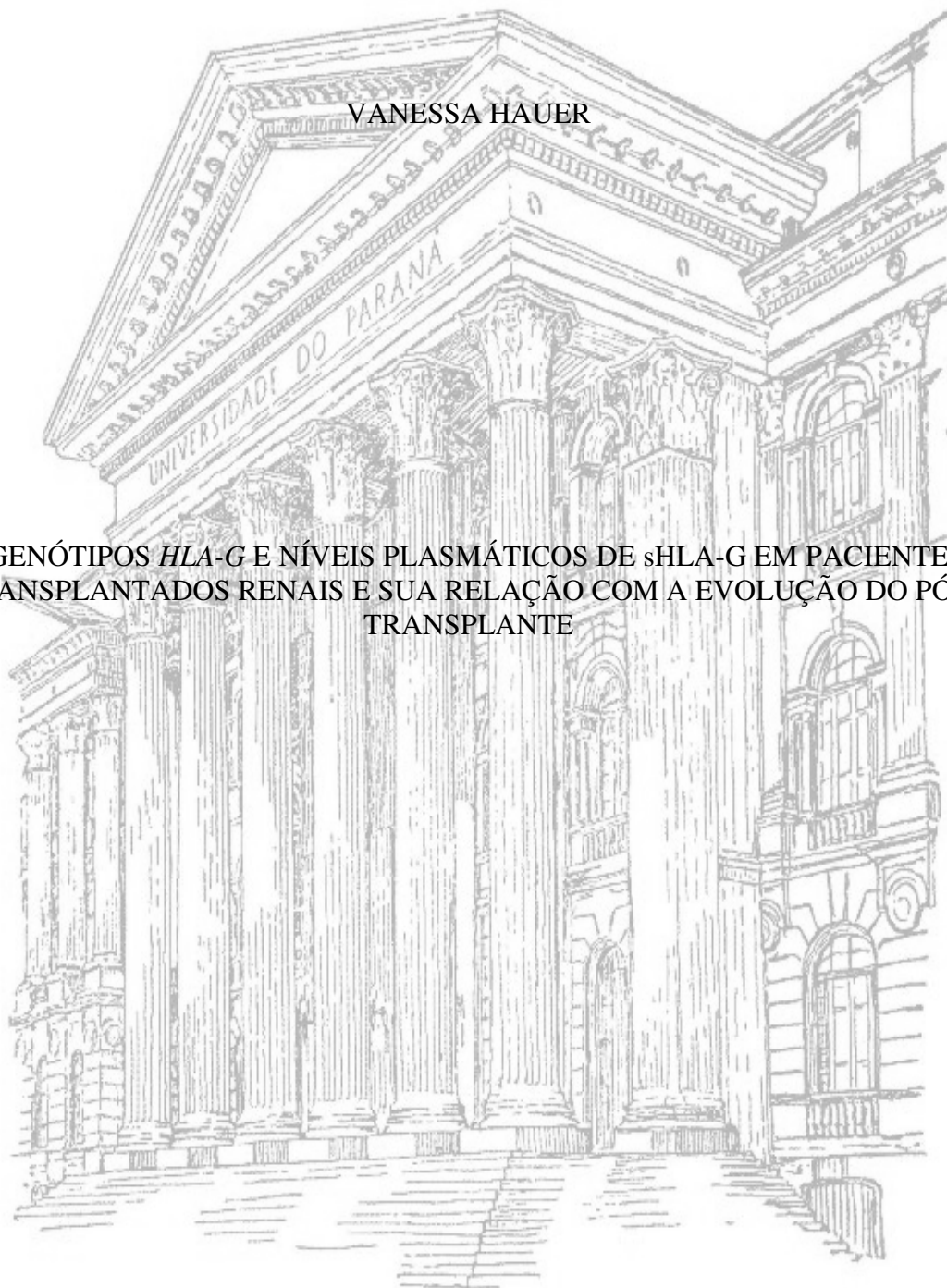


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VANESSA HAUER

GENÓTIPOS *HLA-G* E NÍVEIS PLASMÁTICOS DE s*HLA-G* EM PACIENTES  
TRANSPLANTADOS RENAIIS E SUA RELAÇÃO COM A EVOLUÇÃO DO PÓS-  
TRANSPLANTE



Curitiba  
2014

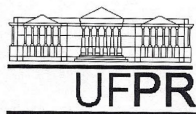
VANESSA HAUER

GENÓTIPOS *HLA-G* E NÍVEIS PLASMÁTICOS DE sHLA-G EM PACIENTES  
TRANSPLANTADOS RENAIIS E SUA RELAÇÃO COM A  
EVOLUÇÃO DO PÓS-TRANSPLANTE

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação  
em Genética, Departamento de Genética, da  
Universidade Federal do Paraná, como requisito  
parcial à obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. M<sup>a</sup>. da Graça Bicalho  
Co-orientador: Pablo Sandro Carvalho Santos

Curitiba  
2014



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



## PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **VANESSA HAUER**, para obtenção do título de Mestre em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira à candidata o conceito "A".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 25 de março de 2014

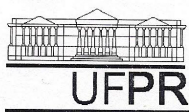
**Doutora Suelli Donizete Borelli**  
UEM – Membro Titular

**Doutora Roseli Wassem**  
Dep. Genética/UFPR – Membro Titular

**Doutora Maria da Graça Bicalho**  
Dep. Genética/UFPR – Orientadora e Presidente da Banca

Visto

**Professor Doutor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza**  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética



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



**Ata da Defesa de Dissertação de Mestrado de  
VANESSA HAUER**

Aos vinte e cinco dias do mês de março do ano de dois mil e quatorze, foi realizada na Sala 67 do Departamento de Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, a Defesa de Dissertação da mestranda **VANESSA HAUER**, intitulada "Genótipos HLA-G e níveis plasmáticos de sHLA-G em pacientes transplantados renais e sua relação com a evolução do pós-transplante". A abertura teve início às dez horas pelo Doutor **Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza**, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética, que em seguida passou a palavra à Presidente da Banca Examinadora e Orientadora da aluna, Doutora **Maria da Graça Bicalho**. A Presidente apresentou ao público presente os membros da Banca Examinadora e passou a palavra à aluna, para que fizesse a apresentação sucinta da sua dissertação. Após a explanação oral, a Professora Doutora **Maria da Graça Bicalho** passou a palavra à primeira examinadora, Doutora **Suelli Donizete Borelli**, da Universidade Estadual de Maringá. Em seguida, passou a palavra à segunda examinadora, Doutora **Roseli Wassem**, do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná. Findas as arguições pelos membros da banca, a Doutora **Maria da Graça Bicalho** fez uma rápida apreciação das conclusões mais importantes dos debates realizados e comunicou que a Banca Examinadora iria proceder à discussão para atribuição dos conceitos, reunindo-se em sessão secreta. Os trabalhos foram interrompidos por cinco minutos. Após, foram proclamados os conceitos atribuídos pela Banca Examinadora, a seguir descritos: Doutora **Suelli Donizete Borelli**, conceito "A"; Doutora **Roseli Wassem**, conceito "A"; Doutora **Maria da Graça Bicalho**, conceito "A"; com o conceito médio final "A". Tendo cumprido o que dita o artigo trinta e cinco das Normas Internas do Programa, a candidata cumpriu os requisitos para obtenção do grau de Mestre em Genética. Como não havia nada mais a ser tratado, a Doutora **Maria da Graça Bicalho**, após informar à candidata que ela tem, a partir desta data, até trinta dias para a entrega da versão definitiva de sua tese e comprovante de submissão de pelo menos um artigo científico para um periódico de circulação internacional com cópia do(s) artigo(s), deu por encerrada a sessão. Eu, **Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza**, lavrei a presente ata, a qual assino juntamente com os senhores examinadores. Curitiba, vinte e cinco de março de dois mil e quatorze.

Centro Politécnico - Jardim das Américas - Caixa Postal 19071 - CEP 81531-980 - Curitiba, Brasil  
Tel(+41) 33611587 / 33611684 - Fax(+41) 33611793 - e-mail ppg-gen@ufpr.br

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria da Graça Bicalho pela orientação e amizade.

À Dr<sup>a</sup> Fabiana Contieri e toda a sua equipe do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba, em especial a Vera Bertoldi e Michelle Cavalheiro, Sílvia e Neusa, pela confiança, dedicação e incentivo dada a este projeto.

Também agradeço a todos que se dispuseram a participar deste estudo.

Ao curso de Pós-Graduação em Genética, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná pelo apoio recebido para o desenvolvimento deste projeto.

Gostaria de agradecer pela amizade do nosso supervisor Alessandro Pirri, por sua contribuição na introdução ao estudo do transplante renal, além de toda a sua dedicação para a manutenção da ordem laboratorial.

Sou muito grata a todos os meus colegas de laboratório, especialmente à Renata Slowik e ao José Samuel da Silva, pelas constantes trocas de experiências e ensinamentos. Também agradeço à dedicação da Sônia, as aulas do Paulo, ao Joandrei e a Gorete, a Geórgia, a Suellen, a Cynthia e a Adriana, pelo incentivo e por toda amizade.

Agradeço muito a minha família, pai, mãe e irmão, que sempre estiveram presentes me apoiando, acreditando, sendo persistentes e me incentivando a continuar.

Agradeço ao meu compaheiro e amigo, Tiago, por toda a sua paciência, compreensão, dedicação e transmissão de tranquilidade. Também a todos os meus amigos que tornaram os momentos mais difíceis desta jornada mais fáceis de serem vividos.

"Só existem dois dias no ano que nada pode ser feito.  
Um se chama ontem e o outro se chama amanhã,  
portanto hoje é o dia certo para amar,  
acreditar e principalmente viver."

Dalai Lama

## RESUMO

O papel de HLA-G em meio a mecanismos de imunotolerância vem sendo cada vez mais elucidado. A sua atuação na imunomodulação se estende desde a interface materno-fetal, a condições patológicas, assim como em transplantes de coração, rim, fígado e pâncreas. O HLA-G apresenta isoformas que podem ser expressas tanto ligadas a membrana celular, como solúveis (sHLA-G), podendo ser esta a forma detectada circulante no plasma. A secreção das moléculas HLA-G ocorre por meio de células que estão envolvidas nos mecanismos específicos de inibição da resposta imune. Polimorfismos genéticos também são observados no gene *HLA-G* influenciando a sua função biológica através da alteração dos níveis de transcrição gênica ou até alterando a afinidade de HLA-G com seus ligantes. Neste estudo foi investigado a influência de HLA-G no perfil imunológico de pacientes transplantados renais. No total 100 pacientes pertencentes ao HUEC (Hospital Univesitário Evangélico de Curitiba) foram genotipados para *HLA-G* e, dentre estes, 36 pacientes foram monitorados do pré ao pós-transplante com relação aos níveis de sHLA-G no plasma. A genotipagem foi realizada utilizando o kit para HLA-G da *SBTcomercial (GenDx)* e a quantificação utilizando o kit ELISA (*Exbio*, Praga, República Checa) para as isoformas mais abundantes: o sHLA-G1 e -G5. As frequências alélicas observadas foram de acordo com o relatado previamente para as populações brasileiras, com exceção de seis alelos (G\*01:01:15 , G\*01:01:17 , G\*01:01:20 , G\*01:04:03, G\*01:04:05 e G\*01:08), que não tinham sido descritos anteriormente. Ainda, foram identificados dois novos alelos *HLA-G*, cada um compondo o genótipo heterozigoto de dois pacientes transplantados renais. Os níveis de sHLA-G quantificados apresentaram variação expressiva do pré ao pós-transplante entre os indivíduos transplantados sensibilizados comparados àqueles indivíduos dessensibilizados (tratados via protocolo de indução com ATG). Com os resultados deste estudo, esperamos melhor explicar o papel do HLA-G em relação ao aumento da sobrevida de aloenxertos, assim como auxiliar na exploração desta molécula como uma potencial biomarcadora positiva da resposta imune dos pacientes transplantados em relação aos protocolos de imunossupressão à que são submetidos.

Palavras-chaves: Transplante renal. HLA-G. Imunotolerância.

## ABSTRACT

The role of HLA-G through the immune tolerance mechanisms has been increasingly elucidated. Its performance in immunomodulation extends from the maternal-fetal interface, in pathological conditions, as well as in heart, kidney, liver and pancreas transplants. HLA-G has isoforms that can be expressed and stays membrane bound or as a soluble (sHLA-G) isoform, which can be detected in the plasma of patients. The secretion of sHLA-G occurs through immune cells involved in the specific inhibition mechanisms of immune response. There are also genetic polymorphisms observed in *HLA-G* gene, which can influence its biological function by altering transcription levels of this gene or even altering the affinity of HLA-G with ligands. In this study we investigated the influence of HLA-G in immune profile from kidney transplant patients. In total of 100 patients belonging to HUEC were genotyped and, among these, 36 transplant patients were monitored from pre to post-transplant with respect to sHLA-G levels in plasma. Genotyping was performed using the commercial SBT kit for *HLA-G* (GenDx) and quantified using the ELISA kit (Exbio, Prague, Czech Republic) for the most abundant isoforms: sHLA-G1 and -G5. The allele frequencies were in accordance with previously studies reported for Brazilian populations, with the exception of six alleles (G\*01:01:15, G\*01:01:17, G\*01:01:20, G\*01:04:03, G\*01:04:05 e G\*01:08), which had not been previously described. Furthermore, two new *HLA-G* alleles have been identified, each one composing the heterozygous genotype of two kidney transplant patients. The quantified levels of sHLA-G have had significant variations in the pre to post-transplant from sensitized individuals when compared with desensitized individuals (treated by an induction protocol using ATG). Thus with the results of this study, we hope to better explain the role of HLA-G in relation to the increased survival of allografts, as well as support in the exploration of this molecule as a positive potential marker of the transplant patients response to immunosuppression protocols.

Key-words: Kidney transplant. HLA-G. Immunotolerance.



## LISTA DE FIGURAS

### 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1 -	MHC HUMANO.....	7
FIGURA 2 -	ESTRUTUTRA DO MHC DE CLASSE I HUMANO.....	9
FIGURA 3 -	ESTRUTUTRA DO MHC DE CLASSE II HUMANO.....	10
FIGURA 4 -	ESTRUTUTRA DA REGIÃO PROMOTORA DOS GENES <i>MHC-I</i> ..	11
FIGURA 5 -	ESTRUTUTRA DA REGIÃO PROMOTORA DOS GENES <i>MHC-II</i> ..	13
FIGURA 6 -	LOCALIZAÇÃO E ESTRUTURA DO GENE <i>HLA-G</i> E <i>HLA-G1</i> (ISORFOMA COMPLETA).....	27
FIGURA 7 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>HLA-G</i> .....	32
FIGURA 8 -	TRANSCRITO PRIMÁRIO E ISOFORMAS PROVENIENTES DO GENE <i>HLA-G</i> .....	33

### 5 RESULTADOS

<i>Figure 1 -</i>	<i>Pre to post-transplant panel reactive antibody (PRA) from kidney transplant patients .....</i>	47
<i>Figure 2 -</i>	<i>Pre-transplant levels of sHLA-G.....</i>	48
<i>Figure 3 -</i>	<i>Levels of sHLA-G from day 3-5 post-transplant.....</i>	49
<i>Figure 4 -</i>	<i>Levels of sHLA-G from day 15-30 post-transplant.....</i>	49
<i>Figure 5 -</i>	<i>Levels of sHLA-G from 2 or more months post-transplant.....</i>	50

### 6 DISCUSSÃO

FIGURA 9 -	NÍVEIS PLASMÁTICOS DE sHLA-G EM HOMENS TRANSPLANTADOS RENAIIS (N=18).....	65
FIGURA 10	NÍVEIS PLASMÁTICOS DE sHLA-G EM MULHERES TRANSPLANTADAS RENAIIS (N=18).....	65

### APÊNDICE I - MATERIAIS E MÉTODOS

FIGURA 11 -	FOTO ILUSTRATIVA DA ELETROFORESE DE PRODUTOS DA AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>HLA-G</i> .....	93
FIGURA 12 -	FOTO ILUSTRATIVA DO RESULTADO DE UMA SEQUÊNCIA DE DNA DO GENE <i>HLA-G</i> .....	94
FIGURA 13 -	ESQUEMA DAS COLETAS DE AMOSTRA DE SANGUE TOTAL.....	95

## LISTA DE TABELAS

### 5 RESULTADOS

Table 1-	<i>Kidney transplant patients description</i> .....	44
Table 2 -	<i>Immunossupression protocol adopted for all patients</i> .....	45
Table 3 -	<b>HLA-G</b> <i>allele associations wih non-sensitized and desensitized transplanted patients</i> .....	50

### 6 DISCUSSÃO

TABELA 1 -	DESCRIÇÃO DOS PACIENTES GENOTIPADOS PARA O GENE <i>HLA-G</i> .....	60
TABELA 2 -	FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE <i>HLA-G</i> OBSERVADAS NA POPULAÇÃO EM ESTUDO PAREADA COM FREQUÊNCIAS DETERMINADAS PARA DUAS OUTRAS POPULAÇÕES BRASILEIRAS.....	66
TABELA 3 -	FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DO GENE <i>HLA-G</i> OBSERVADAS NOS DOADORES VIVOS E PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS.....	67
TABELA 4 -	DIFERENÇAS NAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS E DE AMINOÁCIDOS ENTRE A SEQUÊNCIA DO ALELO REFERÊNCIA G*01:01:01 E A SEQUÊNCIA OBTIDA PARA O ALELO 1 COMPARADO AO ALELO G*01:08.....	68
TABELA 5 -	DIFERENÇAS NAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS E DE AMINOÁCIDOS ENTRE A SEQUÊNCIA DO ALELO REFERÊNCIA G*01:01:01 E A SEQUÊNCIA OBTIDA PARA O ALELO 2 COMPARADO AO ALELO G*01:04:01.....	68
TABELA 6 -	TESTE DE EQUÍLÍBRIO DE HARDY-WEINBERG PARA O <i>LOCI HLA-A, -B, -DR E -G</i> EM DOADORES VIVOS E PACIENTES TRANSPLANTADOS.....	69

### APÊNDICE I - MATERIAIS E MÉTODOS

TABELA 7 -	CARACTERÍSTICAS DETERMINANTES PARA AGRUPAR OS PACIENTES COM OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE sHLA-G MONITORADOS.....	89
TABELA 8 -	PROTOCOLO DE IMUNOSSUPRESSÃO ADOTADO PARA TODOS OS PACIENTES.....	90

## LISTA DE SIGLAS

AP-1	- <i>activator protein-1</i> (proteína ativadora-1)
APC	- <i>antigen presenting cells</i> (célula apresentadora de antígeno)
ATG	- <i>anti- thymocyte globulin</i> (globulina anti-timócito)
AZA	-azatioprina
CD	-célula dendrítica
CDC	-citotoxicidade dependente do complemento
CIITA	- <i>class II transactivator</i> (transativador de classe II)
CREB	- <i>cAMP response element binding protein</i> (elemento de resposta ao AMPc)
CsA	-ciclosporina
CtBP	- <i>C-terminal binding protein</i> (proteínas de ligação C-terminal)
DAMPs	- <i>damage-associated molecular patterns</i>
DSA	- <i>donor specific antibody</i> (anticorpos anti-HLA do doador específico)
FKBP	- <i>FK506 binding-protein</i> (proteína de ligação a FK506)
H-2	-histocompatibilidade-2
HAT	-histona acetiltransferase
HDAC	-histonas deacetilases
HLA	- <i>Human Leukocyte Antigen</i> (Antígeno Leucocitário Humano)
HUEC	-Hospital Universitário Evangélico de Curitiba
IFN $\gamma$	-interferon $\gamma$
IL-2	-interleucina 2
IL-10	-interleucina 10

ILT	- <i>transcript like Ig</i> (transcrito semelhante à Ig)
IRF	- <i>interferon regulatory factor</i> (fator de regulatório de interferon)
ISRE	- <i>interferon response element</i> (elemento de resposta estimulado por interferon)
ITIM	- <i>immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i> (imunoreceptor com motivo de inibição baseado em tirosina)
IVGIg	- <i>intravenous immunoglobulins</i> (imunoglobulinas intravenosas)
KIR	- <i>killer immunoglobulin-like receptor</i> (receptor semelhante a imunoglobulina das células NK)
MHC	- <i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complexo Principal de Histocompatibilidade)
MMF	-micofenolato mofetil
mTORC1	- <i>mammalian target of rapamycin complex 1</i> (complexo 1 alvo da rapamicina de mamíferos)
NF-Y	- <i>nuclear factor Y</i> (fator nuclear Y)
NF-K $\beta$	- <i>nuclear factor-K<math>\beta</math></i> (fator de transcrição nuclear-K $\beta$ )
NK	- <i>natural killer cells</i> (células exterminadoras naturais)
pDNA	-DNA plasmidial
PRA	-painel reativo de anticorpos
RE	-retículo endoplasmático
ROS	- <i>reactive oxygen species</i> (espécies reativas a oxigênio)
RREs	- <i>Ras-responsive elements</i> (elementos de resposta a Ras)
RREB1	- <i>Ras responsive element binding protein 1</i> (proteína 1 de ligação a RREs)
sHLA-G	- <i>soluble HLA-G</i> (HLA-G solúvel)

SNT	-Sistema Nacional de Transplantes
SUS	-Sistema único de Saúde
TAP	- <i>transporter associated with antigen processing</i> (transportador associado com o processamento de antígenos)
TCR	- <i>T cell receptor</i> (receptor de célula T)
TFs	- <i>transcriptional factors</i> (fatores transcritoriais)
TLR	- <i>toll like receptor</i> (receptores <i>toll-like</i> )
Tregs	-células T regulatórias
USP	-Universidade de São Paulo
$\beta_2m$	- $\beta_2$ -microglobulina

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	4
2.1 HISTÓRIA DO TRANSPLANTE RENAL .....	4
2.2 COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE .....	6
2.2.1 Regulação dos genes <i>MHC</i> .....	11
2.3 IMUNOLOGIA DO TRANSPLANTE .....	14
2.3.1 Variáveis clínicas consideradas do pré ao pós-transplante .....	16
2.3.2 Tratamentos de imunossupressão .....	19
2.3.3 Imunotolerância .....	24
2.4 HLA-G .....	26
2.4.1 Estrutura do gene <i>HLA-G</i> .....	28
2.4.2 Isoformas da molécula HLA-G .....	32
2.4.3 Polimorfismos do gene <i>HLA-G</i> .....	34
2.4.4 Papel do gene <i>HLA-G</i> na imunotolerância .....	35
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	39
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	40
4.1 OBJETIVO GERAL .....	40
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	40
<b>5 RESULTADOS</b> .....	41
ARTICLE .....	41
Abstract .....	41
Introduction .....	42
Materials and Methods .....	43
Patients .....	43

Sampling .....	45
<i>HLA-G</i> Genotyping .....	45
Enzyme-Linked Immunosorbent Assay .....	46
Estatistical analysis.....	46
<i>Results</i> .....	47
Discussion.....	51
Acknowledgments .....	55
References .....	56
6 DISCUSSÃO .....	59
6.1 DESCRIÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA .....	59
6.2 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE sHLA-G.....	60
6.3 ANÁLISE DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DE <i>HLA-G</i> .....	65
7 CONCLUSÃO.....	72
REFERÊNCIAS .....	74
APÊNDICE .....	88
APÊNDICE 1 - MATERIAIS E MÉTODOS .....	89
1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	89
2 GENOTIPAGEM DO GENE <i>HLA-G</i> .....	91
2.1 Extração do DNA genômico.....	91
2.2 Amplificação das sequências de DNA para genotipagem.....	92
2.3 Análise dos fragmentos de PCR .....	92
2.4 Reação de sequenciamento dos fragmentos amplificados.....	93
2.5 Precipitação e preparação das reações de sequenciamento .....	94
3 QUANTIFICAÇÃO DE HLA-G SOLÚVEL .....	95
3.1 Obtenção do plasma.....	95
3.2 Teste ELISA .....	95

3.3 Mensuração.....	96
4 ANÁLISE E CLONAGEM DOS VARIANTES ALÉLICOS.....	96
4.1 Ligação dos fragmentos de DNA ao vetor .....	97
4.2 Transformação das células termocompetentes .....	97
4.3 Mini-preparação dos plasmídeos .....	98
4.4 Reação de Sequenciamento do pDNA.....	99
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	99
ANEXOS .....	101
ANEXO I – PARECER DE LIBERAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA .....	102
ANEXO II -PARECER DE LIBERAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO HUEC .....	106
ANEXO III - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	108



## 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 um dos maiores programas de transplantes públicos de órgãos e tecidos do mundo (MEDINA-PESTANA *et al.*, 2011; GARCIA, 2012). Em dez anos o Brasil teve um aumento de 74% no número de transplantes (Ministério da Saúde, 2013). 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. Contudo, cerca de 19.500 pacientes ainda estão na lista de espera por transplante renal no Brasil (ABTO, 2013). O Paraná, apesar de estar entre os três estados brasileiros que mais realizaram transplantes no ano de 2013, também está entre os estados com maior lista de espera para transplante renal (ABTO, 2013).

O transplante renal é a principal terapia adotada por pacientes que possuem doenças renais em estado avançado, em detrimento da terapia via hemodiálise, a qual geralmente está associada a uma má qualidade de vida dos pacientes tratados (FUJISAWA *et al.*, 2000).

As pesquisas relacionadas ao desenvolvimento das técnicas para a realização de transplantes datam de 1930, porém, ainda hoje existem dificuldades, principalmente no período pós-transplante, quando os episódios de rejeição podem se desenvolver (JEAN-PAUL, 2011). Assim, o estudo da imunologia dos transplantes tem se mostrado fundamental para a evolução de diversas áreas, desde as relacionadas aos métodos de diagnóstico precoce da rejeição do enxerto, ao monitoramento não invasivo da resposta imune e principalmente, as pesquisas relacionadas ao estabelecimento da imunotolerância (MEDINA-PESTANA *et al.*, 2011).

O fenômeno biológico da rejeição passou a ser compreendido principalmente por meio dos estudos de Peter Medawar (1944). Medawar foi um dos primeiros pesquisadores a

deduzir que a rejeição seria um evento imunológico. Esta relação possibilitou o início dos estudos na área da imunologia dos transplantes (ABBAS, 2012). Posteriormente, outros trabalhos vieram a definir que a principal resposta imunológica observada em transplantes é dirigida a glicoproteínas de membrana, comumente referidas como aloantígenos ou moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*). Desse modo, muitos anticorpos presentes no indivíduo receptor podem interagir e agir contra antígenos HLA do doador, induzindo respostas imunes que podem levar a rejeição, sendo considerada a principal limitação à sobrevida do órgão ou tecido transplantado (BATEL; TERASAKI, 1969).

Os genes que codificam as glicoproteínas MHC foram identificados primeiramente em camundongos na década de 40 por Gorer e Snell. Seus estudos também levaram a uma melhor compreensão da rejeição de enxertos (GORER, 1937; SNELL, 1948). Em humanos, as moléculas MHC e seus respectivos genes codificadores receberam a denominação de antígenos leucocitários humanos (HLA, do inglês *Human Leukocyte Antigen*) (McDEVITT, 2000).

Os genes do MHC humano estão localizados no braço curto do cromossomo 6, estendendo-se por cerca de 4 Mb e compreendendo três regiões: MHC de classe I, II, e III (LAMM *et al.*, 1985; ELSEN *et al.*, 2003). As regiões cromossômicas do MHC de classe I e II, são caracterizadas por terem genes polimórficos, polialélicos e com capacidade de se expressar de forma co-dominante (ABBAS, 2012). Assim, as variações da resposta imune nos indivíduos resultam principalmente do polimorfismo genético observado nos genes *HLA* e outros genes do sistema imune, alguns deles situados na região MHC de classe III.

Na região MHC de classe I situam-se seis genes *HLA* que codificam a cadeia pesada ( $\alpha$ ) que compõe as diferentes proteínas HLA de classe I clássicas (*HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C*) e não clássicas (*HLA-E*, *HLA-F* e *HLA-G*). A forma de atuação das glicoproteínas não clássicas ainda não é bem compreendida (GARCÍA *et al.*, 2012).

O foco deste trabalho será o estudo da proteína HLA classe I não clássica *HLA-G* e também de seu gene *HLA-G*. A molécula *HLA-G* apresenta isoformas expressas tanto ligadas à membrana celular, como isoformas que podem ser detectadas circulantes no sangue periférico. A expressão do gene *HLA-G* e distribuição da glicoproteína *HLA-G* é restrita a

alguns tipos específicos de células e tecidos. Funcionalmente está relacionada a mecanismos moleculares que estimulam a imunotolerância no estabelecimento da associação materno-fetal, auxiliam no estabelecimento de células tumorais e com isso prevalecem o desenvolvimento do câncer. A expressão de HLA-G em ilhotas pancreáticas também foi associada à imunomodulação ao evitar o desenvolvimento da resistência à insulina (CIRULLI *et al.*, 2006). Níveis elevados de moléculas HLA-G solúveis (sHLA-G) foram associadas à maior sobrevida de aloenxertos em transplantes de coração (LILA *et al.*, 2000; LILA *et al.*, 2002) e fígado (BASTURK *et al.*, 2006). Ainda, estudos de transcriptoma indicaram ter a molécula HLA-G um potencial para ser utilizada como marcadora na descrição do estado imunológico de pacientes transplantados renais (RACCA *et al.*, 2009).

Considerando a existência de relação positiva entre as concentrações de sHLA-G no plasma de pacientes transplantados renais e a aceitação destes aos seus aloenxertos, este trabalho monitorou os níveis de sHLA-G em pacientes transplantados renais. O período de monitoramento considerado foi do pré ao pós-transplante e a mensuração foi realizada via imunoensaios. Também foi realizada a genotipagem por meio da técnica de sequenciamento do gene *HLA-G* dos pacientes monitorados e dos seus respectivos doadores. O intuito da genotipagem foi identificar variantes alélicas do gene *HLA-G* que pudessem também estar associados a uma melhor ou pior aceitação dos aloenxertos renais.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 HISTÓRIA DO TRANSPLANTE RENAL

No início do século XX, o rim tornou-se modelo de órgão para estudo de transplantes. Tais estudos eram realizados em cães, porcos e outros animais, visando também aprimorar as técnicas cirúrgicas. A metodologia adotada para as cirurgias se desenvolveu rapidamente, porém o controle das reações imunológicas na fase pós-cirúrgica demorou mais para ser alcançado (KUSS; BOURGET, 1992; JEAN-PAUL, 2011).

O primeiro transplante renal heterotópico (quando o enxerto é inserido num local anatomicamente não habitual) foi realizado em 1933. Nesta cirurgia foi transplantado o rim de um doador falecido para um receptor com risco de morte por falha renal. O rim foi transplantado na região da virilha, mas no quarto dia pós-transplante o paciente faleceu. Somente em 1952, em Paris, no Hospital de Necker, foi realizado outro transplante de mãe para filha, no qual o rim transplantado se manteve funcional por três semanas, mesmo sem a administração de imunossupressão. Porém a rejeição acabou se desenvolvendo e a paciente foi a óbito (JEAN-PAUL, 2011).

Em 1954, o transplante ortotópico (quando o aloenxerto é inserido em sua localização anatômica habitual) entre gêmeos univitelinos finalmente teve sucesso, onde tanto receptor como o doador sobreviveram por um longo período após a cirurgia. Assim o transplante entre gêmeos foi repetido muitas outras vezes. Neste período, as principais variáveis, hoje consideradas no pré-transplante, como a imunossupressão, marcadores de histocompatibilidade e os métodos de alocação do órgão do doador ao receptor, ainda não eram bem conhecidas (JEAN-PAUL, 2011).

O estudo dos mecanismos de imunotolerância se desenvolveram com Owen (1945), Burnet e Fenner (1951) e também com Billingham, Brent e Medawar (1953). Primeiro foi descoberto o fenômeno da tolerância neonatal, demonstrando que seria possível prevenir a resposta imune a aloantígenos. Os trabalhos desenvolvidos por Dausset, Payne e Van Rood, resultaram na definição dos aloantígenos e do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (DAUSSET, 1980).

Assim, visando interferir nestas complexas respostas imunológicas, agentes farmacológicos passaram a ser produzidos e introduzidos no controle das rejeições dos aloenxertos (JEAN-PAUL, 2011).

Ainda na década de 50, baseado na idéia do tratamento de doenças inflamatórias via esteroídes, iniciou-se a aplicação de glucocorticóides para prevenir as inflamações severas de rejeição aos aloenxertos. Em 1951, Elion e Hitchings desenvolveram o 6-mercaptopurina e a azatioprina (AZA). Já em 1960, o uso de glucocorticóides em conjunto com AZA foi adotado em conjunto a administração de doses elevadas de esteróides para reverter as rejeições (RUBIN, 2007).

A primeira aplicação de globulina anti-timócito (ATG) se deu nesta mesma década. Além disso, outros esforços relacionados à tentativa de promover a depleção das células do sistema imune, tais como a drenagem de ductos torácicos, irradiação, timectomia e esplenectomia também passaram a ser realizados (HALLORAN; GOURISHANKAR, 2001; JEAN-PAUL, 2011).

No ano de 1963, visando-se a preservação do enxerto foi introduzida a técnica do resfriamento intravascular aos transplantes. Posteriormente em 1978, foi descoberta a ciclosporina (CsA) e o seu uso clínico. Neste período tornou-se mais acessível à população a terapia via ALG, via anticorpos policlonais e monoclonais, como muromonab-CD3, o qual auxiliaram na redução das altas doses de esteróides, diminuindo com isso os eventos de rejeição. Na área médica, cirúrgica, anestésica, novas técnicas também trouxeram resultados clínicos mais positivos (JEAN-PAUL, 2011).

No Brasil o primeiro transplante foi realizado em 1965, entre dois irmãos, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP), pelos médicos Dr<sup>o</sup>. Emil Sabaga e Dr. Geraldo Campos Freire. Durante oito anos o paciente transplantado sobreviveu. A identidade HLA destes indivíduos não foi verificada antes do transplante, mas após foi descoberto que eram idênticas. Passados dois anos, ocorreu o primeiro transplante de doador cadáver no país (TUOTO, 2009).

