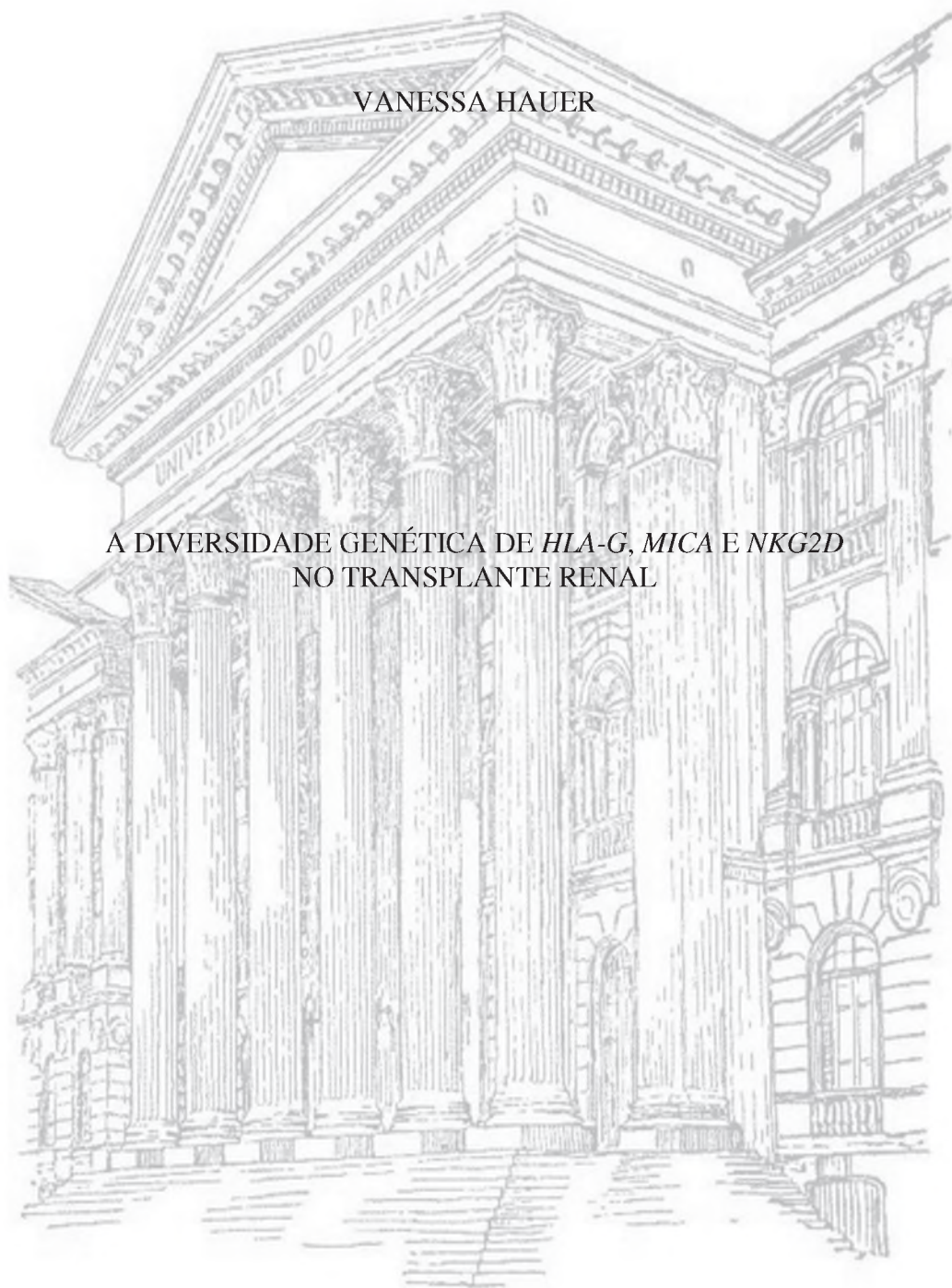


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VANESSA HAUER

A DIVERSIDADE GENÉTICA DE *HLA-G*, *MICA* E *NKG2D*
NO TRANSPLANTE RENAL



CURITIBA
2018

VANESSA HAUER

A DIVERSIDADE GENÉTICA DE *HLA-G*, *MICA* E *NKG2D*
NO TRANSPLANTE RENAL

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção de grau de Doutora ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria da Graça Bicalho
Coorientadores: Dr^o Danilo G. Augusto e Prof^a.
Dr^a. Nuala Mooney

CURITIBA
2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Hauer, Vanessa.

A diversidade genética de *HLA-G*, *MICA* e *NKG2D* no transplante renal. /
Vanessa Hauer. – Curitiba, 2018.
187 f. : il. ; 30cm.

Orientadora: Maria da Graça Bicalho.

Coorientadores: Danillo Gardenal Augusto e Nuala Mooney.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Transplante de rim. 2. Antígenos HLA-G. 3. Mica. 4. Tolerância. I.
Título. II. Bicalho, Maria da Graça. III. Augusto, Danillo Gardenal. IV.
Mooney, Nuala. V. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (20. ed.) 617.461



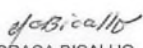
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO GENÉTICA

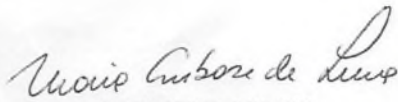
TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **VANESSA HAUER** intitulada: **A diversidade genética de HLA-G, MICA e NKG2D no transplante renal.**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovação no rito de defesa.

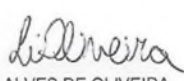
A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

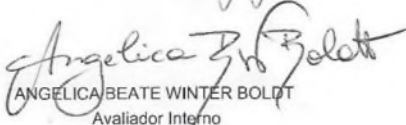
Curitiba, 28 de Maio de 2018.


MARIA DA GRAÇA BICALHO
Presidente da Banca Examinadora


MARIA GERBASE DE LIMA
Avaliador Externo


ALEXANDRA CRISTINA SENEGAGLIA
Avaliador Externo


LIANA ALVES DE OLIVEIRA
Avaliador Externo


ANGELICA BEATE WINTER BOLDT
Avaliador Interno

Dedico
a todos que me encorajaram e tornaram esta caminhada
menos árdua, mais interessante e humana.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora, a Prof^a Maria da Graça Bicalho, por todo apoio e estímulo prestado ao meu trabalho desde o mestrado. Também a Dr^a Nuala pela orientação no exterior, pelo apoio e receptividade de todos os colegas, em especial a Amy Cross.

Tenho uma enorme gratidão ao Dr^o Danilo G. Augusto. Eu me sinto honrada e agradecida por ter me coorientado. Fico grata por toda a sua afabilidade nos momentos mais delicados desta caminhada.

Agradeço ao Dr^o Eduardo Antônio Donadi pela colaboração e contribuições realizadas em vínculo com Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto.

À Dr^a Ida Cristina Gubert pelos ensinamentos e por viabilizar o desenvolvimento desta pesquisa de forma ética.

O meu sincero agradecimento aos membros do hospital participante desta pesquisa, as enfermeiras Vera, Michelle, Denise e Milene. A primeira médica a nos receber, a Dr^a Fabiana Loss de C. Contieri e a Dr^a Carolina M^a Pozzi.

A todos que aceitaram participar deste projeto e a doar parte de si para a construção deste conhecimento.

Aos membros da equipe LIGH, em especial a Sônia, ao Samuel, a Renata e a Suellen, por terem primeiro me recepcionado no laboratório e me ensinado muito. Sou grata a Matilde Risti e a Ana Luiza Cidral pela parceria na pesquisa e amizade. A todos os colegas e amigos de laboratório que compartilharam esta trajetória.

À CAPES, agradeço pelo apoio financeiro e à Universidade Federal do Paraná pela estrutura, e principalmente àqueles que fazem esta instituição ser melhor.

Finalmente, sou eternamente grata ao meu marido, Tiago, por ser cuidadoso, paciente, o meu melhor amigo e amor da minha vida. À minha mãe e ao meu pai, que sempre me apoiaram e viabilizaram os meus estudos. Ao meu irmão, por ter sido o meu modelo, desde pequena, no estudo e na vida, por ser verdadeiro e por ter sempre me estimulado a ir adiante. A minha segunda mãe, a Regina, por todo apoio prestado a mim. Aos que me incentivaram sempre e não estão mais presentes, mas certamente agora olham lá de cima, felizes ao ver este trabalho concretizado.

RESUMO

Numa população tão heterogênea como a brasileira, o estudo de genes pouco explorados, como o *HLA (human leukocyte antigen)-G* e *MICA (MHC class I polypeptide-related gene A)*, é de grande relevância para a compreensão de aspectos evolutivos e imunológicos. Estes genes codificam moléculas de mesmo nome, que em contextos patológicos, atuam na imunorregulação, podendo ser via isoformas solúveis (sHLA-G e sMICA) ou expressas ligadas a membrana celular. HLA-G interage com receptores inibidores de linfócitos e MICA de membrana interage com NKG2D, ativando células NK (*natural killers*). Neste trabalho foi realizada a caracterização de polimorfismos presentes nos genes *MICA*, *NKG2D* e *HLA-G* por meio, respectivamente, de PCR-SSOP, qPCR e SBT em população controle, sem doença renal crônica (Ct, n = 79), pacientes com doença renal crônica (DRC, n = 99) e pacientes submetidos a transplante renal (Tx, n = 67). Aliada a esta genotipagem, foi avaliada a associação de alelos, haplótipos e genótipos com a expressão das moléculas MICA e HLA-G nas suas formas solúveis detectadas no plasma por meio de ELISA. Também foi conduzida análise de associação com o risco de desenvolvimento de DRC e a rejeição no Tx. Com isso, ficou evidente que a produção de sHLA-G e sMICA é estimulada mediante a um estresse contínuo, como a DRC. Porém a produção sMICA no pré-Tx tem um importante papel na imunorregulação e estabelecimento do aloenxerto. O polimorfismo +3010 (rs1710) se sobressaiu frente as outras variações analisadas, sendo relacionado ao risco de rejeição. Em estudo paralelo, também foram avaliadas mais de vinte variáveis de doadores e receptores coletadas na fase do pré-Tx. Via análise univariada e multivariada de dados, estas variáveis foram criteriosamente selecionadas com relação ao poder em discriminar pacientes que tenham desenvolvido episódios de rejeição ou não. O modelo final de seleção apresentou 70,7% de poder de predição, aferindo como sendo os principais fatores de risco o sexo masculino, às incompatibilidades *HLA-B* e ao tempo de diálise. Ainda, em modelo celular foi investigado o potencial de HLA-G mediar a imunotolerância em células endoteliais (CEs, linhagens HMEC-1 e HRGEC), as quais, no entanto, são consideradas o principal alvo dos mecanismos de rejeição em transplantes de órgãos sólidos. As linhagens de CEs foram tipadas para o gene *HLA-G*, analisadas quanto a expressão de LILRB1, LILRB2, HLA-G de membrana e intracelular (mHLA-G e iHLA-G) via citometria de fluxo, e avaliadas quanto a produção de transcritos de HLA-G via qPCR. Foram observadas pequenas subpopulações de CEs LILRB2⁺. Apesar das linhagens celulares estudadas apresentarem genótipos capazes de originar moléculas HLA-G funcionais, foi detectado apenas iHLA-G. Este fato foi associado a confluência celular e a qualidade do meio de cultura, os quais foram determinantes para a expressão de HLA-G. Esta regulação fina, na expressão do gene *HLA-G* e no papel da sMICA, demonstra ainda existir um grande potencial a ser explorado para se alcançar a tolerância natural.

Palavras-chave: *HLA-G*. *MICA*. Transplante renal. Tolerância.

