American Journal of Transplantation**, v. 12, p. 3031-3038, 2012.

PABÓN, M. A.; NAVARRO, C. E.; OSORIO, J. C.; GÓMEZ, J. P.; MORENO, J. P.; DOMADO, A. F.; PÉREZ, H. C.; LOZANO, E. Impacto of human leukocyte antigen molecules E, F, and G on the outcome of transplantation. **Transplantation Proceedings**, v. 46, p. 2957-2965, 2014.

PETRIE, E. J.; CLEMENTS, C. S.; LIN, J. *et al.* CD94-NKG2A recognition of human leukocyte antigen (HLA)-E bound to an HLA class I leader sequence. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 3, p. 725-735, 2008.

RAVINDRANATH, M. H.; PHAM, T.; OZAWA, M.; TERASAKI, P. I. Antibodies to HLA-E may account for the non-donor-specific anti-HLA class-Ia antibodies in renal and liver transplant recipients. **International Immunology**, v. 24, n. 1, p. 43-57, 2011.

SHELDON, S., POULTON, K. HLA typing and its influence on organ transplantation. **Transplantation Immunology**, v. 333, p. 157-174, 2006.

STRONG, R. K.; HOLMES, M. A.; LI, P.; BRAUN, L.; LEE, N.; GERAGHTY, D. E. HLA-E allelic variants: correlating differential expression, peptide affinities, crystal structures, and thermal stabilities. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 7, p. 5082-5090, 2002.

SULLIVAN, L. C.; CLEMENTS, C. S.; ROSSJOHN, J.; BROOKS, A. G. The major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E at the interface between innate and adaptive immunity. **Tissue Antigens**, v.72, p. 415-424, 2008.

SÜSAL, C.; OPELZ, G. Current role of human leukocyte antigen matching in kidney transplantation. **Current Opinion Organ Transplantation**, v. 18, n. 4, p. 438-444, 2013.

TAMOUZA, R.; BUSSON, M.; ROCHA, V. *et al.* Homozygous status for *HLA-E*0103* confers protection from acute graft-versus-host disease and transplant-related mortality in HLA-matched sibling hematopoietic stem cell transplantation. **Transplantation**, v. 82, p. 1436-1440, 2006.

TERASAKI, P. I. Humoral Theory of Transplantation. **American Journal of Transplantation**, v. 3, p. 665-673, 2003.

ULBRECHT, M.; MODROW, S.; SRIVASTAVA, R.; PETERSON, P. A.; WEISS, E. H. Interaction of HLA-E with peptides and the peptide transporter in vitro: implications for its function in antigen presentation. **The Journal of Immunology**, v. 160, p. 4375-4385, 1998.

ULBRECHT, M.; COUTURIER, A.; MARTINOZZI, S.; PLA, M.; SRIVASTAVA, R.; PETERSON, P. A.; WEISS, E. H. Cell surface expression of HLA-E: interaction with human β 2-microglobulin and allelic differences. **European Journal of Immunology**, v.29, p. 537-547, 1999.

8 APÊNDICES

APÊNDICE 1 – CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL DE BANFF (2007)

A Classificação Internacional de Banff consiste de:

1 - Normal: histologia normal.

2 - Alterações mediadas por anticorpos: caracterizam-se pela presença de C4d ou alterações histológicas sugestivas e pela presença de anticorpos específicos anti-HLA (DAS). O depósito de C4d sem evidências histológicas de rejeição aguda, associada a presença de anticorpos circulantes anti-HLA do doador, podem significar rejeição mediada por anticorpo em fase inicial. Algumas vezes as alterações histológicas são muito discretas, como NTA focal, e devem ser encaradas como rejeição humoral se associadas ao C4d e com os anticorpos específicos anti-HLA do doador.

Rejeição aguda mediada por anticorpo:

Tipos histológicos:

Tipo 1 – achado de NTA (necrose tubular aguda), com C4d positivo e mínima inflamação.

Tipo 2 – Glomerulite, com marginação e ou trombozes e C4d positivo.