Com o início do terceiro milênio, novas proteínas humanas começaram a ser disponibilizadas para a prevenção da rejeição. A terapia gênica e as novas classes de agentes, peptídeos e a terapia antisense, constituem atualmente o círculo das terapias promissoras que

estão em desenvolvimento para atuarem de forma específica e com foco na redução da toxicidade e aumento da eficiência das terapias imunossupressoras (MEDINA-PESTANA *et al.*, 2011). Atualmente o desenvolvimento de biomarcadores sensíveis e capazes de identificar o estado imunológico dos pacientes é também muito promissor, principalmente por visar o aprimoramento do tratamento de imunossupressão e por tentar prever precocemente eventos de rejeição, tudo no sentido de aumentar a estabilidade pós-transplante.

## 2.2 COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE

O sistema imune é composto por células e moléculas responsáveis pelo monitoramento e pela manutenção do equilíbrio do organismo quando exposto a micro-organismos e substâncias estranhas. A principal resposta imunológica observada após o transplante no paciente é contra os aloantígenos HLA do aloenxerto provenientes do doador, uma vez que essas proteínas são as que conferem uma identidade biológica única a cada indivíduo. A atuação destas glicoproteínas na resposta imune é capaz de estimular outras respostas que podem culminar na rejeição do enxerto (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

O primeiro *locus* MHC foi identificado em camundongos na década de 40 (GORER, 1937; SNELL, 1948). Evidenciou-se que este gene, localizado no cromossomo 17, teria como produto protéico o antígeno II, relacionado à mecanismos de rejeição. Por isso, a região de localização deste gene foi nomeada histocompatibilidade-2 (*H2*). Outros genes e produtos gênicos relacionados também foram descritos em camundongos e em outros mamíferos, assim de forma mais abrangente este *locus* passou a ser denominado de região do MHC (DUNHAN, 1987).

Após a identificação nos camundongos, também foi identificado na espécie humana genes e proteínas MHC que poderiam ser reconhecidas como estranhas em pacientes submetidos a transplantes. Nestes indivíduos foram detectados anticorpos específicos para certas proteínas presentes nas células de seus respectivos doadores, denominadas de antígenos leucocitários humanos (HLA). As proteínas HLA classe I e classe II são estruturalmente e funcionalmente semelhantes às proteínas H-2, primeiramente descritas em camundongos, e os

genes que as codificam são homólogos (RAMMENSEE; FRIEDE, STEVANOVIĆ, 1995; ABBAS, 2012).

Apenas em 1970 é que as moléculas HLA foram relacionadas funcionalmente a resposta imune, sendo consideradas capazes de interagir e apresentar peptídeos estranhos aos receptores de células T (TCR), desencadeando a resposta imune por meio da indução da citotoxicidade, da produção de citocinas e da ativação de células B (ZINKERNAGEL; DOHERTY, 1979 *apud* ALBERTS *et al.*, 2002; TIENG *et al.*, 2002; ABBAS, 2012).

Já o MHC em humanos é constituído tanto por genes de histocompatibilidade que codificam para moléculas HLA (genes *HLA*) (regiões de classe I e II), assim como para outros produtos gênicos envolvidos na resposta imune e não relacionados a estas respostas pertencentes à região MHC de classe III (McDEVITT, 2000). O MHC localiza-se no braço curto do cromossomo 6 (6p21.1 a 6p21.3) (Figura 1) e se estende por cerca de 4 Mb, ou 4 centimorgans, significando que ocorrem permutas com uma frequência de cerca de 4% a cada meiose.

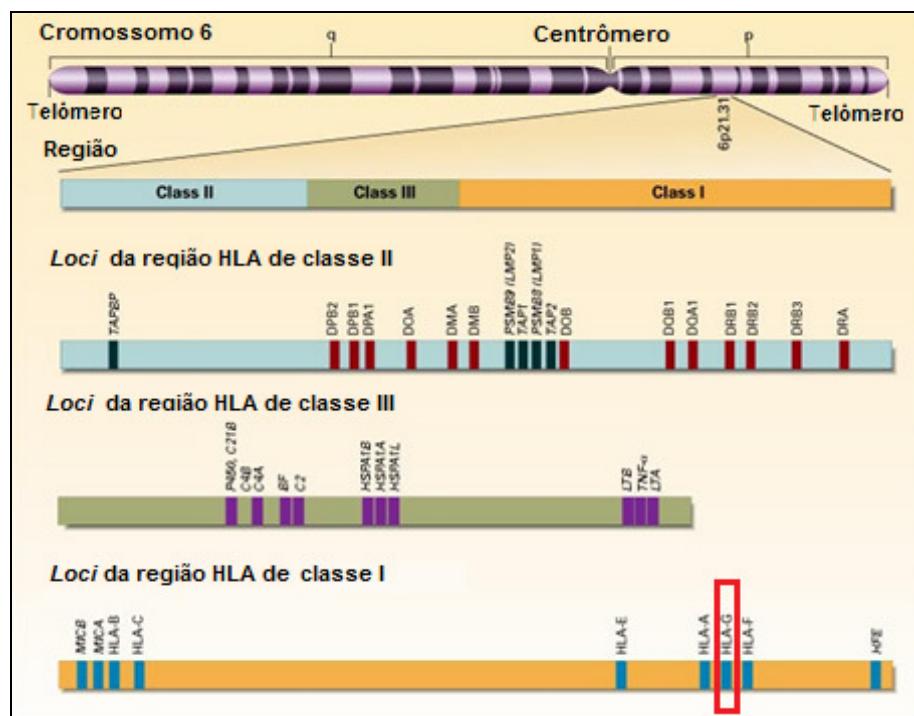


FIGURA 1 – MHC HUMANO

FONTE: modificado pelo autor de KLEIN *et al.*(2000)

A região MHC de classe I estende-se por cerca de 2 Mb, comporta *loci* gênicos codificadores de moléculas HLA e das glicoproteínas MICA e MICB. Ainda existem os pseudogenes, como: *HLA-H*, *-J*, *-K*, *-L*, *-P*, *-T*, *-U*, *-V*, *-W* e *-X* (FAINARDI *et al.*, 2003; IMGT/HLA, 2014), além dos pseudogenes truncados, fragmentos gênicos, genes com função não-imune, genes codificadores de proteínas de ligação a GTP, cadeia  $\beta$  da tubulina e fatores transcricionais. Dentre os genes *HLA*, são considerados os genes clássicos ou classe Ia os genes *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C*, e os não clássicos ou classe Ib os genes *HLA-E*, *HLA-F* e *HLA-G*. Os genes não clássicos são pouco polimórficos, apresentam distribuição e expressão restrita em certos tipos celulares e podem, no caso do *HLA-G*, ser transcritos de forma alternativa, via recomposição do RNA originando diferentes isoformas.

A forma de atuação destas glicoproteínas não clássicas ainda não é bem compreendida (GARCÍA *et al.*, 2012). O HLA-E parece atuar na inibição da ação das células NK e na apresentação de peptídeos sinais provenientes dos genes *HLA* de classe I e II, como uma forma de sinalizar que a expressão destas moléculas está normal nas células (ELSEN *et al.*, 2003). Já o HLA-F parece interagir com HLA-G em certas interações moleculares que estimulam a imunotolerância no estabelecimento da associação materno-fetal. O HLA-G estaria atuando nesta situação inibindo a ação de células T e de células NK, além de inibir a migração transendotelial das células NK (ELSEN *et al.*, 2003).

Os genes *HLA* de classe I (*MHC-I*) codificam para a cadeia  $\alpha$  das glicoproteínas HLA de classe I, a qual é complementada pela junção da cadeia leve não polimórfica  $\beta_2$ -microglobulina ( $\beta_2m$ , codificada por seu gene localizado no cromossomo 15) formando moléculas heterodiméricas (FIGURA 2) (ALBERTS *et al.*, 2002; ELSEN *et al.*, 2003). A cadeia  $\alpha$  é constituída pelos domínios  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ , formando a fenda de ligação do peptídeo, e pelo domínio  $\alpha_3$ , o qual se assemelha a região constante das imunoglobulinas e mantém via ligação não covalente a interação com a  $\beta_2m$ ; cada domínio é codificado por um éxon diferente do gene *MHC-I* (LEFRANC *et al.*, 2005).



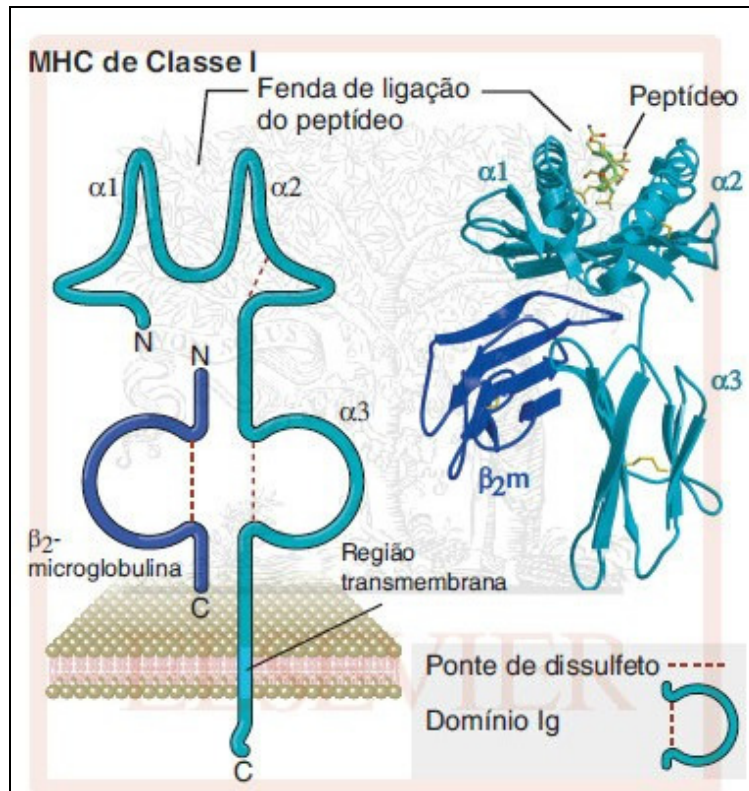


FIGURA 2 – ESTRUTURA DO MHC DE CLASSE I HUMANO  
 FONTE: ABBAS (2012)

A região MHC de classe II apresenta 0,8 Mb e é constituída por genes da região *HLA-D*, com as subregiões, *HLA-DP*, *-DQ*, *-DR*, *-DM* e *-DO*, cada uma contendo *loci* codificadores de cadeia  $\alpha$  e  $\beta$  (FIGURA 3) (GARCÍA *et al.*, 2012). A expressão destes genes é restrita a células especializadas na apresentação de antígenos (APCs), como as células dendríticas (CDs), linfócitos B, macrófagos, células epiteliais do timo, células endoteliais, células de Langerhans, assim como em células T (ELSEN *et al.*, 2003). Esta região também é constituída por quatro genes codificadores de proteínas do proteassomo e genes de transportadores protéicos (TAP 1 e TAP 2). As moléculas HLA de classe II expressas a partir desta região consistem em uma cadeia  $\alpha$ , com domínios  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ , e uma cadeia  $\beta$  com domínios  $\beta_1$  e  $\beta_2$  (ABBAS, 2012). Os domínios  $\alpha_1$  e  $\beta_1$  formam a fenda de ligação do peptídeo e os domínios  $\alpha_2$  e  $\beta_2$  são semelhantes a imunoglobulinas.

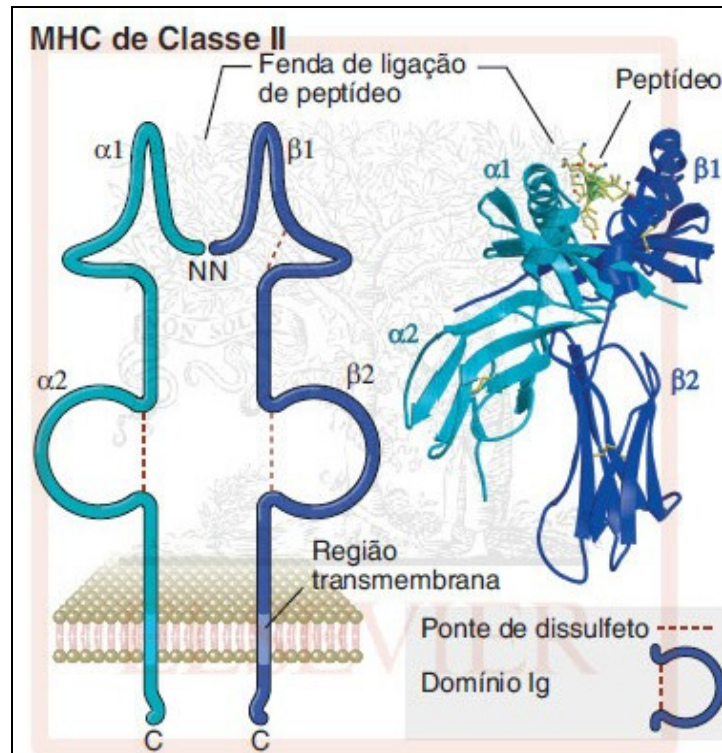


FIGURA 3 – ESTRUTURA DO MHC DE CLASSE II HUMANO  
 FONTE: ABBAS (2012)

As vias pelas quais seguem as moléculas MHC de classe I e II após serem produzidas em polirribossomos e migrarem para o retículo endoplasmático (RE) rugoso são diferentes. As glicoproteínas de classe I sintetizadas ainda no RE se ligam a peptídeos de 8 a 11 aminoácidos processados. Estes peptídeos provêm da degradação proteolítica de proteínas citosólicas (via ubiquitinação e proteossomos ou via peptidase sinal), as quais são sintetizadas pela própria célula (proteínas próprias), ou são produtos protéicos produzidos por vírus ou outros patógenos que tenham sido processados no meio intracelular, podendo ser provenientes de fagossomos. Estas proteínas então são marcadas via ubiquitinação e são clivadas em proteossomos ou quando marcadas por sequência de aminoácidos sinais são clivadas por peptidase sinal. Os fragmentos peptídicos produzidos se ligam a MHC de classe I, que as apresenta na superfície celular, para que possam interagir com receptores expressos pela maioria das células nucleadas, além da principal a célula T CD8<sup>+</sup> (TOWNSEND; BODMER, 1989; ABBAS, 2012; RAMMENSEE; FRIEDE; STEVANOVIĆ, 1995).

As glicoproteínas de classe II são sintetizadas no RE e após são transportadas até endossomos para se ligarem a peptídeos com 10 a 30 aminoácidos processados. Estes peptídeos são provenientes da digestão enzimática de proteínas do meio extracelular (de

origem microbiana, proteínas secretadas, como anticorpos, ou proteínas de membrana celular) que foram internalizadas por APCs especializadas. Após serem processados estes peptídeos se ligam a moléculas MHC de classe II, formando complexos capazes de interagir com receptores de células do sistema imune, principalmente com as células T CD4<sup>+</sup> (CRESSWELL, 1994; ABBAS, 2012).

Para a região do MHC de classe III, são conhecidos 59 genes, dentre os quais estão alguns relacionados ao sistema complemento (*Bf*, *C2*, *C4A* e *C4B*), a citocinas (como TNF e outras linfotoxinas), além de proteínas de choque térmico (MATSUZAKA *et al.*, 2001; GARCÍA *et al.*, 2012).

### 2.2.1 Regulação dos genes *MHC*

Diante do papel central que as moléculas MHC de classe I e II exercem em relação ao sistema imune, os genes que as codificam são regulados para que sejam expressos apenas nos locais e em momentos corretos. Além das sequências CAAT e TATA *box* que são importantes por se ligarem e posicionarem o complexo de iniciação de transcrição basal, variados elementos regulatórios de ação *cis* estão envolvidos com a expressão dos genes *MHC* de classe I e II (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

Os elementos reguladores presentes na região promotora dos genes *MHC-I* (codificadores da cadeia pesada  $\alpha$ ) são: o intensificador A, o elemento de resposta estimulado por interferon (ISRE), o sítio  $\alpha$  e o intensificador B (ELSEN *et al.*, 2003) (FIGURA 4).



FIGURA 4 – ESTRUTURA DA REGIÃO PROMOTORA DOS GENES *MHC-I*

FONTE: modificado pelo autor de ELSSEN *et al.* (1998)

O intensificador A apresenta sítios de ligação ( $\kappa$ B1 e  $\kappa$ B2) para fatores de transcrição nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Estes sítios apresentam variações nucleotídicas que resultam na interação com diferentes subunidades constituintes do NF- $\kappa$ B e podem alterar a regulação da transcrição dos genes *MHC*. O ISRE apresenta sítios para o fator regulatório de interferon 1 (IRF-1), que estimula a expressão gênica e apresenta sítios para IRF-2, que atua reprimindo a expressão do *MHC* (ELSEN *et al.*, 2003). Portanto os genes *MHC* de classe I estão sob regulação de NF- $\kappa$ B e IRF-1 e -2. O IFN- $\gamma$  apresenta um papel crucial na regulação da transcrição dos genes *MHC-I* sendo capaz de induzir a via JAK/STAT e sinalizar para a transcrição dos genes que expressam IRF-1. Então IRF-1 interage com ISRE induzindo a expressão dos genes *MHC-I* (ELSEN *et al.*, 1998).

O sítio  $\alpha$  é homólogo aos elementos de resposta a cAMP (CRE) e *in vivo* fica constitutivamente ligado a fatores transcricionais da família ATF/CREB e da família Fos/Jun. O papel da interação destes fatores com este sítio ainda devem ser melhor elucidados (ELSEN *et al.*, 1998).

O intensificador B é uma sequência invertida de CCAAT *box* (ATTGG), a qual é bem conservada entre os *loci HLA* de classe I e também identificada no promotor dos genes *MHC-II*, em Y *box*. Este elemento é importante por atuar na estabilização da interação de fatores transcricionais com elementos regulatórios (ELSEN *et al.*, 1998).

Os genes *MHC* de classe II (codificadores das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ ) apresentam uma região promotora conservada composta por elementos regulatórios de ação *cis*, mas que apresentam certas diferenças entre os *loci*, além das diferenças alelo-específicas (FIGURA 5).

O módulo SXY (ou W/S, X1 e X2, Y *box*) é um elemento regulador dos genes *MHC-II*, localizado a montante das sequências codificadoras e é composto por sequências *box*. Este elemento se liga ao complexo multiproteico constituído por RFX (composto por RFX5, RFX/ANK e RFX/AP), por proteínas da família CREB/ATF e NF-Y (fator nuclear Y), formando um complexo acentuador transcricional (REITH *et al.*, 1999; ELSEN *et al.*, 2003). Para que este complexo seja ativo é fundamental a interação proteína-proteína com o transativador de classe II (CIITA), o principal regulador da ativação da expressão do *MHC* (REITH *et al.*, 1999; ELSEN *et al.*, 2003). CIITA é sintetizado em resposta ao IFN- $\gamma$ , que por

sua vez é a citocina de maior influência sobre o estímulo da expressão de genes *MHC* aliado ao fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).

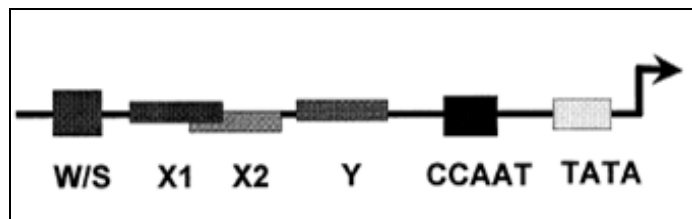


FIGURA 5 – ESTRUTURA DA REGIÃO PROMOTORA DOS GENES *MHC-II*

FONTE: modificado pelo autor de ELSEN *et al.* (1998)

Ainda os elementos reguladores, citados anteriormente, por meio da metilação de citosinas em ilhas CpGs podem ser impedidos de se ligar aos fatores transcricionais (TFs) suprimindo a expressão de genes *MHC*. Também a conformação da cromatina nestas regiões, via alteração da ligação às histonas (H3 e H4) podem aumentar (via acetilação de lisinas) ou diminuir (via desacetilação de lisinas) a acessibilidade do DNA aos TFs. O próprio transativador CIITA apresenta atividade de histona acetiltransferase (HAT), atuando na remodelação da cromatina, permitindo a transcrição do *MHC* (CHOI; MAJUMDER; BOSS, 2011).

Estes mecanismos epigenéticos explicam a baixa expressão de moléculas MHC em determinadas células, como: espermatozoides, ovócitos, células do trofoblasto, assim como células tumorais (ELSEN *et al.*, 2003; CHOI; MAJUMDER; BOSS, 2011). A perda da expressão de moléculas MHC de classe I na superfície de membranas celulares também está associada à mutação ou expressão alterada de genes que codificam para a cadeia pesada de HLAs de classe I,  $\beta_2m$ , TAP, LMP, ou genes de tapasina (ELSEN *et al.*, 2003). A epigenética deve ser considerada também em outras situações fisiológicas, como em transplante de órgãos, quando o epigenoma do receptor pode influenciar a expressão de genes *MHC* em células do aloenxerto (McCAUGHAN *et al.*, 2012).

### 2.3 IMUNOLOGIA DO TRANSPLANTE

Na área de estudo da imunologia do transplante sabe-se que os maiores causadores das perdas dos aloenxertos são os efeitos das moléculas MHC antigênicas, como HLA-B e HLA-DRB1, os quais podem induzir a formação de anticorpos específicos anti-HLA do doador (DSA, do inglês *donor specific antibody*). A incompatibilidade HLA-DRB1, tem efeito maior nos primeiros seis meses após o transplante, já as consequências de *mismatches* HLA-B são maiores por volta dos dois anos após o transplante. Com relação à HLA-A, sabe-se que a incompatibilidade entre doador e receptor também promove uma diminuição na sobrevida do aloenxerto (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

Molecularmente o principal efeito destas glicoproteínas expressas pelas células do aloenxerto é a identificação destas HLAs como aloantígenos pelos receptores das células T (TCR) do paciente. Existem três principais vias de alorreconhecimento mediado por moléculas HLA de células T que capazes de explicar os eventos que promovem o desenvolvimento da rejeição (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

A via direta envolve o alorreconhecimento e ativação de células T do paciente, com consequente ativação da imunidade adaptativa, via ligação de glicoproteínas MHC expressas pelas células dendríticas (CDs) do tecido do doador. Esta interação é possível, porque as CDs do aloenxerto sob influência de citocinas inflamatórias migram do enxerto para os órgãos linfóides do paciente, onde entram em contato com as células T. No reconhecimento direto, os receptores de linfócitos T identificam as moléculas HLAs do doador como próprias, mas os peptídeos por elas apresentados são reconhecidos como antigênicos. Assim, o mecanismo direto de reconhecimento é um evento determinante para a forte resposta imune das rejeições agudas (GARCÍA *et al*, 2012).

A rejeição aguda é caracterizada por se desenvolver após dias, semanas ou até três meses após o transplante, podendo ocorrer quando a administração de imunossupressores ao paciente é diminuída. Outra característica é o alorreconhecimento mediado por células T do paciente que promove a destruição de células do aloenxerto após reconhecerem aloantígenos do doador apresentados por CDs. Esta reação ocorre em resposta a citocinas que estimulam a infiltração dos linfócitos (ABBAS, 2012; Ministério da Saúde, 2012). Anticorpos produzidos pelo paciente também atuam se ligando a superfície de células endoteliais do aloenxerto. Isto

ativa o sistema complemento, o qual desencadeia a lise celular e impede a sobrevivência do aloenxerto por longo tempo no organismo do paciente (INGULLI, 2008; ABBAS, 2012).

Diferentemente da via direta, na resposta de alorreconhecimento indireto, é necessário a etapa de internalização celular e processamento dos aloantígenos (glicoproteínas HLA expressas pelas células do aloenxerto) pelas APCs do paciente transplantado. A apresentação de peptídeos por meio das moléculas HLA expressas em células do paciente a células T resulta na ativação da resposta imune. Esta resposta de ativação dos receptores das células T se completa promovendo a propagação, a proliferação e diferenciação de linhagens de células T, a produção de citocinas e a migração de células T para os sítios inflamatórios (McCAUGHAN *et al.*, 2012).

A via de alorreconhecimento indireto é o principal mecanismo que explica o desenvolvimento das rejeições crônicas (GARCÍA *et al.*, 2012). A rejeição crônica é a principal causa da perda de aloenxertos, podendo se desenvolver após meses ou anos da realização do transplante. Neste caso o órgão desenvolve diversas características, desde lesões, incluindo proliferação de células epiteliais, endoteliais e musculares, e a deposição de colágeno no parênquima do enxerto. Todos esses processos resultam em fibrose intersticial, isquemia (por conta da oclusão arterial) e subsequente perda de função do enxerto (INGULLI, 2008; ABBAS, 2012).

O terceiro mecanismo possível de ocorrer no contexto da rejeição é mediado por receptores semelhantes a imunoglobulinas das células NK (denominados KIR). A ativação normal destes receptores via ligação a HLA-C, -B e -A, promove a inativação das células NK, ao demonstrar que as células que os expressam estão em homeostasia. Na ausência dos ligantes HLA próprios, como as células do aloenxerto, esta ausência de ligantes KIR promove a ativação das células NK do paciente. Esta ação, segundo a teoria *missing self* (falta do próprio), faz com que as células NK ativadas promovam a citólise das células do doador e consequente desenvolvimento do evento da rejeição (GARCÍA *et al.*, 2012).

A imunidade inata apresenta um papel relevante nos eventos de rejeição imediatos ao transplante, esta resposta é também explicada pela “Hipótese da injúria” (LAND *et al.*, 1994). Segundo esta, o aloenxerto pode ser inicialmente afetado pelas espécies reativas a oxigênio (ROS) durante a reperfusão, logo após a cirurgia, quando são produzidos DAMPs (*damage-associated molecular patterns*), como proteínas de choque térmico, as quais são reconhecidas por receptores TLR4 e TLR2 (TLR, *toll like receptor*). Estes receptores TLR estimulam

outras vias levando a transcrição de fatores importantes, como NF- $\kappa$ B, AP-1 (proteína ativadora-1) e fatores transcricionais para interferons (CORNELL; SMITH; COLVIN, 2008).

A ativação de NF- $\kappa$ B e da proteína AP-1 resulta no estímulo da resposta imune mediada por meio de macrófagos. A ativação de IRF promove alterações na regulação da expressão de genes relacionados a proliferação, diferenciação e apoptose em células importantes para o sistema imune (RE; STROMINGER, 2001; HISCOTT *et al*, 2004; SCHRODER *et al*, 2004; ).

Ainda, momentos após a realização do transplante, a presença de anticorpos preexistentes na circulação sanguínea do paciente receptor do aloenxerto, pode desencadear a rejeição hiperaguda mediada por anticorpos (AMR, *antibody-mediated rejection*). Estes anticorpos estão presentes em função da exposição prévia a aloantígenos mediante transfusões sanguíneas, transplantes anteriores ou gestações múltiplas (CORNELL; SMITH; COLVIN, 2008). Este tipo de rejeição se inicia após a anastomose dos vasos sanguíneos do receptor com o aloenxerto, quando os anticorpos preexistentes se ligam a antígenos endoteliais do doador. Como resultado, o sistema complemento é ativado promovendo a trombose intravascular (agregação plaquetária) e oclusão vascular, terminando em lesão isquêmica irreversível do aloenxerto (ABBAS, 2012). A incompatibilidade ABO também pode resultar neste tipo de rejeição, visto que antígenos ABO são expressos em células endoteliais (CORNELL; SMITH; COLVIN, 2008). No entanto doadores e receptores são pareados corretamente com relação a este sistema.

### 2.3.1 Variáveis clínicas consideradas do pré ao pós-transplante

As avaliações laboratoriais para acompanhamento dos pacientes são conduzidas do período do pré ao pós-transplante a fim de se manter a função renal estável e para evitar o desenvolvimento de eventos de rejeição do rim transplantado. Dentre os exames realizados está a verificação de compatibilidade genética via genotipagem HLA-A, -B e -DRB1, a determinação do painel reativo de anticorpos (PRA) do paciente, a realização de biópsias com uso de imuno-histoquímica para diagnóstico de rejeição mediada por anticorpos, além da avaliação da função renal, no caso dos transplantes renais, antes e após a cirurgia principalmente via quantificação da creatinina.



O elevado polimorfismo e as inúmeras combinações dos haplótipos (HLA-A, -B e -DRB1) que são observados nos indivíduos para originar estas moléculas diminuem a probabilidade de se encontrar pares doador-receptor totalmente compatíveis. Historicamente, a tipagem HLA era conduzida por meio de testes sorológicos utilizando antisoro em ensaios de citotoxicidade dependente de complemento (TERASAKI, 2012). Atualmente são utilizadas técnicas moleculares de genotipagem, as quais são mais precisas: via sequenciamento, técnicas de hibridização ou microarranjos. Existe uma clara relação entre o grau de semelhanças ou *matches* HLA e as chances de sobrevivência do aloenxerto transplantado entre doadores vivos relacionados (GARCÍA *et al*, 2012). Foi demonstrado ainda que o efeito de *matches* de HLA é aditivo aos efeitos dos imunossuppressores, assim quanto maior o número (entre zero e seis), maiores são as chances de sucesso no transplante, aliado a menor necessidade do emprego de imunossuppressores (CECKA, 2010).

Ainda a dinâmica do transplante de órgãos sólidos a partir de doadores falecidos, apesar de ser responsável pela maior parte dos transplantes, criou um obstáculo para o encontro da compatibilidade HLA. Os doadores aparecem em diferentes locais e momentos, e o tempo para se encontrar um receptor adequado é limitado pelo tempo que o órgão do indivíduo falecido consegue ser mantido viável antes de ser implantado cirurgicamente no receptor (MEDINA-PESTANA *et al.*, 2011).

Os pacientes que necessitam de transplante de coração, fígado e pulmão, geralmente não são pareados com doadores HLA compatíveis. Com isso é de grande relevância a exploração de outros mecanismos imunológicos envolvidos com a melhor aceitação ao enxerto e que possam ser manipulados e monitorados no pós-transplante. Também a sobrevivência de pacientes transplantados por mais de 20 anos sem desenvolver rejeição e que, em muitos casos, abandonaram o uso de medicamentos imunossuppressores, pode ser considerada como uma evidência da existência de mecanismos relacionados a imunotolerância que precisam ser elucidados e explorados a fim de aumentar a sobrevida de pacientes transplantados (CECKA, 2010).

Como mencionado, a creatinina é um dos biomarcadores mais utilizados para monitoramento dos pacientes transplantados renais. Ela resulta do metabolismo da creatina muscular, logo a quantidade de creatinina produzida é proporcional a massa muscular de cada indivíduo e pode variar de 0,6 a 1,3mg/dL, de acordo com a maioria dos laboratórios de

análises clínicas. O uso da dosagem da creatinina sérica, plasmática ou da urina como método clínico de avaliação do estado da função renal considera como qualidades deste marcador a constância na qual é formada e excretada, além de ser mais confiável como índice de função renal quando comparado a uréia e também por ser determinada de forma simples e reproduzível via método do picrato alcalino (MOTTA, 2011).

Outra análise de rotina citada é do PRA (painel reativo de anticorpos), o qual consiste na identificação e quantificação de anticorpos anti-HLA classe I ou II pré-formados e presentes no soro do paciente receptor via imunoensaio (GARCÍA *et al.*, 2012). O soro do paciente pode ser analisado contra um painel de células representativo da população que contenham a perfil de diferentes tipos de HLA (prova heteróloga) ou contra linfócitos expressando HLA do doador (prova cruzada ou *crossmatch*). A prova cruzada possibilita a detecção de anticorpos presentes no soro do receptor que atuem contra antígenos específicos do doador (DSA). Os valores de PRA podem se alterar mediante eventos que induzam a produção de anticorpos. Estes eventos podem ser: transfusões sanguíneas, transplantes prévios ou gestações, assim como a formação de imunocomplexos no aloenxerto, que estaria afetando a detecção dos anticorpos no sangue periférico coletado para análise, apesar dos anticorpos poderem estar sendo altamente produzidos (BORELLI *et al.*, 1999).

No pós-transplante o PRA também é utilizado para monitoramento do sistema imunológico do paciente na prevenção de rejeições. Assim, este exame é importante tanto para auxiliar na preparação do paciente para a cirurgia, como na escolha do par doador-receptor a fim de se evitar episódios de rejeição (OTTEN *et al.*, 2012).

A realização de biópsias com uso de imuno-histoquímica para detecção de C4d também é muito empregada nos casos onde se presume ter rejeição mediada por anticorpos (FEUCHT *et al.*, 1993). O C4d é um fragmento inativo oriundo da degradação tardia de C4b, este por sua vez faz parte da via clássica do complemento. Neste via antígenos presentes na membrana de células alvo interagem com anticorpos específicos (imunoglobulinas). A região constante destes anticorpos permanecem livres para interagir com C1. Esta ligação promove a ativação da via clássica do complemento acarretando no recrutamento de C4, o qual é clivado produzindo C4b. Esta molécula permanece ligada a C1 e prossegue na cascata de ativação e clivagem de outras moléculas que culminará na lise da célula alvo (NADASDY *et al.*, 2005).

Apesar de C4d não exercer nenhuma função imune, esta molécula permanece ligada ao tecido por até dias após a liberação das imunoglobulinas que ativaram a via clássica do

complemento e seu ligante C1, que atuou na clivagem de C4. A deposição de C4d ocorre em sua maioria nos capilares peritubulares e pode ser detectado via microscopia de imunofluorescência utilizando um anticorpo monoclonal ou, como já citado, via imunohistoquímica utilizando anticorpos policlonais (NADASDY *et al.*, 2005). Anticorpos contra HLA classe I e II do doador estão presentes em cerca de 90% dos pacientes que apresentam a deposição de C4d (COLVIN, 2007). A presença de C4d é importante por estar associada a presença de neutrófilos, a necrose e a DSA circulantes (COLLINS *et al.*, 1999). Portanto este exame também auxilia na escolha do tipo de terapia que deve ser adotado para o controle da resposta imune nos pacientes transplantados.