ABSTRACT

In a heterogeneous population as the Brazilian one, the study of poorly explored genes, such as *HLA* (*human leukocyte antigen*)-*G* and *MICA* (*MHC class I polypeptide-related gene A*), is of great relevance for the understanding of evolutionary and immunological aspects. These genes encode molecules of the same name, which in pathological contexts, act on immunoregulation. This can occur via soluble isoforms (sHLA-G and sMICA) or expressed bound to the cell membrane. HLA-G interacts with lymphocytes inhibitory receptors and MICA of membrane interacts with NKG2D in NK (natural killers) cells, during activation of the immune response. Therefore, this study consisted on investigation of polymorphisms present in *MICA*, *NKG2D* (*MICA* receptor encoding gene) and *HLA-G* genes through, respectively, PCR-SSOP, qPCR and SBT. This was performed in a control population, without chronic kidney disease (Ct, n = 79), patients with chronic kidney disease (CKD, n = 99) and patients undergoing kidney transplant (Tx, n = 67). In addition to this genotyping, the association of alleles, haplotypes and genotypes with the expression of MICA and HLA-G molecules in their soluble forms detected in plasma by ELISA was evaluated. Also, the genetic and phenotypic association analyses were performed with the risk of developing CKD and Tx rejection. Thus, it was shown that the production of sHLA-G and sMICA is stimulated by continuous stress, such as CKD. However, sMICA production in pre-Tx plays an important role in immunoregulation and establishment of allograft. The polymorphism +3010 (rs1710) stood out against the other variations and haplotypes, being related to the risk of rejection. Still, in a separate study, more than twenty variables from donors and recipients were collected in the kidney pre-Tx period. These were carefully selected with respect to the discriminatory power of immune rejection, via univariate and multivariate data analyses. The final selection model presented a 70.7% of predictive power, with the male sex, *HLA-B* incompatibilities and dialysis time being the main risk factors. In addition, in a cellular model was investigated the potential of HLA-G mediate immunotolerance in endothelial cells (CEs, HMEC-1 and HRGEC), which, however, are considered the main target of rejection mechanisms in solid organ transplants. The ECs lineages were typed for *HLA-G* gene, analyzed for expression of LILRB1, LILRB2, membrane and intracellular HLA-G (mHLA-G and iHLA-G) expression by flow cytometry and evaluated for the production of HLA-G transcripts via qPCR. Small subpopulations of LILRB2⁺ ECs were observed. Although the cell lines studied had genotypes capable of generating functional HLA-G molecules, only iHLA-G was detected. This fact was associated with cell confluence and the quality of the culture medium, that were determinants for expression of HLA-G. This fine regulation, in the expression of the HLA-G gene and in the role of sMICA, still demonstrates a great potential to be explored in order to achieve natural tolerance.

Key-words: *HLA-G*. *MICA*. Kidney transplantation. Tolerance.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTO	- Associação Brasileira de Transplante de Órgãos
Ac	- Anticorpo
acLDL	- <i>Acetylated low density lipoprotein</i> (Lipoproteína de baixa densidade acetilada)
ACR	- <i>Acute cellular rejection</i> (Rejeição celular aguda)
ABMR	- <i>Antibody-mediated rejection</i> (rejeição mediada por anticorpos)
ADAM	- <i>Disintegrin and metalloproteinase domain-like protein decysin 1</i> (Desintegrina e decseína 1 da proteína semelhante ao domínio das metaloproteínas)
AFND	- <i>Allele Frequency Net Database</i> (Banco de dados de frequência de alelos)
AIRE	- <i>Autoimmune regulator</i> (Regulador autoimune)
ALG	- <i>Anti-lymphocyte globulin</i> (globulina antilinfócito)
AP-1	- <i>Activator protein-1</i> (proteína ativadora-1)
APC	- <i>Antigen presenting cells</i> (célula apresentadora de antígeno)
ATF1	- <i>Activating transcription factor 1</i> (Fator de transcrição de ativação 1)
ATG	- <i>Anti- thymocyte globulin</i> (globulina anti-timócito)
AZA	- Azatioprina
BACs	- <i>Bacterial artificial chromossomes</i> (Cromossomos artificiais bacterianos)
CAAE	- Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CEs	- Células endoteliais
CD	- Célula dendrítica
CD8/4	- <i>Cluster of differentiation 8 ou 4</i>
CDC	- Citotoxicidade dependente do complemento
CGN	- <i>Chronic graft nephropathy</i> (Nefropatia crônica do enxerto)
CI	- <i>Confidence Interval</i> (Intervalo de confiança)
CIITA	- <i>Class II transactivator</i> (Transativador de classe II)
CKD	- <i>Chronic Kidney Disease</i> (Doença renal crônica)
CREB1	- <i>cAMP responsive element binding protein 1</i>
CRE/TRE	- <i>Cyclic AMP-response element/TPA-response element</i> , onde TPA significa <i>12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate</i>
CsA	- Ciclosporina
Ct	- <i>Cycles threshold</i>

Ct group	- Controles (indivíduos sem DRC)
CtBP	- <i>C-terminal binding protein</i> (Proteínas de ligação C-terminal)
CTU	- Cadastro Técnico Único
DAMPs	- <i>Damage-associated molecular patterns</i>
DAP10/12	- <i>DNAX-activation protein 10</i> ou <i>12</i>
DCs	- <i>Dendritic cells</i> (Células dendríticas)
DRC	- Doença Renal Crônica
DSA	- <i>Donor specific antibody</i> (anticorpos anti-HLA do doador específico)
EDTA	- <i>Ethylene-diamine-tetra-acetic acid</i> (Ácido etilenodiaminotetracético)
EhnA	- <i>Enhancer A</i> (intensificador A)
ELISA	- <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Ensaio de imunoabsorção enzimática)
ERp5	- <i>Endoplasmic reticulum protein 5</i> (Proteína do retículo endoplasmático 5)
ESRD	- <i>End-stage renal disease</i> (Doença renal em estágio final)
EVs	- <i>Extracellular vesicles</i> (Vesículas extracelulares)
EXO1	- Exonuclease I
Fc	- <i>Fragment crystallizable</i> (Fragmento cristalizável)
FET	- <i>Fisher's Exact Test</i> (Teste Exato de Fischer)
FKBP	- <i>FK506 binding-protein</i> (Proteína de ligação a FK506)
GAS	- <i>Interferon-gamma activated site</i> (Sítio de ativação por interferon-gama)
GFR	- <i>Glomerular filtration rate</i> (Taxa de filtração glomerular)
GRCh38	- <i>Genome Reference Consortium Human Genome build 38</i>
G-CSF	- <i>Granulocyte-colony stimulating factor</i> (Fator estimulador de colônias de granulócitos)
H-2	- Histocompatibilidade-2
HAT	- Histona acetiltransferase
hb-1/2	- Haplobloco 1 ou 2
HDAC	- Histonas deacetilases
HGNC	- <i>HUGO Gene Nomenclature Committee</i>
HIF-1	- <i>Hypoxia inducible fator 1</i> (Factor indutível de hipoxia 1)
HIV	- <i>Human immunodeficiency virus</i> (Vírus da imunodeficiência humana)
HLA	- <i>Human Leukocyte Antigen</i> (Antígeno Leucocitário Humano)
HMEC-1	- <i>Human microvascular endothelial cell line-1</i>

HMVEC	- <i>Human microvascular endothelial cells</i>
HNK1	- <i>High natural cytotoxic phenotype 1</i>
HPV	- <i>Human papillomavirus</i> (Papiloma vírus)
HRE	- Elemento de resposta a hipóxia
HRGEC	- <i>Human Renal Glomerular Endothelial Cell</i>
HSE	- <i>Heat shock element</i> (elemento de resposta a choque térmico)
HSF-1	- Fator 1 de <i>heat-shock</i>
hTERT	- <i>Human telomerase reverse transcriptase</i>
HUEC	- Hospital Universitário Evangélico de Curitiba
HUVECs	- <i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
IDO	- Indoleamina 2-3-dioxigenase
Ig	- Imunoglobulina
iHLA-G	- <i>Intracellular HLA-G</i> (HLA-G intracelular)
IFN γ	- Interferon- γ
IFN β	- Interferon- β
IL-2/10/15	- Interleucina-2, -10 ou 15
ILT	- <i>Transcript like Ig</i> (transcrito semelhante à imunoglobulina ou Ig)
IMGT	- <i>International Immunogenetics Information System</i>
IPD	- <i>Immuno Polymorphism Database</i>
IRF	- <i>Interferon regulatory factor</i> (Fator de regulatório de interferon)
ISRE	- <i>Interferon response element</i> (Elemento de resposta estimulado por interferon)
ITAM	- <i>Immunoreceptor tyrosine- based activating motif</i> (Imunoreceptor com motivo de ativação baseado em tirosina)
ITIM	- <i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i> (Imunoreceptor com motivo de inibição baseado em tirosina)
IVGIg	- <i>Intravenous immunoglobulins</i> (imunoglobulinas intravenosas)
kb	- <i>Kilobase</i>
kDa	- <i>KiloDalton</i>
KTN	- <i>Patients underwent kidney transplantation and had not developed rejection</i> (pacientes submetidos a transplante renal e não desenvolveram rejeição)
KTR	- <i>Patients underwent kidney transplantation and had developed rejection</i> (pacientes submetidos a transplante renal e desenvolveram rejeição)

LCR	- <i>Locus Control Region</i> (Região controladora de <i>locus</i>)
LCR de NK	- <i>Leukocyte receptor complex</i> (Complexo receptor leucocitário)
LD	- <i>Linkage disequilibrium</i> (Desequilíbrio de ligação)
LILRB1/2	- <i>leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily b, member 1 e member 2</i>
LINE-1	- <i>Long interspersed elements</i> (Elementos longos intercalados)
LIR	- <i>Leukocyte immunoglobulin-like receptor</i> (Receptores semelhantes a imunoglobulinas de leucócitos)
LNK1	- <i>Natural cytotoxic phenotype 1</i> (Fenótipo citotóxico natural 1)
KIR2DL4	- <i>Killer cell immunoglobulin-like receptor, 2 domains, long cytoplasmic tail 4</i> (receptor semelhante a imunoglobulina das células NK, 2 domínios, cauda citoplasmática longa 4)
MAF	- <i>Minor allele frequency</i> (alelo de menor frequência)
Mb	- Megabases
MDSCs	- <i>Myeloid-derived suppressor cells</i> (Células supressoras derivadas mielóides)
mHLA-G	- <i>Membrane HLA-G</i> (HLA-G de membrana)
MICA	- <i>MHC class I polypeptide-related gene A</i>
miRNA	- microRNA
MHC	- <i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complexo Principal de Histocompatibilidade)
MMF	- Micofenolato mofetil
MPS	- Micofenolato sódico
mRNA	- <i>Messenger RNA</i> (RNA mensageiro)
mTORC1	- <i>Mammalian target of rapamycin complex 1</i> (Complexo 1 alvo da rapamicina de mamíferos)
NFAT	- <i>Nuclear factor of activated T-cells</i> (Fator nuclear de células T ativadas)
NF-Y	- <i>Nuclear factor Y</i> (fator nuclear Y)
NF- κ B	- <i>Nuclear factor-κB</i> (fator de transcrição nuclear- κ B)
NK	- <i>Natural killer cells</i> (células exterminadoras naturais)
NKC	- <i>NK -gene complex</i> (Complexo de genes NK)
NKG2D	- <i>KLRK1, killer cell lectin-like receptor, subfamily K, member 1</i>
nm	- Nanômetros
NOD	- <i>Nonobese diabetic</i> (Diabético não obeso)

NS	- <i>Non-stimulated</i> (Não estimulado)
OR	- <i>Odds Ratio</i>
pb ou bp	- Pares de base ou <i>base pair</i>
PCR	- <i>Polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
PCR-SSOP	- <i>PCR-sequence specific oligonucleotide probes</i>
PDD	- <i>Patient with deceased donors</i> (Pacientes com doadores falecidos)
PERB11	- <i>Perth beta block transcript 11</i>
PLD	- <i>Patients with living donor</i> (Pacientes com doadores vivos)
PR	- <i>Progesterone</i> (Progesterona)
PRA	- Painel reativo de anticorpos
PRE	- <i>Progesterone response elemento</i> (elemento de resposta a progesterona)
<i>Prkdc^{scid}</i>	<i>Protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide, severe combined immunodeficiency</i>
qPCR	- <i>Quantitative polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase quantitativa)
RISC	- <i>RNA-induced silencing complex</i> (complexo de silenciamento induzido por RNA)
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)
rs	- <i>Reference SNP</i>
SBT	- <i>Sequence Based-Typing</i>
sHLA-G	- <i>Soluble HLA-G</i> (HLA-G solúvel)
sMICA	- <i>Soluble MICA</i> (MICA solúvel)
SAP	- <i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
SD	- <i>Standard Deviation</i> (Desvio padrão)
SFI	- <i>Specific Fluorescence Index</i> (Índice de Fluorescência Específico)
SHP-1	- <i>Src homology 2-containing phosphatase--1</i>
Sp1	- Fator transcricional mediador das rotas de transativação constitutivas e induzidas por citocinas
SNP	- <i>Single nucleotide polymorphism</i> (polimorfismo de nucleotídeo único)
SNT	- Sistema Nacional de Transplantes
STR	- <i>Short tandem repeat</i> (Repetição curta em tandem)