Tipo 3 – inflamação arterial transmural, alterações fibrinoides e C4d positivo.

Rejeição crônica ativa mediada por anticorpo: A histologia mostra duplo contorno glomerular ou múltiplas camadas da membrana basal dos capilares peritubulares ou fibrose intersticial/atrofia tubular ou espessamento intimal de artérias e C4d positivo.

3 - Alterações “borderline”: suspeita-se que sejam devidas à rejeição mediada por células e incluem tubulites focais sem arterite intimal.

4- Rejeição mediada por célula T: pode estar associada com categorias 2, 5 e 6.

Rejeição aguda mediada por célula T:

- Tipo IA- Inflamação intersticial significativa (mais de 25% do parênquima afetado) e tubulite focal moderada.

- Tipo IB– Inflamação intersticial significativa (mais de 25% do parênquima afetado) e tubulite acentuada.

- Tipo IIA- arterite discreta para moderada.

- Tipo IIB- arterite acentuada que é associada a mais de 25% de perda da área luminal.

- Tipo III- arterite transmural ou alterações fibrinoides e necrose da camada muscular lisa em associação com inflamação linfocítica do vaso. Rejeição crônica ativa mediada por célula T Caracteriza-se por arteriopatia crônica do enxerto, que envolve fibrose de íntima arterial com infiltração de células mononucleares e formação de neo-íntima.

5 - Fibrose intersticial e atrofia tubular, sem evidências de qualquer etiologia específica (antiga nefropatia crônica do enxerto): caracteriza-se por arteriopatia crônica do enxerto que envolve fibrose intimal arterial com infiltração celular mononuclear e formação de neo-íntima. Fibrose intersticial e atrofia tubular sem evidência de etiologia específica. É também chamada nefropatia crônica do enxerto.

Graus:

I - Fibrose intersticial discreta e atrofia tubular (menos de 25% da área cortical)

II - Fibrose intersticial moderada e atrofia tubular (25% a 50% da área cortical)

III - Fibrose intersticial acentuada e atrofia tubular (50% da área cortical)

6 - Outros: nesta categoria incluem-se alterações não resultantes de rejeição aguda ou crônica, como aquelas secundárias à hipertensão arterial crônica, toxicidade por inibidores da calcineurina, obstrução crônica e infecções virais.

APÊNDICE 2 – DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS

Amostras	Idade no transplante	Sexo	Peso	Altura	Era fumante?	Número de gestações	Número de filhos	Tipagem HLA-A	Tipagem HLA-B
TRX1R01	55	M	53kg	1,64m	Ex	0	-	A*24 A*26	B*44 B*49
TRX1R02	34	M	88kg	1,74m	Sim	0	-	A*25 A*02	B*44 B*39
TRX1R03	24	M	65kg	1,70m	Não	0	-	A*02:01/07 A*24:02/03	B*35:05 B*51:01
TRX1R04	20	M	62kg	1,64m	Não	0	-	A*02 A*02	B*35 B*39
TRX1R07	53	M	84kg	1,68m	Ex	0	-	A*02 A*33	B*14 B*18
TRX1R15	39	F	53kg	1,50m	Não	3	3	A*01 A*11	B*35 B*51
TRX1R17	39	F	68kg	1,59m	Não	2	2	A*03:01 A*03:01	B*44:02 B*51:05
TRX1R20	64	F	53kg	1,51m	Ex	3	1	A*01:01 A*26:01	B*08:01 B*38:01
TRX1R21	47	M	75kg	1,70m	Não	0	-	A*11 A*26	B*50 B*51
TRX1R23	64	M	74kg	1,64m	Não	0	-	A*02 A*32	B*14 B*18
TRX1R27	50	M	59kg	1,73m	Ex	0	-	A*03 A*32	B*07 B*27
TRX1R29	24	F	62kg	1,71m	Não	1	0	A*02 A*02	B*15 B*44
TRX1R31	61	M	85kg	1,71m	Ex	0	-	A*01 A*29	B*18 B*44
TRX1R34	34	F	70kg	1,60m	Não	?	?	A*11 A*31	B*14 B*35
TRX1R38	60	F	74,5kg	1,73m	Não	9	8	A*02 A*11	B*07 B*38
TRX1R47	26	M	61kg	1,75m	Sim	0	-	A*11:02 A*31:01	B*35:01/07 B*39:03
TRX1R51	36	F	69kg	1,65m	Não	2	2	A*02 A*03	B*15 B*18
TRX1R52	34	F	45kg	1,59m	Não	4	4	A*30 A*31	B*08 B*44
TRX1R55	61	M	67kg	1,69m	Não	0	-	A*01 A*24	B*08 B*35
TRX1R56	48	M	80kg	1,67m	Não	0	-	A*01 A*30	B*44 B*57
TRX1R57	67	M	59,6kg	1,75m	Não	0	-	A*01 A*02	B*18 B*58
TRX1R58	54	F	54kg	1,56m	Não	0	-	A*01 A*68	B*35 B*53
TRX1R63	53	F	66kg	1,66m	Não	1	1	A*02 A*32	B*35 B*55
TRX1R64	51	F	64,9kg	1,55m	Não	2	2	A*01 A*02	B*07 B*44