Outras variáveis não imunológicas do doador e do receptor também influenciam no estabelecimento do aloenxerto, tais como idade, sexo, existência de doenças de base ou transplantes anteriores, e o tipo de doador (vivo ou não). Transplantes realizados a partir de doadores vivos estão associados a um menor o risco de desenvolvimento de rejeição. Este risco é igual quando o doador falecido é muito jovem (cerca de 20 anos) ou o doador vivo é mais velho (cerca de 60 anos) (LANGING *et al.*, 2012).

### 2.3.2 Tratamentos de imunossupressão

A imunossupressão visa a minimização das reações que o sistema imune de pacientes a serem transplantados ou já transplantados podem desenvolver contra seus aloenxertos resultando em rejeição. Desde o início de 1990 a sobrevida dos aloenxertos renais tem sido maior que 90%, mas apenas 60% destes permanecem vivos por mais de dez anos (ABBAS, 2012; OLIVEIRA; SANTOS; FILHO, 2012).

A imunossupressão ocorre no pré-transplante, na forma de terapia de indução ou inicial e ocorre também no pós-transplante como terapia de manutenção. Para o seu tratamento existem variados tipos de fármacos adotados de forma combinada e os principais são: os inibidores da calcineurina (ciclosporina e tacrolimus), os agentes antiproliferativos (rapamicina) ou antimetabólitos (azatioprina e micofenolato mofetil), os anticorpos (antiCD3 murino, globulina anti-timócito e anti-CD25) e os corticosteróides.

Os inibidores de calcineurina (molécula dependente de cálcio), como a ciclosporina (CsA) ou o tacrolimus (FK506), que atuam no bloqueio das células T ao se ligar a

imunofilinas (ciclofilina e FK506-*binding protein*, ou FKBP). A CsA é um peptídeo fúngico, proveniente do fungo *Tolypocladium inflatum gams*, que é capaz de inibir a ação de desfosforilação da fosfatase calcineurina após interagir e formar um complexo com a ciclofilina (seu receptor citoplasmático) (BOREL; KIS, 1991). A calcineurina normalmente exerce a atividade fosfatase no fator nuclear de células T, desfosforilando-o, para que migre até o núcleo e induza transcrição de IL-2 (interleucina-2). Com a inibição de calcineurina, então é impedida a ativação transcricional de IL-2 e também de outras citocinas que induziriam a proliferação de células T (linfócitos *T-helper* e células T supressoras) (JEAN-PAUL, 2011; BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

Ao longo da história dos transplantes estas drogas contribuíram significativamente para o conhecimento básico da ativação das células T e trouxeram à tona a era moderna dos transplantes, os quais até 1970, eram frequentemente rejeitados (ABBAS, 2012; JEAN-PAUL, 2011).

O FK506 é derivado do *Streptomyces tsukubaensis* e foi desenvolvido para o tratamento do transplante de fígado após 1970 (KINO *et al.*, 1987). Ele se liga a FKBP (proteína de ligação ao FK506) formando um complexo inibitório da calcineurina, semelhante ao que ocorre entre CsA ao se ligar a ciclofilina. Assim, em meados de 1980, ele começou a ser utilizado nos transplantes de órgãos. Hoje é a droga mais comumente e utilizada (JEAN-PAUL, 2011).

A rapamicina (ou Sirolimus, ou Everolimus) foi descoberta em 1970 como um antifúngico, mas o seu potencial como imunossupressor comercialmente viável não foi reconhecido até 1989. Experimentos em larga escala demonstraram o seu potencial e conduziram a sua aprovação para uso em transplantes renais, sendo a primeira descrição de uso clínico em 1998 (JEAN-PAUL, 2011). Este fármaco, como FK506, também se liga a FKBP, mas não inibe a calcineurina e sim o complexo 1 alvo da rapamicina de mamíferos (mTORC1). Este complexo mTORC1 contém uma importante cinase envolvida na progressão do ciclo celular (proliferação) de células T, B e CDs. Com a inibição de mTORC1 as células não passam da fase G1 para a S do ciclo celular e não se proliferam (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

Assim, a administração de CsA e rapamicina é uma forma potente de inibir a respostas de células T, resposta humoral (via anticorpos) e mediado por CDs (ABBAS, 2012). Porém estes fármacos são capazes de interagir entre si, logo devem ser administrados aos pacientes em tempos diferentes, pois os efeitos colaterais desta interação promovem o agravamento da disfunção renal induzida por CsA e o aumento da hiperlipidemia e mielosupressão induzida por rapamicina (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

A destruição de linfócitos T pode ser realizada utilizando antimetabólitos, que normalmente são administrados no tratamento de rejeições. A azatioprina (AZA) foi o primeiro fármaco com capacidade de inibir a síntese de ácidos nucleicos a ser utilizado em 1959. A ação da AZA depende da sua conversão em nucleótidos 6-tioguanina, que atua sobre a molécula de transdução de sinal Rac1, inibindo-a. Esta inibição induz a apoptose dos linfócitos (morte programada). A azatioprina resolveu alguns dos problemas da cortico-dependência e da cortico-resistência. Porém este imunossupressor depende de um longo tempo de administração para que alcance uma concentração elevada e tenha eficácia (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012). Portanto, outros fármacos foram desenvolvidos, como o micofenolato mofetil (MMF), o qual é também um importante inibidor *de novo* da síntese de purina em linfócitos e altamente efetivo quando combinado com CsA e FK506 na prevenção de rejeições agudas (JEAN-PAUL, 2011; ABBAS, 2012).

Também o bloqueio de células T, assim como células B, pode ser feito utilizando anticorpos monoclonais (OKT3 - antiCD3 murino, Alemtuzumab, Daclizumab ou Basiliximab) ou policlonais (globulina anti-timócito ou ATG). Eles atuam de forma específica e são usados tanto na indução pré-transplante para retardar o uso de inibidores da calcineurina que são nefrotóxicos, como para intensificar a imunossupressão no tratamento de rejeições agudas em pacientes imunogênicos. Ao se ligarem às células T, os anticorpos podem estimular a eliminação destas ou as tornar anérgicas (não responsivas) (ABBAS, 2012). Os anticorpos podem agir de duas formas, como agentes de depleção (diminuindo a população de linfócitos) ou como moduladores imunes (bloqueando a ativação de linfócitos). Por exemplo, a depleção mediada via anticorpos anti-CD25 (CD25 é o receptor de IL-2), de nome comercial: Basiliximab ou Daclizumab. Este anticorpo ao inibir a ligação de IL-2 acaba limitando a expansão clonal e promove a tolerância (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

Os corticosteróides, como a prednisona ou a prednisolona, são hormônios sintéticos semelhantes ao cortisol (glicocorticóide) produzido a partir do colesterol pelo córtex da glândula supra-renal. Estes hormônios sintéticos possuem ação semelhante ao cortisol, porém apresentam maior potência que o natural. Eles atuam em diversas vias do sistema imune levando inibição da inflamação. Porém apresentam atividade mineralocorticóide, induzindo a hiperglicemia, promovendo o aumento da pressão arterial e diminuindo a síntese de proteínas musculares, da pele, dos ossos e dentre outros tecidos. Os corticosteróides são lipofílicos e cruzam a membrana plasmática com facilidade, no citoplasma se ligam a receptores citoplasmáticos, através dos quais estimulam alterações no núcleo celular que promovem a supressão de diferentes genes mediadores da inflamação. Com isso atuam bloqueando a síntese de citocinas, prostaglandinas e até ROS, além de reduzirem o recrutamento de células do sistema imune, assim como a inflamação inibindo a aderência de neutrófilos ao endotélio vascular e o movimento de fluídos a partir dos compartimentos intravasculares. Historicamente, desde 1950 eles são empregados para a imunossupressão em pacientes transplantados (ABBAS, 2012).

A pulsoterapia consiste em outro tratamento mais intenso de imunossupressão realizado nos hospitais. Este tratamento se baseia na administração intravenosa de doses altas de imunossupressor, como o corticosteróide metilprednisolona. Como resultado se tem a diminuição da inflamação de forma muito rápida, portanto ele é adotado na prevenção de rejeições agudas ou para tratá-las (ABBAS, 2012). Após a pulsoterapia a administração de corticosteróide (prednisona) é continuada via oral.

Com relação aos possíveis protocolos de imunossupressão administrados aos pacientes é comum o uso de corticosteróides, como prednisona, junto com inibidores de calcineurina e um agente antiproliferativo (Ministério da Saúde, 2012).

Ainda, para pacientes que desenvolvem rejeições agudas mediadas por anticorpos pode ser feito tratamento com sessões de plasmafereze. Este procedimento consiste na filtração do sangue do paciente através de um equipamento constituído por placas membranosas com poros que permitem a passagem do plasma, mas impedem a passagem de elementos celulares. A finalidade desta terapia é a eliminação de anticorpos e complexos imunes (LINKER, 1983). Ao final das sessões, dependendo do volume de plasma perdido (geralmente é inferior a 15% do volume total do sangue) pelo paciente, pode ser feita a

reposição do plasma ou a reposição com fluido constituído por cerca de 5% de albumina humana em soro fisiológico. Esta reposição com soro tem a vantagem de evitar as reações que poderiam se desenvolver em função de uma transfusão, porém apresenta custo mais elevado (WINTERS, 2012).

Outro tratamento possível é feito através da terapia de imunoglobulina intravenosa (IVGIg), a qual é constituída por imunoglobulinas (95% IgG, 2,5% IgA e resquícios de IgM, CD4, CD8 e outras moléculas de antígenos de leucócitos humanos) que são injetadas no paciente e interagem com os receptores Fc (*fragment crystallizable*) de células B, DCs, NKs, macrófagos e neutrófilos. Esta interação impede a ativação destas células que poderiam induzir a fagocitose ou citotoxicidade celular (BAYARY *et al.*, 2003). Com isso, é induzida a diminuição da produção e a ação de autoanticorpos, a inibição de citocinas, a inibição de células T e a inibição da ligação e ativação do sistema complemento (ABBAS, 2012). No Brasil, em 2012, este tratamento foi disponibilizado a todos os pacientes transplantados com rejeição pós-transplante (Ministério da Saúde, 2012).

A finalidade dos estudos com transplantes renais tem sido aumentar a sobrevivência do aloenxerto, administrando quantidades mínimas ou nada de imunossupressor. Assim é reconhecido que o maior obstáculo destes estudos é a compreensão das injúrias e os mecanismos da imunotolerância que o sistema imunológico é capaz de desenvolver em relação ao transplante, considerando também a necessidade de minimizar os efeitos adversos ou secundários causados pelos imunossupressores (CORNELL; SMITH; COLVIN, 2008).

No Brasil, apenas em 1996 foi implementada a regulamentação nacional da pesquisa clínica para desenvolvimento de regimes de imunossupressão. Mesmo assim, as diferenças em relação ao acesso a saúde pública de qualidade entre as regiões do Brasil ainda dificultam a homogeneização dos protocolos aplicados aos transplantes. Acredita-se ainda, que poderia ser criado um registro nacional para receptores de transplante e de doadores vivos de rins, associando os estudos clínicos e experimentais relacionados à compreensão da resposta imune (MEDINA-PESTANA *et al.*, 2011).

### 2.3.3 Imunotolerância

O principal desafio em transplantes é o entendimento dos mecanismos e condições que acarretam na imunotolerância de forma que seja mantida a defesa do organismo, concomitante com a preservação do enxerto.

Esta compreensão é uma das esperanças para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento de doenças auto-imunes, para o esclarecimento sobre os mecanismos relacionados à sobrevivência de células alteradas em cânceres, além do entendimento das rejeições em transplantes (LYNCH; PLATT, 2009; ABBAS, 2012).

Naturalmente o sistema imune é capaz de promover a defesa do organismo sem causar lesões aos tecidos próprios por meio da acomodação. Os mecanismos que estão envolvidos na acomodação protegem o organismo e o previnem da toxicidade que seu próprio sistema imune poderia desenvolver contra si mesmo. Esta propriedade foi primeiramente descrita em estudos de incompatibilidade ABO de transplantes renais, quando foi evidenciado que transplantados incompatíveis com seus doadores e portadores de anticorpos contra estes conseguiam sobreviver com o aloenxerto recebido (CORNELL; SMITH; COLVIN, 2008; LYNCH; PLATT, 2009). O mesmo foi descrito para anticorpos anti-HLA, porém os dados ainda são controversos. Isso pode ser explicado pelo fato dos antígenos oriundos dos grupos sanguíneos ABO serem carboidratos, o que difere dos mecanismos envolvidos na acomodação dos antígenos protéicos, como moléculas MHC, os quais são mais imunogênicos (CORNELL; SMITH; COLVIN, 2008). Sabe-se que muitos transplantados desenvolvem anticorpos contra os tecidos do doador, mesmo assim, a maior parte não apresenta rejeição. Portanto é possível que os anticorpos produzidos não atuem contra o enxerto e os pacientes estabeleçam uma resistência a danos que seriam mediados pela interação anticorpo com sistema complemento (LYNCH; PLATT, 2009).

A acomodação já foi evidenciada em modelos de xenotransplantes, nos quais a sobrevivência do xenoenxerto foi associada com o aumento da expressão de substâncias anti-apoptóticas e fatores reguladores do complemento. Também mecanismos de acomodação incompletos podem explicar os muitos casos de rejeições crônicas, provavelmente resultantes de rejeições agudas atenuadas (CORNELL; SMITH; COLVIN, 2008).



Os eventos de acomodação geralmente não apresentam uma descrição clara de como ocorrem, mas parte pode ser explicado pelos mecanismos que promovem a auto-tolerância. Esta é considerada como sendo a capacidade que um antígeno (tolerógeno) tem de se ligar a células ou outros componentes do sistema imune os inativando ou eliminando. Esta capacidade é dependente de vários fatores, pois um antígeno pode ser um tolerógeno, mas também um imunógeno quando em condições diversas, como a inflamação (ABBAS, 2012). A capacidade de induzir a tolerância foi observada em 1950 por Medawar e colegas num estudo realizado com camundongos (BILLINGHAM; BRENT; MEDAWAR, 1953). Durante a fase inicial do desenvolvimento dos camundongos e de suas células do sistema imune, como linfócitos, foi observado que a exposição deles a antígenos estranhos de outro indivíduo influenciava no processo de amadurecimento do sistema imune. Assim, as células adultas desenvolvidas nesta fase tinham se tornado especificamente tolerantes aos antígenos anteriormente apresentados sendo estabelecido o microquimerismo (ABBAS, 2012).

Por volta de 1990, as pesquisas passaram a identificar os componentes do sistema imune envolvidos com os mecanismos da tolerância. Estudos sobre as rejeições crônicas possibilitaram associação destes eventos com baixas populações de células T reguladoras (Tregs) (McCAUGHAN *et al.*, 2012). Estas células podem se originar a partir da diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> provenientes do timo ou de células T naïve periféricas. As Tregs expressam o fator de transcrição FoxP3 (indutor da diferenciação celular), a molécula co-estimulatória CD4 e a cadeia  $\alpha$  (CD25) do receptor de IL-2 (relacionado ao crescimento, sobrevivência celular, aumento da expressão de FoxP3 e outros genes). O desenvolvimento de Tregs é dependente de citocinas (TGF- $\beta$  e IL-10) produzidas por variados tipos celulares, como CD4 e as próprias Tregs (ABBAS, 2012).

A atuação de Tregs pode se dar por meio da inibição de APCs ao inibir a coestimulação interagindo via CTLA-4 com B7. Este bloqueio em células T as torna anérgicas (não responsivas) ou pode as conduzir a eliminação. As Tregs são capazes de utilizar IL-2 disponível evitando tanto a interação deste com receptores de outras células como a ativação do desenvolvimento celular (ABBAS, 2012). Estudos com camundongos mostraram que estas células, além de suprimir a ativação de células T próprias que tenham escapado da seleção negativa no timo, são capazes de reprimir a resposta de células T CD4<sup>+</sup> e

CD8<sup>+</sup> em relação ao enxerto (CORNELL; SMITH; COLVIN, 2008; McCAUGHAN *et al.*, 2012).

Linfócitos B também estão envolvidos com a tolerância. Eles podem passar pela edição do receptor que tendo identificado antígenos próprios, ativa os genes *RAG1* e *RAG2*. Isso possibilita uma nova recombinação e rearranjo gênico para a produção de novas cadeias formadoras do receptor, com nova especificidade. Caso este rearranjo ainda falhe, as células podem entrar em apoptose ou entrar no estado de anergia (ABBAS, 2012).

Considerando que a ativação de células T via moléculas MHC é a principal via de resposta do sistema imune (ativando ou inibindo, por exemplo a via de moléculas HLA-G), os alelos codificadores destas moléculas podem determinar o maior ou menor grau de suscetibilidade genética dos indivíduos. Logo, os polimorfismos genéticos nos genes codificadores destas moléculas apresentadoras de antígenos são capazes de contribuir para os mecanismos de regulação imunológica atuando em conjunto com outros fatores. Assim, numa população, determinados alelos prevalecem em relação a outros, frequentemente por contribuírem mais para a sobrevivência no contexto em que estão (DONADI *et al.*, 2011). Por isso, também é importante a verificação da presença de associação entre frequências alélicas e genotípicas nas populações.

#### 2.4 HLA-G

O gene *HLA-G* possui 4 396pb e codifica para moléculas HLA de classe I não clássicas (Ib) HLA-G. Este gene está localizado no braço curto do cromossomo 6, entre os genes *HLA-A* e *HLA-F* (FIGURA 6). Este gene foi clonado em 1987, após ter sido obtido um fragmento de DNA por meio de clivagem com enzimas de restrição *Hind* III, por essa razão foi primeiramente denominado *HLA-6.0* (6.0kb), (GERAGHTY *et al.*, 1987). Apenas em 1990, a molécula codificada por *HLA-6.0*, considerada similar a HLA-A, HLA-B e HLA-C (com 86% de similaridade) (MOREAU; FLAJOLLET; CAROSELLA, 2009), foi associada à HLA-G, a qual era encontrada em abundância na interface materno-fetal.

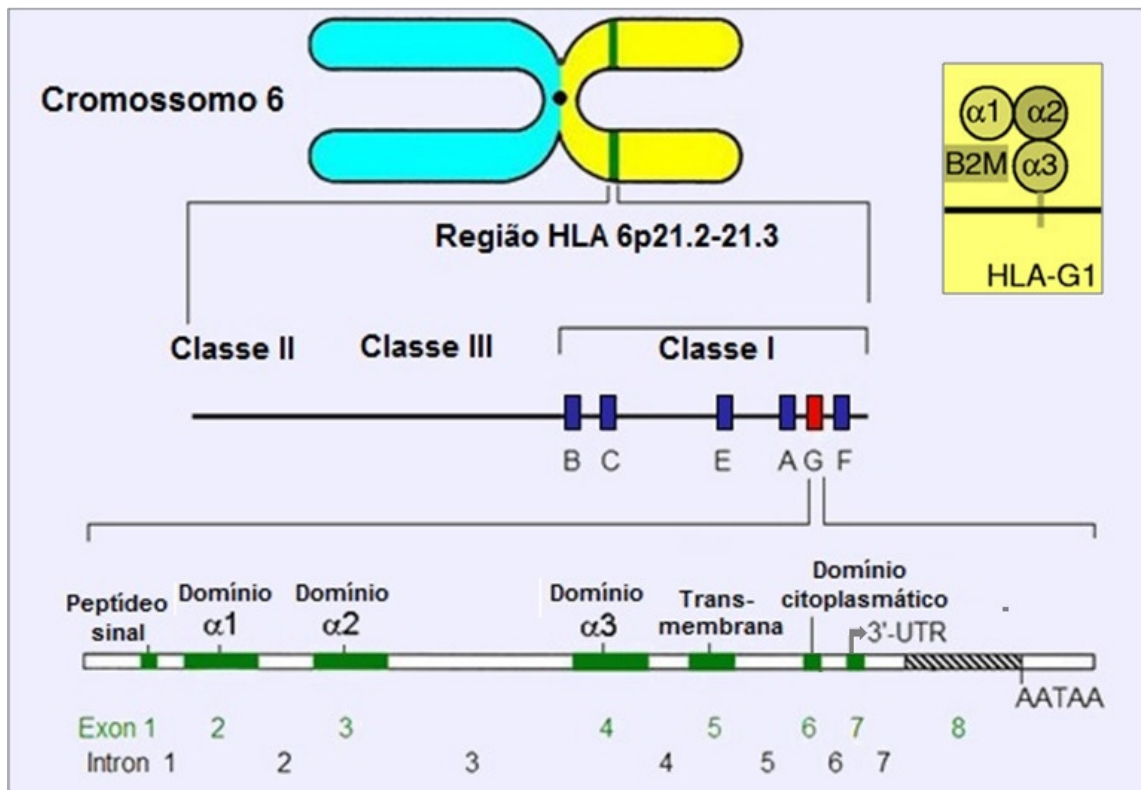


FIGURA 6 - LOCALIZAÇÃO E ESTRUTURA DO GENE *HLA-G* E *HLA-G1* (ISOFORMA COMPLETA)

FONTE: modificado pelo autor de YIE (2012)

A expressão de *HLA-G* parecia ser restrita aos tecidos fetais (trofoblastos) e a sua função era associada apenas à manutenção da imunotolerância materna. Análises posteriores evidenciaram a expressão destas moléculas e detecção de sHLA-G em outros tecidos como no timo, na córnea, na matriz da unha, pâncreas, endotélios, em tumores, infecções virais e em indivíduos transplantados (CAROSELLA *et al.*, 2008; DAHL; HVIID, 2012).

A modulação deste gene foi identificada como sendo influenciada por vários fatores, ao exemplo do estresse provocado pelo choque térmico, a hipoxia ou via ação de citocinas como interferon e IL-10 (MOREAU *et al.*, 1999), ou em resposta ao fator inibitório de leucócitos (LIF) produzido na fase de implantação na interface materno-fetal por trofoblastos e pelo endométrio (BAMBERGER *et al.*, 2000), e a hormônios, como progesterona ou glicocorticóides (MOREAU *et al.*, 2001; FLAJOLLET; CAROSELLA, 2009).

#### 2.4.1 Estrutura do gene *HLA-G*

A estrutura do gene *HLA-G* é similar a dos outros genes *HLA* de classe I (Ia), sendo composta por 7 íntrons e 8 éxons codificadores da cadeia pesada ( $\alpha$ ) da molécula MHC. O éxon 1 codifica o peptídeo sinal, os éxons 2, o 3 e o 4 codificam respectivamente os domínios  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$ . O éxon 5 codifica o domínio transmembrana e o éxon 6 codifica o domínio citoplasmático da cadeia pesada. A existência de um códon de parada (UGA) no éxon 6 resulta na codificação de um polipeptídeo com domínio citoplasmático mais curto (constituído por 6 aminoácidos), enquanto nas moléculas *HLA* clássicas é observado 30 aminoácidos, os quais são altamente conservados (VAN DER VEN; PFEIFFER; SKRABLIN, 2000). A presença deste códon de término de leitura no éxon 6 também determina a inibição da tradução do éxon 7 e 8, considerada região 3' não traduzida (3'UTR) deste gene (FIGURA 6) (OBER; ALDRICH, 1997). Ainda o domínio citoplasmático encurtado não apresenta motivos que desencadeiam a endocitose, o que é capaz de prolongar a meia-vida das moléculas *HLA-G* quando expressas na superfície celular (PARK; AHN, 2003).

O gene *HLA-G* é polimórfico, mas apresenta um reduzido número de variantes alélicas em relação aos genes MHC de classe I clássicos. Assim, estão descritos para o gene *HLA-G* um total de 50 alelos e 16 proteínas, enquanto para os genes codificadores de moléculas *HLA* Ia o número de alelos descritos para cada ultrapassa a 1500 e para as proteínas é superior a 1100 (IMGT/HLA, 2014).

O controle da expressão de *HLA-G* difere parcialmente da regulação dos outros genes *HLA*, ocorrendo tanto em nível transcricional como pós-transcricional. A regulação basal do gene *HLA-G* é mediada por elementos CCAAT *box* e um TATA *box* incomum (TCTTAA) que atuam como sítio de ligação para o complexo de transcrição basal dando início a transcrição. Mas a sua região promotora (FIGURA 7) em sua totalidade ainda é composta por elementos regulatórios proximais, localizados a cerca de -200 do primeiro códon ATG traduzidos, e distais específicos capazes de induzir ou reprimir a expressão gênica (SOLIER *et al.*, 2001).

Os elementos regulatórios de *HLA-G* apresentam uma organização semelhante a dos outros genes *HLA* (ver item 2.2.1 Regulação dos genes *MHC*), no entanto, alterações em suas sequências e a presença de novos elementos dão origem a uma regulação transcricional singular. Dentre estes elementos regulatórios são conhecidos por formar um módulo de

indução: o intensificador A (EhnA), a sequência consenso a interferon (ISRE) e o módulo SXY, os quais apresentam sítios para ligação a diversos fatores transcricionais (SOLIER *et al.*, 2001).

Porém a expressão da molécula HLA-G não é explicada apenas pela ação desses elementos. A cerca de -38 de ATG é encontrado o elemento de resposta a progesterona (*progesterone response element*, PRE) sobreposto a sequência TATA *box* incomum. A progesterona é um hormônio esteróide imunomodulador secretado pelo corpo lúteo e pela placenta responsável pela manutenção do endométrio e pela implantação embrionário. A ativação deste elemento é mediado primeiro pela ativação do receptor de progesterona e após se tem a ligação ao elemento alternativo de resposta a progesterona que atua no estímulo da expressão de *HLA-G* (YIE; XIAO; LIBRACH, 2006; MOREAU; FLAJOLLET; CAROSELLA, 2009).

Distando -101 a -154 de ATG (região promotora proximal) está o módulo SXY que é composto por sequências S, X (compreendendo os meio-sítios X1 e X2) e Y ligados cooperativamente por complexos de multiproteínas reguladoras da transcrição (membros da família RFX, CREB/ATF e NFY). As sequências X2 e Y estão alteradas e por isso não são funcionais, este módulo incapaz de recrutar o transativador CIITA (transativador de classe II), logo o *HLA-G* não é induzido por CIITA e nem por RFX (CAROSELLA *et al.*, 2008; GOBIN; VAN DEN ELSEN, 2000; ROUSSEAU *et al.*, 2003).

O intensificador A (composto pelas subunidades  $\kappa B1$  e  $\kappa B2$ ) está próxima a -198 e -172 de ATG (região promotora proximal), ele também apresenta alterações em sua sequência de nucleotídeos e, diferentemente do que ocorre para outros genes *MHC*, liga-se a NF- $\kappa B$  apenas na forma homodimérica constituído por subunidades p50. Esta subunidade p50 não apresenta um domínio de transativação, logo também não deve transativar na forma p50/p50 (GOBIN; VAN DEN ELSEN, 2000). Em adição, o sítio  $\kappa B2$  do *HLA-G* também se liga ao Sp1 (Fator transcricional mediador das rotas de transativação constitutivas e induzidas por citocinas). Adjacente ao intensificador A (-171 a -161 de ATG) está elemento ISRE (*interferon-sensitive response element* ou elemento de resposta ao interferon) que deveria responder a sinalização estimulada por IFN $\gamma$ , via ligação a família de fatores reguladores do interferon (ativador IRF-1 e inibidores IRF-2 e IRF-8). IFN $\gamma$  é a principal citocina indutora da expressão dos genes *HLA* de classe I, mas novamente o gene *HLA-G* apresenta divergências na região que respone a esta cotocina, o que o torna irresponsivo a ela. Também foram

identificadas sequências candidatas que poderiam ser estimuladas por IFN, como os sítio de ativação por interferon-gamma (*interferon-gamma activated site* ou GAS), localizado -741 e -733 de ATG, mas estudos indicaram ser esta região não ativada por IFN $\gamma$ . Entretanto outro elemento ISRE identificado ao lado deste elemento GAS não-funcional (a -754 e -743 de ATG) foi capaz de ser induzir a expressão de HLA-G mediante o estímulo de IFN $\beta$  (LEFEBVRE *et al.*, 2001).

Distante do intensificador A foram descritos três sítios correspondentes a elementos de resposta a AMPc e elementos de resposta a TAP (CRE/TRE). Eles estão dispersos pela região promotora distal e ensaios *in vitro* veidenciaram a ligação destes elementos a CREB1 (proteína de ligação ao elemento de resposta do AMPc) e ATF1 (FLAJOLLET *et al.*, 2009). Um destes elementos está localizado dentro de uma região controladora de *locus* (*locus control region*, LCR) localizado a -1,2Kb de ATG na região promotora distal. Esta região é considerada importante para a expressão de *HLA-G* por estar possivelmente associada com a manutenção da cromatina aberta viabilizando a transcrição e expressão gênica (SCHMIDT *et al.*, 1993).

Outros elementos também foram identificados, como o HSE (elemento de resposta *heat-shock*), que está localizado a -464 e -453 de ATG, e o elemento de resposta a hipoxia (HRE), que está localizado a -242 e -238 de ATG. O HSE é capaz interagir com HSF-1 (fator 1 de *heat-shock*) induzindo a expressão do gene *HLA-G* (IBRAHIM *et al.*, 2000; MOREAU; FLAJOLLET; CAROSELLA, 2009) e o HRE ainda não foi funcionalmente descrito, porém estudos já evidenciaram o aumento da expressão de HLA-G no contexto da hipoxia (MOUILLOT *et al.*, 2007).

Elementos repressores da transcrição são encontrados ao longo de toda a região promotora (proximal e distal), os RREs (elementos de resposta a Ras, ou *Ras-responsive elements*). Estes elementos interagem com RREB1 (*Ras responsive element binding protein* ou proteína 1 de ligação a RREs) capaz de recrutar histonas deacetilases (HDAC1), e com CtBP1 e CtBP2 (*C-terminal binding proteins* ou proteínas de ligação C-terminal), todas fazem parte do complexo CtBP, o qual atua como repressor remodelando cromatinas para impedir a transcrição gênica (FLAJOLLET *et al.*, 2009). Outra sequência reguladora negativa da expressão do gene *HLA-G* foi descrito estando a -4Kb do início da transcrição de *HLA-G*, situado sobre uma sequência LINE-1 (*long interspersed elements*). esta sequência pertence a um grupo de retrotransposons compostos por elementos altamente repetitivos, que no

contexto do gene *HLA-G* foi denominada elemento gL. Este elemento é rico em AT, o que provavelmente está relacionado com a função de formar grampos que podem interagir diretamente ou indiretamente com a região promotora de *HLA-G* interferindo na ligação de fatores transcricionais (IKENO *et al.*, 2012).

A nível pós-transcricional a expressão do gene *HLA-G* é regulada pela própria constituição dos transcritos produzidos. Os RNAs mensageiros produzidos apresentam uma região 3' não traduzida relativamente grande por conta da existência de um códon de parada antecipado. Com isso se tem a alteração da estabilidade destes transcritos devido a interação com microRNAs capazes de interagir com esta região, além da presença do elemento regulador rico em AU, que corresponde ao sinal de poliadenilação característico de eucariotos e conhecido por influenciar no transporte, na estabilidade e na eficiência de tradução dos mRNAs (CHEN; SHYU, 1995).

Com relação a regulação epigenética do gene *HLA-G*, esta está sendo evidenciada aos poucos. Foram descritos os micro-RNAs: miR-148a, miR-148b e miR-152 como sendo capazes de se ligar a região 3'UTR de RNA mensageiros de *HLA-G* reprimindo a expressão deste gene em células de tecidos saudáveis (MANASTER *et al.*, 2012). Também os polimorfismos (correspondentes a variantes alélicas) descritos na região 3' UTR, exercem influência na regulação do gene *HLA-G*. Um exemplo bem estudado é a inserção ou deleção de 14 bp no éxon 8, sendo sua presença associada a níveis baixos de tradução de mRNA e a origem de transcritos mais estáveis (MOREAU; FLAJOLLET; CAROSELLA, 2009).

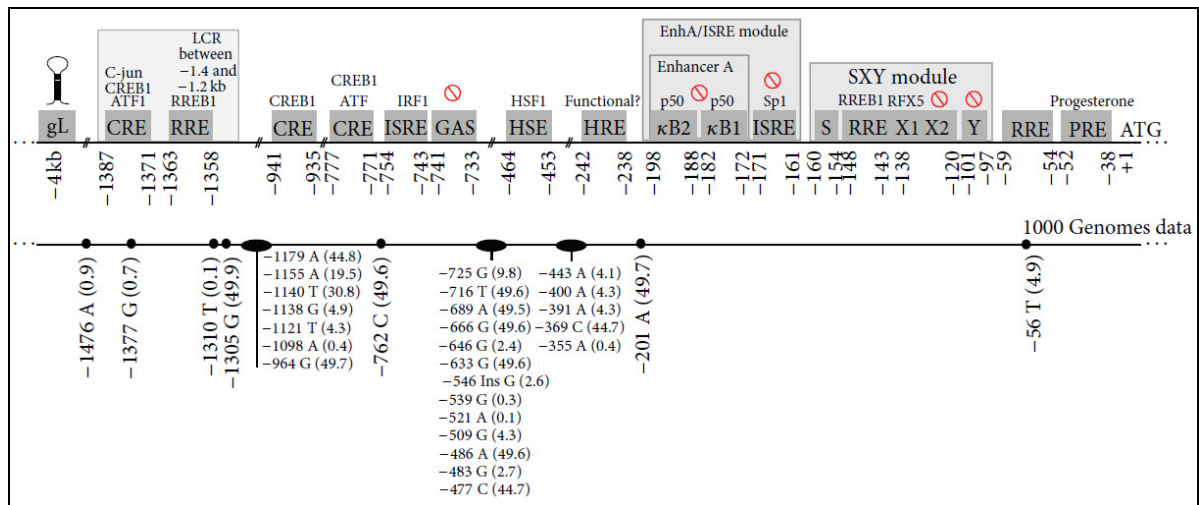


FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *HLA-G*

LEGENDA: O número das posições tem como referência a sequência NG\_029039 e a adenina do primeiro códon (ATG) como nucleotídeo +1 (na posição 5 867 de NG\_029039). (●): Sítios com variação considerando 1092 indivíduos de 14 populações estudadas em 100 projetos genomas, seguido pela frequência (%) global do alelo menos frequente. (⊗): Corresponde a elementos não funcionais.