SUS	- Sistema Único de Saúde
TAP	- <i>Transporter associated with antigen processing</i> (transportador associado com o processamento de antígenos)
TC	- <i>Tolerance cocktail</i> (Coquetel de tolerância)
TCLE	- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR	- <i>T cell receptor</i> (receptor de célula T)
TFs	- <i>Transcriptional factors</i> (fatores transcrpcionais)
TGF-β	- <i>Transforming growth factor-β</i>
TLR	- <i>Toll like receptor</i> (receptores <i>toll-like</i>)
TO	- Tolerante Operacional
tPA	- <i>Tissue-type plasminogen activator</i> (Ativador do plasminogênio tipo tecidual)
Tregs	- Células T regulatórias
Tx	- Transplante ou <i>Transplant</i>
UL 16	- ULBP (<i>UL 16 binding proteins</i>)
vWF	- <i>Willebrand Factor</i>
Wt	- <i>Wild type</i> (selvagem)
3'-UTR	- <i>Three prime untranslated region</i> (região 3' não traduzida)
5'-URR	- <i>Five upstream regulatory region</i> (região regulatória 5')
β ₂ m	- beta-2-microglobulina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 JUSTIFICATIVA.....	4
1.2 OBJETIVOS.....	5
1.2.1 Objetivo Geral.....	5
1.2.2 Objetivos Específicos	5
2 REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1 GENES MHC DE CLASSE I	6
2.2 ESTRUTURA E FUNÇÃO DO GENE <i>HLA-G</i>	10
2.2.1 Evolução do gene <i>HLA-G</i>	11
2.2.2 Polimorfismos do gene <i>HLA-G</i>	13
2.2.3 Regulação da expressão do gene <i>HLA-G</i>	16
2.2.3.1 A regulação negativa da expressão do gene <i>HLA-G</i> via microRNAs	21
2.2.4 Isoformas de <i>HLA-G</i>	24
2.2.5 Receptores de <i>HLA-G</i>	30
2.3 ESTRUTURA E FUNÇÃO DO GENE <i>MICA</i>	31
2.3.1 Evolução do gene <i>MICA</i>	33
2.3.2 Polimorfismos do gene <i>MICA</i>	34
2.3.3 Regulação da expressão do gene <i>MICA</i>	36
2.3.4 Expressão e função de isoformas de <i>MICA</i>	37
2.3.5 Receptores expressos por células <i>natural killers</i> e a interação de NKG2D com <i>MICA</i>	39
2.3.6 O gene codificador de NKG2D e seus polimorfismos	41
2.4 IMUNOLOGIA DOS TRANSPLANTES	41
2.4.1 Variáveis clínicas consideradas do pré ao pós-transplante renal.....	45
2.4.2 Imunossupressão nos transplantes.....	49
2.4.2.1 Imunossupressão induzida por medicamentos	50
2.4.2.2 Mecanismos de tolerância natural	55

2.4.3 Modelos de estudo da imunologia dos transplantes	58
2.4.3.1 Modelos animais não humanos de estudo da imunologia dos transplantes.....	58
2.4.3.2 Modelos celulares de estudo da imunologia dos transplante.....	62
3 RESULTADOS.....	66
3.1 CAPÍTULO 1 - SINGULARIDADES DOS FATORES DE RISCO PRÉ-TRANSPLANTE PARA O ALOENXERTO RENAL: ANÁLISE UNIVARIADA E MULTIVARIADA	66
SINGULARITIES OF PRE-TRANSPLANT RISK FACTORS FOR THE KIDNEY ALLOGRAFT: UNIVARIATE AND MULTIVARIATE ANALYSIS.....	67
Introduction	68
Methods.....	69
Patients and donors.....	69
Variables	70
Data analysis	71
Results	72
Description of risk predictors for kidney-transplanted patients.....	72
Defining risk factors for pre-transplant evaluation	72
Discussion.....	73
Conclusion	76
Aknowledgments	76
Funding	77
References	78
Figures and Tables	81
3.2 CAPÍTULO 2 - A SUSCETIBILIDADE À DOENÇA RENAL CRÔNICA E O ÊXITO DO ALOENXERTO ESTÃO ASSOCIADOS A POLIMORFISMOS DE <i>HLA-G</i> E ISOFORMAS SOLÚVEIS DA MICA E DO <i>HLA-G</i>	86
SUSCEPTIBILITY TO CHRONIC KIDNEY DISEASE AND ALLOGRAFT OUTCOME ARE ASSOCIATED WITH <i>HLA-G</i> POLYMORPHISMS AND SOLUBLE ISOFORMS OF MICA AND <i>HLA-G</i>.....	87
Introduction	88

Methods	89
Sample	89
Immunosuppression protocol from kidney-transplant patients	90
<i>HLA-G</i> , <i>MICA</i> and <i>NKG2D</i> Genotyping	90
ELISA for sHLA-G and sMICA	92
Data analysis	92
Results	93
Association of <i>HLA-G</i> , <i>MICA</i> and <i>NKG2D</i> genotypes	94
Soluble HLA-G and MICA phenotypes association	95
Discussion	95
Conclusion	97
Aknowledgments	97
Funding	98
References	99
Figures and Tables	104
3.3 CAPÍTULO 3 - ESTUDO PILOTO DO FENÓTIPO DE IMUNOTOLERÂNCIA DE HMEC-1 E HRGEC MEDIADO POR HLA-G	113
A PILOT STUDY OF THE IMMUNE TOLERANT PHENOTYPE OF HMEC-I AND HRGEC MEDIATED BY HLA-G	114
Introduction	115
Methods	116
Cell culture	116
DNA extraction and <i>HLA-G</i> genotyping	117
Flow Cytometry	117
ELISA for sHLA-G from supernatants cells cultures	118
qPCR for <i>HLA-G</i> transcripts	118
Evaluation of HMEC-1 and HRGEC in response to the presence of sHLA-G and the inhibitory receptors expression	119
Evaluation of HLA-G expression	119

Preliminary analysis of HLA-G expression in control cells.....	119
Evaluation of HLA-G expression in HMEC-1 and HRGEC.....	120
Data analysis	120
Results	120
Endothelial cells normally grow and are activated even in the presence of exogenous sHLA-G	120
A subpopulation of endothelial cells express the inhibitory receptor of HLA-G	121
Evaluation of HLA-G expression.....	121
M8-HLA-G1 and M8-HLA-G5 had differences in HLA-G expresssion	121
HLA-G expression in HMEC-1 and HRGEC.....	122
Discussion.....	122
Conclusion.....	124
References	125
Figures and Tables	129
4 DISCUSSÃO GERAL.....	136
5 CONCLUSÕES GERAIS.....	140
REFERÊNCIAS	141
APÊNDICE A - TCLE DOS PACIENTES NÃO TRANSPLANTADOS COM DOENÇA RENAL CRÔNICA E DOS PACIENTES TRANSPLANTADOS	175
APÊNDICE B - TCLE DOS INDIVÍDUOS DO GRUPO CONTROLE	178
APÊNDICE C - INSTRUMENTO DE AVALIAÇÃO APLICADO AOS INDIVÍDUOS DO GRUPO CONTROLE.....	181
ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO PROJETO DE PESQUISA.....	182

1 INTRODUÇÃO

A resposta imunológica compreende diversos mecanismos moleculares e celulares regulados por fatores genéticos e ambientais. É de suma importância a qualidade das respostas imunológicas para a sobrevivência e evolução das espécies. Neste contexto, os genes *HLA* (do inglês *human leukocyte antigens*) apresentam um papel muito relevante para a imunidade. A diversidade desses genes é a maior já descrita em humanos, e tem importância adaptativa para a espécie (HORTON et al., 2004). No entanto, o grande polimorfismo de *HLA* representa uma barreira à terapia baseada em transplantes, pois dificulta o encontro de doadores e receptores compatíveis. As moléculas codificadas pelos genes *HLA*, devido a sua contínua função imunológica na vigilância e apresentação de antígenos, quando diferem entre doador e receptor, passam a ser o principal alvo antigênico da resposta imune capaz de afetar a histocompatibilidade (compatibilidade tecidual). Dessa forma, o transplante entre indivíduos não compatíveis (diferentes em relação a moléculas *HLA*) leva à rejeição do enxerto, que corresponde a células, tecidos ou órgãos transplantados.

Os mecanismos imunológicos relacionados ao produto gênico de genes semelhantes aos genes *HLA* começou a ser revelado por Peter Alfred Gorer e colaboradores em 1936, após a descoberta do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *major hiscompatibility complex*) em camundongos da espécie *Mus musculus*. Estes foram utilizados como modelo para o estudo de transplante de pele singênico (quando o doador é irmão gêmeo) e alogênico (quando o doador é um indivíduo aparentado não geneticamente idêntico ou um indivíduo não aparentado). Através desses estudos, foi desenvolvida a “teoria imunológica do transplante” (KLEIN; FIGUEROA, 1986). George Davis Snell e Peter Brian Medawar também colaboraram com a descoberta do papel fundamental de mecanismos da resposta imune como a causa da rejeição em transplantes, em 1948 e 1953, respectivamente (GORER, 1937; SNELL, 1948; SIMPSON, 2015). Após esta primeira abordagem, outros genes e produtos gênicos relacionados foram descritos em camundongos e em outros mamíferos. De forma mais abrangente, este complexo gênico passou a ser denominado de região do MHC, independente da espécie referenciada (DUNHAM et al., 1987).

Os principais genes contidos no MHC em humanos constituem o grupo de genes *HLA*. A primeira descrição de uma das moléculas HLA codificada por este grupo foi em 1958, pelo francês Jean Baptiste Dausset (DAUSSET, 1958, 1981; DAUSSET et al., 1972), em colaboração com Jon

van Rood e Rose Payne (PAYNE et al., 1964). Historicamente, primeiro Dausset descreveu o processo de aglutinação entre anticorpos anti-antígenos HLA, expressos na superfície da membrana celular de leucócitos, sendo então evidenciado que a presença das moléculas HLA seriam as principais atuantes no mecanismo envolvendo a resposta imune adaptativa capaz de levar à rejeição em transplantes. Com o advento das técnicas moleculares, vieram as descrições dos genes codificadores apresentados nos trabalhos de Baruj Benecerraf e George Snell (SNELL, 1948; MCDEVITT; BENACERRAF, 1969; BENACERRAF, 1981).

No MHC, parte dos genes *HLA* codificam para moléculas HLA não-clássicas de classe I, além de genes de histocompatibilidade menor, que codificam para moléculas não-HLA. Como exemplo temos o gene *HLA-G* (gene do antígeno leucocitário humano-G do inglês *human leukocyte antigens-G*) e os genes *MIC* (do inglês *MHC class I polypeptide-related genes*), os quais têm demonstrado importante papel imunológico em situações fisiopatológicas distintas e ainda não explicadas pelos conhecimentos atuais, como os mecanismo de rejeição em transplantes (LAPERROUSAZ et al., 2012).

A relação da imunologia com o transplante evoluiu muito depois de 1960 e, após todos os conhecimentos adquiridos com o transplante de pele, o transplante renal se tornou o novo modelo de estudo, além de ser atualmente o mais realizado no mundo inteiro (WARREN et al., 2012). Desde então foram descobertos e desenvolvidos medicamentos imunossupressores e terapias capazes de conter com grande eficácia os efeitos negativos causados pelas diferenças entre HLA clássicos do doador e do receptor. Nesse caso, é possível propiciar o sucesso do transplante a curto prazo. No entanto, a longo prazo, os pacientes apresentam grandes taxas de episódios de rejeição e tendem a permanecer suscetíveis a infecções, devido ao efeito generalizado dos imunossupressores (HALLORAN, 2004; CHEN; GYLLENSTEN, 2014; PAN et al., 2016)

Como a rejeição tardia pode ter origem diversa, também especula-se que a desregulação de fatores imunológicos pouco conhecidos, como os mecanismos envolvendo MICA e HLA-G, possam ter associação com o prognóstico dos pacientes transplantados. Os genes codificadores, *HLA-G* e *MICA*, são conhecidos por apresentar uma regulação restrita comparado aos genes *HLA* clássicos. Funcionalmente, infere-se que o HLA-G estaria envolvido com mecanismos de tolerância, fato associado com a aceitação do enxerto (QIU et al., 2006), enquanto o MICA estaria relacionado a mecanismos de rejeição (MENIER et al., 2002; RACCA et al., 2009). Mas o papel de MICA na forma solúvel permanece não esclarecido, visto poder também atuar promovendo

mecanismos de escape, inibindo a resposta imune, como observado na tumorigênese (CHOY; PHIPPS, 2010).

Fatores não imunológicos também contribuem para o desenvolvimento das rejeições tardias, incluindo infecções virais ou bacterianas, e a susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças secundárias. Atualmente, parte significativa das perdas de enxerto se deve ao uso exacerbado e contínuo de imunossupressores, da expansão do número de doadores idosos e histórico de vida dos pacientes. Desta forma, é relevante a contínua reinterpretação dos fatores clínicos que se encontram em constante alteração, dependendo da época e população em procedimento para transplante. Apenas desta forma, poderão surgir medidas profiláticas ou terapêuticas para conter as causas da rejeição (CASTIGLIA, 2005).