Amostras	Tipagem HLA-DRB1	Necessitou de transfusão sanguínea alguma vez?	Tipo sanguíneo ABO e Fator RH	Data do transplante
TRX1R01	DRB1*13 DRB1*01	1	A+	17/10/2012
TRX1R02	DRB1*14 DRB1*15	0	A+	19/10/2012
TRX1R03	DRB1*11:01 DRB1*16:01/02	0	O+	24/10/2012
TRX1R04	DRB1*14 DRB1*16	0	O+	05/12/2012
TRX1R07	DRB1*07 DRB1*11	3	A+	12/12/2012
TRX1R15	DRB1*03 DRB1*11	6	O+	20/02/2013
TRX1R17	DRB1*04:05 DRB1*11:01	2	O+	27/02/2013
TRX1R20	DRB1*03:01/04 DRB1*11:04	1	O+	09/03/2013
TRX1R21	DRB1*03 DRB1*04	1	O+	13/03/2013
TRX1R23	DRB1*07 DRB1*11	0	O+	20/03/2013
TRX1R27	DRB1*03 DRB1*15	0	B-	23/04/2013
TRX1R29	DRB1*14 DRB1*16	0	O+	15/05/2013
TRX1R31	DRB1*07 DRB1*07	0	O+	24/05/2013
TRX1R34	DRB1*01 DRB1*01	0	O+	29/05/2013
TRX1R38	DRB1*13 DRB1*15	2	O+	17/06/2013
TRX1R47	DRB1*01:01 DRB1*14:06	1	A+	14/08/2013
TRX1R51	DRB1*03 DRB1*04	0	O+	28/08/2013
TRX1R52	DRB1*01 DRB1*03	2	AB-	01/09/2013
TRX1R55	DRB1*07 DRB1*11	1	A+	11/09/2013
TRX1R56	DRB1*11 DRB1*13	0	O+	13/09/2013
TRX1R57	DRB1*11 DRB1*13	0	O+	18/09/2013
TRX1R58	DRB1*04 DRB1*11	4	A+	16/09/2013
TRX1R63	DRB1*01 DRB1*11	0	A+	13/10/2013
TRX1R64	DRB1*04 DRB1*15	2	O+	11/10/2013