SEQUÊNCIAS REGULATÓRIAS - gL (LINE-1 retrotransposon na região promotora de *HLA-G*); LCR (região controladora de locuss (candidate)); CRE (elemento de resposta a cAMP); RRE (elemento de resposta a Ras); ISRE (elemento de resposta estimulado por IFN); GAS (sítio ativado via IFN $\gamma$ ); HSE (elemento de *heat-shock*); HRE (elemento de resposta a hipoxia); PRE (elemento de resposta a progesterona); Enhancer A ou intensificador A (sítios de ligação para NF- $\kappa$ B com ISRE).

FATORES TRANSCRICIONAIS - C-jun fator transcricional codificado pelo gene *JUN*); CREB1 (proteína 1 de ligação ao elemento de resposta CAMP); ATF1 (cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-1); RREB1 (proteína 1 de ligação ao elemento de resposta Ras); IRF1 (fator 1 de regulação do interferon ou IRF-1); HSF1 (fator de *heat-shock* 1); Sp1 (fator Sp1 de transcrição); RFX5 (proteína RFX5 de ligação ao DNA - família RFX).

FONTE: CASTELLI (2014)

#### 2.4.2 Isoformas da molécula HLA-G

A molécula HLA-G apresenta sete isoformas conhecidas. A isoforma completa HLA-G1 é constituída por domínios globulares (domínios  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 e  $\alpha$ 3, transmembrânicos e citoplasmáticos) e uma cadeia leve ( $\beta$ 2m). Quando o transcrito primário de *HLA-G* reorganiza-se recombinaando os éxons de forma diferente originam-se as demais formas alternativas de mRNA (FIGURA 6 e 8). A tradução destes pode formar até quatro moléculas HLA-G ligadas a membrana celular (HLA-G1, -G2, -G3, -G4) que diferem na sua região C-terminal e apresentam os éxons 5 e 6 nos seus mRNAs, que codificam para a região transmembrânica e a cauda citoplasmática da molécula HLA-G, e três moléculas solúveis que substituem essas regiões por uma pequena cauda hidrofílica codificada pela sequência 5' do íntron 4 (HLA-G5 e -G6) ou íntron 2 (HLA-G7) (VAN DER VEN; PFEIFFER; SKRABLIN, 2000).



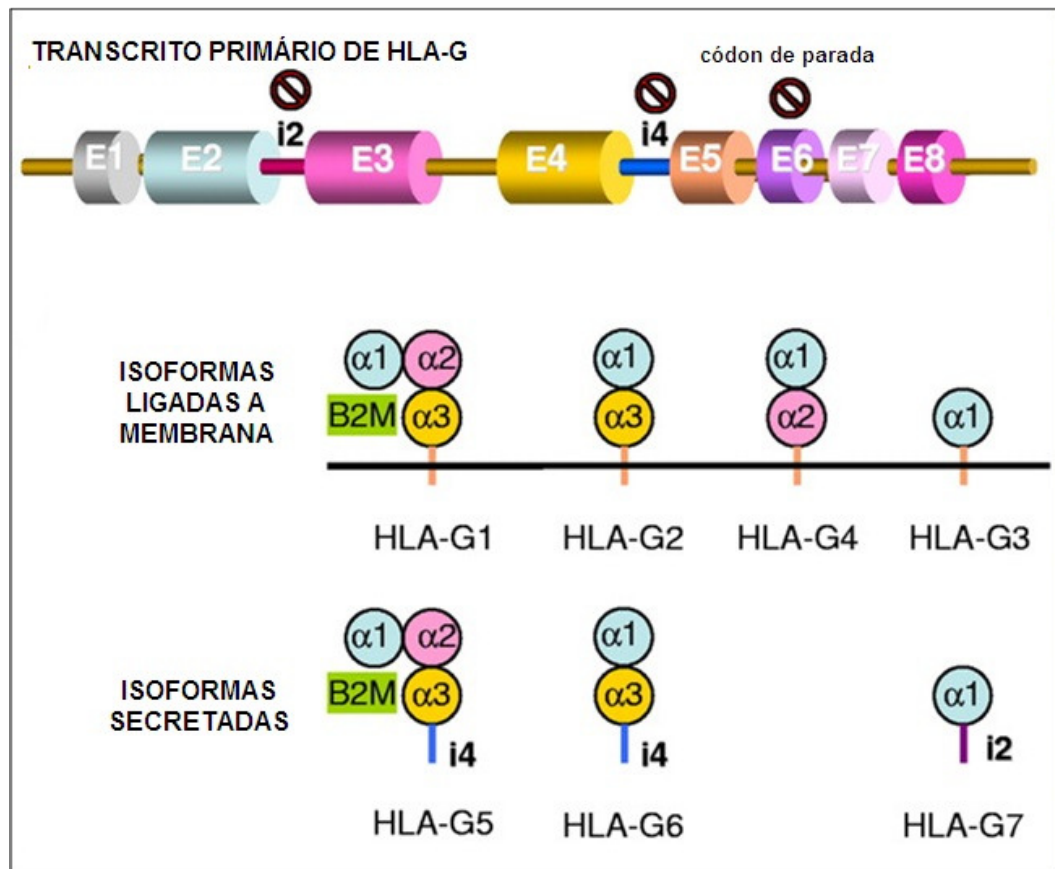


FIGURA 8 - TRANSCRITO PRIMÁRIO E ISOFORMAS PROVENIENTES DO GENE *HLA-G*  
 FONTE: modificado pelo autor de MENIER *et al.* (2008)

As isoformas solúveis, como HLA-G5 e HLA-G6 formam-se por reterem em seu mRNA o íntron 4, o qual apresenta um códon de parada; enquanto a isoforma solúvel HLA-G7 (solúvel), retem o íntron 2 que apresenta outro códon de parada. Além destas três formas solúveis, HLA-G1 pode se tornar solúvel via clivagem proteolítica (MOREAU; FLAJOLLET; CAROSELLA, 2009).

As moléculas HLA-G podem ainda aparecer formando dímeros, via ligação por pontes dissulfeto entre dois resíduos de cisteína do domínio  $\alpha 1$  da cadeia pesada (DAHL; HVIID, 2012). Esta capacidade torna os sítios de ligação de HLA-G do domínio  $\alpha 3$  mais acessíveis aos seus receptores, tornando os dímeros mais eficientes na interação com seus ligantes quando comparados as formas monoméricas (SHIROISHI *et al.*, 2003).

### 2.4.3 Polimorfismos do gene *HLA-G*

Foram descritos 50 alelos codificadores para HLA-G baseados em 72 polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP, do inglês *single nucleotide polymorphisms*), os quais foram detectados entre o éxon 1 e íntron 6. A variabilidade dos nucleotídeos do gene *HLA-G* está concentrada nos éxons 2, 3 e 4, assim como em seus íntrons (DONADI *et al.*, 2011).

Segundo o sistema de nomenclatura HLA, os alelos de HLA-G são nomeados usando letras e números. Como exemplo a caracterização do alelo: HLA-A\*01:02:03:04. A sigla HLA corresponde ao sistema gênico, separado por um hífen com a letra A que corresponde ao *locus*. O asterisco corresponde ao tipo de análise, no caso, análise do DNA ou genotipagem. A seguir quatro grupos de dois dígitos (totalizando oito), dos quais o primeiro grupo “01” corresponde a família alélica, o segundo “02” corresponde ao variante alélico originado por mutação não sinonímia na região codificadora, o “03” corresponde à mutação sinonímia ou silenciosa e “04” corresponde a variações em região reguladora, promotora ou intrônica. O grupo alélico conhecido mais freqüente é o HLA-G\*01:01:01 (composto por 5 alelos) (MOREAU; FLAJOLLET; CAROSELLA, 2009).

A região codificadora da cadeia pesada  $\alpha$  concentra 33 SNPs, dos quais 13 resultam em alterações não sinonímias, destas 4 alterações já foram identificadas no domínio  $\alpha 1$ , 6 no domínio  $\alpha 2$  e no domínio  $\alpha 3$  (DONADI *et al.*, 2011). Estas substituições de aminoácidos podem influenciar na função biológica de HLA-G, ao alterar a afinidade dos sítios de ligação a receptores, ou originando novas isoformas, assim como a formação de diferentes dímeros, determinantes na modulação do sistema imune. Polimorfismos em ilhas CpG também podem afetar a metilação e disponibilidade do DNA durante transcrição destas regiões.

A região promotora do gene *HLA-G* apresenta 29 SNPs, dos quais muitos estão em regiões correspondentes aos elementos regulatórios, podendo afetar a atuação e interação destes com fatores transcricionais (TAN *et al.*, 2005; HVIID *et al.*, 2006; MOREAU; FLAJOLLET; CAROSELLA, 2009).

Alguns polimorfismos da região promotora apresentam desequilíbrio de ligação com variantes da região 3'UTR e influenciam na recomposição alternativa e estabilidade do mRNA (ROUSSEAU *et al.*, 2003).

Dentre as substituições sinonímias descritas para o gene *HLA-G* estão as substituições que ocorrem nos códons 31 (Thr→Ser) e 110 (Leu→Ile), que promovem a substituição de aminoácidos, mas não interferem na estrutura e função da molécula HLA.

Enquanto em meio as substituição não sinonímias, está o polimorfismo conhecido por 1597delC no códon 130, que altera a matriz de leitura. Neste caso, este polimorfismo provoca a instabilidade de HLA-G1 pela perda das pontes dissulfeto dos resíduos 101 e 164. O polimorfismo 1597delC é a primeira mutação nula de HLA-G que é encontrado de forma independente em diferentes grupos étnicos. Este ainda ocorre em combinação com outros dois polimorfismos, no códon 57 (éxon 2) e no códon 93 (éxon 3). Também o alelo HLA-G\*01:05:N, o qual contem o polimorfismo 1597delC apresenta de equilíbrio de ligação com HLA-A30 (VAN DER VEN; PFEIFFER; SKRABLIN, 2000). Muitos estudos já reportaram esta forte herança haplotípica entre alelos HLA-G e HLA-A e com alelos HLA classe II, mas as implicações biológicas destes achados ainda não são bem compreendidas (OBER *et al.*, 1996; PIRRI *et al.*, 2009).

#### 2.4.4 Papel de HLA-G na imunotolerância

Vários estudos realizados em 1990 forneceram evidências do papel de HLA-G na imunotolerância durante as gestações (VAN DER; PFEIFFER; SKRABLIN, 2000). Dados recentes mostraram o HLA-G expresso por todas as células constituintes da interface materno-fetal no primeiro trimestre, como trofoblastos, células endoteliais, células amnióticas (APPS; GARDNER; MOFFET, 2008).

Atualmente, sabe-se que a expressão destas moléculas é restrita, ocorrendo em níveis significativamente mais baixos no plasma de indivíduos controles do que quando analisado em estudos comparativos com pacientes transplantados (ZARKHIN *et al.*, 2010; ALMASOOD *et al.*, 2011).

A expressão de HLA-G passou a ser também detectada em níveis maiores em situações patológicas, como em pacientes com câncer, transplantados, com doenças inflamatórias e portadores de infecções virais, como o vírus HIV. Já foi demonstrado que esta molécula está relacionada à imunotolerância, ao atuar na imunossupressão do sistema imune (CAROSELLA *et al.*, 2008).

Um dos mecanismos de ação da molécula HLA-G (solúvel ou ligada a membrana celular) é a sua interação com receptores de células NK citotóxicas e células T CD8<sup>+</sup> inibindo a capacidade de citólise delas. HLA-G também pode induzir a apoptose de células T CD8<sup>+</sup> e células NK, auxiliando na tolerância ao aloenxerto eliminando as células T periféricas

alorreativas, além de gerar células T regulatórias (QIU *et al.*, 2006). A molécula HLA-G exerce seu efeito inibitório sobre as células T citotóxicas ao interagir com seus domínios  $\alpha 3$  com as moléculas co-estimulatórias CD8. Isso promove a apoptose ao induzir a super-expressão da produção de Fas e interação Fas/FasL (CONTINI *et al.*, 2003). Outro mecanismo é a interação de HLA-G com receptores de células T CD4<sup>+</sup> suprimindo a resposta proliferativa (QIU *et al.*, 2006).

A inibição da função imune via HLA-G ocorre pela interação com receptores leucocitários semelhantes a imunoglobulinas da subfamília B, membros 1 e 2 (LILRB, do inglês *leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member*), e com receptores semelhantes a imunoglobulinas das células NK, KIR2DL4 (SHIROISHI *et al.*, 2003; APPS; GARDNER; MOFFET, 2008).

LILRB1 (ILT-2) é expresso na superfície celular de vários leucócitos, células NK, células linfóides e mielóides, e LILRB2 (ILT-4) é expresso em monócitos e CDs, ou seja, em células mielóides. Estes dois receptores apresentam em suas caudas citoplasmáticas motivos inibidores (ITIM, do inglês *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*), os quais são capazes de inibir a transdução de sinais estimulatórios, além de poderem interagir com outras moléculas MHC. Entretanto, a ligação com HLA-G (nos sítios localizados no domínio  $\alpha 3$  e  $\beta 2m$ ) tem cerca de três a quatro vezes maior afinidade quando comparada com sua ligação a outras moléculas HLA clássicas (SHIROISHI *et al.*, 2003). Sendo a ligação com LILRB2 com o domínio  $\alpha 3$  a de maior afinidade.

Os receptores KIRs são glicoproteínas transmembrânicas expressas naturalmente por células NK e um subgrupo de células T, capazes de expressar 2 (KIR2D) ou 3 (KIR3D) domínios extracelulares semelhantes a imunoglobulinas, cada um contendo motivos ITIM. O conjunto de receptores ativadores e inibidores expressos e que são estimulados por seus ligantes na superfície de células NK e macrófagos são determinantes para a função efetora final destas células, portanto as moléculas HLA-G atuam como ligantes auxiliando provavelmente na inibição (HSU *et al.*, 2002).

A molécula HLA-G ainda está envolvida no processo de tumorigênese, promovendo a inibição de células T e NK, impedindo a eliminação de células tumorais. Esta molécula foi encontrada sendo super-expressa no plasma de indivíduos associados a um pior prognóstico do desenvolvimento de câncer de mama, ovário, pulmão e colo-retal (CAROSELLA *et al.*,

2008). Portanto, também em indivíduos portadores de câncer a mensuração da expressão de HLA-G plasmático seria uma forma de auxiliar na predição do desenvolvimento tumoral.

No estudo realizado por Jin *et al.* (2012), foi investigado a manutenção da tolerância a enxertos renais logo após o transplante em 40 pacientes (entre 25 e 63 anos). Com isso foram analisadas as rejeições e a função renal após três meses feito o transplante. Entre as amostras que apresentaram altas concentrações de HLA-G5 e baixas foi observada correlação entre os níveis de sHLA-G no soro e a aceitação ao enxerto. Um maior nível de HLA-G foi detectado em pacientes com poucos episódios de rejeição. O clearance de creatinina (utilizado para estimar a taxa de filtração glomerular) neste grupo também foi maior e o tempo de recuperação da hemoglobina foi menor. Portanto, este estudo demonstrou que, imediatamente após o transplante, HLA-G possivelmente esteja participando da indução a tolerância, complementando a ação dos tratamentos imunossupressivos.

A ausência de rejeição crônica em enxertos renais também foi observada em pacientes com expressão de HLA-G em enxertos de fígado. Assim a expressão de HLA-G em aloenxertos de fígado está associada com uma frequência menor de rejeições agudas do fígado e do rim, ou seja, em transplantes simultâneos de órgãos (CRÉPUT *et al.*, 2003). No trabalho de Qiu *et al.* (2006) foi analisado a presença de sHLA-G no soro de 65 pacientes transplantados renais. Antes dos transplantes não foi observado a existência de sHLA-G nestes pacientes, também o histórico de gestações mostrou não influenciar em nada na expressão de sHLA-G. Após os transplantes, a presença de sHLA-G esteve mais frequentemente associada aos casos nos quais não ocorreram rejeições. Quando os pacientes foram divididos de acordo com as concentrações de sHLA-G, os pacientes com rejeição crônica ficaram no grupo de sHLA-G negativos. Estes resultados demonstraram ter sHLA-G uma relação negativa com a rejeição.

Foi constatado também que a secreção desta molécula pode ser influenciada por diversos fatores não bem estabelecidos, como o uso de esteróides (MOREAU *et al.*, 2001). Amostras de soro sHLA-G positivas, apresentam poucos anticorpos IgG para HLA, portanto sHLA-G pode auxiliar de forma aditiva aos esteróides na inibição da resposta imune humoral contra aloantígenos presentes no enxerto. Visto ser capaz de inibir células T CD4<sup>+</sup>, fato que acarreta na inibição indireta da ativação de células B (QIU *et al.*, 2006).

Além do soro, as novas técnicas desenvolvidas para a detecção de sHLA-G via anticorpos monoclonais tornaram possível a detecção isolada de sHLA-G no plasma e no líquido amniótico.

Já tem sido encontrado no plasma o sHLA-G em níveis mais elevados nas desordens linfoproliferativas, e em pacientes com melanomas, gliomas, câncer de mama e ovário. Estudos ainda têm indicado que quantificações de sHLA-G realizadas no plasma detectam níveis maiores desta molécula, em relação ao quantificado no soro (POLÁKOVA; BANDZUCHOVÁ; RUSS, 2011). A explicação para esta variação é que durante a coagulação provavelmente o sHLA-G seja seqüestrado (RUDSTEIN-SVETLICKY *et al.*, 2006).

Provavelmente este seja o motivo pelo qual certos estudos não tenham achado uma correlação mais positiva entre as quantificações de sHLA-G e a imunotolerância a aloenxertos.

### 3 JUSTIFICATIVA

O estudo de componentes do sistema imune os quais exercem influência no sucesso de transplantes renais auxiliando no prognóstico de eventos de rejeição é de grande importância clínica.

O avanço das técnicas de detecção e estudo destes componentes possibilitou a identificação de novas moléculas e células que desempenham um papel considerável no sucesso do estabelecimento de aloenxertos. Portanto, além das moléculas HLA de classe I clássicas, as não clássicas, como HLA-G também tem se mostrado importantes, principalmente na determinação do perfil de imunotolerância do sistema imune. O envolvimento destas moléculas em mecanismos relacionados à aceitação de aloenxertos já foi constatado em estudos com transplantes de coração (LILA *et al.*, 2000; LILA *et al.*, 2002), fígado e rim (RACCA *et al.*, 2009).

Portanto o estudo de alelos, genótipos e fenótipos associados à função biológica de moléculas HLA-G em pacientes transplantados renais, é relevante por ter como objetivo a evidência de predisposições genéticas relacionadas ao melhor ou pior prognóstico na aceitação de aloenxertos. Além disso, o monitoramento dos níveis plasmáticos de sHLA-G permitirá avaliar a sua ocorrência no pós-transplante, possivelmente caracterizando um melhor ou pior perfil de imunotolerância do pacientes transplantados em relação ao seu aloenxerto.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a possível relação entre o perfil de imunotolerância e fenótipos/genótipos do gene *HLA-G* em pacientes transplantados renais.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar os genótipos do gene *HLA-G* de 100 pacientes transplantados renais e 49 doadores vivos.

Estabelecer as frequências alélicas e genotípicas do gene *HLA-G* nesta amostra de indivíduos estudada.

Investigar a relação entre a imunotolerância aos aloenxertos e as frequências alélicas e genotípicas de pacientes transplantados renais e seus doadores.

Determinar os níveis de sHLA-G no plasma de 36 pacientes transplantados renais monitorados do pré ao pós-transplante.

Investigar a relação entre a imunotolerância aos aloenxertos e os níveis de sHLA-G dos pacientes transplantados.

Analisar a relação entre variantes genéticas do gene *HLA-G*, níveis plasmáticos de sHLA-G e o perfil de imunotolerância dos pacientes transplantados renais.



## 5 RESULTADOS

Intenção de submissão na *Human Immunology - Official Journal of the American Society for Histocompatibility and Immunogenetics* (ISSN: 0198-8859) - Fator de impacto: 2013: 2.282 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2013.

Article

*HLA-G* genotypes and monitoring of plasma levels of sHLA-G in kidney transplant patients

Short title: *HLA-G* genotypes and sHLA-G in kidney transplants patients

Vanessa Hauer<sup>a</sup>, Fabiana C. Contieri<sup>b</sup>, Renata Slowik<sup>a</sup>, José S. da Silva<sup>a</sup>, Maria da G. Bicalho<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Immunogenetics and Histocompatibility-LIGH, Department of Genetics, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil

<sup>2</sup>Hospital Universitário Evangélico de Curitiba, Alameda Augusto Stellfeld, 1908 Curitiba, 80.730-150, Brazil

### Abstract

The expression of human leukocyte antigen (HLA)–G, a nonclassical HLA class I molecule, and its soluble isoforms (sHLA-G) are known to improve graft acceptance. In this study we investigated HLA-G gene polymorphisms and sHLA-G levels as a biomarker in groups of non-sensitized (PNS), sensitized (PSS) and desensitized (PDS) kidney transplanted patients. HLA-G gene was genotyped for all recipients and it was obtained by sequencing-based typing (SBT) using a commercial kit. The assays for detection of sHLA-G were performed for duplicate plasma samples from 36 patients monitored from pre to post-transplant using an ELISA-based kit. Levels of sHLA-G between the three groups differ along the time. PNS maintained higher concentrations of sHLA-G (> 25 ng/mL) from pre to post-transplant period. The levels of sHLA-G was higher before transplant in desensitized patients with ATG immunosuppression (47.66 ng/mL,  $p = 0.0084$ ). This may demonstrate a positive response of these patients to the induction treatment. Some *HLA-G* alleles were found been more common in PNS ( $G^*01:04$ ,  $p = 0.03$ ) and PDS ( $G^*01:01:02/03$ ,  $p < 0.05$ ). Allele  $G^*01:04$  have already been related to a higher expression of sHLA-G and the immunotolerance profile observed for PNS corroborates with this knowledge.

Keywords: HLA-G; Kidney transplatation; Immunotolerance.

Abreviations: soluble HLA-G-sHLA-G; sequence-based typing-SBT; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay-ELISA; PNS: patients non-sensitized; PSS: patients sensitized; PDS: patients desensitized.

Corresponding address: Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, R. Cel. Francisco H. dos Santos S/N, Centro Politécnico – Jardim das Américas, CP 19071, CEP 81.531.980, Curitiba, PR, Brazil. Fax: +55 41 3266 2042.

## Introduction

Human leukocyte antigen (HLA)-G were discovered displaying immunotolerogenic properties toward maternal-fetal interface in 1990 mainly acting in the protection of the fetus [1][2]. In a similar way, this molecule has been demonstrated to be involved in tolerance processes after transplantation. Even its expression exhibits an exclusive tissue specific regulation, it was also described to be expressed in pathological conditions and in viral infections acting as an inhibitor of inflammatory responses [3][4].

The biological function and expression levels of HLA-G can be too influenced by polymorphisms in its coding or regulatory sequence [5-7]. *HLA-G* gene can be transcribed in different ways through alternative processing results in seven protein isoforms, which can be cell membrane-bound or soluble, turning HLA-G functions wider [8]. Among those isoforms, the most abundant and also quantified in this study, are the HLA-G1 and -G5. The immune tolerance mediated by HLA-G is mainly by the interaction of its  $\alpha 3$  domain with cell receptors, which have inhibitory motifs (ITIM) in their cytoplasmic tails [4][8].

Plasma levels of sHLA-G are directly influenced by *HLA-G* alleles. Low levels of sHLA-G have already been related to individuals bearing *HLA-G\*01:03N* and *HLA-G\*01:05N* alleles. Alleles *G\*01:04:01* and *G\*01:01* also result in high expression levels of sHLA-G, while intermediate levels have been associated with alleles *G\*01:01:08* and *G\*01:04* [6][9]. The HLA-G molecules can be expressed by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. HLA-G can interact with immunoglobulin-like inhibitory receptors B1 (LILRB1 or ITL2) and LILRB-2 (or ILT-4) found in many types of cells and with immunoglobulin-like receptors of NK cells, such as KIR2DL4 [10] [11].

The HLA-G binding with those receptors has a higher affinity compared with the binding to other classical HLA molecules [8]. HLA-G interaction with KIR receptors acts like a negative effector stimulating the inhibition of NK cells cytotoxicity and CD8<sup>+</sup>T cells mediated cytotoxicity, as well as CD4<sup>+</sup> T cells proliferation [12]. Those mechanisms show that HLA-G molecules affect the main effector cells involved in graft rejection. In particular, soluble HLA-G can induce apoptosis of CD8<sup>+</sup>T and NK cells, and may participate in allograft tolerance through deletion of peripheral alloreactive T cells after allotransplantation *in vivo* [14].

High levels of soluble HLA-G (sHLA-G) were associated with increased allograft survival in heart [14][16] and liver transplants [16]. Moreover, expression studies indicated molecule HLA-G is a potential marker of the immune state of renal transplant patients [17][18].

Currently, it is known that the expression of HLA-G molecules is restricted and occurs in plasma of control subjects at lower levels when analyzed in comparative studies with transplanted patients [19][20].

In this study we investigated the immunotolerance profile mediated by HLA-G of non-sensitized, sensitized and desensitized kidney transplant patients. In order to accomplish this, *HLA-G* gene was genotyped for 67 kidney transplant patients from Curitiba, Brazil. Considering all patients that were genotyped, 36 patients were monitored and they had their sHLA-G levels quantified in plasma from pre to post-transplant.

## Materials and Methods

### Patients

A total of 67 patients (men and women between 18 and 65 years) undergoing kidney transplantation at the Kidney Transplant Sector at the Hospital Universitário Evangélico do Paraná (Curitiba, Paraná, Brazil) from 2012 to 2013 were included in this study. Patients underwent transplantation with allografts from living and from deceased donors.

The monitoring of transplanted patients occurred from pre to post-transplant and they were grouped in non-sensitized patients (PNS), sensitized patients (PSS) and desensitized patients (PDS) (received rabbit antithymocyte globulin (ATG) as induction therapy). The demographic profiles of those kidney transplanted patients are shown in **Table 1** and the immunosuppression protocol adopted for all patients are shown in **Table 2**. The immunosuppression protocol adopted for all patients prior to transplantation consisted of corticosteroid (methylprednisolone, 500mg independent of weight) through intravenous administration. Patients with increased immunological risk (PRA generally above 50%) or detection of DSA underwent induction therapy performed with polyclonal antibody (anti-thymocyte globulin, 1 to 1.5 mg / kg / day) initiated a few hours before surgery via infusion for up to 5 to 10 days. The calcineurin inhibitor was suspended during induction. It was only restarted just three days before the end of induction.

**Table 1**  
Kidney transplant patients description

Characteristics	PNS (n=18)	PSS (n=10)	PDS (n=8)	<i>p</i> value
Recipient n° of men/women	13/5	3/7	2/6	
Recipient age (years $\pm$ SD)	45.11 $\pm$ 15.62	43.90 $\pm$ 12.80	41.00 $\pm$ 12.14	0.7520
Donors n° of men/women	7/11	6/4	3/5	
Donors age (years $\pm$ SD)	45.50 $\pm$ 12.49	46.50 $\pm$ 12.08	34.37 $\pm$ 9.78	0.1198
<b>Donor type</b>				
Related living donor	9 (50.00%)	3 (30.00%)	4 (50.00%)	
Unrelated living donor	2 (11.11%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	
Deceased donor	7 (38.89%)	7 (70.70%)	4 (50.00%)	
<b>Previous transplants (&gt;1)*</b>	<b>0 (0.00%)</b>	<b>2 (20.00%)</b>	<b>5 (62.50%)</b>	
<b>Previous blood transfusion (&gt;1)*</b>	<b>2 (11.11%)</b>	<b>7 (70.00%)</b>	<b>7 (87.50%)</b>	
<b>Multiparous women*</b>	<b>1 (5.56%)</b>	<b>5 (50.00%)</b>	<b>3 (37.50%)</b>	
<b>Pre-transplant PRA (<math>\leq</math>10%)*</b>	<b>7 (38.89%)</b>	<b>0 (0.00%)</b>	<b>2 (25.00%)</b>	<b>0.0049</b>
<b>Post-transplant PRA (<math>\leq</math>10%)*</b>	<b>6 (33.33%)</b>	<b>0(0.00%)</b>	<b>3 (37.50%)</b>	<b>0.0057</b>
Time on dialysis before transplantation (Hd or CAPD) (months)	27.05 $\pm$ 30.31	51.10 $\pm$ 46.78	62.12 $\pm$ 65.31	0.0797
<b>Intensive immunosuppression maintenance therapy adopted *</b>				
<b>IVGIg therapy</b>	0 (0.00%)	0 (0.00%)	4 (50.00%)	
<b>Pulsetherapy with methyl prednisolone</b>	6 (33.33%)**	3 (30.00%)**	2 (25.00%)**	
<b>Terapia com ATG therapy</b>	1 (5.56%)**	2 (20.00%)**	8 (100.00%)	
<b>Plasmapheresis therapy</b>	0 (0.00%)	0 (0.00%)	2 (25.00%)**	
<b>Induction therapy *</b>	0 (0.00%)	0 (0.00%)	8 (100.00%)	
<b>Therapy with monoclonal Ab</b>	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	
<b>No intensive intensive therapy adopted in the post-transplant</b>	11 (61.11%)	5 (50.00%)	0 (0.00%)	
Cold ischemia time (hours $\pm$ SD)	1:00 $\pm$ 9:25	17:52 $\pm$ 12:00	7:26 $\pm$ 10:18	0.4751
<i>Mismatches</i> (HLA-A, -B e -DR)				0.9955
0-2 MM	7 (38.89%)	3 (30.00%)	3 (37.50%)	
3-4 MM	7 (38.89%)	6 (60.00%)	4 (50.00%)	
5-6 MM	2 (11.11%)	0 (0.00%)	1 (12.50%)	
Not determined	2 (11.11%)	1 (10.00%)	0 (0.00%)	
Predict acute rejection	4 (22.22%)	1 (10.00%)	2 (25.00%)	
<b>Base diseases</b>				
Hypertension	18 (100.00%)	9 (90.00%)	6 (75.00%)	
Diabetes	2 (11.11%)	3 (30.00%)	0 (0.00%)	
Glomerulonephritis	9 (50.00%)	4 (40.00%)	4 (50.00%)	
Pyelonephritis	1 (5.56%)	0 (0.00%)	2 (25.00%)	
Polycystic kidney	2 (11.11%)	1 (10.00%)	1 (12.5%)	
Chronic renal failure	15 (83.33%)	10 (100.00%)	8 (100.00%)	
Hypertensive nephropathy	3 (16.67%)	1 (10.00%)	1 (12.5%)	
Others	3 (16.67%)	5 (50.00%)	1 (12.5%)	

Recipients and donors age, time on dialysis before transplantation, cold ischemia time, PRA and mismatches were analysed by *Kruskal-Wallis* test (*p* value  $\leq$  0,01). \***Determining characteristics considered in the division of the three groups of transplanted patients.** \*\* **Just adopted in post-transplant.** \*\*\* **Adopted in pre and post-transplant.** SD: standard deviation; PNS: patients non-sensitized; PSS: patients sensitized; PDS: patients desensitized.

**Table 2**  
Immunosuppression protocol adopted for all patients

Medication (type)	Quantity administered	Start of medication when:	
		recipients from living donors	recipients from deceased donors
Prednisone (corticosteroid)	1mg/kg/day (progressively reducing to 5mg within 30 days after transplantation independent of weight)	Initiated 24 hours before transplantation	Immediately prior to surgery
Tacrolimus (calcineurin inhibitor)	0,10 a 0,15 mg/kg/dose every 12 hours (dose adjustments depending on the blood level of toxicity)	Initiated 36 hours before transplantation	Immediately prior to surgery
Mycophenolate mofetil (antimetabolite agent)	360mg every 12 hours	Initiated 36 hours before transplantation	Immediately prior to surgery

## Sampling

Blood samples have been collected since 2012 at the Laboratory of Immunogenetics and Histocompatibility (LIGH) of the Genetics Department, Federal University of Paraná, UFPR (Brazil). The Ethics Committee of Hospital Universitário Evangélico do Paraná (Curitiba, Paraná, Brazil) approved the study, and all participants signed a free and informed consent form. Blood samples of 67 patients were obtained before transplantation and serially on day 3-5, day 15-30 and 2 or more months after the transplants. Obtaining of our blood samples were taken at the same time the routine collection of patients for clinical examinations, such as PRA and serum creatinine. After collection in ethylene-diamine-tetraacetic acid-containing tubes the samples were subjected to centrifugation and plasma obtained was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ , as was done for buffy coats at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. A total of 67 patients had their DNA genotyped for *HLA-G* gene and from 36 patients 174 duplicate plasma samples were analysed. Also 6 healthy individuals had their plasma samples analysed and blood samples from 49 healthy living donors served as control in genotyping procedures.

## *HLA-G* Genotyping

Peripheral blood DNA extraction was carried out with the salting out technique described by Lahiri and Nurnberger [21]. DNA samples were typed by sequence-based typing (SBT), using the SBT*excellerator*® *HLA-G* kit (GenDx). The whole genomic region from

*HLA-G* gene encompassing exon 1 to exon 6, carrying all relevant polymorphisms, were amplified in a single PCR. Sequences from exon 2 to 4 were obtained at two directions. The sequences spanning all relevant genomic regions were analyzed using *SBTEngine* software (*GenDx*) and *ABI Prism SeqScape* (*Applied Biosystems*) software. Resolution analysis was performed on typing results at the second field of resolution and at the third field of resolution, including silent variants.

#### Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Soluble HLA-G was measured by ELISA in plates of 96 wells coated with the capture antibody MEM-G/9 (sHLA-G Kit; Exbio, Czech Republic) which recognizes sHLA-G1 and HLA-G5 isoforms. Plasma samples and calibrators were added to each well (100mL) in duplicates and incubated for 16 hour. After incubation and washing, monoclonal anti-human  $\beta$ 2-microglobulin antibody labelled with horseradish peroxidase was added to the wells and incubated again with captured sHLA-G. Following washing step, the remaining horseradish peroxidase conjugate was allowed to react with the substrate solution. The absorbance of the resulting product was measured by optical densities at 450 nm using ELX-800 Universal Microplate Reader (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA). The final concentration was determined by optical density compared to standard curves. Measurements that fell at or below the minimum detectable dose specific to each kit were considered not detectable.