Portanto, este trabalho teve como objetivo caracterizar os atuais fatores de risco imunológicos e não imunológicos para o transplante renal, numa amostra de pacientes recrutados em centro transplantador de rim, em Curitiba, Paraná, Brasil. Na segunda parte deste trabalho, foram caracterizados polimorfismos presentes nos genes *HLA-G*, *MICA* e *NKG2D* (gene codificador do receptor de MICA). Além da análise da associação de genótipos a expressão das moléculas MICA e HLA-G nas suas formas solúveis, detectadas em sangue periférico. Esta análise englobou indivíduos saudáveis e pacientes com doença renal crônica, submetidos e não submetidos a transplante renal. Por fim, foi investigado em estudo piloto a existência de fenótipo de tolerância mediado por HLA-G em células endoteliais, visto serem estas o principal alvo dos mecanismos da rejeição nos transplantes de órgãos sólidos. Em síntese, este trabalho visou contribuir para a elucidação de diversos aspectos que propiciam o equilíbrio imunológico e a aceitação do enxerto de forma concomitante.

1.1 JUSTIFICATIVA

A população brasileira é uma das populações mais heterogêneas do mundo, resultado de cerca de quinhentos anos de populações provenientes da miscigenação de quatro continentes (PASSOS-BUENO et al., 2014). Isto determinou a formação de uma natureza genética singular e a necessidade de estudos para conhecer a variação normal de genes da resposta imune, que incluem *HLA-G*, o *MICA* e o *NKG2D*, além de muitos outros. As frequências alélicas desses genes difere entre regiões do Brasil e o que também é observado para outras populações mundiais. Portanto, este trabalho contribui para a caracterização e identificação destes variantes alélicos, cujo conhecimento pode fomentar a base da compreensão de associações com doenças, ocorrência de epidemias, além da importância evolutiva.

No contexto patológico do transplante, o *HLA-G* solúvel e expresso na membrana, teria importante papel no desenvolvimento da tolerância natural por inibir a ativação de células efectoras (células T, B e macrófagos). Por outro lado, a isoforma de *MICA* solúvel apresentaria função associada a tolerância, mas quando expressa na membrana, promoveria a ativação de células NK, via interação com *NKG2D*. Logo, foi foco deste estudo a caracterização dos genes codificadores destas moléculas, contribuindo para o esclarecimento da associação destas com a tolerância ou não, na doença renal crônica e transplante renal.

Ainda, fatores não imunológicos interferem no desenvolvimento das rejeições. (MEIER-KRIESCHE et al., 2000; ØIEN et al., 2007; GUMABAY et al., 2018). Esta influência para o Brasil, que tem o maior sistema público de transplantes do mundo, pode ser agravada pela heterogeneidade da qualidade e tipos de serviços fornecidos em cada região do país. Ao exemplo da diversidade no perfil da faixa etária e estilo de vida, observados entre doadores e receptores. Portanto, a reinterpretação e compreensão das variáveis clínicas individuais a cada população de pacientes é importante, principalmente por preparar e melhor selecionar pacientes em procedimento para transplante.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Verificar se variações genéticas presentes nos genes *HLA-G*, *MICA* e *NKG2D* impactam no prognóstico no tratamento de pacientes submetidos a transplante renal e se estão associados com o desenvolvimento da falência renal crônica.

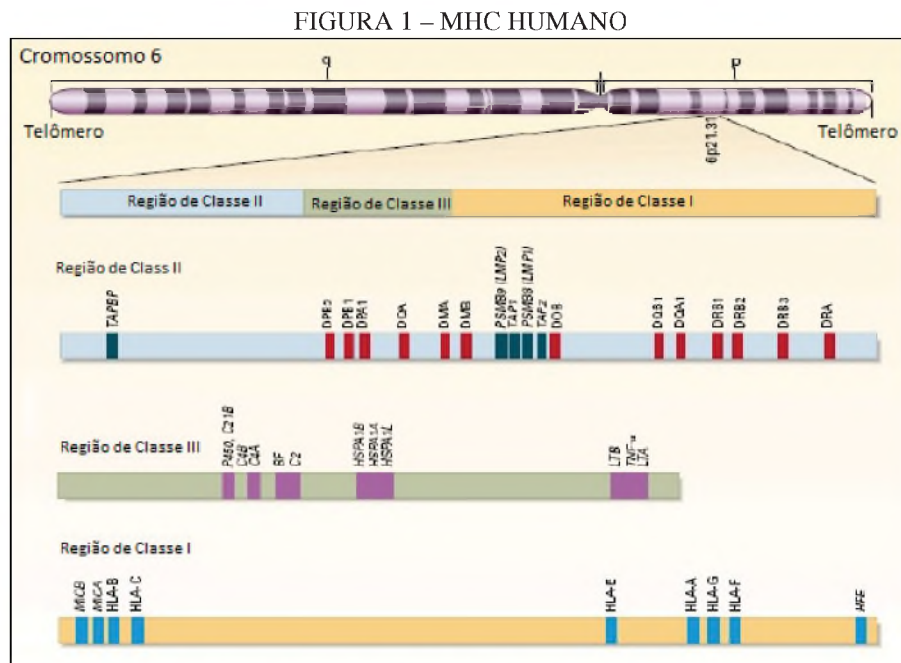
1.2.2 Objetivos Específicos

- Procurar por possíveis fatores de risco do pré-transplante que possam estar associados com os episódios de rejeição do aloenxerto renal.
- Caracterizar polimorfismos presentes nos genes *HLA-G* (região codificadora e não traduzida a 3'), *MICA* e *NKG2D* em amostra da população de Curitiba, Paraná, Brasil.
- Investigar se o polimorfismo dos genes *HLA-G*, *MICA* e *NKG2D* aumenta o risco de desenvolver falência renal crônica.
- Investigar se polimorfismos dos genes *HLA-G*, *MICA* e *NKG2D* aumenta o risco de desenvolver episódios de rejeição imunológica.
- Investigar o potencial de células endoteliais *in vitro* em desenvolver perfil tolerogênico mediado por HLA-G.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 GENES MHC DE CLASSE I

Os genes *HLA* de classe I em humanos estão localizados dentro do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), no braço curto do cromossomo 6 (6p21.1 a 6p21.3). Este complexo (FIGURA 1) se estende por cerca 3,6 Mb e contém mais de 224 *loci* gênicos, sendo 40% destes, com papel associado a funções imunológicas (NORMAN et al., 2017). O MHC em humanos é dividido em três regiões, incluindo além da região de classe I, as regiões de classe II e III. Além dos *HLAs* são encontrados diversos outros genes importantes para a percepção de odores, pseudogenes e outros, com papel não relacionado a mecanismos de resposta imune (SANTOS et al., 2005, 2010; SILVA, DA et al., 2013). É proposto que a origem de vários genes dentro desse complexo ocorreu, entre outros fatores, por mecanismos de duplicação gênica e com a inserção de retrotransposons. Isso ocasionou grande polimorfismo estrutural, regiões altamente repetitivas e agrupamentos gênicos, dentre os quais existe elevado desequilíbrio de ligação (HORTON et al., 2004).



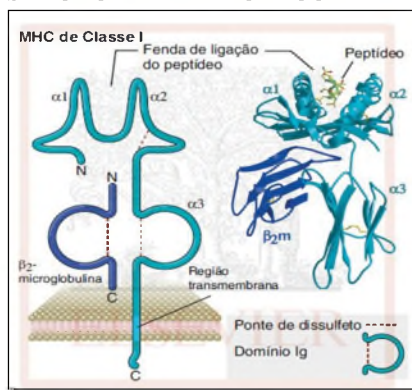
FONTE: Modificado pelo autor de KLEIN & SATO (2000).

NOTA: Acima é mostrada a localização do MHC em relação ao cromossomo 6. Abaixo estão ampliadas as regiões do MHC e são mostrados os principais genes que constituem as regiões de classe II, III e I.

Apesar do MHC ser dividido em três regiões (classes I, II e III), os genes *HLA* estão apenas presentes nas regiões de classe I e II. Os *HLA* de classe I são divididos em clássicos (*HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C*) e não clássicos (genes *HLA-E*, *-F*, *-G*), além de vários pseudogenes. Os genes MIC também se encontram na região de classe I (BLUMBERG et al., 2001). Os genes *HLA* da região de classe II (por exemplo, *HLA-DRB1*, *HLA-DQB1* e *HLA-DPBI*) não são o foco desse trabalho e não serão extensivamente abordados.

Os genes *HLA* de classe I codificam para a cadeia α (peso molecular de 44 a 47 kDa) das glicoproteínas HLA de classe I, a qual forma um heterodímero com a cadeia leve conservada de 12kDa, beta-2-microglobulina (β_2m), codificada por um gene localizado no cromossomo 15 (FIGURA 2) (ELSEN, VAN DEN et al., 2003). A cadeia α é constituída pelos domínios α_1 e α_2 , e entre eles se forma a fenda de ligação do peptídeo a ser apresentado. Além disso, há o domínio α_3 , que se assemelha a região constante das imunoglobulinas e mantém via ligação não covalente a interação com a cadeia não polimórfica β_2m . Cada domínio é codificado por um éxon diferente de cada gene *HLA* (LEFRANC et al., 2005).

FIGURA 2 – ESTRUTURA DA MOLÉCULA HLA DE CLASSE I



FONTE: ABBAS (2012).

As moléculas HLA de classe I clássicas são expressas por todas as células nucleadas e atuam na resposta imune apresentando peptídeos próprios e não próprios, compostos por 8 a 11 aminoácidos em sua fenda peptídica. Esses peptídeos são provenientes do meio intracelular e são apresentados para as células T-CD8⁺, através dos receptores das células T (TCR, do inglês *T cell receptor*). Havendo uma alteração celular, seja por infecção viral ou uma desregulação interna da célula, como num processo de tumorigênese, as moléculas HLA da célula alterada passam a apresentar de forma desregulada, os peptídeos próprios ou não próprios. Dessa forma, a célula T reconhece que a célula está alterada e promove um ataque contra ela por meio da citotoxicidade,

da citólise ou da ativação de células B (ZINKERNAGEL; DOHERTY, 1979 *apud* ALBERTS *et al.*, 2002; TIENG *et al.*, 2002).

Os genes que codificam as moléculas HLA de classe I clássicas são polimórficos e polialélicos, apresentando milhares de alelos descritos em cada loco. Em contrapartida, os genes que codificam as moléculas não clássicas são também polimórficos, mas apresentam número reduzido de variantes alélicas. Também codificam para cadeia α , mas que pode ou não interagir covalentemente com a cadeia leve β_2m . Em relação à sua expressão na superfície, esta tem se revelado restrita a certos tipos celulares, como tecidos fetais, nos quais atuam na regulação da resposta imunológica durante as gestações. O polimorfismo desses genes e a expressão de HLA de classe I não clássicos também foram associados a resposta imunológica contra infecções virais, tumorigênese e respostas autoimunes (LAPERROUSAZ *et al.*, 2012).

O *HLA-G* integra o grupo de genes HLA de classe I não clássicos e se distingue dos demais em diversos aspectos, que serão explorados em detalhe ao longo deste trabalho. Uma particularidade está no processo de recomposição alternativa do seu RNA mensageiro, que origina diferentes moléculas, expressas tanto na superfície celular, como na forma de isoformas solúveis ou liberadas em microvesículas, para o meio extracelular. Esta característica induz a imunotolerância tanto em sítios próximos, como distantes de onde é produzido (REBMANN *et al.*, 2014; MORANDI *et al.*, 2016; KÖNIG *et al.*, 2016).

Já o gene *HLA-E*, também pertencente a região de classe I, é expresso em diversos tecidos, nos quais interage como ligante de receptores inibidores CD94/NKG2 das células *natural killer* (NK) e de receptores de células T (TCR). À sua fenda peptídica, ligam-se preferencialmente peptídeos sinais oriundos da tradução do éxon 1 dos genes *HLA*. Isto funciona como um mecanismo de vigilância celular. Logo, quando a sua expressão é reduzida (hiporregulada) é um sinal de alteração celular, possivelmente associada a um estado patológico. Outro papel do *HLA-E* é como apresentador de antígenos a células T $\alpha\beta$, originados de uma situação de estresse ou infecção por patógenos (FORONI *et al.*, 2014).

O papel das moléculas *HLA-G* e *HLA-E* em condições não patológicas tem sido cada vez mais estudado. Ambas foram fortemente associadas a promoção da anergia de células efectoras da resposta imune, tal como das células NK, durante a tumorigênese (GONÇALVES *et al.*, 2016).