Amostras	Protocolo de Imunossupressão	PRA pré-transplante	PRA pós-transplante
TRX1R01	Tacrolimus 506, micofenolato mofetil, metilprednisona 1X (alta), prednisona	0,03	0,03
TRX1R02	Tacrolimus 506, micofenolato mofetil, metilprednisona 1X (alta), prednisona	95,88	96,93
TRX1R03	Tacrolimus 506, micofenolato mofetil, metilprednisona 1X (alta), prednisona	?	69,75? 0,0-13,96?
TRX1R04	Tacrolimus -> Sirolimus; micofenolato mofetil, metilprednisona 1X (alta), prednisona	?	0
TRX1R07	Tacrolimus -> Sirolimus; micofenolato mofetil, metilprednisona 1X (alta), prednisona	11,29	0,03
TRX1R15	Tacrolimus -> Sirolimus; micofenolato mofetil, metilprednisona 2X (alta), prednisona	100	?
TRX1R17	Ciclosporina/Tacrolimus (2/2); Tacrolimus -> Sirolimus; Prednisona (5), metilprednisona 1X; micofenolato mofetil (720)	6,58	0
TRX1R20	Tacrolimus -> Sirolimus; micofenolato mofetil, metilprednisona 1X, prednisona, adiciona azatioprina	53,58	7,98
TRX1R21	Tacrolimus -> Sirolimus; metilprednisona 3X, prednisona; Nefrotoxicidade à Ciclosporina	49,95	49,95
TRX1R23	Tacrolimus -> Sirolimus; metilprednisona 1X, prednisona	44,46 ou 48,97?	44,46
TRX1R27	Tacrolimus -> Sirolimus; metilprednisona 1X, prednisona	0	?
TRX1R29	Tacrolimus -> Sirolimus; metilprednisona 1X, prednisona	?	10,03
TRX1R31	Tacrolimus -> Sirolimus; metilprednisona 1X, prednisona	0	?
TRX1R34	Tacrolimus -> Sirolimus; metilprednisona 1X, prednisona	34,8	?
TRX1R38	Tacrolimus -> Sirolimus; metilprednisona 1X, prednisona	97,31	?
TRX1R47	Tacrolimus -> Sirolimus; metilprednisona 1X, prednisona	41	0
TRX1R51	Tacrolimus -> Sirolimus; metilprednisona 1X, prednisona	8,53	8,53
TRX1R52	Tacrolimus -> Sirolimus; metilprednisona 3X, prednisona	71,55	54,48
TRX1R55	Tacrolimus -> Sirolimus; metilprednisona 3X, prednisona	94,71	99
TRX1R56	Tacrolimus -> Sirolimus; metilprednisona 1X, prednisona	24,67	68,38
TRX1R57	Tacrolimus -> Sirolimus; metilprednisona 1X, prednisona	0	27,33
TRX1R58	Tacrolimus -> Sirolimus; metilprednisona 2X, prednisona	?	99,95
TRX1R63	Tacrolimus -> Sirolimus; metilprednisona 1X, prednisona	53,17 ou 10,3?	?
TRX1R64	Tacrolimus -> Sirolimus; metilprednisona 1X, prednisona	0	?

Amostras	Doença de base	Tipo de Diálise	Tempo de diálise pré-TX (meses)
TRX1R01	Glomérulo Nefrite Crônica (GNC), Insuficiência Renal Crônica (IRC) e Pielonefrite Crônica	Hemodiálise	51
TRX1R02	GNC, IRC	Hemodiálise	13
TRX1R03	GNC, IRC	Hemodiálise	15
TRX1R04	IRC	0	0
TRX1R07	Nefroesclerose Hipertensiva, IRC	Hemodiálise	48
TRX1R15	GNC, IRC	Hemodiálise	90
TRX1R17	GNC, IRC	Hemodiálise	14
TRX1R20	Nefroesclerose Hipertensiva, IRC	Hemodiálise	80
TRX1R21	IRC	Diálise Peritoneal Ambulatorial Contínua	48
TRX1R23	Nefroesclerose Hipertensiva, IRC	Hemodiálise	23
TRX1R27	IRC	Hemodiálise	14
TRX1R29	GNC	0	0
TRX1R31	Nefroesclerose Hipertensiva, IRC	Hemodiálise	24
TRX1R34	IRC	Hemodiálise e Diálise Peritoneal Automatizada	36 e 17
TRX1R38	IRC	Hemodiálise	42
TRX1R47	GNC, IRC	Hemodiálise	24
TRX1R51	IRC	Hemodiálise	13
TRX1R52	IRC	Hemodiálise	25
TRX1R55	Nefroesclerose Hipertensiva, IRC	Hemodiálise	18
TRX1R56	GNC, IRC	Diálise Peritoneal Ambulatorial Contínua	56
TRX1R57	GNC	Hemodiálise	46
TRX1R58	GNC, IRC	Hemodiálise	204
TRX1R63	GNC, IRC	Hemodiálise	7
TRX1R64	IRC	Hemodiálise	30