#### Statistical analysis

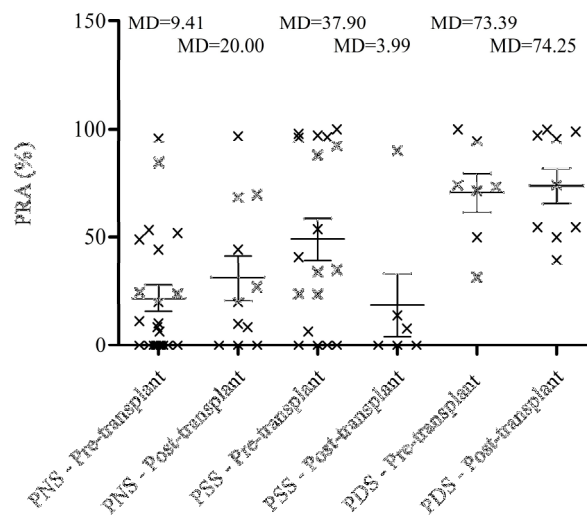
Genotypes and alleles frequencies were obtained through analysis using GenePop [22]. Comparisons between groups (patients vs. controls) were performed in 2x2 (Fisher's exact test) contingency tables using the BIOESTAT version 5.0 (AnalystSoft) and GraphPad Prism 5 [23] with significance set at  $p \leq 0.05$ . Odds ratios were calculated using BIOESTAT 5.0 with 95% confidence intervals.

The distributions of sHLA-G levels among three different groups were characterized through median and interquartile range. The *Kruskal–Wallis* test was used to compare the sHLA-G levels between the three groups and *Mann-Whitney* test for two groups (with significance set at  $p \leq 0.05$ ). In rejection of the null hypothesis between three or more groups,

they were reanalyzed in pairs for confirmation and identification of differences via *Student-Newman-Keuls* test.

## Results

There was no statistically significant difference between the three groups of kidney transplanted patients in terms of recipient and donors age, cold ischemic time of the kidney and HLA-A, -B and HLA-DR mismatches (**Table 1**). The panel reactive antibody (PRA) (**Figure 1**) from patients showed a compatible profile. Measurements of PRA at pre-transplant time from desensitized (median of 73.39%) and sensitized patients (median of 37.9%) were not considered different ( $p = 0.2185$ ), but they were higher than levels from non-sensitized patients (median of 9.41%) when compared at the same time (PNS *versus* PDS,  $p = 0.0219$  and PNS *versus* PSS,  $p = 0.0033$ ). Data from PRA after transplants continue higher for desensitized patients (median of 74.25%), showing significant difference when compared with sensitized patients (median of 3.99%,  $p = 0.0025$ ). Non-sensitized patients had also higher PRA when compared with sensitized patients ( $p = 0.0172$ ).

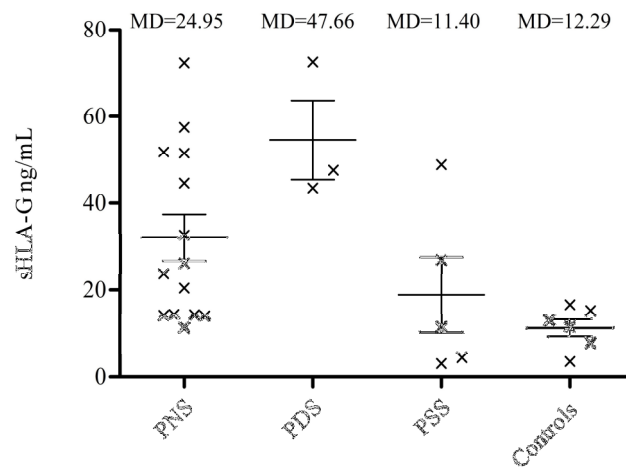


**Figure 1** Pre to post-transplant panel reactive antibody (PRA) from kidney transplant patients. MD: median; PNS: patients non-sensitized (n=18); PDS: patients desensitized (n=8); PSS: patients sensitized (n=10).

Levels of sHLA-G were determined for 18 non-sensitized patients (PNS), 8 desensitized patients (PDS), 10 sensitized patients and 6 healthy individuals (controls) from pre to post transplant grouped into: day 0 (sampling before transplant) and day 3-5, day 15-30 and 2 or more months after the transplants. Those four times of quantifications between the

three groups were analysed through *Kruskal-Wallis* non-parametric test. Difference when detected (significant  $p$  value  $<0.05$ ) were identified among groups through *Student-Newman-Keuls* test.

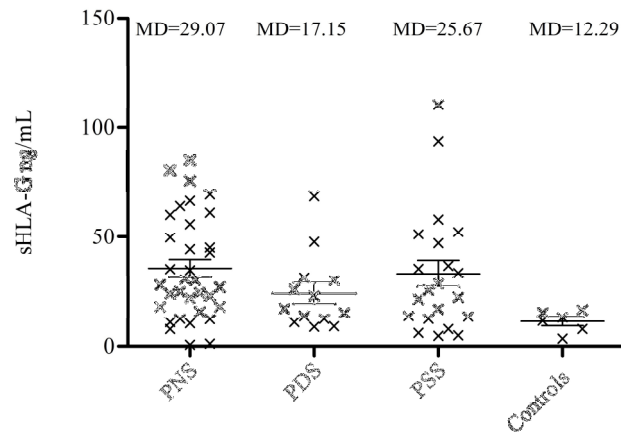
In the pre-transplant (**Figure 2**) differences were detected for sHLA-G levels found in non-sensitized patients (median of 24.95 ng/mL,  $p=0.0261$ ) and desensitized patients (median of 47.66 ng/mL,  $p=0.0084$ ) when were both compared with controls (median of 12.29 ng/mL). However similar levels of sHLA-G (11.40 ng/mL,  $p=0.6587$ ) were observed for sensitized patients.



**Figure 2** Pre-transplant levels of sHLA-G. MD: median; PNS: patients non-sensitized (n=18); PDS: patients desensitized (n=8); PSS: patients sensitized (n=10); controls (n=6).

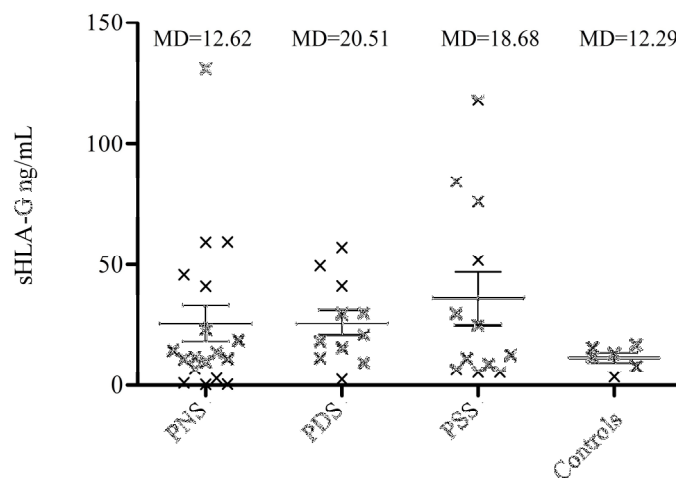
In the days that follow immediately after surgery, day 3-5 (**Figure 3**), differences were detected for sHLA-G levels found again in non-sensitized patients (median of 29.07 ng/mL,  $p=0.0060$ ) and in sensitized patients (median of 25.67 ng/mL,  $p=0.0295$ ), but not in desensitized patients (median of 17.15 ng/mL,  $p=0.1308$ ), when all were compared with controls (median of 12.29 ng/mL).





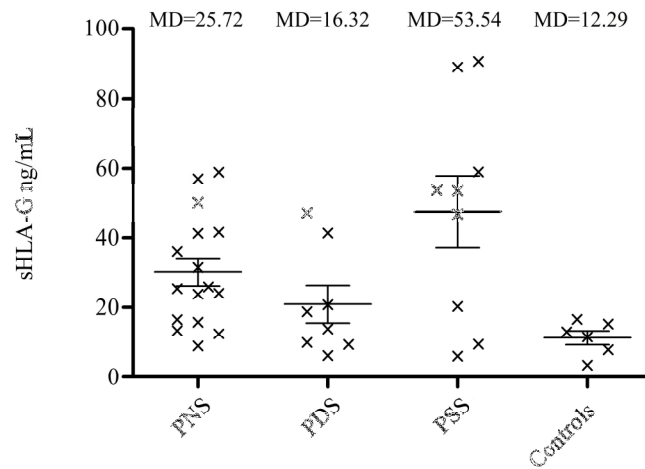
**Figure 3** Levels of sHLA-G from day 3-5 post-transplant. MD: median; PNS: patients non-sensitized (n=18); PDS: patients desensitized (n=8); PSS: patients sensitized (n=10); controls (n=6).

Between two weeks and one month after transplantation (**Figure 4**), no differences were detected for sHLA-G levels in the three groups when compared with controls ( $p=0.5038$ , median of controls 12.29 ng/mL).



**Figure 4** Levels of sHLA-G from day 15-30 post-transplant. MD: median; PNS: patients non-sensitized (n=18); PDS: patients desensitized (n=8); PSS: patients sensitized (n=10); controls (n=6).

Measurements obtained from two months onwards after transplants showed differences between non-sensitized patients (median of 25.72 ng/mL *versus* controls,  $p=0.0169$ ) and sensitized patients (median of 53.54 ng/mL *versus* controls,  $p=0.0042$ ). But no difference was observed from desensitized patients compared with controls (PDS median of 16.32 ng/mL,  $p=0.2881$ ).



**Figure 5** Levels of sHLA-G from 2 or more months post-transplant. MD: median; PNS: patients non-sensitized (n=18); PDS: patients desensitized (n=8); PSS: patients sensitized (n=10); controls (n=6).

*HLA-G* allele frequencies were determined for all 67 patients and 49 controls. Genotyping results were used to analyze the possible allele associations with the groups of patients vs. controls considered in this work. Alleles G\*01:04, G\*01:01:02 and G\*01:01:03 had significant associations ( $p$  value < 0.05) considering results from Fischer exact test (Table 3). Presence of G\*01:01:02/03 was higher for desensitized patients when compared with control group, as well as G\*01:04 on non sensitized patients when compared again with control group. But all those results need to be carefully analyzed considering their confidences intervals and the number of patients analysed.

**Table 3**

<i>HLA-G</i> allele associations with non-sensitized and desensitized transplanted patients					
Allele		PNS (n=18)	Control group (n=49)	Fischer exact test	Odds Ratio (CI)
01:04	+	7	6	0.03	4.77 (1.33-17.07)
	-	11	45		
Allele		PDS (n=8)	Control group (n=49)	Fischer test	Odds Ratio (CI)
01:01:02	+	6	14	0.01	7.93 (1.43-44.03)
	-	2	37		
01:01:03	+	4	4	0.04	7.05 (1.21-40.90)
	-	5	47		

PNS: patients non-sensitized; PDS: patients desensitized; CI: Confidence interval.

## Discussion

Laboratory evaluations for monitoring of patients are conducted from pre to post-transplant to keep stable renal function and to prevent the development of kidney transplant rejection events. The tests commonly performed are: genetic compatibility verification by genotyping HLA-A, -B and -DRB1 [24], the determination of panel reactive antibodies (PRA) of the patient, the renal biopsy using immunohistochemistry for diagnostic antibody-mediated rejection (AMR) [25], the evaluation of renal function in the case of kidney transplants before and after surgery through quantification of creatinine [26].

Currently biopsy is the methodology that enables the detection of accurate and early immune response. Through this histopathological examination is performed adjustments in immunosuppressive therapies aiming prolong the life of the patient and slow down the loss of graft function, either by rejection or nephrotoxicity. However, biopsy is a very invasive and is dependent on the subjective analysis of a pathologist [27-29]. Therefore, new more flexible methods to assist in the characterization of the immune response of transplanted patients, such as characterization of immune tolerance profile of kidney transplant patients in response to the allograft and the adopted immunosuppressive therapy, are likely to space the use of this so-invasive method [30].

Our results show that the sHLA-G expression profile is in accordance with immunotolerance profile expected for kidney transplanted patients that were also described through their medical records.

The group from non sensitized patients before kidney transplant have not undergone previous transplants, their time of pre-transplant dialysis (mean of 27 months) and panel of reactive antibodies determined before (PRA median of 9.41%) and after (PRA median of 20.00%) transplantation are lower compared to other patients. The number of blood transfusions (11.11%) and multiparous women (5.56%) in this group is reduced. Among non-sensitized patients were not employed ATG as induction therapy (just in one patient and as maintenance therapy) and more than 60% of patients did not adopt any kind of intensive immunosuppressive therapy.

Considering those information and that sHLA-G have already been demonstrated to be more expressed by patients that exhibit significantly better graft acceptance, non-sensitized

patients had also higher levels of sHLA-G (median from day 0: 24.95 ng/mL, day 3-5: 29.07 ng/mL, 2 or more months: 25.72 ng/mL), a positive sign of immunotolerance.

The maintenance of a lower production of HLA alloreactive antibodies (PRA) has been linked with kidney transplanted patients who express HLA-G, as was evidenced between the patient non sensitized. These antibodies play an important role in triggering acute and chronic graft rejection. However HLA-G could act and induce the tolerance through interaction with receptors from B cells, as has been demonstrated its effect *in vitro*, specially the role of HLA-G1 and HLA-G5, with lymphocyte suppressing the alloproliferative response of T cells [17].

Those mechanisms show that HLA-G molecules affect the main effector cells involved in graft rejection. In particular, soluble HLA-G can induce apoptosis of CD8<sup>+</sup>T and NK cells, and may participate in allograft tolerance through deletion of alloreactive T cells from peripheral blood after allotransplantation *in vivo* [13].

The higher levels of sHLA-G in non-sensitized patients were observed in pre and post-transplantation, except for the period from the 15<sup>th</sup> day to the 30<sup>th</sup> day after transplantation (12.62 ng/mL). During this period, all patients regardless of which group they were classified, showed lower levels of sHLA-G (similar to control levels, 12.29 ng/mL,  $p = 0.5038$ ). This period corresponds to the first two weeks of hospital discharge, in which the administration of immunosuppressive drugs is reduced or in some cases cannot be correctly taken by patients. Plasma levels of sHLA-G were found to increase soon after administration of the immunosuppressive drugs, like cyclosporine and tacrolimus in some heart transplant patients [31]. These drugs are also adopted in immunosuppression protocols by patients from this study and a gradual decrease of the administration of these drugs might also affect the expression of *HLA-G*, as well as its molecular immunotolerance mechanisms.

About desensitized and sensitized kidney transplant patients, they were relatively similar. In both groups individuals can have undergone previous transplants, their time of pre-transplant dialysis are higher (PDS with a mean of 62 months and for PSS a mean of 51 months). The number of blood transfusions (PDS - 70.00% and PSS - 87.50%) and multiparous women (PDS - 37.50% and PSS - 50.00%) in this group are also elevated. But with respect to intensive immunosuppressive therapies adopted in pre-transplant, all desensitized patients underwent induction therapy via ATG, while no one of the sensitized patients has. Regarding the panel of reactive antibodies determined before and post-

transplantation, different results were found for those two groups of patients. The desensitized patients maintained the highest PRA pre to post-transplant (medians of 73.39% and 74.25%, respectively), while the sensitized patients had a high pre-transplant PRA (median of 37.90%), but lower post-transplant (median of 3.99%). The lower PRA post-transplant observed in sensitized patients could be explained by formation of immunocomplex. Therefore the production of antibodies is higher, but it could not be described, because PRA is just the detection obtained from serum and not from allograft tissue [32-33].

Regarding the levels of sHLA-G in desensitized patients, levels remained elevated in the pre-transplant (median of 47.66 ng/mL *versus* controls,  $p=0.0084$ ) due to the induction therapy adopted. However, after transplant occurred a decrease in sHLA-G levels (day 3-5: 17.15 ng/mL; day 15-30: 20.51 ng/mL; 2 or more months: median of 16.32 ng/mL) when compared to controls (median of 12.29 ng/mL). This soluble HLA-G profile indicates a transient positive effect of induction therapy prior to transplantation, that would delay the use of post-transplant immunosuppression which is also nephrotoxic. However it also demonstrates a low immunotolerance of those patients after transplantation and the need of more frequent monitoring.

In sensitized patients, the levels of sHLA-G did not differ in pre-transplant compared with controls (median of 11.04 ng/mL,  $p = 0.6587$ ) and just after transplantation levels increased (median of 17.15 ng/mL,  $p = 0.0295$ ). But they still were lower when compared with levels from non-sensitized patients that were considered more immunotolerant (or stable). After 15 days until the first month post-transplantation as we could observe and discuss for other groups, sHLA-G levels were similar to values found in our controls (PSS median of 18.68 ng/mL,  $p = 0.5038$ ).

Interestingly the sHLA-G levels measured in sensitized patients from second month onwards were higher (median of 53.54 ng/mL,  $p = 0.0042$ ) compared to controls. The explanation for this event should be understood as the beginning of a return to stability of the immune system after transplantation. However, knowing that HLA-G may act by modulating inflammation [3], then its high expression in soluble form and detection in the plasma of such patients could be related to the body's attempt to prevent the development of allograft rejection.

Considering that plasma levels of sHLA-G are directly influenced by *HLA-G* alleles, monitored patients (N=36) and healthy controls (N=49) were *HLA-G* genotyped. The

presence or not of *HLA-G* alleles associations from each group *versus* controls were analyzed through Fischer exact test. Significant results of allele G\*01:04 ( $p = 0.03$ ) was found been associated among non-sensitized patients than in controls. In the other groups it was not observed. This allele have already been related to a high expression of sHLA-G and to a linkage disequilibrium with a polymorphism in regulatory region which would stimulate the expression of *HLA-G* gene [6][10][34-35]. In our study the maintenance of high levels of sHLA-G and the association of allele 01:04 with non-sensitized patients group collaborate with this knowledge already reported.

Significant associations were evidenced of alleles G\*01:01:02 ( $p = 0.01$ ) and G\*01:01:03 ( $p = 0.04$ ) in desensitized patients group when compared with control group. The presence of allele G\*01:01:02 and G\*01:01:03 in desensitized patients act like a risk allele according to *Odds Ratio*, it could be influencing in the susceptibility of these individuals. Specially because both alleles are related to lower levels of sHLA-G and to recurrent miscarriages [36]. These alleles have also been related to the 14 bp insertion in the 3'UTR region of the *HLA-G* gene. The nucleotide base sequence of this insertion after transcription sequence from mRNA promotes its instability and decreases its viability to be translated into *HLA-G* molecules.

The positive relationship observed between the maintenance of tolerance and levels of sHLA-G in kidney transplant patients demonstrates that *HLA-G* is participating inducing tolerance immediately after transplantation, also complementing the action of immunosuppressive treatments [37]. It was evidenced with the increase of sHLA-G after induction treatment in the group of desensitized patients and the other two groups after transplantation (day 3-5). With this, we should consider the influence of the immunosuppressive therapy on *HLA-G* gene expression [38].

Then, the results point *HLA-G* as a positive potential biomarker of immune tolerance profile of kidney transplant patients. However, we understand the need for continuation of studies to characterize the profile of *HLA-G* expression in more kidney transplant patients and healthy individuals, which is not well described because of its restricted expression. This description would help in comparison with transplant patients, contributing to the definition of an acceptable standard of expression and, therefore, the possible introduction of this test in routine monitoring of patients. In clinical the quantification of *HLA-G* could be useful to assist in the characterization of immune tolerance profile of patients and adjust in the

administration of immunosuppressants, which in excess become nephrotoxic and can lead to graft loss or development of secondary diseases.

#### Acknowledgements

This study was supported by the research fund of FUNPAR- LIGH. We are most grateful to kidney transplant patients and their donors for generously accorded to provide samples for this study. We also thank Hospital Universitário Evangélico de Curitiba and LIGH staff for technical support.

## References

- [1] Kovats S, Main EK, Librach C, Stubblebine M, Fisher SJ, DeMars R. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science*. 1990;248:220–223.
- [2] Moreau P, Flajollet S, Carosella ED (2009) Non-classical transcriptional regulation of HLA-G: an update. *J Cell Mol Med*. 2009;13:2973–2989.
- [3] Carosella ED, Moreau P, Lemaoult J, Rouas-Freiss N. HLA-G: from biology to clinical benefits. *Trends Immunol*. 2008;29:125–132.
- [4] Dahl M, Hviid TVF. Human leucocyte antigen class Ib molecules in pregnancy success and early pregnancy loss. *Hum Reprod Update*. 2012;18(1):92-109.
- [5] Hviid, T.V. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. *Hum. Reprod. Update*. 2006;12:209–232
- [6] Donadi EA, Castelli EC, Aranaiz-Villena A, Roger M, Rey D, Moreau P. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. *Cellular Molecular Life Sciences*. 2011;68(3):369-395.
- [7] Van der Ven K, Pfeiffer K, Skrablin S. HLA-G polymorphisms and molecule function-questions and more questions-a review. *Placenta*. 2000;21(Suppl A):S86-92.
- [8] Shiroishi M, Tsumoto K, Amanoc K, Shirakihara Y, Colonnad M, Braude VM, Allane DSJ, Makadzange A, Rowland-Jones S, Willcox B, Jones EY P, Merweh A, Kumagaib I, Maenaka K. Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:8856–8861.
- [9] Lajoie J, Jeanneau A, Faucher M-C, Moreau P, Roger M. Characterisation of five novel *HLA-G* alleles with coding DNA base changes. *Tissue Antigens*. 2008;72(5):502–504.
- [10] Rebmann V, van der Ven K, Passler M, Pfeiffer K, Krebs D, Grosse-Wilde H. Association of soluble HLA-G plasma levels with HLA-G alleles. *Tissue Antigens*. 2001;57:15–21.
- [11] Hsu KC, Chida S, Gerahty DE, Dupont B. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunology Rev*, 2002;190:40-52.
- [12] Apps R, Gardner L, Moffett A. A critical look at HLA-G. *Trends Immunol*. 2008; 29: 313.
- [13] Contini P, Ghio M, Poggi A, Filaci G, Indiveri F, Ferrone S, Puppo F. Soluble HLA-A, -B, -C and -G molecules induce apoptosis in T and NK CD8<sup>+</sup> cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation. *Eur J Immunol*. 2003;33:125–134



- [14] Lila N, Carpentier A, Amrein C, Khalil-Daher I, Dausset J, Carosella ED. Implication of HLA-G molecule in heartgraft acceptance. *Lancet*. 2000;355:2138.
- [15] Lila N, Amrein C, Guillemain R, et al. Human leukocyte antigen-G expression after heart transplantation is associated with a reduced incidence of rejection. *Circulation* 2002;105:1949–54.
- [16] Baştürk B, Karakayali F, Emiroğlu R, Sözer O, Haberal M. Human leukocyte antigen-G, a new parameter in the follow-up of liver transplantation. *Transplant Proc*. 2006; 38: 571–4.
- [17] Qiu J, Terasaki PI, Miller J, Mizutani K, Cai J, Carosella ED. Soluble HLA-G expression and renal graft acceptance. *Am J Transplant*. 2006;6:2152–2156.
- [18] Racca AL, Veaute CM, Bailat AS, et al. Expression of HLA-G and MICA mRNA in renal allograft. *Transpl Immunol*. 2009; 21: 10.
- [19] Zarkhin V, Talisetti A, Li L, Wozniak LJ, McDiarmid SV, Cox K, Esquivel C, Sarwal MM. Expression of Soluble HLA-G Identifies Favorable Outcomes in Liver Transplant Recipients. *Transplantation*, 2010;90:1000-1005.
- [20] Almassod A, Sheshgiri R, Joseph JM, Rao V, Kamali M, Tumati L, Ross H, Delgado DH. Human leukocyte antigen-G is upregulated in heart failure patients: A potential novel biomarker. *Hum Immunol*, 2011;72:1064-1067.
- [21] Lahiri DK, Nurnberger JI, A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nuc Acid Res* 1991;19:5444.
- [22] Raymond M, Rousset F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered*. 1995; 86:248-249.
- [23] Motulsky HJ. *Analyzing Data with GraphPad Prism*. GraphPad Software Inc., San Diego C.A. , 1999. Disponível em:< [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)>. Acesso em: 26 set. 2013.
- [24] García MAA, Yebra BG, Flores ALL, Guerra EG. The Major Histocompatibility Complex in Transplantation. *J Transp*. 2012;1-7.
- [25] Cornell, L.D.; Smith, R.N.; Colvin, R.B. *Kidney Transplantation: Mechanisms of Rejection and Acceptance*. *Annu Rev Pathol-Mech*, Massachusetts. 2008;3:189-220.
- [26] Motta, V.T. E-book: Biomarcadores na Nefrologia. *Bioquímica Clínica: Princípios e Interpretações*. Sociedade Brasileira de Nefrologia. 2011;15.
- [27] Feucht, H.E.; Schneeberger, H.; Hillebrand, G.; Burkhardt, K.; Weiss, M.; Riethmuler, G.; Land, W.; Albert, E. Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. *Kidney Int*. 1993;43:1333–1338.

- [28] Serón D, Moreso F. Protocol biopsies in renal transplantation: prognostic value of structural monitoring. *Kidney International*. 2007;72:690–697.
- [29] Williams WW, Taheri D, Tolckoff-Rubin N, Colvin RB. Clinical role of the renal transplant biopsy. *Nature Reviews Nephrology*. 2012;8:110–121.
- [30] Einecke G, Sis B, Reeve J, Mengel M, Campbell PM, Hidalgo LG, Kaplan B, Halloran PF. Antibody-Mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure. *Am J Transplant*. 2009;9:2520-2531.
- [31] Luque J, Torres Mi, Aumente MD, Marín J, García-Jurado G et al. Soluble HLA-G in heart transplantation: their relationship to rejection episodes and immunosuppressive therapy. *Hum Immunol*. 2006;67: 257–63.
- [32] Borelli SD, Ferreira E, Oliveira AM, Krishnaswamy S, Hiraki DD, Grumet FC. Specific sHLA in Healthy Donors and Donor-Specific sHLA in Renal Transplant Patients. *Hum Immunol*. 1999; 60:430–434.
- [33] Otten HG Verhaar MC, Borst HPE, Hené RJ, Zuilen AD. Pretransplant Donor-Specific HLA Class-I and –II Antibodies Are Associated With an Increased Risk for Kidney Graft Failure. *Am J Transplant*. 2012;12:1618-1623.
- [34] Rebmann, V.; Van Der Ven, K.; Päßler, M.; Pfeiffer, K.; Krebs, D.; Grosse-Wilde, H. Association of soluble HLA-G plasma levels with HLA-G alleles. *Tissue Antigens*, 2001;57:15-21.
- [35] Cristofaro JD, Moujally DE, Agnel A, Mazières S, Cortey M, Basire A, Chiaroni J, Picard C. HLA-G haplotype structure shows good conservation between different populations and good correlation with high, normal and low soluble HLA-G expression. *Hum Immunol Rap Comm*. 2013;74: 203-206.
- [36] Abbas A, Tripathi P, Naik S, Agrawal S. Analysis of human leukocyte antigen (HLA)-G polymorphism in normal women and in women with recurrent spontaneous abortions. *Eur J Immunogenet*, 2004;31:275-278.
- [37] Jin L, Li CR, Xiao L, Shi BY, Cai M, Li ZL, Wang S, Chen LP, Zhan SL, Li PC. Clinical Relevance of sHLA-G-Mediated With Better Graft Acceptance in Early Posttransplantation. *Transplant P*, 2012;44:1259–1261.
- [38] Sheshgiri R, Gustafsson F, Sheedy J, Rao V, Ross HJ, Delgado DH. Everolimus but not mycophenolate mofetil therapy is associated with soluble HLA-G expression in heart transplant patients. *J Heart Lung Transplant*, 2009;28:1193–1197.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 DESCRIÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA

As análises realizadas com os dados demográficos e clínicos dos grupos de pacientes transplantados renais utilizados para as análises genótípicas são apresentados na TABELA 1. Do total de pacientes recrutados, 36 pacientes que foram monitorados do pré ao pós-transplante com relação aos seus níveis de HLA-G solúvel no sangue periférico. A descrição isolada deste subgrupo foi apresentado na TABELA 1 (**ver item 5 RESULTADOS, *Materials and Methods, Patients***).

TABELA 1 - DESCRIÇÃO DOS PACIENTES GENOTIPADOS PARA O GENE *HLA-G*

CARACTERÍSTICAS	Pacientes de TXV (N=55)	Pacientes de TXF (N=45)	<i>p</i> value
Nº de homens/mulheres receptores (%)	31/24 (56,36%/43,64%)	27/18 (60,00%/40,00%)	
Idade do receptor (anos $\pm$ DP)	36,70 $\pm$ 13,65	49,34 $\pm$ 11,29	<0,0001
Nº de homens/mulheres doadores (%)	22/33 (40,00%/60,00%)	27/16 (60,00%/40,00%)	
Idade do doador (anos $\pm$ DP)	40,31 $\pm$ 9,58	46,41 $\pm$ 13,31	0,0198
Transplantes prévios (>1)	7 (12,96%)	5 (50,00%)	
Diálise pré-transplante(Hd ou CAPD)	46 (85,18%)	43 (97,73%)	
Tempo de diálise pré-transplante	21,03 $\pm$ 19,58	60,89 $\pm$ 46,48	<0,0001
Terapia de imunossupressão intensiva adotada			
Terapia IVGIg	3 (5,56%)	4 (9,10%)	
Pulsoterapia com metil prednisolona no pós-transplante	28 (50,91%)	11 (24,44%)	
Terapia com ATG	10 (18,52%)	16 (36,36%)	
Terapia via plasmaferese	2 (3,70%)	0 (0,00%)	
Terapia de Indução	5 (9,26%)	11 (25,00%)	
Terapia com Ac monoclonal	3 (5,56%)	0 (0,00%)	
Nenhuma terapia intensiva	23 (42,59%)	19 (43,18%)	
Tempo de isquemia fria (horas $\pm$ DP)	1:00 $\pm$ 0:00	19:48 $\pm$ 6:05	<0,0001
<i>Mismatches</i> (HLA-A, -B e -DRB1)			0,1148
0-2 MM	20 (37,04%)	6 (13,64%)	
3-4 MM	23 (42,59%)	23 (52,27%)	
5-6 MM	11 (20,37%)	5 (11,36%)	
Não determinado	0 (0,00%)	10 (22,73%)	
Rejeição aguda presumida	26 (47,27%)	10 (22,73%)	
Doenças de base			
Hipertensão	40 (74,07%)	42 (95,45%)	
Diabetes	2 (3,70%)	12 (27,27%)	
Glomerulonefrite	38 (70,37%)	17 (38,64%)	
Pielonefrite	3 (5,56%)	2 (4,54%)	
Rim policístico	1 (1,85%)	6 (13,64%)	
Insuficiência renal crônica	23 (42,59%)	40 (90,91%)	
Nefropatia hipertensiva	7 (12,96%)	7 (15,91%)	
Outros	10 (18,52%)	17 (38,64%)	

As variáveis idade de receptores e doadores, tempo de diálise pré-transplante, tempo de isquemia fria e *mismatches* foram analisadas através do teste de *Mann-Whitney* (*p* value < 0,01). DP: desvio padrão; TXV: transplante a partir de doador vivo; TXF: transplante a partir de doador falecido.

FONTE: autor

## 6.2 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE sHLA-G

Os níveis de sHLA-G plasmático foram determinados do pré ao pós-transplante para 36 pacientes transplantados renais do total de 100 pacientes recrutados. No total, foram quantificadas 174 amostras de plasma, as quais foram analisadas em duplicata. Amostras de plasma de 6 doadores vivos foram coletadas anteriormente ao transplante e utilizadas como controle. Todas as amostras foram mensuradas via imunoenensaio utilizando o kit comercial específico para sHLA-G (Exbio). Os níveis de sHLA-G das amostras de plasma dos pacientes foram estimados com base nas mensurações feitas nas amostras de calibradores provenientes do kit, os quais apresentavam as concentrações de sHLA-G pré-determinadas pelo fabricante.

As quantificações obtidas para os grupos de pacientes não sensibilizados, dessensibilizados e sensibilizados foram comparadas entre si em quatro fases: no pré-transplante (dia 0) e em três fases no pós-transplante: do dia 3º ao 5º, do dia 15º ao 30º e do segundo mês em diante. As análises foram realizadas via teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* (considerando significativo  $p$  value  $\leq 0.05$ ). Quando diferenças foram encontradas foi realizado o teste de *Student-Newman-Keuls* a fim de se verificar entre qual grupo estaria esta diferença.

Os pacientes transplantados renais não sensibilizados (PNS) foram agrupados por apresentarem anteriormente a cirurgia características específicas e relacionadas a um perfil de imunotolerância considerado positivo para a aceitação do aloenxerto. A não realização de transplantes prévios, o tempo de diálise reduzido (média de 27 meses) antes da cirurgia, o número reduzido de transfusões sanguíneas e um painel reativo de anticorpos baixo no pré-transplante (média de 9.41%) e também no pós-transplante (média de 20.00%) foram fatores que auxiliaram a classificar e determinar pacientes com melhor prognóstico da sobrevida do aloenxerto. Estes pacientes também se diferenciaram por não terem sido submetidos a terapia de indução (que ocorre na fase pré-transplante) via ATG e mesmo no pós-transplante a maioria não adotou imunoterapia intensiva.

A presença de sHLA-G sendo expresso em pacientes transplantados renais associada a baixas quantificações de anticorpos foi descrito anteriormente como característico de pacientes não sensibilizados (Zarkhin *et al.*, 2010). Neste sentido, HLA-G poderia estar agindo e induzindo a tolerância via interação com células B, inibindo a proliferação destas células e a produção de anticorpos aloreativos (Qiu *et al.*, 2006).