Outro gene não clássico de classe I, o *HLA-F* é expresso em células B, T, NK e monócitos. A molécula HLA-F é comumente encontrada no citoplasma, mas também já foi observada na superfície celular de linfócitos B, monócitos e trofoblastos. O seu papel ainda não foi bem estabelecido, porém infere-se que por se ligar a receptores inibidores, tais como LILRB1, LILRB2 (do inglês *leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily b, member 1* e *member 2*, respectivamente citados) e KIR (do inglês *killer-cell immunoglobulin-like receptor*), desempenhe papel importante na imunorregulação de respostas inflamatórias que envolvem células NK e linfócitos (BUKUR et al., 2012; FORONI et al., 2014).

Dentre os genes não HLA da região de classe I do MHC estão o *MICA* e o *MICB*, que apresentam expressão restrita a linhagens de células epiteliais e tumorais. MICA e MICB são sinalizadores do estresse, que podem ser expressos tanto na superfície celular ou serem encontrados na forma solúvel no meio extracelular (CHOY; PHIPPS, 2010). Portanto, assim como o HLA-G, MICA pode atuar em sítios próximos ou distantes de onde é produzido (BOUKOUACI et al., 2009).

Por último, outro gene presente no cromossomo 6 é o *HFE* (anteriormente nomeado *HLA-H*) que codifica molécula sem ligante conhecido e é mais expresso em células epiteliais, macrófagos do fígado e em células da cripta intestinal. O produto gênico é importante para a regulação da absorção do ferro e a sua alteração promove o desenvolvimento da hemocromatose clássica, que é uma doença autossômica recessiva provocada por desordem no metabolismo do ferro, devido a absorção excessiva deste mineral pelos enterócitos (FEDER et al., 1998; WANG; PANTOPOULOS, 2011).

Com relação à função de HLAs de classe I não clássicos, mas que não estão presentes no cromossomo 6, o produto do gene *CD1*, localizado em 1q23.1, desempenha papel importante na apresentação de antígenos lipídicos e glicolipídicos derivados de micobactéria, a células T $\alpha\beta$. O gene *FcRn*, localizado em 19q13.33, codifica para o receptor neonatal Fc, o qual viabiliza a passagem de IgG (imunoglobulina G), HLA-G, HLA-E e MICA pela placenta e o gene *ZAG*, localizado em 7q22.1, codifica uma proteína solúvel e independente de $\beta 2m$, com função não estabelecida (BLUMBERG et al., 2001; KULSKI et al., 2001).

2.2 ESTRUTURA E FUNÇÃO DO GENE *HLA-G*

O gene *HLA-G*, nomeado oficialmente pelo HGNC (*HUGO Gene Nomenclature Committee*), como gene do antígeno do complexo de histocompatibilidade principal, classe I (Ib), *G*, possui 4144 pb. Está localizado na região cromossômica 6p21.3, entre a posição 29826979 e 29831122, segundo o *Genome Reference Consortium Human Genome build 38* de 7 de maio de 2014 (GRCh38) e codifica para proteínas, também nomeadas HLA-G. Está localizado entre o gene *HLA-A*, distando 115 kb a montante, e o *HLA-F*, que está 103 kb a jusante.

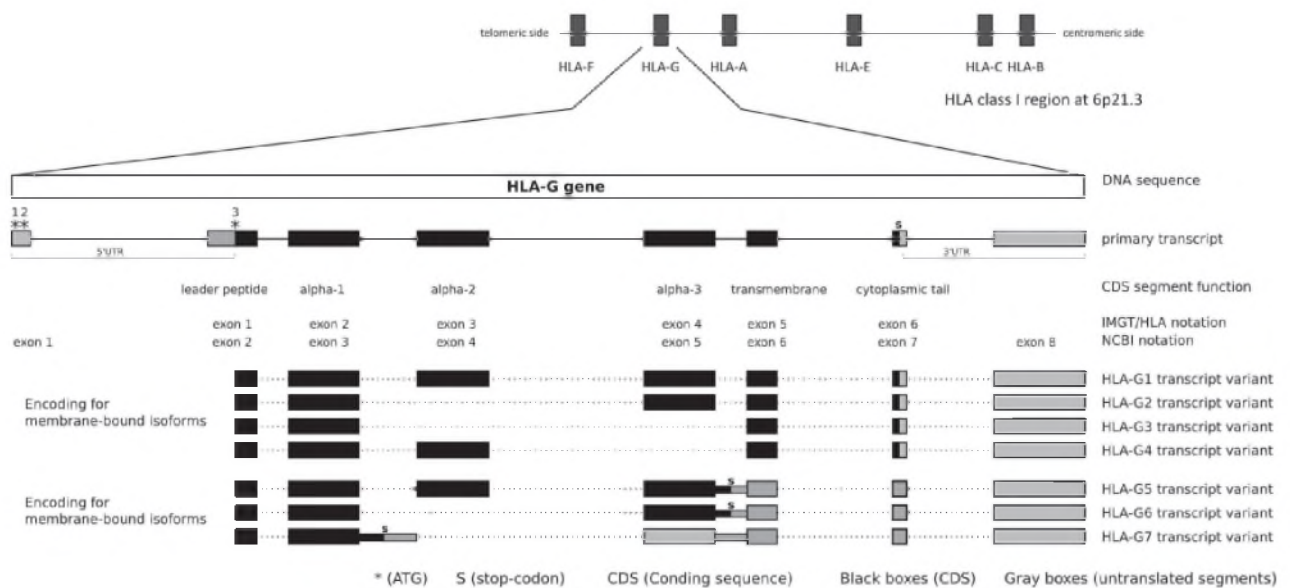
A primeira clonagem molecular do *HLA-G* correu em 1987, após ter sido obtido um fragmento de DNA por meio de clivagem com enzimas de restrição *Hind III*. Por essa razão foi primeiramente denominado *HLA-6.0* (6.0 kb) (GERAGHTY, D E et al., 1987). Em 1990, a molécula codificada por *HLA-6.0*, considerada semelhante a HLA-A, HLA-B e HLA-C (com 86% de similaridade), foi denominada HLA-G, sendo encontrada em abundância na interface materno-fetal promovendo a tolerância. Atualmente, sabe-se que esta molécula tem importante papel imunorregulador e é expressa em tecidos adultos imunoprivilegiados (MOREAU et al., 2009; MORANDI et al., 2016).

A estrutura do gene *HLA-G* (FIGURA 3) é similar a dos outros genes *HLA* de classe I. Mesmo assim, a sua função para a ativação da resposta imune como ocorre para HLA-A, HLA-B e HLA-DR é discutível (DIEHL et al., 1996). Isso se deve por sua expressão não ser ubíqua, como é para HLA-A e -B, fato que aliado a redução de suas variantes alélicas, diminui a variabilidade de peptídeos que esta molécula teria capacidade de apresentar para induzir uma imunoativação (MÜNZ et al., 1999; BOUTEILLER, LE; SOLIER, 2001).

Duas anotações existem para este gene como apresentado na FIGURA 4: uma do NCBI (SHERRY et al., 2001) e outra adotada neste trabalho, referente ao banco de dados IMGT/IPD (ROBINSON et al., 2015). Segundo o IMGT, o *HLA-G* contém 7 íntrons e 8 éxons codificadores da molécula. O éxon 1 codifica o peptídeo sinal, os éxons 2, 3 e 4 codificam respectivamente os domínios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$. O éxon 5 codifica o domínio transmembrana e os éxons 5 e 6 codificam a cauda citoplasmática da cadeia pesada. A existência de um códon de parada (UGA) no éxon 6 resulta na codificação de um polipeptídeo com cauda citoplasmática mais curta (constituído por 6 aminoácidos) (VEN, VAN DER et al., 2000). A presença deste códon de término de leitura no éxon 6 também determina a inibição da tradução dos éxons 7 e 8, considerados pertencentes a região 3' não traduzida (3'-UTR) deste gene (LEFRANC et al., 2005; CASTELLI;

VEIGA-CASTELLI; et al., 2014). Outra peculiaridade é que o domínio citoplasmático encurtado não apresenta motivos que desencadeiam a endocitose, o que prolonga a meia-vida das moléculas HLA-G quando expressas na superfície celular (PARK; AHN, 2003). O transcrito completo de *HLA-G* apresenta uma região codificadora contendo 1017 nucleotídeos que codificam para 338 aminoácidos.

FIGURA 3 – ESTRUTURA DO GENE *HLA-G* E SEUS TRANSCRITOS



FONTE: CASTELLI (2014).

NOTA: Acima é apresentada a organização (éxons e introns) do gene *HLA-G* com base em duas anotações: NCBI e IMGT/IPD, sendo esta última a adotada neste trabalho. Abaixo estão os diferentes transcritos pós-processamento alternativo. (---): Íntrons excisados. (■): Éxons traduzidos. (□): Éxons transcritos e não traduzidos.

2.2.1 Evolução do gene *HLA-G*

As estrutura do gene *HLA-G* se manteve preservada ao longo de sua origem. Existem evidências da seleção purificadora (conservadora) atuando sobre a região codificadora. Dessa forma, há favorecimento da eliminação de mutações deletérias e da permanência de mutações neutras (sinônimas) ou de pequeno impacto (não sinônimas que promovem a troca por aminoácido com propriedades físico-químicas semelhantes). Em contrapartida, foi observado o efeito da seleção balanceadora (diversificadora) nas regiões reguladoras 5'-URR (do inglês *5'-upstream regulatory region*) e na 3'-UTR (do inglês *3'-untranslated region*) de *HLA-G* (DONADI et al., 2011).

O conjunto de dezessete polimorfismos conhecidos para a região 3'-UTR de *HLA-G* foi descrito na forma de haplótipos nomeados de UTR e seguidos pela numeração (ex.: UTR-1 e UTR-46) (CASTELLI et al., 2017). Com relação a distribuição populacional, estas UTRs representam mais de 98% dos haplótipos observados em populações distantes, como a de Chipre e Brasil, apenas variando em relação a frequência na qual ocorrem (CASTELLI et al., 2017). Esta semelhança, com relação a manutenção da maioria dos haplótipos, demonstra a conservação da variabilidade proveniente de eventos anteriores á dispersão dos humanos da África. Este fato também é apoiado por dados publicados pelo projeto *1000 Genomes*, que evidenciou a presença de grande parte dos haplótipos sendo representada no mundo inteiro em frequências diversas. Outro relato marcante foi a descrição do gene *HLA-G* de uma amostra de Neandertal de 40 mil anos atrás, que revelou a existência de longa data da sequência do gene. O sequenciamento identificou a composição genotípica de *HLA-G* *01:01:01f/G*01:01:01:04/UTR-6 (haplótipo estendido: 5'-URR, região codificadora e 3'-UTR) com outro haplótipo ainda não encontrado nas populações atuais, mas próximo de *HLA-G**01:01:02:01 (região codificadora) e UTR-2 (3'-UTR). Portanto, todas as ocorrências demonstram que o *HLA-G* é um gene com haplótipos conservados e antigos (CASTELLI; RAMALHO; et al., 2014; SABBAGH et al., 2014).

Além disto, estes perfis de seleção purificadora e balanceadora são corroborados respectivamente, pela constatação de que as variações encontradas no gene *HLA-G* geralmente são provenientes de mutações sinônimas ou que ocorreram em regiões intrônicas. Ao passo que a região promotora concentra a maioria dos polimorfismos, o que se reflete numa maior diversidade genética em nível populacional (SABBAGH et al., 2014). Mesmo assim, essas informações podem apresentar baixa acurácia, devido à baixa cobertura do sequenciamento utilizado nos trabalhos até o momento e pela não inclusão de populações autóctones (nativas) (CASTELLI et al., 2017).

O perfil de distribuição dos haplótipos também demonstra a existência de alguns mais frequentes, associados à expressão diferencial de moléculas HLA-G. Por exemplo, o haplótipo UTR-1 é associado a uma menor expressão de HLA-G. Este mesmo perfil de expressão já foi descrito para polimorfismos da região promotora de *HLA-G* e variações que englobam ambas as regiões (5'-URR e 3'-UTR), demonstram que elas estão em desequilíbrio de ligação, provavelmente favorecendo a prevalência de determinada combinação, em detrimento de outra, de acordo com os fatores evolutivos envolvidos na seleção de cada população (CASTELLI et al., 2017).

2.2.2 Polimorfismos do gene *HLA-G*

Para o gene *HLA-G*, foram descritos e registrados um total de 1518 variações de único nucleotídeo (ou SNPs, do inglês *single-nucleotide polymorphisms*) no banco de dados do *dbSNP* no NCBI (SHERRY et al., 2001). Destas, 223 apresentam o alelo de menor frequência (*MAF*, do inglês *minor allele frequency*) superior a 0,01 descritas no Projeto *1000 Genomes* (ASHTON-CHESS et al., 2006b). Em termos de alelos *HLA-G* conhecidos, são oficialmente descritos no IPD-IMGT apenas 58 alelos, dos quais se originam até 18 proteínas diferentes, além de mais 2 alelos nulos (ROBINSON et al., 2015).