Amostras	Possui alguma outra doença? Doença imunológica?
TRX1R01	Hipertensão e diabetes mellitus pós-transplante; (positivo para citomegalovírus Pós-transplante)
TRX1R02	Hipertensão; (positivo para citomegalovírus Pós-transplante)
TRX1R03	Hipertensão; (positivo para citomegalovírus Pós-transplante)
TRX1R04	Hipertensão e diabetes mellitus pós-transplante
TRX1R07	Hipertensão
TRX1R15	Hipertensão e diabetes mellitus pós-transplante; (positivo para citomegalovírus Pós-transplante)
TRX1R17	Hipertensão, Hernia Inguinal, Apendicite, Câncer na tireoide, Histerectomia; (positivo para citomegalovírus)
TRX1R20	Hipertensão, diabetes mellitus, apendicite, asma, bronquite, eritroblastose fetal (DRH), doença auto-imune; (positivo para citomegalovírus)
TRX1R21	Hipertensão; (positivo para citomegalovírus Pós-transplante)
TRX1R23	Hipertensão, Apendicectomia, Chagas Doador-Receptor
TRX1R27	Hipertensão
TRX1R29	Hipertensão
TRX1R31	Hipertensão, diabetes mellitus
TRX1R34	Hipertensão, paratireoidectomia, broncopneumonia
TRX1R38	Hipertensão
TRX1R47	Sífilis, Toxoplasmose; (positivo para citomegalovírus)
TRX1R51	Hipertensão, Câncer, Pré-eclampsia na 2ª gestação
TRX1R52	Hipertensão, Nefrolitíase (pedras nos rins)
TRX1R55	Hipertensão; (positivo para citomegalovírus Pós-transplante)
TRX1R56	Hipertensão
TRX1R57	Hipertensão, Obesidade
TRX1R58	Hipertensão
TRX1R63	Hipertensão
TRX1R64	Hipertensão, diabetes mellitus; Doador com sífilis e com anti HBc+

APÊNDICE 3 – DADOS CLÍNICOS DOS DOADORES

Amostras	Idade na época do transplante	Sexo	Peso	Altura	Tipagem HLA-A	Tipagem HLA-B	Tipagem HLA-DRB1	Tipo sanguíneo ABO e Fator RH	Doador Vivo / Cadáver
TXR1D01	44	F	75kg	1,58m	A*24 A*31	B*15 B*44	DRB1*13 DRB1*16	A+	Vivo (relacionado 1º grau)
TXR1D02	58	F	80kg	1,65m	A*03 A*26	B*07 B*38	DRB1*13 DRB1*15	A+	Cadáver
TXR1D03	33	F	55kg	1,55m	A*03:01 A*24:02/03	B*15:16 B*51:01	DRB1*11:01 DRB1*11:02	O+	Vivo (relacionado 1º grau)
TXR1D04	49	F	77kg	1,67m	A*01 A*68	B*50 B*51	DRB1*07 DRB1*13	O+	Vivo (relacionado 2º grau)
TXR1D07	48	F	63kg	1,56m	A*02 A*68	B*44 B*57	DRB1*07 DRB1*15	A+	Vivo (não relacionado)
TXR1D15	35	F	58kg	1,62m	A*01 A*11	B*35 B*51	DRB1*03 DRB1*11	O+	Vivo (relacionado 1º grau)
TXR1D17	40	F	88kg	1,52m	A*03:01 A*03:01	B*44:02 B*51:05	DRB1*04:04 DRB1*11:01	O+	Vivo (relacionado 1º grau)
TXR1D20	60	F	70kg	1,65m	A*23 A*26	B*38 B*45	DRB1*11/DRB1*12 DRB1*52/DRB1*53	O	Cadáver
TXR1D21	35	F	66kg	1,65m	A*11 A*26	B*50 B*51	DRB1*03 DRB1*04	O+	Vivo (relacionado 1º grau)
TXR1D23	35	F	50kg	1,56m	A*01 A*32	B*08 B*14	DRB1*07 DRB1*07	O+	Vivo (relacionado 1º grau)
TXR1D27	62	M	70kg	1,70m	A*03 A*32	B*07 B*40	DRB1*13 DRB1*15	B	Cadáver
TXR1D29	25	M	78kg	1,85m	A*02 A*02	B*15 B*44	DRB1*14 DRB1*16	O+	Vivo (relacionado 1º grau)
TXR1D31	58	F	70kg	1,60m	A*01 A*30	B*14 B*18	DRB1*01 DRB1*07	O	Cadáver