Como era esperado os pacientes classificados como não sensibilizados neste estudo apresentaram níveis sHLA-G também elevados, principalmente no pré-transplante, até 5 dias após a cirurgia e dois meses ou mais após o transplante. Estes níveis apresentaram medianas sempre superiores a 25 ng/mL, enquanto as quantificações obtidas para indivíduos saudáveis apresentaram mediana de 12.29 ng/mL. Isto aliado a constatação de uma baixa produção de anticorpos alorreativos demonstraram a prevalência da imunotolerância entre estes pacientes.

No entanto, este perfil elevado de expressão de sHLA-G em pacientes não-sensibilizados acabou não se mantendo num dos períodos analisados, o qual correspondeu do 15° ao 30° dia após o transplante. Estes níveis baixos e similares aos controles (12.29 ng/mL,  $p = 0.5038$ ) foram observados em todos os pacientes independente do perfil. Coincidentemente, esta fase está temporalmente associada as duas semanas pós-transplante, quando a maioria dos pacientes recebem alta hospitalar. Isso ocorre juntamente com diminuição das doses de imunossupressores que utilizam, ou em certos casos, os pacientes não seguem a ingestão das doses recomendadas pelo nefrologista. Como estudos já evidenciaram que os níveis plasmáticos de sHLA-G podem se elevar mediante a administração de drogas imunossupressoras, como a ciclosporina ou tacrolimus em pacientes transplantados renais (LUQUE *et al.*, 2006), a diminuição gradual na ingestão de drogas pelos pacientes estudados, pode ter afetado a expressão do gene *HLA-G*, assim como os mecanismos moleculares no qual está envolvido.

O efeito sinérgico de medicamentos imunossupressores que induzem a expressão de sHLA-G, que é também um imunomodulador, foi descrito em outros estudos envolvendo pacientes transplantados de coração (SHESHGIRI *et al.*, 2009). Assim as evidências da maior expressão desta molécula no plasma de pacientes transplantados renais poderiam vir a ser utilizadas para aprimorar o controle dos protocolos de imunossupressão e diminuir os efeitos nefrotóxicos do uso exacerbado de medicamentos.

Com relação a caracterização dos pacientes transplantados renais dessensibilizados (PDS) e sensibilizados (PSS), eles apresentaram similaridades. Ambos os grupos foram obtidos pela seleção de pacientes que já tinham passado por transplantes prévios, independente da seleção foi observado que o tempo de diálise pré-transplante foi maior que 50 meses em média, a quantidade de pacientes que tinham passado por transfusões sanguíneas pré-transplante foi maior que 70% e a presença de mulheres múltíparas superior a 35%. Porém estes pacientes diferiram na terapia de imunossupressão adotada pré-transplante,

enquanto todos os pacientes dessensibilizados foram submetidos a terapia de indução via ATG (protocolo de dessensibilização adotado para pacientes com alto risco de desenvolver rejeição pós-transplante), nenhum paciente sensibilizado passou por esta indução. O painel reativo de anticorpos determinado antes e depois do transplante também diferiu entre estes dois grupos de pacientes. Os pacientes dessensibilizados mantiveram um PRA elevado do pré ao pós-transplante (medianas de 73.39% e 74.25%, respectivamente), enquanto os pacientes sensibilizados apresentaram PRA pré-transplante elevado (mediana de 37.90%), mas no pós-transplante mais baixo (mediana de 3.99%). Esta diminuição do PRA no pós-transplante em pacientes sensibilizados pode ser associada a formação de imunocomplexos com anticorpos anti-HLA no sítio da resposta imune, ou seja, no aloenxerto. Desta forma, apesar das quantificações baixas de anticorpos circulantes, as quais são mensuradas no soro, a real detecção dos anticorpos formados estaria sendo mascarada, pois estes permaneceriam aglomerando nos imunocomplexos no aloenxerto.

Interessantemente os níveis de sHLA-G em pacientes dessensibilizados se mantiveram elevados no pré-transplante (mediana de 47.66 ng/mL,  $p = 0.0084$ ). Esta elevação foi associada a terapia de indução adotada no pré-transplante, quando a medicação pode ter estimulado a produção da molécula imunomoduladora HLA-G. Entretanto, após o transplante ocorreu uma queda nos níveis de HLA-G (dia 3-5: 17.15 ng/mL; dia 15-30: 20.51 ng/mL,  $p=0.5038$ ; 2 meses ou mais: 16.32 ng/mL,  $p=0.2881$ ), quando comparado com os níveis do grupo controle (mediana de 12.29 ng/mL). Este perfil de HLA-G solúvel é um indício do rápido efeito da terapia de indução anteriormente ao transplante. Considerando a menor expressão de *HLA-G* associada com maiores chances de rejeição ao aloenxerto (LU *et al.*, 2010), estes pacientes teriam maior risco de perder o enxerto. Porém, ao mesmo tempo, a elevada expressão pré-transplante de HLA-G demonstra o sucesso da terapia de indução, considerando que a sua eficiência é capaz de postergar o reinício da administração de drogas imunossupressoras, as quais conhecidamente apresentam efeito nefrotóxico.

Para o grupo de pacientes sensibilizados os níveis de sHLA-G não diferiram do observado para os controles no pré-transplante (mediana de 11.04 ng/mL,  $p = 0.6587$ ), mas se elevaram após a cirurgia (mediana de 17.15 ng/mL,  $p = 0.0295$ ). Entretanto estas quantificações ainda se mantiveram baixas quando comparadas com o grupo de pacientes não sensibilizados.

Quantificações elevadas de sHLA-G, que não eram esperadas, em amostras coletadas após dois meses do transplante em indivíduos sensibilizados foram evidenciadas (mediana de 53.54 ng/mL,  $p = 0.0042$ ). Esta expressão pôde ser compreendida como uma resposta do sistema imune em retornar a estabilidade, isso mesmo após o transplante. Considerando que a função principal de HLA-G é a imunomodulação de inflamações (CAROSELLA *et al.*, 2008), o aumento de sua expressão e detecção no plasma dos pacientes poderia estar relacionado a uma tentativa do sistema imune em prevenir o desenvolvimento de rejeição ao aloenxerto.

Outro fator associado a expressão do gene *HLA-G* são fatores hormonais (MOREAU *et al.*, 2001; FLAJOLLET; CAROSELLA, 2009). A progesterona constitui um destes fatores, sendo capaz de estimular a expressão deste gene. A região reguladora do gene *HLA-G* apresenta um sítio específico de ligação a progesterona, a qual foi relacionada com o aumento da expressão deste gene (YIE; XIAO; LIBRACH, 2006). No trabalho publicado por Poláková e colaboradores (2011), foram estudados dois grupos, um constituído por mulheres e outro por homens saudáveis. Estes grupos tiveram os níveis de sHLA-G mensurados no plasma. Os resultados deste trabalho demonstraram maiores níveis de sHLA-G sendo expressos pelo grupo das mulheres em relação ao grupo dos homens. A explicação para isso, seria que estas mulheres teriam a influência da progesterona (hormônio relacionado a reprodução) na regulação da expressão do *HLA-G*.

No presente trabalho os níveis de sHLA-G mensurados a partir dos pacientes transplantados renais também foram comparados entre homens e mulheres em quatro períodos, do pré ao pós-transplante. Os resultados apresentados graficamente nas FIGURAS 9 e 10, demonstraram uma expressão similar no pré-transplante em pacientes de ambos os sexos ( $p = 0.10$ ), mas no período do dia 3 ao dia 5 pós-transplante os níveis de sHLA-G nos homens se mantiveram elevados e nas mulheres ocorreu uma queda tornando a expressão delas similar ao do grupo controle (mediana nas mulheres 15.84 ng/mL,  $p < 0.0001$  em relação aos homens). No período de 15 a 30 dias após o transplante os níveis de sHLA-G abaixaram para os homens e se mantiveram ainda reduzidos para as mulheres. Passados dois meses em diante do transplante foi observado uma elevação nos níveis de sHLA-G de homens (mediana de 25.98 ng/mL) e mulheres (33.42 ng/ml). A diferença detectada entre homens e mulheres nas quantificações realizadas de 3 a 5 dias após o transplante não eram esperadas. Mas considerando que a maioria das mulheres transplantadas passam por um estresse proveniente da diálise e da cirurgia que promovem irregularização de seus ciclos hormonais



(amenorréia) (Kim *et al.*, 1998) e queda na produção de progesterona, isto poderia ser um fator relevante que estaria contribuindo para a menor expressão de sHLA-G observada no grupo de mulheres estudado.

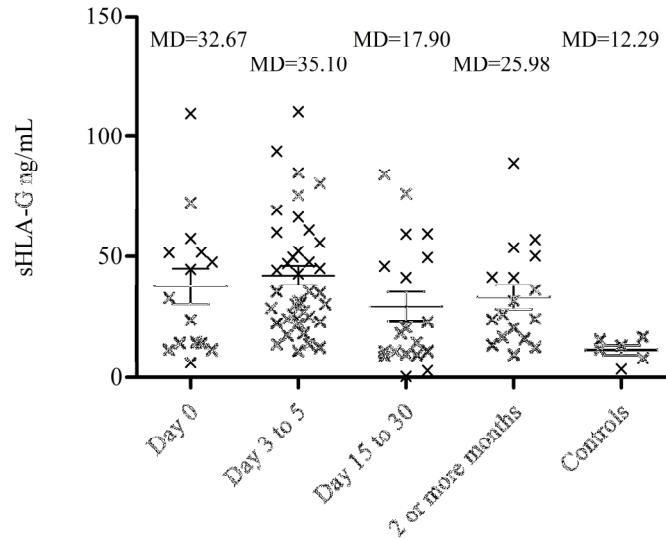


FIGURA 9 - NÍVEIS PLASMÁTICOS DE sHLA-G EM HOMENS TRANSPLANTADOS RENAIIS (N=18)  
 FONTE: autor

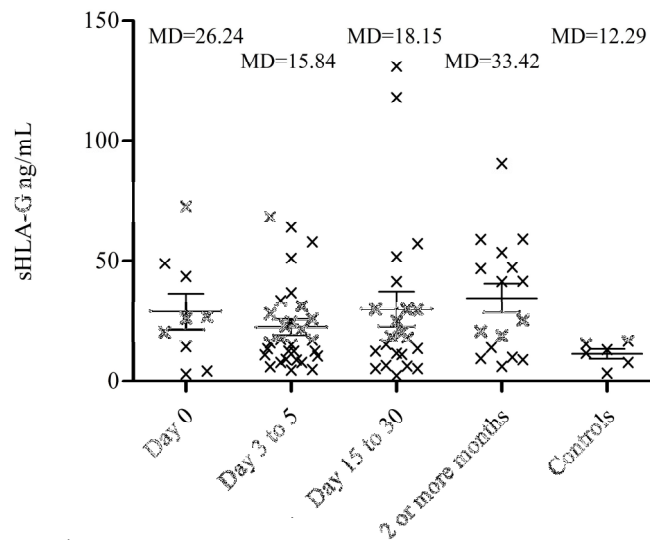


FIGURA 10 - NÍVEIS PLASMÁTICOS DE sHLA-G EM MULHERES TRANSPLANTADAS RENAIIS (N=18)  
 FONTE: autor

### 6.3 ANÁLISE DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DE *HLA-G*

Com relação ao estudo dos genótipos *HLA-G*, foram genotipados 100 pacientes transplantados renais e 49 doadores vivos (TABELA 3). As frequências alélicas encontradas

na população estudada estão de acordo com outras populações brasileiras (TABELA 2), exceto pelos alelos G\*01:01:15 , G\*01:01:17 , G\*01:01:20 , G\*01:04:03, G\*01:04:05 e G\*01:08, os quais foram encontrados neste estudo e não tinham sido descritos em populações brasileiras.

TABELA 2 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE *HLA-G* OBSERVADAS NA POPULAÇÃO EM ESTUDO PAREADA COM FREQUÊNCIAS DETERMINADAS PARA DUAS OUTRAS POPULAÇÕES BRASILEIRAS

ALELOS	Paraná* (N=52)	São Paulo** (N=103)	POPULAÇÃO EM ESTUDO		
			DOADORES (N=49)	PACIENTES TXV (N=55)	PACIENTES TXF (N=45)
<i>G*01:01</i>	73.00%	70.40%	80.61%	75.45%	78.89%
<i>G*01:01:01</i>	29.00%	39.80%	54.08%	46.36%	44.44%
<i>G*01:01:02</i>	24.00%	19.90%	15.31%	14.55%	23.33%
<i>G*01:01:03</i>	2.00%	5.30%	4.08%	6.36%	4.44%
<i>G*01:01:04</i>	0.00%	0.50%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>G*01:01:06</i>	0.00%	1.00%	0.00%	0.00%	2.22%
<i>G*01:01:08</i>	18.00%	4.40%	2.04%	1.82%	0.00%
<b><i>G*01:01:15</i></b>	0.00%	0.00%	<b>2.04%</b>	<b>1.82%</b>	<b>2.2%</b>
<b><i>G*01:01:17</i></b>	0.00%	0.00%	<b>1.02%</b>	0.00%	0.00%
<b><i>G*01:01:20</i></b>	0.00%	0.00%	<b>2.04%</b>	<b>4.55%</b>	<b>2.22%</b>
<i>G*01:03</i>	14.00%	8.70%	9.18%	7.27%	6.67%
<i>G*01:03:01</i>	?	?	9.18%	6.36%	6.67%
<i>G*01:03:02</i>	?	?	0.00%	0.91%	0.00%
<i>G*01:04</i>	12.00%	12.20%	6.12%	14.55%	12.22%
<i>G*01:04:01</i>	12.00%	8.30%	4.08%	7.27%	3.33%
<b><i>G*01:04:03</i></b>	0.00%	0.00%	0.00%	<b>1.82%</b>	<b>2.22%</b>
<i>G*01:04:04</i>	0.00%	3.90%	2.04%	5.45%	5.56%
<b><i>G*01:04:05</i></b>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	<b>1.11%</b>
<i>G*01:05N</i>	1.00%	1.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>G*01:06</i>	0.00%	4.90%	3.06%	0.91%	2.22%
<b><i>G*01:08</i></b>	0.00%	0.00%	<b>1.02%</b>	0.00%	0.00%
<b>Alelo novo</b>	0.00%	0.00%	0.00%	<b>1.82%</b>	0.00%

\* PIRRI *et al.*, 2009 \*\* CASTELLI; MENDES-JUNIOR; DONADI, 2007. TXV: transplante a partir de doador vivo; TXF: transplante a partir de doador falecido.

FONTE: autor

TABELA 3 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DO GENE *HLA-G* OBSERVADAS NOS DOADORES VIVOS E PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS.

GENÓTIPOS ENCONTRADOS		DOADORES VIVOS (N=49)	PACIENTES TXV (N=55)	PACIENTES TXF (N=45)
<i>G*01:06</i>	<i>G*01:01:01</i>	4.08%	0.00%	0.00%
<b><i>G*01:01:01</i></b>	<b><i>G*01:01:01</i></b>	<b>38.78%</b>	<b>23.64%</b>	<b>24.44%</b>
<i>G*01:01:02</i>	<i>G*01:06</i>	2.04%	0.00%	4.44%
<b><i>G*01:01:02</i></b>	<b><i>G*01:01:01</i></b>	<b>10.20%</b>	<b>12.73%</b>	<b>24.44%</b>
<i>G*01:01:02</i>	<i>G*01:01:02</i>	2.04%	1.82%	4.44%
<i>G*01:01:03</i>	<i>G*01:01:01</i>	2.04%	1.82%	4.44%
<i>G*01:01:03</i>	<i>G*01:01:02</i>	6.12%	3.64%	2.22%
<i>G*01:01:06</i>	<i>G*01:01:01</i>	0.00%	0.00%	2.22%
<i>G*01:01:06</i>	<i>G*01:01:02</i>	0.00%	0.00%	2.22%
<i>G*01:01:08</i>	<i>G*01:01:01</i>	4.08%	3.64%	0.00%
<i>G*01:01:15</i>	<i>G*01:01:15</i>	2.04%	1.82%	2.22%
<i>G*01:01:17</i>	<i>G*01:08</i>	2.04%	0.00%	0.00%
<i>G*01:01:20</i>	<i>G*01:01:01</i>	2.04%	9.09%	2.22%
<i>G*01:01:20</i>	<i>G*01:01:02</i>	0.00%	0.00%	2.22%
<i>G*01:03:01</i>	<i>G*01:01:01</i>	6.12%	5.45%	2.22%
<i>G*01:03:01</i>	<i>G*01:01:02</i>	2.04%	1.82%	2.22%
<i>G*01:03:01</i>	<i>G*01:01:03</i>	0.00%	5.45%	0.00%
<i>G*01:03:01</i>	<i>G*01:01:20</i>	2.04%	0.00%	0.00%
<i>G*01:03:01</i>	<i>G*01:03:01</i>	2.04%	0.00%	2.22%
<i>G*01:03:02</i>	<i>G*01:01:01</i>	0.00%	1.82%	0.00%
<i>G*01:04:01</i>	<i>G*01:01:01</i>	2.04%	0.00%	2.22%
<i>G*01:04:01</i>	<i>G*01:06</i>	0.00%	1.82%	0.00%
<i>G*01:04:01</i>	<i>G*01:01:01</i>	0.00%	5.45%	0.00%
<i>G*01:04:01</i>	<i>G*01:01:02</i>	4.08%	5.45%	0.00%
<i>G*01:04:01</i>	<i>G*01:01:03</i>	0.00%	0.00%	2.22%
<i>G*01:04:01</i>	<i>G*01:03:01</i>	2.04%	0.00%	0.00%
<i>G*01:04:04</i>	<i>G*01:01:01</i>	0.00%	1.82%	2.22%
<i>G*01:04:04</i>	<i>G*01:01:02</i>	2.04%	1.82%	0.00%
<i>G*01:04:04</i>	<i>G*01:01:03</i>	0.00%	1.82%	0.00%
<i>G*01:04:04</i>	<i>G*01:03:01</i>	2.04%	0.00%	4.44%
<i>G*01:04:04</i>	<i>G*01:04:01</i>	0.00%	1.82%	2.22%
<i>G*01:04:04</i>	<i>G*01:04:03</i>	0.00%	3.64%	2.22%
<i>G*01:04:05</i>	<i>G*01:04:03</i>	0.00%	0.00%	2.22%
<b>Alelo novo</b>	<b><i>G*01:01:01</i></b>	0.00%	<b>3.64%</b>	0.00%

TXV: transplante a partir de doador vivo; TXF: transplante a partir de doador falecido.

FONTE: autor

Dois novos alelos também foram identificados, os quais apresentaram um conjunto de mutações não descritas pelo IMGT (TABELA 3 e 4). O alelo denominado 1 (TABELA 3) apresentou o conjunto de mutações de transição, C→T (GGC→GGT, códon 124<sup>o</sup>, éxon 3) em relação ao alelo G\*01:08, promovendo uma alteração não sinonímia de arginina (R ou Arg) para triptofano (W ou Trp), e C→T (CGG→TGG, códon 243<sup>o</sup>, éxon 4) em relação ao alelo G\*01:08, promovendo uma alteração sinonímia no códon que codifica para glicina (G ou Gly). Esta última alteração ocorre num resíduo do éxon 4, que codifica para o domínio  $\alpha 3$  de HLA-G, um importante domínio para na interação com receptores inibidores de células do sistema imune.

TABELA 4 - DIFERENÇAS NAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS E DE AMINOÁCIDOS ENTRE A SEQUÊNCIA DO ALELO REFERÊNCIA G\*01:01:01 E A SEQUÊNCIA OBTIDA PARA O ALELO 1 COMPARADO AO ALELO G\*01:08.

Nt n <sup>o</sup> :	Nt:			aa n <sup>o</sup> :	aa em:		
	G*01:01:01	G*01:08	alelo novo		G*01:01:01	G*01:08	alelo novo
372 <sup>o</sup>	C	C	T	124 <sup>o</sup> (éxon 3)	Gly (G)	Gly (G)	Gly (G)
727 <sup>o</sup>	C	C	T	243 <sup>o</sup> (éxon 4)	Arg (R)	Arg (R)	Trp (W)

Nt: nucleotídeo; aa:aminoácido.

FONTE: autor

O segundo alelo denominado 2 (TABELA 4) apresentou a mutação de transição, G→A (ACG→ACA, códon 163<sup>o</sup>, éxon 3) em relação ao alelo G\*01:04:01, que é uma mutação silenciosa no códon que codifica para treonina, a qual não estaria afetando a regulação do gene *HLA-G*, nem a função da proteína HLA-G.

TABELA 5 - DIFERENÇAS NAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS E DE AMINOÁCIDOS ENTRE A SEQUÊNCIA DO ALELO REFERÊNCIA G\*01:01:01 E A SEQUÊNCIA OBTIDA PARA O ALELO 2 COMPARADO AO ALELO G\*01:04:01.

Nt n <sup>o</sup> :	Nt:			aa n <sup>o</sup> :	aa em:		
	G*01:01:01	G*01:04:01	alelo novo		G*01:01:01	G*01:04:01	alelo novo
561 <sup>o</sup>	G	G	A	187 <sup>o</sup> (éxon 3)	Thr (T)	Thr (T)	Thr (T)

Nt: nucleotídeo; aa:aminoácido.

FONTE: autor

Também foi realizado o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg para os *loci* HLA-A, -B, -DR e -G subdividindo a população em grupo de pacientes transplantados renais de doadores vivos (n=55) e de doadores falecidos (n=45), além do grupo controle constituído por doadores vivos (n=49). Os pacientes transplantados renais também foram subdivididos em pacientes com desenvolvimento de rejeição ao aloenxerto e sem rejeição. As populações analisadas estavam em equilíbrio para todos os *loci*, exceto o *loci* HLA-G (TABELA 6). A

heterozigose observada nestes indivíduos foi inferior a esperada, ou seja, foi observado um número maior de indivíduos em homozigose. Pirri e colaboradores (2009) interpretaram a homozigose (presença de dois alelos iguais ou com mutações sinonímias para a produção de moléculas HLA-G também iguais) como um fator de proteção ao aloenxerto. Visto que estes indivíduos seriam capazes de expressar moléculas HLA-G com estrutura proteica igual e em quantidade suficiente para atuar e ativar uma via de inibição da resposta imune. Enquanto em indivíduos heterozigotos (com alelos sem mutações sinonímias), teriam dois alelos expressando formas diferentes de HLA-G, mas não em quantidades suficientes para ultrapassar o limiar que é necessário para a ativação dos mecanismos imunomodulatórios. Portanto é possível prever que a homozigose para o gene *HLA-G*, por estar originando fenótipos favoráveis as condições de sobrevivência ao longo da evolução, tem prevalecido entre as populações estudadas.

TABELA 6 - TESTE DE EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG PARA O *LOCI HLA-A, -B, -DR E -G* EM DOADORES VIVOS E PACIENTES TRANSPLANTADOS.

Doadores vivos (N=49)					
<i>Loci</i>	Fis Observado	Fis Esperado	<i>p</i> value	DP	
<i>HLA-A</i>	0.0142	0.0137	0.3174	0.0294	
<i>HLA-B</i>	-0.0525	-0.0224	0.7091	0.0342	
<i>HLA-DR</i>	0.0459	0.0034	0.5177	0.0245	
<b><i>HLA-G</i></b>	0.2000	0.1019	<b>0.0036</b>	<b>0.0035</b>	
Pacientes de transplantes intervivos (N=55)					
<i>Loci</i>	Fis Observado	Fis Esperado	<i>p</i> value	DP	
<i>HLA-A</i>	0.0287	0.0091	0.1206	0.0205	
<i>HLA-B</i>	-0.0241	0.0285	0.1624	0.0299	
<i>HLA-DR</i>	-0.0707	-0.0485	0.5935	0.0235	
<b><i>HLA-G</i></b>	0.0516	0.0713	<b>0.0178</b>	<b>0.0053</b>	
Pacientes de transplante de doadores falecidos (N=45)					
<i>Loci</i>	Fis Observado	Fis Esperado	<i>p</i> value	DP	
<i>HLA-A</i>	0.0300	-0.0042	0.4753	0.0324	
<i>HLA-B</i>	-0.0435	-0.0252	0.4962	0.0401	
<i>HLA-DR</i>	-0.0171	-0.0190	0.071	0.0111	
<b><i>HLA-G</i></b>	0.0935	0.1082	<b>0.0118</b>	<b>0.0078</b>	

DP: desvio padrão de *p* value.

FONTE: autor

Os 100 pacientes transplantados renais também tiveram suas frequências alélicas comparadas em função dos seus episódios de rejeição, visto que os níveis plasmáticos de

sHLA-G já foram diretamente associados a certos alelos *HLA-G*. As análises foram realizadas via teste exato de Fischer, considerando um  $p$  value  $< 0.05$ . Os resultados desta análise não foram significativos, ou seja, não foram encontradas alelos associados com efeito protetor ou risco em desenvolver episódios de rejeição.

Também os 36 pacientes monitorados com relação aos níveis de sHLA-G tiveram suas frequências alélicas comparadas em função ao grupo que foram incluídos: pacientes não sensibilizados, dessensibilizados e sensibilizados. A presença ou não de alelos *HLA-G* foi significativo para o alelo G\*01:04 ( $p = 0.03$ ), o qual foi associado aos pacientes não sensibilizados. Este alelo foi relacionado a uma elevada expressão de sHLA-G e a um desequilíbrio de ligação com polimorfismos da região regulatória do gene *HLA-G* (Rebmann *et al.*, 2001; Donadi *et al.*, 2011; Cristofaro *et al.*, 2013). Portanto este achado nos pacientes não sensibilizados pode estar relacionado com a possível maior estimulação da expressão e produção de sHLA-G detectado neste grupo.

Associações significativas foram evidenciadas dos alelos G\*01:01:02 ( $p = 0.01$ ) e G\*01:01:03 ( $p = 0.04$ ) em pacientes dessensibilizados quando comparados com o grupo de controles. A presença dos alelos G\*01:01:02 e G\*01:01:03 podem estar influenciando na susceptibilidade dos indivíduos a virem a ser pacientes com elevado risco de desenvolvimento de episódios de rejeição. Ambos os alelos já foram relacionados a uma baixa expressão de sHLA-G e a abortos recorrentes (ABBAS *et al.*, 2004). Estes alelos também foram associados com a inserção de 14 pb na região 3'UTR do gene *HLA-G*, estando em desequilíbrio de ligação. A sequência de bases nucleotídicas desta inserção após a transcrição promove a instabilidade do mRNA diminuindo a sua viabilidade para ser traduzido em moléculas HLA-G.

As associações genéticas e fenotípicas observadas ao longo deste estudo demonstraram ter a a molécula HLA-G um baixo potencial como biomarcadora da rejeição, porém um elevado potencial como biomarcadora positiva da imunotolerância.

No entanto as análises ainda requerem um aumento no número amostral, não apenas de pacientes transplantados renais, mas também de indivíduos saudáveis. Isto visando firmar, ao longo do tempo de monitoramento dos pacientes, as variações detectadas neste estudo dos níveis de sHLA-G que estão associados a melhor ou pior evolução no pós-transplante. Este monitoramento poderia vir a ser utilizado na clínica para caracterizar o perfil do equilíbrio da imunossupressão natural (HLA-G) *versus* a induzida (medicamentosa) presente nos

pacientes, que devem manter também suas respostas imunes contra patógenos e bactérias que podem vir a afetá-los.

## 7 CONCLUSÃO

- ✓ O perfil de imunotolerância demonstra ser alto do pré ao pós-transplante com base nos níveis de sHLA-G estabelecidos para o grupo de pacientes não sensibilizados.
- ✓ Para o grupo de pacientes dessensibilizados o perfil de imunotolerância com base nos níveis de sHLA-G permaneceu alto apenas no pré-transplante, isso mediante administração de ATG. Permanecendo baixo no período pós-transplante, fato que é considerado um risco para o desenvolvimento de episódios de rejeição.
- ✓ No grupo de pacientes sensibilizados o perfil de imunotolerância estabelecido com base nos níveis de sHLA-G foi considerado baixo no pré-transplante, mas se elevou no período pós-transplante após 2 meses. Esta elevação não era esperada e requer novas análises e um aumento no tempo de monitoramento destes pacientes.
- ✓ Os níveis de sHLA-G nos dias que se sucederam a cirurgia (3 a 5 dias) no pós-transplante foi inferior nas mulheres, quando comparados aos homens. Isso poderia ser um efeito da desregulação hormonal e queda na produção da progesterona (capaz de estimular a expressão de *HLA-G*), o que estaria afetando as mulheres nessa fase crítica do estabelecimento aloenxerto.
- ✓ O alelo G\*01:04 relacionado a pacientes com maior expressão de sHLA-G, foi encontrado estando associado ao grupo de pacientes não sensibilizados, também considerados mais imunotolerantes.
- ✓ Os alelos G\*01:01:02 e G\*01:01:03 relacionados a baixa produção de sHLA-G, foram encontrados estando associados ao grupo de pacientes dessensibilizados, também considerados menos imunotolerantes.
- ✓ Não foram encontradas associações de alelos *HLA-G* relacionados a susceptibilidade ou proteção em pacientes transplantados renais com ou sem episódios de rejeição ao aloenxerto, mas sim a um melhor ou pior perfil de imunotolerância ao aloenxerto.



- ✓ A população de pacientes transplantados renais sem episódios de rejeição apresentou desequilíbrio de Hardy-Weinberg para o *loci HLA-G*, apresentando maior frequência de indivíduos em homozigose do que o esperado.
- ✓ Dois pacientes apresentaram alelos *HLA-G* não descritos pelo IMGT, um contendo o par de mutação não sinóníma de C→T (posição 727, éxon 4) e C→T (posição 327, éxon 3), e outro contendo a mutação sinóníma de G→A (posição 561, éxon 3).
- ✓ Os alelos G\*01:01:15 , G\*01:01:17 , G\*01:01:20 , G\*01:04:03, G\*01:04:05 e G\*01:08 foram descritos na população estudada e anteriormente não tinham sido descritos em populações brasileiras.
- ✓ Os perfis de expressão de sHLA-G estabelecidos em acordo com dados genotípicos e outros dados clínicos dos pacientes estudados demonstram ser esta molécula uma potencial marcador da imunotolerância em pacientes transplantados renais.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K. **Imunologia celular e molecular**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

ABBAS, A.; TRIPATHI, P.; NAIK, S.; AGRAWAL, S. Analysis of human leukocyte antigen (HLA)-G polymorphism in normal women and in women with recurrent spontaneous abortions. **Europe Journal of Immunogenetic**, v.31, p.275-278, 2004.

ALBERTS, B.; JOHNOSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of The Cell**. 4ª.ed. USA: Garland Science, 2002.

ALMASSOD, A.; SHESHGIRI, R.; JOSEPH, J.M.; RAO, V.; KAMALI, M.; TUMIATI, L.; ROSS, H.; DELGADO, D.H. Human leukocyte antigen-G is upregulated in heart failure patients: A potential novel biomarker. **Human Immunology**, v.72, p.1064-1067, 2011.

APPS, R.; GARDNER, L.; MOFFET, A. A critical look at HLA-G. **Trends in Immunology**, Cambridge, v.29, n.7, p.313-321, 2008.

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](http://www.abto.org.br)>. Acesso em: 01 abr. 2013.

BAMBERGER, A.; JENATSCHKE, S.; SCHULTE, H.M.; LÖNING, T.; BAMBERGER, C.M. Leukemia inhibitory factor (LIF) stimulates the human HLA-G promoter in JEG3 choriocarcinoma cells. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.85, n.10, p.3932-3936, 2000.

BASTURK, B.; KARAKAYALI, F.; EMIROGLU, R.; SÖZER, O.; HABERAL, A.; BAL, D.; HABERAL, M. Human leukocyte antigen-G, a new parameter in the follow-up of liver transplantation. **Transplantantion Proceedigs**, v.38, n.2, p.571-574, 2006.

BATEL, R.; TERASAKI, P. I. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. **New England Journall of Medicine**, v.280, n.14, p.735-739, 1969.

BAYARY, J.; MISRA, N.; LATRY, V.; PROST, F.; DELIGNAT, S.; LACROIX-DESMAZES, S.; KAZATCHKINE, M.D.; KAVERI, S.V. Mechanisms of action of

intravenous immunoglobulin in autoimmune and inflammatory diseases. **Transfusion Clinique et Biologique**, v.10, n.3, p.165-169, 2003.

BILLINGHAM, R. E.; L. BRENT, P. B.; MEDAWAR. Actively acquired tolerance of foreign cells. **Nature**, v.172, p.603-606, 1953.

BOREL, J.F.; KIS, Z.L. The discovery and development of cyclosporine (Sandimmune). **Transplant Proceedings**, v.23, n.2, p.1867-1874, 1991.

BORELLI, S.D.; FERREIRA, E.; OLIVEIRA, A.M.; KRISHNASWAMY, S.; HIRAKI, D.D.; GRUMET, F.C. Specific sHLA in Healthy Donors and Donor-Specific sHLA in Renal Transplant Patients. **Human Immunology**, v.60, p.430-434, 1999.

BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.C.; **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman.**, 12<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012.

BURNET, F.; F. FENNER. The Production of Antibodies. **Journal of Immunology**, v.66, p.485-486, 1951.

ERICK C. CASTELLI, E.C.; VEIGA-CASTELLI, L.C.; YAGHI, L.; MOREAU, P.; DONADI, E.A. Transcriptional and Posttranscriptional Regulations of the *HLA-G* Gene. **Journal of Immunology Research**, v.2014, p.1-15, 2014.

CASTELLI, E.C.; MENDES-JUNIOR, C.T.; DONADI, E.A. HLA-G alleles and HLA-G 14 bp polymorphisms in a Brazilian population. **Tissue Antigens**, v.70, p.62-68, 2007.

CASTELLI, E.C.; CASTELLI-VEIGA, L.C.; YAGHI, L.; MOREAU, P.; DONADI, E.A. Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of *HLA-G* Gene. **Journal of Immunology Research**, v.2014, p.1-15, 2014.

CAROSELLA, E. D.; MOREAU, P.; LeMAOULT, J.; ROUS-FREISS, N. HLA-G: from biology to clinical benefits. **Trends Immunology**, Paris, v.29, n.3, p.125-132, 2008.