A região codificadora da cadeia pesada α de *HLA-G* concentra 15 variações com *MAF* igual ou superior a 0,05 (SHERRY et al., 2001; MACCARI et al., 2017). O éxon 2 codifica o domínio $\alpha 1$ e contém 7 SNPs com *MAF* > 0,05; o éxon 3 codifica o domínio $\alpha 2$ e contém 5 SNPs com *MAF* > 0,01; o éxon 4 codifica o domínio $\alpha 3$ e contém 4 SNPs com *MAF* > 0,05 e o éxon 5 contém 2 SNPs com *MAF* > 0,05. Ainda, o éxon 6 apresenta uma variação com *MAF* < 0,05 que origina um códon de parada prematuro, e quando traduzido forma uma proteína com domínio transmembrana e uma cauda citoplasmática encurtada (SHERRY et al., 2001).

Entre os alelos de maior frequência estão os do grupo *HLA-G*01:01*, que inclui o alelo de referência e primeiro a ser descrito (*HLA-G*01:01:01:01*), além de mais 4 variantes. Todos codificam para a mesma proteína e diferem por terem mutações sinônimas ou mutações em regiões intrônicas (MACCARI et al., 2017). Ainda destacam-se os alelos *HLA-G*01:01:01:01*, *HLA-G*01:01:02:01* e *HLA-G*01:04:01*, que representam quase 90% de todos os haplótipos observados para *HLA-G* (LEFRANC, 2011; GONZÁLEZ-GALARZA; TAKESHITA, LOUISE Y C; et al., 2015).

Com relação a região promotora do gene *HLA-G*, esta apresenta 37 variações já descritas na forma de 23 haplótipos (FIGURA 4), dos quais muitos estão em regiões correspondentes a elementos reguladores *cis*, que podem afetar a atuação e interação destas regiões com fatores transcricionais (SHERRY et al., 2001; HVIID et al., 2006; MOREAU et al., 2009). Variações em 14 sítios da região promotora apresentam frequência superior a 1% e 11 sítios apresentam frequência superior a 44%. As composições: *PROMO-G010101a* e *PROMO-G010102a* contemplam mais de 50% de todos os haplótipos descritos (CASTELLI; RAMALHO; et al., 2014; CASTELLI et al., 2017). Em síntese, a diversidade da região promotora poderia ser classificada em quatro grupos haplotípicos: *PROMO-010101*, *PROMO-010102*, *PROMO-0103* e *PROMO-*

0104, os quais ainda não são bem compreendidos com relação à importância na regulação da expressão gênica (CASTELLI et al., 2017).

FIGURA 4 -HAPLÓTIPOS DA REGIÃO 5'-URR DO GENE *HLA-G*

<i>HLA-G promoter</i> Haplotype	Cyprus (2n=370)	Brazil - (2n=630)	All samples (2n=1000)
PROMO-010101a	0.2297	0.2587	0.2480
PROMO-010101b	0.0568	0.0508	0.0530
PROMO-010101c	0.0324	0.0476	0.0420
PROMO-010101d	0.0027	0.0254	0.0170
PROMO-010101f	0.0486	0.0476	0.0480
PROMO-010101g	0.0135	0.0016	0.0060
PROMO-010101h	0.0027	0.0032	0.0030
PROMO-010101i	0.0054	0.0079	0.0070
PROMO-010101j	0.0054	0.0032	0.0040
PROMO-010102a	0.3676	0.2952	0.3220
PROMO-010102b	0.0027	0.0016	0.0020
PROMO-010102c	0.0027	0.0032	0.0030
PROMO-010102d	-	0.0111	0.0070
PROMO-010102e	0.0108	0.0048	0.0070
PROMO-0103a	0.0027	0.0397	0.0260
PROMO-0103c	-	0.0032	0.0020
PROMO-0103d	0.0432	0.0259	0.0260
PROMO-0103e	0.0162	0.0254	0.0220
PROMO-0103f	-	0.0016	0.0010
PROMO-0103g	-	0.0016	0.0010
PROMO-0104a	0.1568	0.1413	0.1470
PROMO-0104b	-	0.0079	0.0050
PROMO-0104c	-	0.0016	0.0010

FONTE: CASTELLI (2017).

NOTA: Apresentação das frequências relativas de haplótipos nomeados e caracterizados para a região promotora do gene *HLA-G* em duas populações, provenientes do Chipre e Brasil. *HLA-G promoter*: Promotor do *HLA-G*. *Haplotypes*: Haplótipos. *PROMO*: Prefixo utilizado para nomear haplótipos da região reguladora não traduzida a 5' de *HLA-G*. *Cyprus*: Chipre. *Brazil*: Brasil. *All samples*: Amostra total

Na região 3'-UTR de *HLA-G*, existem descritas 28 variações de nucleotídeo único, destas, 9 são descritas como sendo polimórficas (MAF > 0,01) e representam 95% da frequência de variantes observados nas populações (SHERRY et al., 2001). A nomenclatura indicada pelo prefixo UTR e diferenciada numericamente (FIGURA 5) foi elaborada em 2010. Desde então a maioria dos grupos de pesquisa a tem adotado para caracterizar suas amostras (CASTELLI et al., 2017).

FIGURA 5 – FREQUÊNCIAS DE HAPLÓTIPOS DA REGIÃO 3' NÃO TRADUZIDA DO GENE *HLA-G*.

<i>HLA-G</i> 3'UTR Haplotype	14bp	+3001	+3003	+3010	+3027	+3032	+3035	+3044	+3092	+3121	+3142	+3187	+3196	+3227	Cyprus (2n=370)	Brazil (2n=630)	All samples (2n=1000)
UTR-01	G	C	T	G	C	G	C	A	G	T	C	G	C	G	0.2486	0.2857	0.2720
UTR-02	GATTGFTCATGCC	C	T	C	C	G	C	A	G	T	G	A	G	G	0.2892	0.2524	0.2660
UTR-03	G	C	T	C	C	G	C	A	G	T	G	A	C	G	0.1405	0.1476	0.1450
UTR-04	G	C	C	G	C	G	C	A	G	T	C	A	C	G	0.0892	0.1048	0.0990
UTR-05	GATTGFTCATGCC	C	T	C	C	G	T	A	G	T	G	A	C	G	0.0622	0.0825	0.0750
UTR-06	G	C	T	G	C	G	C	A	G	T	C	A	C	G	0.0405	0.0175	0.0260
UTR-07	GATTGFTCATGCC	C	T	C	A	G	T	A	G	T	G	A	C	G	0.0784	0.0587	0.0660
UTR-08	GATTGFTCATGCC	C	T	G	C	G	C	A	G	T	G	A	G	G	0.0027	-	0.0010
UTR-10	G	C	T	C	C	G	C	A	G	T	G	A	G	G	0.0027	-	0.0010
UTR-13	G	C	T	C	C	G	T	A	G	T	G	A	C	G	0.0135	0.0032	0.0070
UTR-17	GATTGFTCATGCC	T	T	C	C	G	T	A	G	T	G	A	C	G	-	0.0048	0.0030
UTR-18	G	C	T	G	C	G	C	A	G	T	C	A	C	A	0.0162	0.0317	0.0260
UTR-20	G	C	T	G	C	C	C	A	G	T	C	A	C	G	-	0.0063	0.0040
UTR-27	G	C	C	G	C	G	C	A	T	T	C	A	C	G	0.0027	-	0.0010
UTR-44	GATTGFTCATGCC	C	T	C	C	G	T	A	G	C	G	A	C	G	0.0108	0.0048	0.0070
UTR-46	G	C	T	C	C	G	C	T	G	T	G	A	C	G	0.0027	-	0.0010

FONTE: CASTELLI (2017).

NOTA: Apresentação das frequências relativas de haplótipos nomeados e caracterizados para a região não traduzida a 3' (3'-UTR) do gene *HLA-G* em duas populações, provenientes do Chipre e Brasil. *HLA-G promoter*: Promotor do *HLA-G*. *Haplotypes*: Haplótipos. UTR: Prefixo utilizado para nomear haplótipos da região 3'-UTR de *HLA-G*. *Cyprus*: Chipre. *Brazil*: Brasil. *All samples*: Amostra total

Analisando isoladamente os polimorfismos da região 3'-UTR (considerando apenas o éxon 8), a montante está a inserção/deleção de 14pb (dbSNP: rs371194629, *Ins/Del* 14 pb), da qual a inserção é a variação mais antiga, por ser também encontrada tanto em gorilas, como em chimpanzés (DONADI et al., 2011). A *Ins* 14 pb também é conhecida por influenciar a estabilidade do mRNA (do inglês *messenger RNA*), por conter sítios de ligação e regulação de microRNAs, devido a presença de um códon de parada, que leva a formação de uma região 3'-UTR não traduzida alongada (ALVAREZ et al., 2009). O polimorfismo em questão é conhecido por estar em desequilíbrio de ligação com outros SNPs, como o localizado a jusante da inserção, o +3142G (dbSNP: rs1063320; C>G) e o +3187A (dbSNP: rs9380142; A>G), tendo sido esta combinação associada a menor estabilidade do mRNA.

Interessantemente, a análise conjunta de haplótipos da região promotora demonstra a existência de desequilíbrio de ligação com haplótipos da região 3'-UTR, que é capaz de influenciar a expressão e estabilidade do mRNA (ROUSSEAU et al., 2003; TAN; SHON; OBER, 2005). Portanto, a regulação da expressão de *HLA-G* está provavelmente associada ao efeito

cumulativo de variantes herdadas em conjunto e não apenas, variações isoladas (CASTELLI et al., 2017).

Os polimorfismos descritos para o gene *HLA-G* quando agrupados podem ser apresentados na forma de haplótipos estendidos, determinados tanto para a região reguladora 5' de *HLA-G* (FIGURA 6), como para a região 3' não traduzida de *HLA-G* (FIGURA 7) e a região codificadora. Considerando esta análise mais abrangente do gene, existem 200 haplótipos estendidos; destes, 15 apresentam frequência igual ou superior a 1%. Interessantemente, destacam-se pela maior frequência entre as populações, dois haplótipos estendidos e extremamente divergentes em relação a região regulatória, mas que produzem a mesma proteína, além de outros representado no QUADRO 1 (CASTELLI et al., 2017).

QUADRO 1 - HAPLÓTIPOS ESTENDIDOS DE MAIOR FREQUÊNCIA.

5'-URR	ALELO	3'-UTR
<i>HLA-G 010101a</i> ¹	<i>HLA-G*01:01:01:01</i>	UTR-1
<i>HLA-G 010102a</i> ¹	<i>HLA-G*01:01:02:01</i>	UTR-2
<i>HLA-G 0103</i>	<i>HLA-G*01:03</i>	UTR-5 ou UTR-17
<i>HLA-G 010101</i>	<i>HLA-G*01:01:01</i>	UTR-1, -4, -6 ou 27
<i>HLA-G 0104</i>	<i>HLA-G*01:04</i>	UTR-3, -13 ou -46
<i>HLA-G 010102</i>	<i>HLA-G*01:01:03</i>	UTR-7
<i>HLA-G 010102</i>	<i>HLA-G*01:01:02</i> ²	UTR-2

FONTE: Adaptado pela autora de Castelli (2017).

NOTA: ¹Haplótipos estendidos de maior frequência e divergência. ²Inclui as derivações alélicas, como *HLA-G*01:05N* e *HLA-G*01:06*. URR: Região reguladora não traduzida a 5'. 3'-UTR: Região não traduzida a 3'. UTR: Prefixo utilizado para nomear haplótipos da região 3'-UTR de *HLA-G*.

2.2.3 Regulação da expressão do gene *HLA-G*

A expressão de *HLA-G* foi primeiramente demonstrada como restrita aos tecidos fetais (trofoblastos), sendo sua função associada apenas à manutenção da imunotolerância materna. Análises posteriores evidenciaram a sua expressão contínua em células, como no timo (BLASCHITZ et al., 1997), além da expressão *de novo* na forma solúvel em indivíduos transplantados, com câncer ou infecções virais. Neste último contexto, o *HLA-G* estaria propiciando a inibição da resposta imune, viabilizando um mecanismo de escape das células infectadas com vírus (CAROSELLA et al., 2008; DAHL; HVIID, 2012).

Portanto, expressão de *HLA-G* restrita a certos tipos celulares evidencia que o controle da sua expressão gênica difere dos mecanismos presentes em genes *HLA* clássicos, tanto em nível

transcricional, como pós-transcricional. Não existe um consenso com relação à localização exata de onde se inicia a transcrição do gene *HLA-G*. Já foi sugerido que o início seria a 24 nucleotídeos antes do códon de início (ATG), mas existem evidências de que também estaria a 866 nucleotídeos de distância. Estes diferentes pontos de início de transcrição sugeridos para *HLA-G* podem ter relação com a variação na expressão deste gene, devido a fatores transcricionais diversos (MOREAU et al., 2009; CASTELLI et al., 2017).