Amostras	Idade na época do transplante	Sexo	Peso	Altura	Tipagem HLA-A	Tipagem HLA-B	Tipagem HLA-DRB1	Tipagem HLA-DRB1	Tipagem HLA-DRB1	Tipo sanguíneo ABO e Fator RH	Doador Vivo / Cadáver
TXR1D34	48	F	60kg	1,63m	A*02 A*31	B*14 B*51	DRB1*01 DRB1*10	DRB1*01	DRB1*10	O+	Vivo (relacionado 1º grau)
TXR1D38	46	M	64kg	1,70m	A*02 A*02	B*15 B*48	DRB1*09 DRB1*16	DRB1*09	DRB1*16	O	Cadáver
TXR1D47	28	F	53kg	1,54m	A*02:01/11 A*31:01	B*39:02 B*39:03	DRB1*08:04 DRB1*14:06	DRB1*08:04	DRB1*14:06	A	Vivo (relacionado 1º grau)
TXR1D51	55	F	75kg	1,57m	A*02 A*03	B*18 B*48	DRB1*03 DRB1*16	DRB1*03	DRB1*16	O+	Vivo (relacionado 1º grau)
TXR1D52	33	M	73kg	1,70m	A*01 A*23	B*35 B*44	DRB1*03 DRB1*04	DRB1*03	DRB1*04	AB	Cadáver
TXR1D55	48	F	46kg	1,45m	A*24 A*31	B*37 B*51	DRB1*13 DRB1*16	DRB1*13	DRB1*16	A	Vivo (relacionado 3º grau)
TXR1D56	34	M	70kg	1,70m	A*30 A*30	B*07 B*57	DRB1*03 DRB1*14	DRB1*03	DRB1*14	O+	Cadáver
TXR1D57	61	M	73kg	?	A*01 A*02	B*08 B*51	DRB1*03 DRB1*14	DRB1*03	DRB1*14	O+	Vivo (não relacionado)
TXR1D58	26	M	70kg	1,75m	A*01 A*01	B*35 B*51	DRB1*04 DRB1*11	DRB1*04	DRB1*11	A	Cadáver
TXR1D63	33	F	64kg	1,67m	A*24 A*32	B*55 B*58	DRB1*01 DRB1*03	DRB1*01	DRB1*03	A+	Vivo (relacionado grau 0 - mãe)
TXR1D64	46	M	90kg	1,80m	A*02 A*26	B*07 B*44	DRB1*01 DRB1*01	DRB1*01	DRB1*01	O	Cadáver

APÊNDICE 4 – GENOTIPAGENS *HLA-E* DOS PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS, PACIENTES RENAIIS CRÔNICOS E CONTROLES SAUDÁVEIS

PACIENTES TRANSPLANTES RENAIIS

SNP	rs115492845	rs141437869	rs41562314	Alelo 1	Alelo 2
Amostra	48 A(G)	169 C(T)	198 A(G)		
TXR1R01	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
TXR1R02	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
TXR1R03	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
TXR1R04	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
TXR1R07	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
TXR1R15	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
TXR1R17	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
TXR1R20	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
TXR1R21	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
TXR1R23	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
TXR1R27	A/A	C/C	A/A	01:01	01:01
TXR1R28	Não Amplificou				
TXR1R29	A/A	C/C	A/A	01:01	01:01
TXR1R31	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
TXR1R34	A/A	C/C	A/A	01:01	01:01
TXR1R38	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
TXR1R47	A/A	C/C	A/A	01:01	01:01
TXR1R51	A/A	C/C	A/A	01:01	01:01
TXR1R52	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
TXR1R55	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
TXR1R56	A/A	C/C	A/A	01:01	01:01
TXR1R57	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
TXR1R58	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
TXR1R63	A/A	C/C	A/A	01:01	01:01
TXR1R64	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
TXR1R66	Não Amplificou				