CECKA, J.M. HLA matching for organ transplantation... Why not? **International Journal of Transplantation**, Los Angeles, v. 37, p.323-327, 2010.

CHEN, C.Y.A.; SHYU, U.B. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. **Trends in biochemical sciences**, v.20, n.11, p.465-470, 1995.

CHOI, N. M.; MAJUMDER, P.; BOSS, J. M. Regulation of major histocompatibility complex class II genes. **Current Opinion in Immunology**, Atlanta, v.23, p.1-7, 2011.

CIRULLI, V.; ZALATAN, J.; McMASTER, M.; PRINSEN, R.; SALOMON, D. R.; RICORDI, C.; TORBETT, B. E.; MEDA, P.; CRISA, L. The class I HLA repertoire of pancreatic islets comprises the nonclassical class Ib antigen HLA-G. **Diabetes**, v.55, n.5, p.1214-1222, 2006.

COLLINS, A.B.; SCHNEEBERGER, E.E.; PASCUAL, M.A.; SAIDMAN, S.L.; WILLIAMS, W.W.; NINA TOLKOFF-RUBIN, N.; COSIMI, A.B.; COLVIN, R.B. Complement activation in acute humoral renal allograft rejection: diagnostic significance of C4d deposits in peritubular capillaries. **Journal American Society of Nephrology**, v.10, p.2208-2214, 1999.

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

CONTINI, P.; GHIO, M.; POGGI, A.; FILACI, G.; INDIVERI, F.; FERRONE, S.; PUPPO, F. Soluble HLA-A,-B,-C and -G molecules induce apoptosis in T and NK CD8+ cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation. **European Journal of Immunology**, Genova, v.33, n.1, p.125-134, 2003

CORNELL, L.D.; SMITH, R.N.; COLVIN, R.B. Kidney Transplantation: Mechanisms of Rejection and Acceptance. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, Massachusetts, v.3, p.189-220, 2008.

CRÉPUT, C.; DURRBACH, A.; MENIER, C.; GUETTIER, C.; SAMUEL, D.; DAUSSET, J.; CHARPENTIER, B.; CAROSELLA, E. D.; ROUAS-FREISS, N. Human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression in biliary epithelial cells is associated with allograft acceptance in liver-kidney transplantation. **Journal of Hepatology**, v.39, p.587-594, 2003.

CRESSWELL, P. Antigen presentation. Getting peptides into *MHC* class II molecules. **Current Biology**, Cambridge, v.4, n. 6, p. 541-543, 1994.

CRISTOFARO, J.D.; MOUJALLY, D.E.; AGNEL, A.; MAZIÈRES, S.; CORTEY, M.; BASIRE, A.; CHIARONI, J.; PICARD, C. HLA-G haplotype structure shows good conservation between different populations and good correlation with high, normal and low soluble HLA-G expression. **Human Immunology Rapid Communication**.v.74, p.203-206, 2013.

DAUSSET, J. The major histocompatibility complex in man -- past, present, and future concepts. Nobel Lecture. **Institute of Research in Blood Diseases**, Paris, 8 dez. 1980.

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

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

DONADI, E. A.; CASTELLI, E. C.; ARNAIZ-VILLENA, A.; ROGER, M.; REY, D.; MOREAU, P. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. **Cellular Molecular Life Sciences**. v.68, n.3, p.369-395, 2011.

DUNHAN, I., SARGENT, C.A.; TROWSDADE, J.; CAMPBELL, R.D. Molecular mapping of the human major histocompatibility complex by pulse-field gel eletroforesis. **Proceedings of National Academy of Science of the United States of America**, v. 84, p. 72-75, 1987.

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.

ELSEN, P.J.; GOBIN, S.J.P.; EGGERMOND, M.C.A.J.; PEIJNENBURG, A. Regulation of MHC class I and II gene transcription: differences and similarities. **Immunogenetics**, vol.48, p.208-221, 1998.

ELSEN, P. J.; HOLLING, T. M.; STOEP, N.; BOSS, J. M. DNA methylation and expression of major histocompatibility complex class I and classII transactivator genes in human developmental tumor cells and in T cell malignancies. **Clinical Immunology**, Leiden, v.109, p.46-52, 2003.

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.

FAINARDI, E.; RIZZO, R.; MELCHIORRI, L.; VAGHI, L.; CASTELLAZZI, M.; MARZOLA, A.; GOVONI, V.; PAOLINO, E.; TOLA, M. R.; GRANIERI, E.; BARICORDI, O. R. Presence of detectable levels of soluble HLA-G molecules in CSF of relapsing-remitting multiple sclerosis: relationship with CSF soluble HLA-I and IL-10 concentration and MRI findings, **Journal of Neuroimmunology**, Bethesda, v.167, p.6002-6008, 2003.

FEUCHT, H.E.; SCHNEEBERGER, H.; HILLEBRAND, G.; BURKHARDT, K.; WEISS, M.; RIETHMÜLLER, G.; LAND, W.; ALBERT, E. Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. **Kidney International**, v.43, p.1333–1338, 1993.

FLAJOLLET, S.; PORAS, I.; CAROSELLA, E. D.; MOREAU, P. RREB-1 is a transcriptional repressor of HLA-G. **Journal of Immunology**, v. 183, n.11, p. 6948-6959, 2009.

GARCIA, E. Ministério amplia assistência para transplante de rim. **Portal da Saúde-Brasil**. 20 jul. 2012. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/6222/162/ministerio-amplia-assistencia%3Cbr%3E-para-transplante-de-rim.html>>. Acesso em: set. 2012.

GARCÍA, M. A. A.; YEBRA, B. G.; FLORES, A. L. L.; GUERRA, E. G. The Major Histocompatibility Complex in Transplantation. **Journal of Transplantation**, León, p.1-7, 2012.

GERAGHTY, D. E.; KOLLER, B. H.; ORR, H. T. A Human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. **Proceedings of National Academy of Science of United States of America**, Washington, v.84, p. 9145, 1987.

GOBIN, S.J.P.; VAN DEN ELSEN, P.J. Transcriptional regulation of the MHC class Ib genes HLA-E, HLA-F and *HLA-G*, **Human Immunology**, v.61, n.11, p.1102–1107, 2000.

GORER, P. A. The genetic and antigenic basis of tumor transplantation. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 44, n. 3, p. 691–697, 1937.

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.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium**, Ser. v.41, p.95-98, 1999.

HISCOTT, J.; PITHA, P.; GENIN, P.; NGUYEN, H.; HEYLBROECK, C.; MAMANE, Y.; ALGARTE, M.; LIN, R. Triggering the Interferon Response: The Role of IRF-3 Transcription Factor. **Journal of Interferon & Cytokine Research**. v.19, n.1, p.1-13, 2004.

HSU, K. C.; CHIDA, S.; GERAGHTY, D. E.; DUPONT, B. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. **Immunology Review**, v.190, p.40-52, 2002.

HVIID, T. V.; RIZZO, R.; MELCHIORRI, L.; STIGNANI, M.; BARICORDI, O. R. Polymorphism in the 5'-upstream regulatory and 3'-untranslated regions of the HLA-G gene in relation to soluble HLA-G and IL-10 expression. **Human Immunology**, v.67, n.1-2, p.53-62, 2006.

IBRAHIM, E.C.; MORANGE, M.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D.; PAUL, P. Heat shock and arsenite induce expression of the nonclassical class I histocompatibility HLA-G gene in tumor cell lines. **Cell Stress Chaperones**, v.5, n.3, p.207-218, 2000.

IKENO, M.; SUZUKI, N.; KAMIYA, M.; YUJI TAKAHASHI, Y; KUDOH, J.; OKAZAKI, T. LINE1 family member is negative regulator of HLA-G expression, **Nucleic Acids Research**, v.40, n.21, p.10742-10752, 2012.

IMGT/HLA *Database*, disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>>, acessado em outubro de 2014.

INGULLI, E. Mechanism of cellular rejection in transplantation. **Pediatric Nephrology**, San Diego, v.25, p.61-74, 2008.

JEAN-PAUL, S. The History of Kidney Transplantation: Past, Present and Future (with Special References to the Belgian History), 2011. **Understanding the Complexities of Kidney Transplantation**. Disponível em: <<http://www.intecho.com/books/understanding-the-complexities-of-kidney-transplantation/the-history-of-kidney-transplantation-past-present-and-future-with-special-references-to-the-belgian>>. Acesso em: jul. 2012.

JIN, H. L.; LI, C. R.; XIAO, L.; SHI, B. Y.; CAI, M.; LI, Z. L.; WANG, S.; CHEN, L. P.; ZHAN, S. L.; LI, P. C. Clinical Relevance of sHLA-G-Mediated With Better Graft Acceptance in Early Posttransplantation. **Transplantation Proceedings**, v. 44, p.1259–1261, 2012.

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.

KIM, J.H.; CHUN, C.J.; KANG, C.M.; KWAK, J.Y. Kidney Transplantation and menstrual changes. **Transplantation Proceedings**, v.30, p.3057-3059, 1998.

KINO, T.; HATANAKA, H.; MIYATA, S.; INAMURA, N.; NISHIYAMA, M.; YAJIMA, T.; GOTO, T.; OKUHARA, M. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. **The Journal of Antibiotics**, v.40, n.9, p.1256-1265, 1987.

KLEIN, J.; SATO, A. The HLA system. First of two parts. Advances in immunology. **New England Journal of Medicine**, Boston, v.343, n10, p.702-709, 2000.

KOVATS, S.; MAIN, E.K.; LIBRACH, C.; STUBBLEBINE, M.; FISHER, S.J.; DEMARS, R. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. **Science**, v.248, p.220–223, 1990.

KUSS R, BOURGET, P. **Una historia ilustrada del trasplante de órganos**. Rueil-Malmaison, Sandoz, 1992.

LAHIRI, D. K.; NURNBERGER, J. I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HWM DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids**, Oxford, v. 19, p. 5444, 1991.

LAJOIE, J.; JEANNEAU, A.; FAUCHER, M.-C.; MOREAU, P.; ROGER, M. Characterisation of five novel *HLA-G* alleles with coding DNA base changes. **Tissue Antigens**, v.72, n.5, p.502–504, 2008.

LAMM, L. U.; OLAISEN, B. Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 5 and 6. **Cytogenetics and Cell Genetics**, Basel, v.40, p.128, 1985.

LAND, W.; SCHNEEBERGER, H.; SCHLEIBNER, S.; ILLNER, W. D.; ABENDROTH, D. The beneficial effect of human recombinant superoxide dismutase on acute and chronic



rejection events in recipients of cadaveric renal transplants. **Transplantation**, v.57, p. 211-217, 1994.

LANGING, M.; GESTEL, J.A.K.; WETERING, J.; IJZERMANS, J.N.M.; WEIMAR, W.; ROODNAT, J.I. The relative importance of donor age in deceased and living donor kidney transplantation. **Transplant International**, v.25, n.11, p.1150-1157, 2012.

LEFEBVRE, S.; BERRIH-AKNIN, S.; ADRIAN, F.; MOREAU, P.; POEA, S.; GOURAND, L.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E. D.; PAUL, P. A specific interferon (IFN)-stimulated response element of the distal HLA-G promoter binds IFN-regulatory factor 1 and mediates enhancement of this nonclassical class I gene by IFN-beta. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, n.9, p.6133-6139, 2001.

LEFRANC, M.P.; DUPRAT, E.; KAAS, Q.; TRANNE, M.; THIRIOT, A.; LEFRANC, G. IMGT unique numbering for MHC groove G-DOMAIN and MHC superfamily (MhcSF) G-LIKE-DOMAIN. **Developmental and Comparative Immunology**, New York, v.29, p. 917-938, 2005.

LILA, N.; CARPENTIER, A.; AMREIN, C.; KHALIL-DAHER, I.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E. D. Implication of HLA-G molecule in heart-graft acceptance. **The Lancet**, New York, v.355, p.2138, 2000.

LILA, N.; AMREIN, C.; GUILLEMAIN, R.; CHEVALIER, P.; LATREMOUILLE, C.; FABIANI, J. N.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E. D.; CARPENTIER, A. Human leukocyte antigen-G expression after heart transplantation is associated with a reduced incidence of rejection. **Circulation**, Boston, v. 105, n. 16, p. 1949-1954, 2002.

LINKER, C. Plasmapheresis in clinical medicine. **The Western Journal of Medicine**, v.138, p.60-69, 1983.

LU, N.; ZHANG, Y.; ZOU, X.; YANG, X.; TIAN, J.; ZHEN, J.; ZHOU, Y.; ZHAO, S.; SHI, W. HLA-G on peripheral blood CD4<sup>+</sup> T lymphocytes: a potential predictor for acute renal rejection. **Transplant International**, v.24, p.1103-1111, 2011.

LUQUE J.; TORRES, M.I.; AUMENTE, M.D.; MARÍN, J.; GARCÍA-JURADO, G. Soluble HLA-G in heart transplantation: their relationship to rejection episodes and Immunosuppressive therapy. **Human Immunology**. v.67, p.257-63, 2006.

LYNCH, R. J.; PLATT, J. L. Escaping from rejection. **Transplantation**, Michigan, v.88, n.11, p.1233-1236, 2009.

MANASTER, I.; GOLDMAN-WOHL, D.; GREENFIELD, C.; NACHMANI, D.; TSUKERMAN, P.; HAMANI, Y.; YAGEL, S.; MANDELBOIM, O. MiRNA-Mediated Control of HLA-G Expression and Function. **PLoS ONE**, v.7, n.3, p. 1-9, 2012.

MATSUZAKA, Y.; MAKINO, S.; NAKAJIMA, K.; TOMIZAKA, M.; OKA, A.; BAHRAM, S.; KULSKI, J. K.; TAMIYA, G.; INOKO, H. New polymorphic microsatellite markers in the human MHC class III region. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v.57, n.5, p.397-404, 2001.

McCAUGHAN, J. A.; McKNIGHT, A. J.; COURTNEY, A. E.; MAXWELL, A. P. Epigenetics: Time to translate Into Transplantation. **Transplantation**, Belfast, v.20, p.1-7, 2012.

McDEVITT, H.O. Discovering the role of the major histocompatibility complex in the immune response. **Annual review of immunology**, Palo Alto, v. 18, p. 1-17, 2000.

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.

MEDAWAR, P. B.. The Behaviour and Fate of Skin Autografts and Skin Homografts in Rabbits: A Report to the War Wounds Committee of the Medical Research Council. **Journal of Anatomy**, v.78, n. 5, p176–199, 1944.

MENIER, C.; ROUAS-FREISS, N.; CAROSELLA, E. D. The HLA-G non classical MHC class I molecule is expressed in cancer with poor prognosis. Implications in tumour escape from immune system and clinical applications. **Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology**, 2008. Disponível em: <<http://AtlasGeneticsOncology.org/Deep/HLAinCancerID20070.html>>. Acesso em: 20 ago. 2012.

Ministério da Saúde (Brasil). Portaria nº 666, de 17 de julho de 2012. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas: Imunossupressão no Transplante Renal**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 17 jul. 2012. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/pt\\_sas\\_666\\_transplante\\_renal\\_2012.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/pt_sas_666_transplante_renal_2012.pdf)>. Acesso em: 10 ago. 2012.

Ministério da Saúde (Brasil). **Ministério da Saúde apresenta o balanço de transplantes e a campanha nacional de doação de órgãos**. Coletiva ao vivo - 25 de Outubro de 2013. Disponível em: <<http://conteudo.ebcservicos.com.br/streaming/nbr>>. Acesso em: 26 set. 2013.

MOREAU, P.; ADRIAN-CABESTRE F.; MENIER, C.; GUIARD, V.; GOURAND, L.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E. D.; PAUL, P. IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. **International Immunology**, v.11, n.5, p.803-811, 1999.

MOREAU, P.; FLAJOLLET, S.; CAROSELLA, E. D. Non-classical transcriptional regulation of *HLA-G*: na update. Paris, **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.13, n.9, p.2973-2989, 2009.

MOREAU, P.; FAURE, O.; LEFEBVRE, S.; IBRAHIM, E.C.; O'BRIEN, M.; GOURAND, L.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D.; PAUL, P. Glucocorticoid Hormones Upregulate Levels of HLA-G Transcripts in Trophoblasts. **Transplantation Proceedings**, v. 33, p.2277–2280, 2001.

MOTTA, V.T. E-book: Biomarcadores na Nefrologia. Bioquímica Clínica: Princípios e Interpretações. **Sociedade Brasileira de Nefrologia**, v. 15, 2011.

MOTULSKY, H.J. , **Analyzing Data with GraphPad Prism**. GraphPad Software Inc., San Diego C.A. , 1999. Disponível em:< [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)>. Acesso em: 26 set. 2013.

NADASDY, G.M.; BOTT, C.; COWDEN, D.; PELLETIER, R.; FERGUSON, R.; NADASDY, T. Comparative study for the detection of peritubular capillary C4d deposition in human renal allografts using different methodologies. **Human Pathology**, v.36, n.11, p.1178–1185, 2005.

OBBER, C.; ALDRICH, C.; CHERVONEVA, I.; BILLSTRAND, C.; RAHIMOV, F.; GRAY, H.L.; HYSLOP, T. Variation in the *HLA-G* promoter region influences miscarriage rates. **The American Society of Human Genetics**, v.72, p. 1425-1435, 2003.

OBBER, C.; ROSINSKY, B.; GRIMSLEY, C.; VAN DER VEN, K.; ROBERTSON, A.; RUNGE, A. Population genetic studies of HLA-G: allele frequencies and linkage disequilibrium with HLA-A. **Journal of Reproductive Immunology**, v.32, p. 111-123, 1996.

OLIVEIRA, M.I.G.; SANTOS, A.M.; FILHO, N.S. Análise da sobrevida e fatores associados à mortalidade em receptores de transplante renal em Hospital Universitário no Maranhão. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v.34, n.3, p.216-225, 2012.

OTTEN, H.G.; VERHAAR, M.C.; BORST, H.P.E.; HENÉ, R.J.; ZUILEN, A.D. Pretransplant Donor-Specific HLA Class-I and –II Antibodies Are Associated With an Increased Risk for Kidney Graft Failure. **American Journal of Transplantation**, v.12, p.1618-1623, 2012.

OWEN, R. D. Immunogenetic consequences of vascular anastomoses between bovine twins. **Science**, v.102, p.400-401, 1945.

PARK, B.; AHN, K. An essential function of tapasin in quality control of HLA-G molecules. **Journal of Biological Chemistry**, v.278, n.16, p.14337-143345, 2003.

PIRRI, A.; CONTIERI, F. C.; BENVENUTTI, R.; BICALHO, M. G. A study of HLA-G polymorphism and linkage disequilibrium in renal transplant patients and their donors. **Transplant Immunology**, v.20, p.143-149, 2009.

POLÁKOVA, K.; BANDZUCHOVÁ, E.; RUSS, G. Impacto f blood processing on estimation of soluble HLA-G. **Neoplasma**, v.58, n.4, p.337-342, 2011.

QIU, J.; TERASAKI, P. I.; MILLERB, J.; MIZUTANIA, K.; CAIA, J.; CAROSELLA, E. D. Soluble HLA-G Expression and Renal Graft Acceptance. **American Journal of Transplantation**, v.6, p.2152-2156, 2006.

RACCA, A. L.; VEAUTE, C. M.; BAILAT, A. S.; GAITE, L.; ARRIOLA, M.; HAJOS, S. E.; BOREL, I. S. M. Expression of HLA-G and MICA mRNA in renal allograft. **Transplant Immunology**, Santa Fe, v.21, p.10-12, 2009.

RAMMENSEE, H.G.; FRIEDE, T.; STEVANOVIĆ, S. *MHC* ligands and peptide motifs: first listing. **Immunogenetics**, v.41, n.4, p.178–228, 1995. Austin: Landes Bioscience, 1995.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity**, v.86, p.248-249, 1995.

RE, F.; STROMINGER, J.L. Toll-like Receptor 2 (TLR2) and TLR4 Differentially Activate Human Dendritic Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n.40, p. 37692–37699, 2001.

REBMANN, V.; VAN DER VEN, K.; PASSLER, M.; PFEIFFER, K.; KREBS, D.; GROSSE-WILDE, H. Association of soluble HLA-G plasma levels with HLA-G alleles. **Tissue Antigens**, v.57, p.15–21, 2001.

REITH, W.; MUHLETHALER-MOTTET, A.; MASTERNAK, K.; VILLARD, J.; MACH, B. The molecular basis of MHC class II deficiency and transcriptional control of MHC class II gene expression. **Microbes and Infection**, Geneva, v.1, p.839-846, 1999.

ROUSSEAU, P.; LE DISCORDE, M.; MOUILLOT, G.; MARCOU, C.; CAROSELLA, E. D.; MOREAU, P. The 14 bp deletion-insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. **Human Immunology**, v.64, n.11, p.1005-1010, 2003.

RUBIN, R. P. A Brief History of Great Discoveries in Pharmacology: In Celebration of the Centennial Anniversary of the Founding of the American Society of Pharmacology and Experimental Therapeutics. **Pharmacological Review**, v.59, p.289-359, 2007.

RUDSTEIN-SVENTLICKY, N.; LOEWENTHAL, R.; HOREJSI, V.; GAZIT, E. HLA-G levels in serum and plasma. Ramat Gan, **Tissue Antigens**, v.67, p.111-116, 2006.

SCHMIDT, C.M.; EHLENFELDT, R.G.; ATHANASIOU, M.C.; DUVICK, L.A.; HEINRICH, H.; DAVID, C.S.; ORR, H.T. Extraembryonic expression of the human MHC class I gene HLA-G in transgenic mice. Evidence for a positive regulatory region located 1 kilobase 5' to the start site of transcription. **Journal of Immunology**, v.151, n.5, p.2633-2645, 1993.

SCHRODER, K.;HERTZOG, P.J.;RAVASI, T.;HUME, D.A. Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions. **Journal of Leukocyte Biology**, v.75, 2004.

SHESHGIRI, R.; GUSTAFSSON, F.; SHEEDY, J.; RAO, V.; ROSS, H.J.; DELGADO, D.H. Everolimus but not mycophenolate mofetil is associated with soluble HLA-G expression in heart transplant patients. **Journal of Heart and Lung Transplantation**, v.28, n.11, p.1193-1197, 2009.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W.. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3<sup>a</sup> ed. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SERÓN, D.; MORESO, F. Protocol biopsies in renal transplantation: prognostic value of structural monitoring. **Kidney International**, v.72, p.690–697, 2007.

SHIROISHI, M.; TSUMOTO, K.; AMANO, K.; SHIRAKIHARA, Y.; COLONNA, M.; BRAUD, V. M.; ALLAN, D. S.; MAKADZANGE, A.; ROWLAND-JONES, S.; WILLCOX, B.; JONES, E. Y.; VAN DER MERWE, P. A.; KUMAGAI, I.; MAENAKA, K. Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, n.15, p.8856-8861, 2003.

SNELL, G. D. Methods for the study of histocompatibility genes. **Journal of Genetics**, v. 49, n. 2, p. 87-108, 1948.

SOLIER, C.; MALLET, V.; LENFANT, F.; BERTRAND, A.; HUCHENQ, A.; BOUTEILLER, L.P. HLA-G unique promoter region: functional implications. **Immunogenetics**, v.53, p.617-625, 2001.

TAN, Z.; SHON, A. M.; OBER, C. Evidence of balancing selection at the HLA-G promoter region. **Human Molecular Genetics**, v.14, n.23, p.3619-3628, 2005.

TIENG, V.; L.E. BOUGUÉNEC, C.; DU MERLE, L.; BERTHEAU, P.; DESREUMAUX, P.; JANIN, A.; CHARRON, D.; TOUBERT, A. Binding of *Escherichia coli* adhesin AfaE to CD55 triggers cell-surface expression of the MHC class I-related molecule MICA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 99, n.5, p. 2977-2982, 2002.

TOWNSEND, A.; BODMER, H. Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 7, p. 601-624, 1989.

TUOTO, E. A. O Primeiro Transplante Renal da América Latina. In: **História da Medicina**, Brasil, 2009. Disponível em: <<http://historyofmedicine.blogspot.com/2009/11/o-orimeiro-transplante-renal-da-america.html>>. Acesso em: set. 2012.

TURKA, L.A.; NORMAN, D.J. **Primer on transplantation**. 2ª ed. Mount Laurel, New Jersey: American Society of Transplantation, p.73-75, 2001.

VAN DER VEN, K.; PFEIFFER, K.; SKRABLIN, S. HLA-G Polymorphisms and Molecule Function-Questions and More Questions-A Review. **Placenta**, v.21, Suplemento A, p.86-92, 2000.

WILLIAMS, W.W.; TAHERI, D.; TOLKOFF-RUBIN, N.; COLVIN, R.B. Clinical role of the renal transplant biopsy. **Nature Reviews Nephrology**, v.8, p.110–121, 2012.

WINTERS, J.L. Plasma exchange: concepts, mechanisms, and an overview of the American Society for Apheresis guidelines. **Hematology**, v.2012, n.1, p.7-12, 2012.

WOOLF, B. On estimating the relation between blood group and disease. **Annals Human Genetics**, London, v. 19, p.251-253, 1955.

YIE, S. M. HLA-G (Major Histocompatibility Complex, Class I). **Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology**, 2012. Disponível em: <<http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/HLAGID43744ch6p22.html>>. Acesso em: 20 ago. 2012.

YIE, S.M.; XIAO, R.; LIBRACH, C.L. Progesterone regulates HLA-G gene expression through a novel progesterone response element. **Human Reproduction**, v.21, n.10, p.2538-2544, 2006.

ZARKHIN, V.; TALISSETTI, A.; LI, L.; WOZNIAK, L.J.; McDIARMID, S.V.; COX, K.; ESQUIVEL, C.; SARWAL, M.M. Expression of Soluble HLA-G Identifies Favorable Outcomes in Liver Transplant Recipients. **Transplantation**, v.90, p.1000-1005, 2010.

APÊNDICE



## APÊNDICE I – MATERIAIS E MÉTODOS

### 1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra estudada foi composta por 100 pacientes transplantados renais e 49 doadores vivos recrutados no Hospital Universitário Evangélico de Curitiba (HUEC). Todos estes indivíduos participantes assinaram o termo de anuência apresentado no ANEXO III.

Com o intuito de compreender o perfil de imunotolerância destes pacientes transplantados renais a população estudada teve analisada diversas variáveis clínicas e demográficas descritas na TABELA 5. Os pacientes foram relacionados com relação ao grau de parentesco com o doador, além da similaridade (*matches*, designado por M) HLA dos *loci* *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-DRB1* entre as duplas de doador-receptor, podendo esta variar de zero a seis *matches* (6M) a similaridade entre as duplas. A idade de receptores e doadores, o tempo de isquemia fria dos aloenxerto renais, os valores de PRA pré e pós-transplante dos pacientes pertencentes aos três grupos foram analisados através do teste de *Kruskal-Wallis* ( $p$  value < 0,01). Os dados de todos os 100 pacientes recrutados separados entre receptores de doadores vivos (RDV) e receptores de doadores falecidos (RDF) foram apresentados na TABELA 1.

**TABELA 7 - CARACTERÍSTICAS DETERMINANTES PARA AGRUPAR OS PACIENTES COM OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE sHLA-G MONITORADOS**

CARACTERÍSTICAS	PACIENTES NÃO SENSIBILIZADOS (PNS)	PACIENTES SENSIBILIZADOS (PSS)	PACIENTES DESSENSIBILIZADOS (PDS)
PRA > 10% (elevado)			
Realizou transfusão sanguínea prévia	Apresenta no máximo uma destas características determinantes e não fez tratamento de indução*.	Apresenta duas ou mais destas características determinantes e não fez tratamento de indução.	Apresenta uma ou mais destas características determinantes e fez tratamento de indução.
Realizou transplante prévio			
Mulheres múltiparas			

\*Pacientes que não tenham apresentado as características determinantes, mas tenham realizado tratamento de indução (via administração de ATG ou sessões de pulsoterapia) foram agrupados com os pacientes não sensibilizados (PNS).

FONTE: autor

O protocolo de imunossupressão adotado para todos os pacientes consistiu na administração prévia e imediata ao transplante de corticosteróide (metilprednisolona, 500mg independente do peso) pela via endovenosa. A terapia mantida pós-transplante (TABELA 6) foi composta por corticosteróide (prednisona), um agente antimetabólito (micofenolato mofetil) e um inibidor de calcineurina (tacrolimus). Pacientes com maior risco imunológico (geralmente PRA superior a 50%) ou com detecção de DSA eram submetidos a terapia de indução feita com anticorpo policlonal (globulina anti-timócito, 1 a 1,5mg/kg/dose) iniciado poucas horas antes da cirurgia via infusão por até 5 a 10 dias seguidos. Durante esta indução o inibidor de calcineurina ficou suspenso, sendo reiniciado com 3 dias para o término da indução.

TABELA 8 - PROTOCOLO DE IMUNOSSUPRESSÃO ADOTADO PARA TODOS OS PACIENTES

MEDICAÇÃO (TIPO)	QUANTIDADE ADMINISTRADA	INÍCIO DA ADMINISTRAÇÃO DA MEDICAÇÃO AOS PACIENTES QUANDO:	
		DOADOR VIVO	DOADOR FALECIDO
Prednisona (corticosteróide)	1mg/kg/dia (com progressiva redução até 5mg em até 30 dias após o transplante independente do peso)	Iniciados 24h antes do transplante	Imediatamente antes da cirurgia
Tacrolimus (inibidor de calcineurina)	0,10 a 0,15 mg/kg/dose a cada 12horas (ajuste de doses conforme o nível sanguíneo de toxicidade)	Iniciados 36h antes do transplante	Imediatamente antes da cirurgia
Micofenolato mofetil (agente antimetabólito)	360mg a cada12horas	Iniciados 36h antes do transplante	Imediatamente antes da cirurgia

FONTE: autor

Dentre os 100 pacientes recrutados, 36 tiveram os níveis de sHLA-G determinados e foram separados em três grupos segundo os dados obtidos a partir dos prontuários médicos. Esta divisão se baseou em características determinantes (TABELA 5), as quais determinaram a formação dos grupos: pacientes não sensibilizados ou PNS (reação normal pós-transplante, a detecção de anticorpos HLA do doador específico – DSA – geralmente é menor que 10%), pacientes sensibilizados ou PSS (reação anormal no pós-transplante, DSA – geralmente maior que 10%) e pacientes dessensibilizados ou PDS (risco de rejeição no pós-transplante e

tratados com imunossupressão de indução). A descrição isolada dos pacientes monitorados foi apresentada na TABELA 1 (**ver item 5 RESULTADOS, *Materials and Methods, Patients***).

## 2 GENOTIPAGEM DO GENE *HLA-G*

### 2.1 Extração do DNA genômico

A partir de cada indivíduo, tanto doadores, quanto pacientes transplantados, eram coletados 10 mL de sangue periférico através de punção venosa, em tubos estéreis tipo *vacutainer* com anticoagulante EDTA. A obtenção das amostras de sangue foram realizadas aproveitando as coletas de rotina dos pacientes para a realização de exames clínicos, como o PRA e determinação da creatinina sérica. As amostras foram centrifugadas para a obtenção da camada de leucócitos (*buffy coat*) da qual foi extraído o DNA genômico por meio da técnica de *salting out* (JOHN *et al.*, 1990, modificado por LAHIRI e NURNBERGER Jr, 1991).

A camada de leucócitos coletada era tratada com tampão de lise (RBCLB 1X; composição: Tris 12,1g; MgCl<sub>2</sub> 10,2g; NaCl 5,8g e água ultrapura q.s.p. 1L; pH ajustado para 7,6 com HCl, solução pós-preparo é autoclavada; 800µl/500µl de *buffy coat*) para lisar as células vermelhas. Após era adicionado SDS 20% (dodecil sulfato de sódio; 20µl/500µl de *buffy coat*) para que a membrana nuclear dos leucócitos fosse lisada liberando o DNA. Também foi adicionado proteinase K (Invitrogen; 40µl/500µl de *buffy coat*) contra a ação de enzimas como, DNases e RNases e tampão da proteinase K (80µl/500µl de *buffy coat*). As proteínas eram precipitadas com cloreto de sódio (6M; 200µl/500µl de *buffy coat*). Por fim o DNA remanescente foi precipitado com etanol absoluto, sendo centrifugado e descartado o sobrenadante. O precipitado então era lavado com etanol 70%, centrifugado, o sobrenadante retirado e o precipitado era seco em temperatura ambiente. Ao final o DNA seco era ressuspenso em 50µl de água ultrapura estéril.

A concentração do DNA genômico das amostras extraídas foram determinadas via leitura da densidade óptica num espectrofotômetro.

## 2.2 Amplificação das sequências de DNA para genotipagem

A genotipagem a partir do DNA extraído das amostras de doadores e receptores foi realizada utilizando o kit *HLA-G Typing* (GenDx SBT *excellerator* – QIAGEN) seguindo os procedimentos descritos pelo fabricante.

Foram realizadas por amostra as amplificações dos éxons 1 ao 8 constituintes dos gene *HLA-G* (cerca de 3kb) através de uma reação em cadeia da polimerase.

A cada reação de amplificação era acrescido: água ultrapura estéril para completar 25  $\mu\text{L}$  de volume final; tampão *LongRange* (2,5  $\mu\text{L}$ ; 10X); dNTP *mix* (2,5  $\mu\text{L}$ ; 10 mM de cada); G1 amp *primers* (1  $\mu\text{L}$  de cada; 10  $\mu\text{M}$ ); enzima *LongRange* (0,2  $\mu\text{L}$ ; 5U/ $\mu\text{L}$ ) e DNA genômico (cerca de 100 ng/ $\mu\text{L}$ ). As misturas foram homogeneizadas e levadas ao termociclador com a seguinte programação: um período de desnaturação de 95°C por 3 minutos e 35 ciclos com as seguintes temperaturas: 95°C por 15 segundos, depois 65°C por 30 segundos e 68°C por 3 minutos, por fim, uma extensão adicional dos produtos de PCR a 68°C por 10 minutos.