A regulação basal do gene *HLA-G* é mediada por sequências reguladoras CCAAT *box* e um TATA *box* incomum (TCTTAA), que atuam como sítio de ligação para o complexo de transcrição basal dando início a transcrição. A sua região promotora (FIGURA 6) em sua totalidade, ainda é composta por elementos regulatórios proximais, localizados a cerca de -200pb à montante do primeiro códon (ATG) traduzido, e elementos distais específicos capazes de induzir ou reprimir a expressão gênica (SOLIER et al., 2001).

Apesar dos elementos regulatórios de *HLA-G* apresentarem uma organização semelhante a dos outros genes *HLA*, alterações nucleotídicas em suas sequências e a presença de novos elementos reguladores dão origem a uma regulação transcricional singular. Dentre estes elementos, formam um módulo de indução o intensificador A (*EhnA*), o elemento de resposta a interferon (ISRE, do inglês *interferon response elements*) 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 pode ser explicada apenas pela ação desses elementos. Na posição -38 do primeiro códon de início da tradução (ATG), é encontrado o elemento de resposta a progesterona (PRE, do inglês *progesterone response element*), que está sobreposto a sequência TATA *box* incomum. A progesterona é um hormônio esteroide imunomodulador secretado pelo corpo lúteo, após a ovulação, e pela placenta durante a gestação, sendo responsável pela manutenção do endométrio e pela implantação embrionária, além de ser secretado também pelas adrenais e pelo sistema nervoso central (YIE, S.; XIAO; et al., 2006). A ativação de PRE é mediada primeiro pela ativação e ligação da progesterona ao seu receptor. Após, este complexo formado atua interagindo com o elemento alternativo de resposta a progesterona que estimula a expressão de *HLA-G* (YIE, S.; LI; et al., 2006; YIE, S.; XIAO; et al., 2006; MOREAU et al., 2009). Alguns pesquisadores demonstraram o aumento da expressão de *HLA-G* *in vitro*, utilizando a progesterona em células endoteliais de artérias coronarianas, células endoteliais da aorta e células musculares da artéria coronariana (SHESHGIRI et al., 2008). Células de coriocarcinoma da linhagem JEG-3 e citotrofoblastos também já foram estimuladas (YIE, S.;

LI; et al., 2006), assim como células-tronco mesenquimais (IVANOVA-TODOROVA et al., 2009).

A montante de PRE, distando -101 a -154 de ATG, ainda na 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 multiproteicos reguladores da transcrição (membros da família RFX, CREB/ATF e NFY). As sequências X2 e Y diferem dos promotores dos genes *HLA* clássicos e por isso não são funcionais, sendo 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, como observado para os genes *HLA* clássicos (GOBIN; ELSSEN, VAN DEN, 2000; MOREAU et al., 2003; CAROSELLA et al., 2008).

O intensificador A, composto pelas subunidades $\kappa B1$ e $\kappa B2$, está a cerca de -198 e -172 de ATG, e também apresenta alterações em sua sequência de nucleotídeos. Diferentemente do que ocorre para outros genes *HLA*, liga-se a NF- κB apenas na forma homodimérica, quando constituída por subunidades p50 (LEFEBVRE et al., 2001). Esta subunidade p50 não apresenta um domínio de transativação, logo também não deve transativar na forma p50/p50 (GOBIN; ELSSEN, VAN DEN, 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) (SOLIER et al., 2001).

Adjacente ao intensificador A (a cerca de -171 a -161 de ATG), está o elemento ISRE (*interferon-sensitive response element* ou elemento de resposta ao interferon), que supostamente responderia a sinalização estimulada por IFN γ , após interagir com fatores da família de reguladores do interferon (ativador IRF-1 e inibidores IRF-2 e IRF-8). O IFN γ é a principal citocina indutora da expressão dos genes *HLA* de classe I, mas o gene *HLA-G* apresenta divergências na região que responde a esta citocina, o que o torna irresponsivo a ela. Também sequências candidatas que poderiam ser estimuladas por interferon, como o sítio de ativação por interferon-gama (*interferon-gamma activated site* ou GAS) localizado a -741 e a -733pb à montante de ATG foram descritos, mas não são ativados por IFN γ . Entretanto, outro elemento ISRE identificado ao lado deste elemento GAS não-funcional (a -754 e -743pb à montante de ATG) foi capaz de induzir a expressão de *HLA-G*, mediante o estímulo com IFN β (LEFEBVRE et al., 2001).

Distante do intensificador A, foram descritos três sítios correspondentes a elementos CRE/TRE (do inglês *cyclic AMP-response element/TPA-response element*, onde TPA significa *12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*). Estes elementos estão dispersos pela região promotora distal

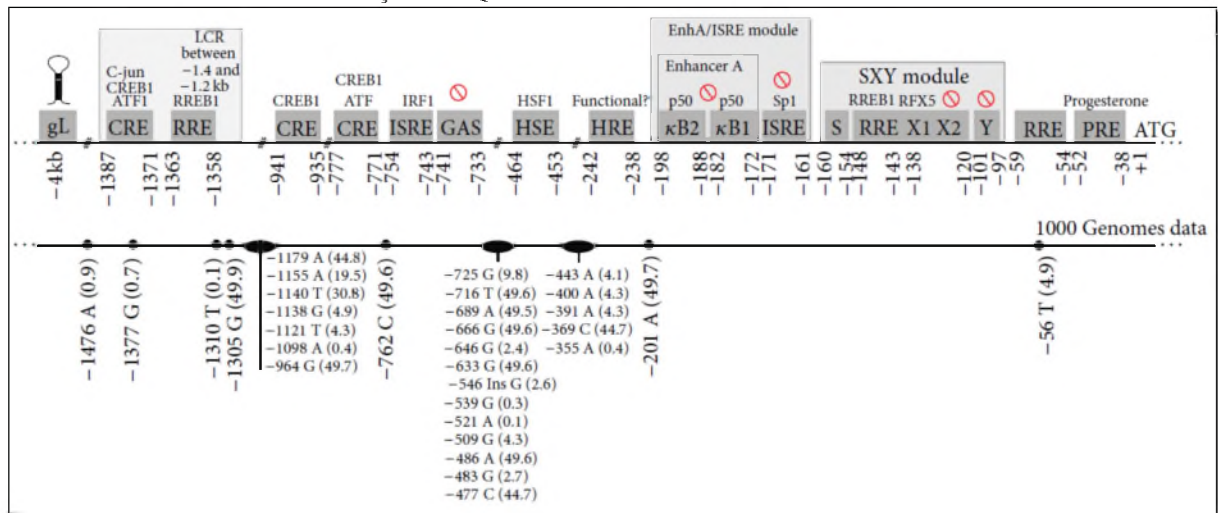
e ensaios *in vitro* evidenciaram a ligação destes com CREB1 (do inglês *cAMP responsive element binding protein 1*) e AP-1 (do inglês *activator protein 1*), formado por ATF1 (do inglês *activating transcription factor 1*) e c-Jun (FLAJOLLET et al., 2009). Um destes elementos está localizado dentro da região controladora de *locus* (*Locus Control Region*, LCR) localizada a 1,2Kb à montante de ATG na região promotora distal. Esta região é considerada muito importante para a expressão de *HLA-G*, por estar associada com a manutenção da cromatina aberta, viabilizando a transcrição e expressão gênica (SOLIER et al., 2001; TAN et al., 2005).

Considerando os microambientes nos quais *HLA-G* já foi descrito sendo expresso *in vivo*, também foram inferidos elementos regulatórios promissores em sua região gênica promotora proximal. Por exemplo, o HSE (elemento de resposta *heat-shock*) está localizado a -464 e -453 à montante de ATG. O HSE possivelmente interage com HSF-1 (fator 1 de *heat-shock*) induzindo a expressão do gene *HLA-G* (IBRAHIM et al., 2000; MOREAU; FLAJOLLET; CAROSELLA, 2009). Outro elemento estudado, e recentemente com função esclarecida, é HRE, o elemento de resposta a hipóxia, que foi encontrado a -242, a -966 (G) de ATG e o outro HRE no éxon 2 (+281). Os HREs de maior influência seriam os localizados na região codificadora e o HRE a -966 de ATG, sendo que a interação concomitante de ambos com HIF-1 (do inglês *hypoxia inducible fator 1*) favoreceria a transcrição gênica (GARZIERA et al., 2017). Estudos já demonstraram que este estímulo da hipóxia induz HRE em trofoblastos (KILBURN et al., 2000) e células tumorais (GARZIERA et al., 2017), porém o mesmo ainda não pode ser observado em células endoteliais (SHESHGIRI et al., 2008).

Também são encontrados ao longo de toda a região promotora (proximal e distal) de *HLA-G* elementos repressores da transcrição, como 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), que é capaz de recrutar histonas deacetilases (HDAC1), CtBP1 e CtBP2 (*C-terminal binding proteins* ou proteínas de ligação C-terminal), que fazem parte do complexo CtBP, o qual atua como repressor, remodelando a cromatina para impedir a transcrição gênica (FLAJOLLET et al., 2009). Outra sequência supressora da expressão do gene *HLA-G* foi descrita estando a 4 kb à montante do início da transcrição de *HLA-G*, situado sobre uma sequência LINE-1 (do inglês *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 formação de grampos podendo interagir diretamente ou indiretamente

com a região promotora de *HLA-G*, culminado na inibição da ligação de fatores transcricionais ao gene (IKENO et al., 2012).

FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *HLA-G*



FONTE: CASTELLI (2014)

NOTA: O número das posições tem como referência a sequência NG_029039 e a adenina do primeiro códon (ATG) como nucleotídeo +1 (na posição 5867 de NG_029039). (●): Sítios com variação considerando 1092 indivíduos de 14 populações estudadas no projeto *1000 Genomes*, 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 *locus* (candidato)); CRE (elemento de resposta a cAMP); RRE (elemento de resposta a Ras); ISRE (elemento de resposta estimulado por IFN); GAS (sítio ativado via IFN γ); HSE (elemento *heat-shock*); HRE (elemento de resposta a hipoxia); PRE (elemento de resposta a progesterona); *Enhancer A* ou intensificador A (sítios de ligação para NF- κ 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 *heat-shock* 1); Sp1 (fator Sp1 de transcrição); RFX5 (proteína RFX5 de ligação ao DNA - família RFX).

Interessantemente, a regulação da expressão do gene *HLA-G* a nível pós-transcricional depende da própria constituição haplotípica dos transcritos que produz. Os RNAs mensageiros resultantes podem apresentar uma região 3' não traduzida relativamente grande por conta da existência de um códon de parada antecipado no éxon 6. Com isso, ocorre a alteração da estabilidade destes transcritos, devido a presença de polimorfismos com afinidade maior ou menor a microRNAs. Também a presença do elemento regulador rico em “AU”, que corresponde ao sinal de poliadenilação característico de eucariotos, influencia no transporte, na estabilidade e na eficiência de tradução dos mRNAs (CHEN; SHYU, 1995). Polimorfismo em ilha CpG completa esta regulação, podendo afetar a metilação e disponibilidade do DNA durante transcrição (OBER et al., 2003).

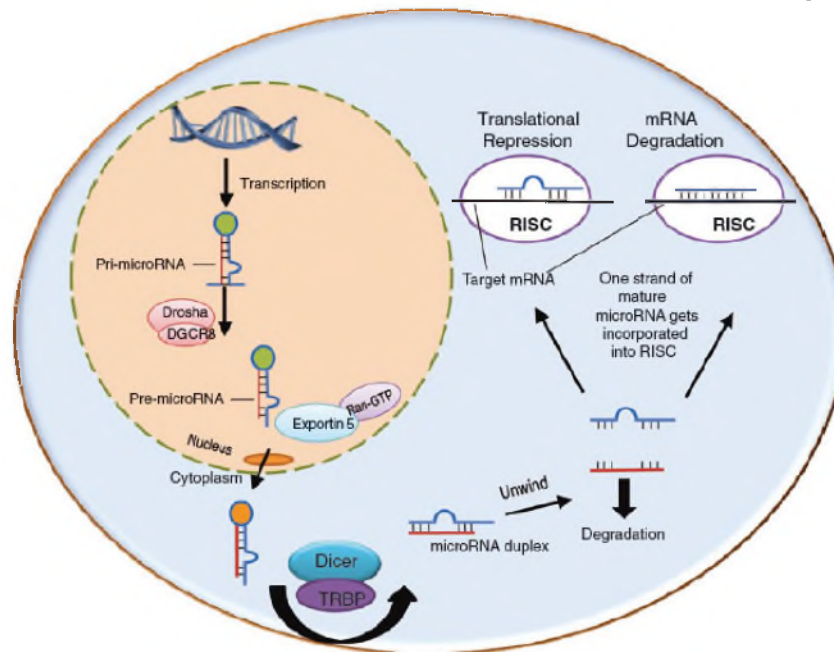
A influência de todos os elementos descritos e dos fatores transcricionais aliados com as variações genéticas, evidenciam a meticulosa regulação gênica na qual o *HLA-G* está envolvido. Além disso, as discordâncias nos resultados de estudos *in vitro* e *in vivo* utilizando células de melanoma, as quais são conhecidas por expressarem elevadas quantidades da molécula HLA-G, demonstram a importância do microambiente e a melhor compreensão da regulação gênica para viabilizar a estimulação do *HLA-G* (CHANG et al., 2003).