PACIENTES RENAIIS CRÔNICOS

SNP	rs115492845	rs141437869	rs41562314	Alelo 1	Alelo 2
Amostra	48 A(G)	169 C(T)	198 A(G)		
NTXC01	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXC02	G/G	C/C	A/A	01:03	01:03
NTXC03	G/G	C/C	A/A	01:03	01:03
NTXC04	Não Amplificou				
NTXC05	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXC06	A/A	C/C	A/A	01:01	01:01
NTXC07	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXC08	A/A	C/C	A/A	01:01	01:01
NTXC09	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXC10	G/G	C/C	A/A	01:03	01:03
NTXC11	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXC12	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXC13	A/A	C/C	A/A	01:01	01:01
NTXC14	A/A	C/C	A/A	01:01	01:01
NTXC15	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXC16	G/G	C/C	A/A	01:03	01:03
NTXC17	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXC18	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXC19	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXC20	G/G	C/C	A/A	01:03	01:03
NTXC21	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXC22	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXC23	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXC24	G/G	C/C	A/A	01:03	01:03
NTXC25	A/A	C/C	A/A	01:01	01:01
NTXC26	A/A	C/C	A/A	01:01	01:01
NTXC27	Não Amplificou				
NTXC28	A/A	C/C	A/A	01:01	01:01
NTXC29	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXC30	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXC31	A/A	C/C	A/A	01:01	01:01
NTXC32	A/A	C/C	A/A	01:01	01:01
NTXC33	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXC34	G/G	C/C	A/A	01:03	01:03
NTXC35	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXC36	A/A	C/C	A/A	01:01	01:01
NTXC37	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXC38	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXC39	A/A	C/C	A/A	01:01	01:01
NTXC40	A/A	C/C	A/A	01:01	01:01
NTXC41	G/G	C/C	A/A	01:03	01:03

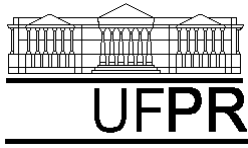
SNP	rs115492845	rs141437869	rs41562314		
Amostra	48 A(G)	169 C(T)	198 A(G)	Alelo 1	Alelo 2
NTXC42	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXC43	A/A	C/C	A/A	01:01	01:01
NTXC44	A/A	C/C	A/A	01:01	01:01
NTXC45	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXC46	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXC47	A/A	C/C	A/A	01:01	01:01
NTXC48	G/G	C/C	A/A	01:03	01:03
NTXC49	A/A	C/C	A/A	01:01	01:01
NTXC50	G/G	C/C	A/A	01:03	01:03

CONTROLES SAUDÁVEIS

SNP	rs115492845	rs141437869	rs41562314	Alelo 1	Alelo 2
Amostra	48 A(G)	169 C(T)	198 A(G)		
NTXS01	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXS02	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXS03	G/G	C/C	A/A	01:03	01:03
NTXS04	G/G	C/C	A/A	01:03	01:03
NTXS05	Não Amplificou				
NTXS06	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXS07	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXS08	A/A	C/C	A/A	01:01	01:01
NTXS09	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXS10	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXS11	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXS12	A/A	C/C	A/A	01:01	01:01
NTXS13	A/A	C/C	A/A	01:01	01:01
NTXS14	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXS15	A/A	C/C	A/A	01:01	01:01
NTXS16	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXS17	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXS18	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXS19	G/G	C/C	A/A	01:03	01:03
NTXS20	A/A	C/C	A/A	01:01	01:01
NTXS21	A/A	C/C	A/A	01:01	01:01
NTXS22	G/G	C/C	A/A	01:03	01:03
NTXS23	A/A	C/C	A/A	01:01	01:01
NTXS24	A/A	C/C	A/A	01:01	01:01
NTXS25	G/G	C/C	A/A	01:03	01:03
NTXS26	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXS27	G/G	C/C	A/A	01:03	01:03
NTXS28	G/G	C/C	A/A	01:03	01:03
NTXS29	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXS30	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXS31	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXS32	G/G	C/C	A/A	01:03	01:03
NTXS33	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXS34	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXS35	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXS36	G/G	C/C	A/A	01:03	01:03
NTXS37	A/A	C/C	A/A	01:01	01:01
NTXS38	G/G	C/C	A/A	01:03	01:03
NTXS39	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXS40	A/A	C/C	A/A	01:01	01:01
NTXS41	A/A	C/C	A/A	01:01	01:01