## 2.3 Análise dos fragmentos de PCR

Em seguida os fragmentos de PCR foram analisados via eletroforese, realizadas em gel de agarose (1%), preparado em tampão TBE 1 X (estoque 10 X Tris 107,81 g/L; EDTA 5,8 g/L; ácido bórico 55 g/L), corrido em 100V/30 minutos. Cerca de 2 $\mu\text{L}$  de cada amostra eram acrescidos de 1,5  $\mu\text{L}$  de FSUDS (azul de bromofenol 0,025%; xileno cianol 0,025%, SDS 0,1%, Ficoll 20% em tampão contendo 10 mM de Tris-HCl pH 8,0 e 1 mM de EDTA pH 8,0) contendo *Gel Red*. Os géis foram visualizados em transiluminador ultravioleta e fotografados. Os produtos de PCR esperados apresentavam aproximadamente 3Kb (FIGURA 11).

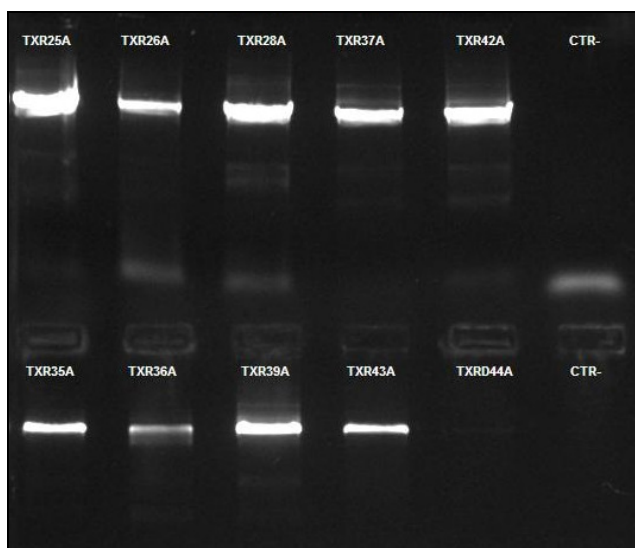


FIGURA 11 - FOTO ILUSTRATIVA DA ELETROFORESE DE PRODUTOS DA AMPLIFICAÇÃO DO GENE *HLA-G*  
 LEGENDA: TXR\_\_: PRODUTO DE PCR DO GENE *HLA-G* (3 KB); CTR-: CONTROLE NEGATIVO.  
 FONTE: autor

#### 2.4 Reação de sequenciamento dos fragmentos amplificados

Os fragmentos especificamente amplificados foram submetidos a tratamento enzimático com Exonuclease I (EXO1) e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP). Para cada reação era adicionado ao volume total do produto de PCR, 1  $\mu$ L de EXOI (20U/ $\mu$ L) e 2  $\mu$ L de SAP (1U/  $\mu$ L). Após homogeneizar os tubos eram levados até o termociclador, com a seguinte programação: 37°C por 30 minutos, depois 80°C por 20 minutos.

Em seguida, as amostras foram submetidas à reação de sequenciamento, utilizando o kit *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems). Para cada produto de PCR contendo o gene *HLA-G* amplificado eram realizadas 6 reações de sequenciamento, para os éxons 2, 3 e 4 utilizando *primers forward* e *reverse*. Então cada uma destas reações eram preparadas utilizando 1 $\mu$ L de um dos *primers* (cada éxon apresenta dois *primers* específicos para a reação de sequenciamento), *Ready Reaction Premix* (1 $\mu$ L; 2,5X), tampão *BigDye Sequencing Buffer* (1,5 $\mu$ L; 5X), 5,5  $\mu$ L de água ultrapura e 1 $\mu$ L do produto de PCR tratado enzimaticamente e previamente acrescido de 20  $\mu$ L de água ultrapura. Também uma reação controle era elaborada, utilizando os mesmos reagentes, mas como molde DNA controle. As reações eram submetidas a 96°C por 10 segundos, e 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 10 segundos e 60°C por 2 minutos.

## 2.5 Precipitação e preparação das reações de sequenciamento

Para a purificação de cada reação eram adicionados 2µL de acetato de sódio com EDTA 7,5 M e 25µL de etanol 100%. O etanol atua depletando a camada de hidratação dos ácidos nucleicos o que expõe as cargas negativas dos grupamentos fosfatos. Enquanto o acetato atua neutralizando estas cargas expostas o que permite a formação de precipitados de DNA. Após homogeneização, as reações eram incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos e centrifugadas por 30 minutos (2.000g; 4°C). O sobrenadante era descartado, o precipitado lavado com etanol 80%, para a retirada do acetato de sódio sendo centrifugado por mais 5 minutos (2.000 g; 4°C). O sobrenadante era removido, o precipitado seco a 60°C por 2 minutos. Ao precipitado era adicionado 12µL de formamida, homogeneizando-a com o DNA a ser seqüenciado e depois era submetida a 96°C por 2 minutos para a desnaturação do DNA, tornando-o fita simples. Esta reação era inibida via choque térmico deixando a placa por cerca de um minuto a -80°C. Com isso o DNA estava pronto para ser analisado via eletroforese em capilar no sequenciador *ABI3130 (Applied Biosystems)*, seguindo as recomendações do fabricante.

As seqüências obtidas (ilustradas na FIGURA 12) foram analisadas utilizando o programa para genotipagem *SBTEngine (GenDx)*, também o *ABI Prism SeqScape (Applied Biosystems)* e o *BioEdit (HALL, 1999)*.

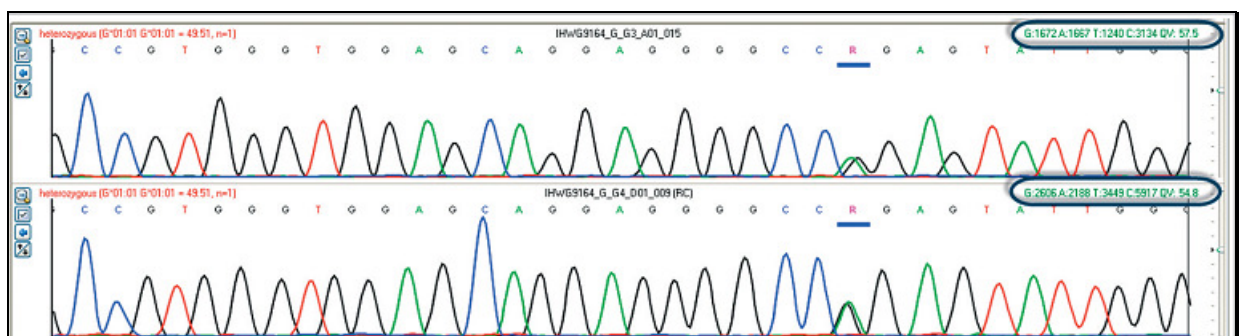


FIGURA 12 - FOTO ILUSTRATIVA DO RESULTADO DE UMA SEQUÊNCIA DE DNA DO GENE *HLA-G* ANALISADO NESTE ESTUDO

FONTE: autor

### 3 QUANTIFICAÇÃO DE HLA-G SOLÚVEL

#### 3.1 Obtenção do plasma

O cronograma de coleta das amostras de sangue total para a obtenção de plasma ocorreu seguindo preferencialmente o esquema descrito na FIGURA 13.

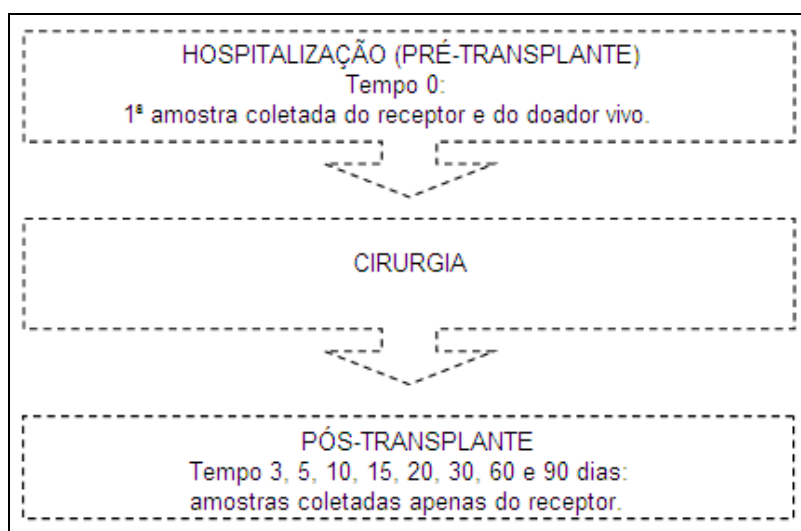


FIGURA 13 – ESQUEMA DAS COLETAS DE AMOSTRA DE SANGUE TOTAL  
 FONTE: autor

Após a coleta, as amostras eram imediatamente processadas, via centrifugação a 2.000 rpm por 15 minutos para a separação das fases de plasma, da camada fina de leucócitos e a mais basal e densa composta por eritrócitos. Alíquotas de 200µl eram armazenadas em microtubos no freezer a -80°C para posterior quantificação de sHLA-G via imunoenensaio.

#### 3.2 Teste ELISA

A quantificação de moléculas HLA-G solúveis (sHLA-G) no plasma de pacientes transplantados renais foi realizada com o auxílio do kit “sHLA-G *specific enzyme-linked immunosorbent assay* - ELISA” (Exbio, Praga, República Tcheca). A partir deste eram elaborados imunoenaios enzimáticos sanduíches capazes de quantificar as formas solúveis HLA-G1 e HLA-G5 mais abundantes.

Então as amostras de plasma em duplicata, cada qual constituída por cerca de 100µL, além da solução calibradora fornecida pelo kit, eram incubadas de 16 à 20 horas

separadamente nos poços de microplacas previamente encobertas com anticorpos monoclonais anti-sHLA-G.

Após eram realizadas lavagens e depois aos sHLA-G capturados eram adicionados os anticorpos monoclonais anti- $\beta_2$ -microglobulina marcados com *horseradish peroxidase* (HRP). Então esta reação era incubada por mais uma hora e depois novas lavagens eram realizadas. Aos conjugados HRP resultantes adicionava-se um substrato solúvel a base de etrametilbenzidino (TMB), sensível a luz. Esta reação era inibida com a adição de peróxido de hidrogênio. As reações dos poços até então na cor esverdeada assumiam a cor amarelada e dentro de no máximo cinco minutos a absorbância do produto resultante era mensurado.

### 3.3 Mensuração

Os níveis de sHLA-G foram determinados via espectrofotômetro. A conversão via enzima HRP do substrato TMB em um produto colorido pode ser mensurada determinando a absorbância dos calibradores do kit (com concentração sHLA-G conhecida) em comparação a absorbância das amostras de plasma dos pacientes. Com isso as concentrações de sHLA-G das amostras desconhecidas pode ser estimadas por meio da curva de calibração estabelecida via imunoenensaio.

O equipamento utilizado para a leitura das absorbâncias foi o *ELX-800 Universal Microplate Reader* (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA). Foram realizadas leituras de 450 nm com um comprimento de onda de referência de 630 nm. Além de uma segunda leitura a 405 nm considerando amostras que poderiam ter extrapolado o limite de leitura detectado pelo leitor.

## 4 ANÁLISE E CLONAGEM DOS VARIANTES ALÉLICOS NOVOS

Dentre os participantes deste estudo que tiveram o DNA seqüenciado, dois indivíduos heterozigotos apresentaram mutações não descritas para o gene *HLA-G*, ou seja, apresentaram alelos que não puderam ser classificados dentre os 50 alelos descritos pelo IMGT.

As sequências contendo a mutação do primeiro alelo encontrado foram comparadas com os alelos de referência G\*01:01:01 e G\*01:01:17 e as sequências contendo a mutação do



segundo alelo encontrado foram comparadas com os alelos de referência G\*01:01:01 e G\*01:04:01 (TABELA 3).

Para determinação da fase na qual se encontravam as alterações entre os alelos de cada indivíduo (2n) foi realizada a clonagem e seqüenciamento de ambos os alelos de cada indivíduo

#### 4.1 Ligação dos fragmentos de DNA ao vetor

O produto da amplificação do gene *HLA-G* dos indivíduos que apresentaram os variantes alélicos novos no mesmo dia em que foram obtidos, também foram submetidos à reação de adenilação. A cada reação foi acrescido: tampão  $MgCl_2$  (1  $\mu L$ ; 10X); dATP (0,1  $\mu L$ ; 100 mM);  $MgCl_2$  (0,3  $\mu L$ ; 50 mM); Taq polimerase (0,3  $\mu L$ ; 5 U/ $\mu L$ ) e o fragmento de DNA amplificado (cerca de 8  $\mu L$ ). As misturas eram homogeneizadas e incubadas no termociclador por 10 minutos a 72°C.

Em seguida foram elaboradas as reções para ligação dos fragmentos de DNA (aproximadamente 3kb contendo o gene *HLA-G*) ao vetor (ptZ57R/T). A cada reação de ligação foi acrescido: tampão de ligação (2  $\mu L$ ; 5X; Fermentas); vetor ptZ57R/T (0,5  $\mu L$ ; 55 ng/  $\mu L$ ; Fermentas); T4 DNA ligase (1  $\mu L$ ; 5 U/ $\mu L$ ; Fermentas); Taq polimerase (0,3  $\mu L$ ; 5 U/ $\mu L$ ; Fermentas) e o fragmento de DNA amplificado e adenilado (cerca de 515 ng). As misturas foram homogeneizadas e incubadas a 8°C por 24 horas.

#### 4.2 Transformação das células termocompetentes

A célula utilizada para esta preparação foi a *Escherichia coli* DH10B. Cerca de 10 $\mu L$  de seu estoque armazenado em glicerol 50% foi cultivado, sob agitação a 37°C, em 1 mL de meio LB (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) contendo 10 $\mu g/mL$  de estreptomicina por 24 horas. Em seguida, 500 $\mu L$  desta cultura foi inoculado em 80 mL de meio líquido SOB e incubado por 3 horas sob as mesmas condições anteriores (até atingir a D.O.<sub>600</sub> entre 0,5 e 0,8). Após resfriamento em gelo por 15 minutos, as células foram coletadas por centrifugações e lavadas depois da primeira centrifugação em 15 mL de  $MgCl_2$  (100 mM), após a segunda centrifugação foram ressuspensas em  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (100 mL), incubadas por 20 minutos em

banho de gelo e centrifugadas pela terceira vez. O sobrenadante resultante foi descartado e as células lavadas foram ressuspensas em 600  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (100 mL) com glicerol a 20 % gelado. Alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  foram estocadas no freezer  $-80^\circ\text{C}$ .

Para a transformação, 50  $\mu\text{L}$  de células termocompetentes misturadas com 1 a 2  $\mu\text{L}$  dos fragmentos de DNA ligados (ver item 5.4.1) foram incubadas em banho de gelo por 30 minutos. Esta mistura foi em seguida incubada em banho quente a  $42^\circ\text{C}$  por 1 minuto e 30 segundos. Após, as células incubadas passaram por um banho de gelo por mais 2 minutos. As células transformadas foram recuperadas em 1mL de meio líquido rico por 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$  sob agitação e 300  $\mu\text{L}$  de cada cultura foi plaqueada em meio LA (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) contendo X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-alfa-D-galactopiranosídeo) a 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , IPTG a 50  $\mu\text{M}$  (Isopropil  $\beta$ -D-tiogalactosídeo) e ampicilina a 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

#### 4.3 Mini-preparação de plasmídeos

As colônias resultantes das células eletroporadas foram cultivadas em meio LB (SAMBROOK; RUSSEL, 2001), contendo ampicilina a 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , sob agitação a  $37^\circ\text{C}$  por cerca de 16 horas. Em seguida, 1,5 mL das culturas de *E. coli* cultivadas eram coletadas via centrifugação (14 500 rpm, por 1 minuto). Este precipitado era ressuspensão em 200  $\mu\text{L}$  de solução gelada GET (glucose 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM), às células eram acrescidos 150  $\mu\text{L}$  de solução de lise (NaOH 0,2 M e SDS 1%), e a mistura era homogeneizada por inversão até a ocorrência da lise. O pH da solução era neutralizado pela adição de 150  $\mu\text{L}$  de KAcF (acetato de potássio a 3M e ácido fórmico a 1,8M), e a mistura era homogeneizada e incubada em banho de gelo por 5 minutos. Após centrifugação por 5 minutos a 14.500 rpm, o sobrenadante era transferido para novo tubo, ao qual era adicionado 50  $\mu\text{L}$  de fenol: clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). A amostra era centrifugada por 5 minutos (14.500 rpm) e a fase aquosa era coletada em tubo novo. A esta fase aquosa era adicionado 0,7 volume de isopropanol seguido de incubação por 15 minutos, para que ocorresse a precipitação do DNA. Após 10 minutos de centrifugação (14.500 rpm), o DNA precipitado era lavado com 1 mL de etanol 70% e centrifugado por 5 minutos a 14.500 rpm. O sobrenadante era descartado e o DNA era seco e ressuspensão em água ultrapura estéril.

Os produtos das mini-preparações foram verificados via reação de restrição. A reação era preparada com: tampão R (1 $\mu\text{L}$ ; 10X); RNase (0,5 $\mu\text{L}$ ; 10mg/mL); *ECO* RI (0,2 $\mu\text{L}$ ;

10U/ $\mu$ L); *Hind* III (0,2 $\mu$ L; 10U/ $\mu$ L); água mili-Q estéril (6,1 $\mu$ L) e de cada amostra de DNA plasmidial (pDNA) era usado 2 $\mu$ L por reação. Estas reações eram incubadas a 37°C por 3 horas. O restante do DNA purificado era tratado com RNase (1 $\mu$ L; 10mg/mL) e incubado nas mesmas condições descritas para as reações de restrição. Os produtos eram analisados via eletroforese em gel de agarose (segundo o item 2.3 de Materiais e Métodos).

#### 4.4 Reação de sequenciamento do pDNA

Ao pDNA tratado com RNase era adicionado 2/3 do volume de acetato de amônio 7,5M e tudo era homogeneizado. Adicionava-se também 2 volumes de etanol 100%, homogeneizava-se novamente e incubava-se por 10 minutos a temperatura ambiente. As amostras eram centrifugadas por 10 minutos (14.500 rpm), o sobrenadante era descartado e o *pellet* era lavado com etanol 80% e centrifugado por 5 minutos (14.500 rpm). O sobrenadante era removido, o *pellet* seco e ressuspensão em 30  $\mu$ L de água ultra-pura estéril.

Para a reação de sequenciamento foi utilizado kit *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems). Para cada amostra de pDNA contendo o gene *HLA-G* eram realizadas seis reações de sequenciamento, para os éxons 2, 3 e 4 utilizando *primers forward* e *reverse*. Então cada uma destas reações eram preparadas utilizando 1 $\mu$ L de um dos *primers* (cada éxon apresenta dois *primers* específicos para a reação de sequenciamento), *Ready Reaction Premix* (1 $\mu$ L; 2,5X), tampão *BigDye Sequencing Buffer* (1,5 $\mu$ L; 5X), 4,5  $\mu$ L de água ultrapura e 2  $\mu$ L (cerca de 200 a 300 ng) do pDNA extraído. Também uma reação controle era elaborada, utilizando os mesmos reagentes, mas como molde de DNA controle. As reações eram submetidas a 96 °C por 10 segundos, e 25 ciclos de 96 °C por 10 segundos, 50 °C por 10 segundos e 60 °C por 2 minutos. Em seguida as reações eram precipitadas e preparadas para passarem pelo sequenciamento (ver item 2.5 de Materiais e Métodos).

## 5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A identificação dos genótipos *HLA-G* dos indivíduos da população estudada foi determinada via análise combinada das sequências dos éxons 2, 3 e 4 utilizando os programas: *ABI Prism SeqScape* (Applied Biosystems) e *HLA-G - SBTengine*® (GenDx). A

frequência de alelos e genótipos identificados, assim como o Teste de Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* para o *locus HLA-G* para a população estudada, foi realizado utilizando os programas: *Arlequin* (EXCOFFIER; LAVAL; SCNHEIDER, 2005) e *GenePop* (RAYMOND; ROUSSET, 1995).

As comparações entre os grupos amostrais das frequências alélicas e genotípicas foram realizadas utilizando o programa BioEstat versão 5.0 (*AnalystSoft*) e o *GraphPad Prism 5* (MOTULSKY, 1999). O teste não-paramétrico de *Kruskall-Wallis* ( $p$  value  $\leq 0.05$ ) foi utilizado para a comparação de três grupos independentes ou mais de amostras de sHLA-G quantificadas, enquanto o teste de *Mann-Whitney* ( $p$  value significativo  $\leq 0.05$ ) foi utilizado para a comparação entre dois grupos independentes. Mediante a rejeição da hipótese nula entre três ou mais grupos, estes foram reanalisadas aos pares para a confirmação e identificação das diferenças via teste *Student-Newman-Keuls* ( $p$  value significativo  $\leq 0.05$ ).

O teste exato de *Fischer* foi utilizado para determinar a significância de associações atribuídas entre pacientes com ou sem rejeição e com alta ou baixa expressão de sHLA-G *versus* controles portadores ou não um dado alelo *HLA-G*. Nos casos em que a diferença entre as frequências alélicas dos grupos analisados foram estatisticamente significativas, também foram calculados o “*Odds Ratio*” (OR) (WOLF,1955), visando a demonstrar as chances de um dado alelo ser mais frequente dentro de uma das populações comparadas. Foram consideradas significativas associações com  $p$  value  $\leq 0.05$  e dentro de um intervalo de confiança de 95%.

ANEXOS

ANEXO I – PARECER DE LIBERAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

SOCIEDADE EVANGÉLICA  
BENEFICENTE DE CURITIBA -  
PR



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** GENÓTIPOS HLA-G E NÍVEIS PLASMÁTICOS DE sHLA-G EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS E SUA RELAÇÃO COM A EVOLUÇÃO DO PÓS-TRANSPLANTE

**Pesquisador:** Vanessa

**Área Temática:** Área 1. Genética Humana.

(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.);

**Versão:** 3

**CAAE:** 12386313.9.0000.0102

**Instituição Proponente:** Programa de Pós-Graduação em Genética

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior ((CAPES))

Programa de Pós-Graduação em Genética

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 253.540

**Data da Relatoria:** 23/04/2013

#### Apresentação do Projeto:

Esta pesquisa consistirá no estudo de amostras de sangue de pacientes transplantados renais e seus respectivos doadores. Os pacientes receptores do transplante serão analisados estando divididos em três grupos. O grupo I será composto por pacientes receptores não sensibilizados (com reação normal pós-transplante, sem a detecção de anticorpos HLA do doador específico), o grupo II por pacientes receptores sensibilizados (com reação anormal no pós-transplante) e o grupo III por pacientes receptores dessensibilizados (reação anormal no pós-transplante, mas tratados via plasmaferese e/ou imunoglobulinas com sucesso). Todos os indivíduos participantes deverão assinar os termos de consentimento. As amostras dos pacientes receptores serão obtidas entre o período pré-transplante ao pós-transplante totalizando 12 coletas realizadas no Hospital Universitário Evangélico de Curitiba (HUEC). Enquanto as amostras dos doadores serão obtidas através de uma única coleta no pré-transplante. Os

Endereço: Rua Padre Anchieta, 2770  
Bairro: Bigorriho CEP: 80.730-000  
UF: PR Município: CURITIBA  
Telefone: (41)3240-5570 Fax: (41)3240-5584 E-mail: comite.etica@fepar.edu.br

SOCIEDADE EVANGÉLICA  
BENEFICENTE DE CURITIBA -  
PR



pares de receptores e doadores serão selecionados e caracterizados a partir dos prontuários médicos. As amostras de sangue coletadas dos pacientes receptores e doadores serão utilizadas para genotipagem de genes relacionados à resposta imune, fator relevante na busca do melhor par doador-receptor compatível quando da indicação do transplante. Também as amostras de sangue coletadas dos pacientes receptores serão utilizadas para a análise e quantificação da molécula HLA-G, uma potencial marcadora do estado de pacientes transplantados renais.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Investigar a possível relação entre o perfil de imunotolerância e fenótipos/genótipos HLA-G em pacientes transplantados renais.

Objetivo Secundário:

Determinar os genótipos do gene HLA-G de 60 pares de doadores-receptores de transplantes de rim. Estabelecer as frequências alélicas e genótípicas do gene HLA-G. Quantificar moléculas HLA-G solúveis no plasma de pacientes transplantados.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Esta pesquisa não trará risco nenhum a mais aos indivíduos constituintes dos grupos amostrais. Não existirá risco, pois as coletas de amostras de sangue ocorrerão na sequência das coletas de amostras para exames de rotina dos pacientes. Assim a punção sanguínea no paciente, a qual é realizada pelas enfermeiras do Hospital Evangélico de Curitiba ocorrerá uma única vez, como já ocorre para a coleta de amostras para os exames de rotina, sendo coletado apenas um tubo de sangue a mais destinado a pesquisa.

Benefícios:

Este estudo não trará benefícios num curto prazo aos pacientes estudados. Porém num prazo maior de tempo caso estes pacientes realizem novos transplantes e para novos pacientes transplantados os resultados deste estudo poderão vir a servir como uma ferramenta mais sensível para o monitoramento da evolução do pós-transplante de pacientes transplantados. Além de poder vir a aperfeiçoar o encontro de duplas compatíveis de doadores e receptores nos transplantes.

Endereço: Rua Padre Anchieta, 2770  
Bairro: Bigorinho CEP: 80.730-000  
UF: PR Município: CURITIBA  
Telefone: (41)3240-5570 Fax: (41)3240-5584 E-mail: comite.etica@fepar.edu.br



SOCIEDADE EVANGÉLICA  
BENEFICENTE DE CURITIBA -  
PR



**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Não há

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Não há

**Recomendações:**

Rever preenchimento dos dados do pesquisador responsável na Plataforma Brasil( nome incompleto).

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

CURITIBA, 24 de Abril de 2013

---

Assinador por:

Carmen Australia Paredes Marcondes Ribas  
(Coordenador)

Endereço: Rua Padre Anchieta, 2770

Bairro: Bigorriho

CEP: 80.730-000

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3240-5570

Fax: (41)3240-5584

E-mail: comite.etica@fepar.edu.br

ANEXO II – PARECER DE LIBERAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO HUEC

Senhor Coordenador

Declaramos que nós do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba, estamos de acordo com a condução do projeto de pesquisa “GENÓTIPOS *HLA-G* E NÍVEIS PLASMÁTICOS DE *sHLA-G* EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS E SUA RELAÇÃO COM A EVOLUÇÃO DO PÓS-TRANSPLANTE” sob a responsabilidade de Vanessa Hauer, nas nossas dependências, tão logo o projeto seja aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, até o seu final em Julho de 2016.

Estamos cientes que os sujeitos de pesquisa serão homens e mulheres doadores e receptores de transplante renal com a idade ou acima de 18 anos, bem como de que o presente trabalho deve seguir a resolução 196/96 do CNS e complementares.

Outrossim, informamos que, uma vez cientes do parecer exarado pelo Comitê de Ética, emitiremos outro documento em conformidade com as exigências da CONEP, autorizando a execução do projeto em tela.

Sendo o que se nos apresenta para o momento enviamos nossas cordiais saudações.

Atenciosamente,



(Dr<sup>a</sup>. Fabiana L. C. Contieri)  
Responsável pelo Setor de Transplante Renal  
do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba

DRA. FABIANA L. C. CONTIERI  
Nefrologia / Transplante Renal  
CRM-PR 11472

ANEXO III – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



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



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós do Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade, pesquisadores da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando o(a) Sr(a), transplantado( ) ou doador( ), com idade igual ou superior a 18 anos, a participar do estudo intitulado “Genótipos HLA-G e Níveis Plasmáticos de SHLA-G em pacientes transplantados renais e sua relação com a evolução do pós-transplante”, que visa analisar a “OCORRÊNCIA DE VARIAÇÃO NO GENE HLA-G e o MONITORAMENTO DA MOLÉCULA PRODUZIDA PARTIR DESTE GENE EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS”. A tipagem deste gene tem se mostrado uma importante etapa da pesquisa genética, avaliando o impacto da resposta imune na aceitação ou rejeição do rim transplantado. A avaliação por meio da análise de uma amostra de sangue, informará características e possíveis semelhanças relevantes entre o doador e receptor na busca da melhor dupla compatível quando da indicação do transplante.

- a) O objetivo desta pesquisa é investigar a possível relação entre a tolerância ao transplante e o gene HLA-G, monitorando também, via quantificação, as proteínas produzidas a partir deste gene em pacientes transplantados renais.
- b) Com relação a possíveis benefícios:
1. É possível que para o(a) Sr(a) não exista nenhum benefício direto a curto prazo.
  2. No entanto, a médio prazo, caso haja a necessidade de um novo transplante, ou mesmo para outras pessoas que venham a necessitar de um novo transplante, os resultados obtidos com este estudo poderão auxiliar na busca de duplas compatíveis (doador e receptor) e no monitoramento da evolução do transplante.
- c) Optando por participar desta pesquisa, será necessário o fornecimento de uma amostra de sangue, a qual será colhida junto com a coleta para o exame de rotina solicitado pelo médico. Também será necessário a coleta de alguns dados presentes em seu prontuário. Os dados a serem coletados seja o Sr(a) paciente receptor ou doador serão: nome, sexo, data de nascimento, estatura, peso, etnia, tipo sanguíneo ABO, fator Rh, tipagem HLA-A, HLA-B e HLA-DRB1 (realizada na rotina do pré-transplante), existência de doenças basais e realização de transfusão(s) sanguínea(s) prévia. Ainda, apenas de pacientes receptores serão coletados os seguintes dados: data do último transplante, data

Rubricas:  
 Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal \_\_\_\_\_  
 Pesquisador Responsável \_\_\_\_\_  
 Orientador \_\_\_\_\_ Orientado \_\_\_\_\_

Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR  
 Telefone: (41) 3360-7259 e-mail: cometica.saude@ufpr.br



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



de alta após a cirurgia deste último transplante, grau de parentesco com o doador do rim transplantado, painel reativo de anticorpos (PRA) pré-transplante, existência de transplantes anteriores, ocorrido de uma ou mais rejeições e imunossupressão pré- e pós-transplante adotada. Os dados serão coletados após o último transplante realizado pelo paciente receptor, e seu monitoramento ocorrerá até um ano após o transplante.

- d) Cada paciente (doador e receptor) receberá um código, o qual manterá o anonimato e privacidade das informações dos pacientes estudados.
- e) O recrutamento e coleta de amostras para este estudo serão realizados quando do seu comparecimento no Hospital Universitário Evangélico de Curitiba, na oportunidade de suas consultas rotineiras, solicitadas pelo médico responsável, sem alterar a rotina que existiria mesmo na ausência deste estudo. Os procedimentos serão realizados por enfermeiras aptas do setor de transplante renal, sem a necessidade da realização de consultas extras para a participação neste estudo. As amostras de sangue coletadas serão armazenadas conforme o disposto na resolução do CNS No 441, de 12 de maio de 2011, para o caso de existir a necessidade da confirmação dos resultados obtidos por meio desta pesquisa, ou para a realização de novos estudos relacionados a mesma linha de pesquisa também por meio do Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade – Universidade Federal do Paraná. Considerando nova pesquisa a ser realizada com este material armazenado, esta será realizada apenas mediante aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) institucional e, quando for o caso, pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).
- f) Esta pesquisa não representará nenhum risco adicional para o(a) Sr(a)., além do desconforto da coleta de sangue, que é rotina de seus exames.
- g) Embora a quebra de confidencialidade seja um risco inerente a qualquer pesquisa, serão tomadas todas as medidas cabíveis e disponíveis para a proteção da identidade e dos dados obtidos, seja de prontuários ou das amostras de sangue coletadas, os quais serão codificados de modo a proteger sua identidade. É importante ressaltar que a equipe de enfermagem disposta para recrutamento e coleta está apta para contornar o desconforto pela punção para a coleta do sangue.
- h) Os pesquisadores (Orientadora deste estudo: Profª. Drª. Maria da Graça Bicalho, Co-orientador deste estudo: Prof. Dr. Pablo Sandro Carvalho Santos, Mestranda responsável por este estudo: Vanessa Hauer - <vanessa.hauer@yahoo.com>), responsáveis por este estudo poderão ser contatados no Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade – Universidade Federal do Paraná (<ligh@ufpr.br>), Centro Politécnico, Rua Coronel Francisco Heráclito dos Santos, 210, Jardim das Américas, (41)3361-1729, os quais estão à disposição para quaisquer esclarecimentos que possam surgir, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

Rubricas:  
Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal \_\_\_\_\_  
Pesquisador Responsável \_\_\_\_\_  
Orientador \_\_\_\_\_ Orientado \_\_\_\_\_

Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR  
Telefone: (41) 3360-7259 e-mail: cometica.saude@ufpr.br



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



i) A participação neste estudo é voluntária e o(a) Sr(a). poderá desistir a qualquer momento, solicitando que lhe seja devolvido o presente termo de consentimento assinado. A sua desistência não terá prejuízo para o(a) Sr(a). e nem para o seguimento de nosso estudo.

j) As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas (Médica responsável pelo setor de Transplante Renal do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba: Dr<sup>a</sup> Fabiana L. C. Contieri, Orientadora deste estudo: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria da Graça Bicalho, Co-orientador deste estudo: Prof. Dr. Pablo Sandro Carvalho Santos, Mestranda responsável por este estudo: Vanessa Hauer, Pesquisadora e Técnica: Renata Slowik, Pesquisador e Técnico: José Samuel Silva). No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a **sua identidade seja preservada e seja mantida a confidencialidade**.

k) As despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames, medicamentos etc.) não são de sua responsabilidade e pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro.

l) Na hipótese de publicação dos resultados, não será divulgado sua identidade, e sim um código.

Eu, \_\_\_\_\_ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo com o qual concordo em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificativa prévia.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

\_\_\_\_\_  
(Assinatura do sujeito de pesquisa ou responsável legal – CPF n.º)

Curitiba, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ 20\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador

Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR  
Telefone: (41) 3360-7259 e-mail: cometica.saude@ufpr.br