SNP	rs115492845	rs141437869	rs41562314		
Amostra	48 A(G)	169 C(T)	198 A(G)	Alelo 1	Alelo 2
NTXS42	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXS43	A/A	C/C	A/A	01:01	01:01
NTXS44	A/A	C/C	A/A	01:01	01:01
NTXS45	Não Amplificou				
NTXS46	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXS47	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXS48	Não Amplificou				
NTXS49	A/G	C/C	A/A	01:01	01:03
NTXS50	G/G	C/C	A/A	01:03	01:03
NTXS51	A/A	C/C	A/A	01:01	01:01
NTXS52	G/G	C/C	A/A	01:03	01:03
NTXS53	G/G	C/C	A/A	01:03	01:03

APÊNDICE 5 – FICHA DE AVERIGUAÇÃO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



INSTRUMENTO DE AVALIAÇÃO

Nome completo: _____

Sexo: F () / M () Idade: _____ RG ou CPF: _____

INFORMAÇÕES PARA RECONTATO

Telefone celular: _____

Telefone residencial: _____

Endereço residencial: _____ Cidade/Estado: _____

Endereço de e-mail: _____

INFORMAÇÕES A SEREM UTILIZADAS NA PESQUISA

Data de nascimento: _____ Peso: _____ Altura: _____

Tipo sanguíneo: A () / B () / AB () / O () Fator Rh: Rh + () / Rh - ()

Etnia: Amarelo () / Branco () / Indígena () / Negróide () / Miscigenado ()

DOENÇAS / CONDIÇÕES CRÔNICAS:

() hipertensão arterial	() pedras no rim (cálculo)	() hipercolesterolemia
() diabetes <i>mellitus</i> congênita	() tabagista	() hipertireoidismo
() diabetes <i>mellitus</i> adquirida	() ex-tabagista	() hipotireoidismo
() histórico - doença de chagas	() histórico - toxoplasmose	() histórico - hepatite

herpes - EBV (Vírus Epstein-Barr) HIV câncer

outras doenças/condições doença auto-imune diversa

Qual (s)?

Qual(s)?

Por favor, liste seus medicamentos e doses atuais, incluindo VITAMINAS:

a) _____ d) _____ g) _____

b) _____ e) _____ h) _____

c) _____ f) _____ i) _____

QUESTÕES APENAS A SEREM RESPONDIDAS PELAS MULHERES

Em qual período reprodutivo se encontra? período fértil perimenopausa menopausa

Número de gestações: 0 1 2 3 ou mais

Número de abortos: 0 1 2 3 ou mais

Estando no período fértil, qual é a fase do seu ciclo atual? fase da menstruação (1^o ao 4^o dia) fase proliferativa (5^o ao 13^o dia)
 ovulação (13^o ao 16^o dia) fase luteínica/secretora (16^o ao 28^o dia)

No momento está grávida? Sim / Não

Método(s) contraceptivo(s) adotado(s)? pílula DIU ou SIU anel vaginal

preservativo injeção anticoncepcional nenhum

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal _____

Pesquisadores Responsáveis _____

Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR

Telefone: (41) 3360-7259 e-mail: cometica.saude@ufpr.br