2.2.3.1 A regulação negativa da expressão do gene *HLA-G* via microRNAs

Os microRNAs (miRNAs) são RNAs não codificadores (com cerca de 22 nucleotídeos), conhecidos por desempenharem a função biológica de regulação pós-transcricional de vários genes envolvidos com mecanismos celulares de diferenciação e desenvolvimento celular (apoptose, hematopoiese e tumorigênese) (BARTEL, 2004). Estas pequenas moléculas podem atuar na supressão gênica, ao se ligar a região 3' de mRNAs inibindo a tradução ou desencadeando a degradação destes (BARTEL, 2009). O primeiro microRNA foi descrito em 1993. Atualmente, é estimado que ocorra regulação mediada por microRNAs em cerca de 30% dos genes em humanos e foram descritos mais de 3000 microRNAs, transcritos a partir de mais de 500 genes (LEWIS et al., 2005).

A biogênese dos microRNAs (FIGURA 7) apresenta uma via comum, a qual se inicia no núcleo das células e se completa no citoplasma. Após esta etapa de processamento, a fita de RNA associada ao complexo de silenciamento induzido por RNA ou RISC (do inglês, *RNA-induced silencing complex*) pode silenciar mRNAs via pareamento total com o sítio de nucleação (do inglês *seed sequence*) do transcrito alvo (CARTHEW; SONTHEIMER, 2009; TREIBER et al., 2012).

FIGURA 7 - BIOGÊNESE DE microRNAS E SEUS MECANISMOS DE REGULAÇÃO GÊNICA.



FONTE: MAS et al. (2013)

NOTA: A formação de microRNAs ocorre a partir do núcleo com a transcrição via RNA polimerase II de alvos específicos, que podem estar localizadas em íntrons, éxons ou em regiões intergênicas. Os transcritos primários ou pri-miRNA (~70 pb), contém a sequência do microRNA maduro, que forma uma estrutura em grampo. O pri-miRNA é reconhecido pelo complexo composto por ribonucleases III, como a Drosha e o DGCR8 (do inglês *digeorge syndrome critical region gene 8*). Este complexo cliva a região de curvatura do grampo formando o pré-miRNA, que é reconhecido pela exportina-5 (Ran-GTP-dependente), que o carrega do núcleo para o citoplasma. No citoplasma a endonuclease de RNA III, a DICER, realiza a clivagem da estrutura característica do grampo, formando uma molécula de RNA dupla-fita (19 a 25 pb). A partir do miRNA dupla fita formado, uma fita é transferida para a proteína Argonata 3 e a outra é degradada. A fita de RNA mantida se associa a RISC (do inglês, *RNA-induced silencing complex*) e desta forma pode silenciar mRNAs via pareamento total (ou extensivo) do transcrito alvo, levando a clivagem e degradação do mRNA, ou via inibição da tradução quando o pareamento é parcial.

Quando o RISC não apresenta alvo intracelular, o microRNA pode ser exportado dentro de exossomos (partículas derivadas da via de reciclagem endocítica, apresentando de 40 a 100 nm), ligado a proteínas carreadoras ou dentro de microvesículas (produzidas pela exocitose, apresentam de 50 a 100 nm). Estes microRNAs circulantes foram primeiramente descritos em 2007. Eles podem atuar de forma sistêmica no organismo, ligando-se a alvos celulares distantes de onde são produzidos. Podem ser excretados na urina, na saliva ou outros fluidos, permanecendo circulantes (SCIÂN; MALUF; MAS, 2013; MAS *et al.*, 2013).

A estabilidade de microRNAs circulantes no sangue periférico e a variabilidade deles, podem refletir vários aspectos do estado fisiológico em humanos. Tem o potencial para serem utilizados no monitoramento contínuo do progresso de doenças ou tratamentos como potenciais biomarcadores e/ou alvos para terapias em diversas áreas, como no contexto da imunologia dos transplantes (SHAN et al., 2011). O “padrão ouro” para o diagnóstico de rejeições imunológicas no

enxerto são as biópsias, porém é um método muito invasivo. Portanto, o uso de métodos menos invasivos que detectem as alterações moleculares, como a detecção de miRNAs, que precedem as alterações histológicas e outras variações fenotípicas, podem vir a contribuir para o melhor tratamento dos pacientes transplantados (HARTONO et al., 2010).

A regulação epigenética do gene *HLA-G* e sua associação a pré-eclâmpsia e a aborto recorrente também estão sendo evidenciados. Foram descritos alguns microRNAs capazes de se ligar a região 3'-UTR do mRNA de *HLA-G*, reprimindo a expressão deste gene em células de tecidos saudáveis.

Entre os microRNAs com potencial em regular negativamente a expressão de *HLA-G*, destaca-se a família miR-148/152, que é constituída pelo hsa-miR-148a, hsa-miR-148b e o hsa-miR-152. Estes microRNAs são expressos em tumores e tecidos normais, principalmente em células-tronco. Todos os membros apresentam o mesmo sítio de nucleação no gene *HLA-G*, localizado na região entre +3110 a +3150 da 3'-UTR, o que engloba os polimorfismos +3121 (dbSNP: rs138249160; T>C) e +3142 (dbSNP: rs1063320; C>G). Outro microRNA de interesse para a regulação negativa de *HLA-G* é o hsa-miR-139-3p, que apresenta alta especificidade para a região a montante de 3'-UTR, localizado entre +3095 e +3115 do gene, a qual não é polimórfica. Portanto, este último microRNA é um bom candidato a regulação específica de *HLA-G* sem ter efeito sobre múltiplos genes (PORTO et al., 2015).

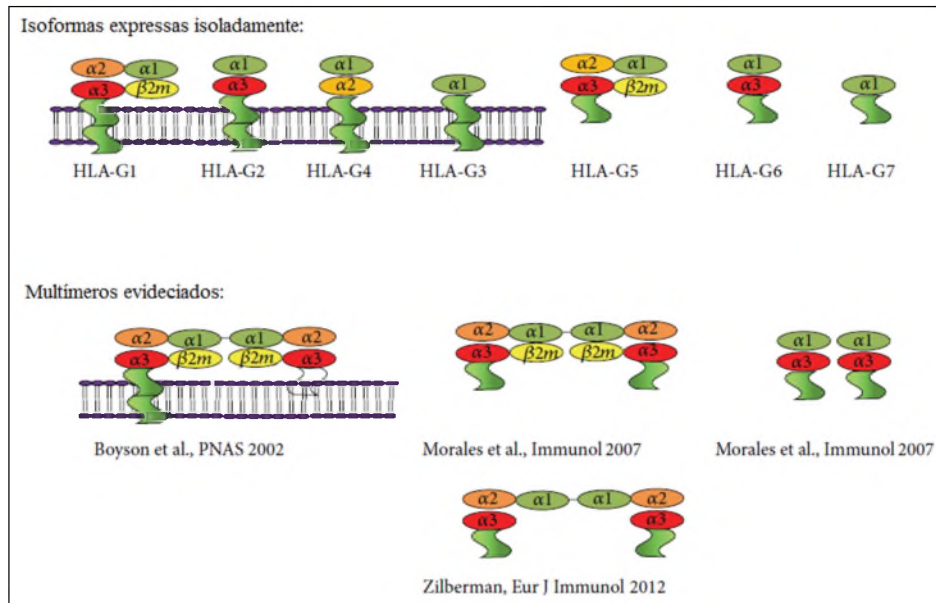
Além disso, o hsa-miR-148a vem sendo foco de diversos estudos, envolvendo além da regulação negativa da expressão de *HLA-G*, a regulação do gene *HLA-C*. A interação deste microRNA com a região 3'-UTR de transcritos *HLA-C* seria um mecanismo que estaria favorecendo a infecção pelo HIV-1, pela repressão da tradução deste *HLA* de classe I (CELSI et al., 2013). Pelo fato da infecção viral também estar associada a maior produção de *HLA-G* (TURK et al., 2013), possivelmente exista uma competição entre alvos de microRNAs. Neste caso, teríamos o desfavorecimento da ligação com a região 3'-UTR de transcritos *HLA-G* durante a infecção viral, o que estaria disponibilizando os transcritos de *HLA-G* para tradução, culminando no mecanismo de escape da resposta imune, juntamente com a diminuição da produção de *HLA-C*. Em suma, a múltipla ação de um microRNA em vários alvos parece frequente e deve ser investigada, principalmente por serem potenciais imunorreguladores da resposta imune e novos alvos a serem explorados no contexto dos transplantes.

2.2.4 Isoformas de HLA-G

O amplo papel do HLA-G na manutenção e produção da autotolerância, advém da existência das diversas isoformas descritas, as quais são capazes de atuar em sítios tanto distantes, como próximos de onde é produzido. Esta molécula apresenta sete isoformas conhecidas (FIGURA 8). A mais completa é a HLA-G1, a qual é constituída por domínios globulares (domínios $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$, transmembrânicos e citoplasmáticos) e uma cadeia leve ($\beta 2m$), a qual não está necessariamente presente.

Quando o transcrito primário de *HLA-G* é reorganizado, recombinando os éxons de diferentes maneiras, originam-se as formas alternativas de mRNA. A tradução destes pode formar até quatro moléculas HLA-G ligadas a membrana celular (HLA-G1 a -G4) e três moléculas solúveis que apresentam a região transmembrana por uma pequena cauda hidrofílica, codificada pela sequência 5' do íntron 4 (HLA-G5 e -G6) ou íntron 2 (HLA-G7) (VEN, VAN DER et al., 2000). Além destas três formas solúveis, HLA-G1 pode se tornar solúvel via clivagem proteolítica mediada pela metaloproteinase 2 (RIZZO et al., 2013). Ainda, as moléculas HLA-G podem formar dímeros, via ligação por pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteína na posição 42 (Cys41-Cys42) e na posição 147 (Cys147-Cys147), exceto a isoforma HLA-G3 (BOYSON et al., 2002; GONEN-GROSS et al., 2003). Esta capacidade torna os sítios de ligação de HLA-G do domínio $\alpha 3$ mais acessíveis aos seus receptores, tornando também os dímeros mais eficientes na interação com seus ligantes, quando comparados às formas monoméricas (SHIROISHI et al., 2003; EZEAKILE et al., 2014; NARDI et al., 2016).

FIGURA 8 – POSSÍVEIS ISOFORMAS E CONFORMAÇÕES DE HLA-G SOLÚVEL OU LIGADO A MEMBRANA CELULAR.



FONTE: MODIFICADO PELO AUTOR, DE ALEGRE et al. (2014).

A expressão de HLA-G é restrita a condições fisiológicas específicas, tendo sido também observado em trofoblastos da interface materno-fetal (GERAGHTY, DANIEL E et al., 1987), em células do timo (CRISA et al., 1997), da córnea (DISCORDE, LE et al., 2003), da matriz da ungueal (ITO et al., 2005), pâncreas (CIRULLI et al., 2006), monócitos (MOREAU et al., 1999) e células endoteliais progenitoras (BLASCHITZ et al., 1997). Outras populações celulares com potencial imunorregulatório, nas quais foram detectadas a expressão de HLA-G incluem células T e células-tronco mesenquimais (IVANOVA-TODOROVA et al., 2009).

Com relação às isoformas solúveis de HLA-G, estas podem ser detectadas em fluidos biológicos variados. As formas solúveis ocorrem no sangue periférico e no líquido amniótico (REBMANN; PFEIFFER; PÄSSLER, M; et al., 1999), ascites (SINGER et al., 2003), fluido cerebrospinal (FAINARDI et al., 2016) e esperma (YAO et al., 2014). No entanto, estas isoformas apresentam formas de mensuração susceptíveis a variações, dependentes de como os fluidos foram coletados e armazenados. Ao exemplo dos estudos realizados a partir de amostras de plasma sanguíneo, estabilizado com heparina ou amostras de soro, os quais apresentam quantificações inferiores a amostras de plasma estabilizadas com EDTA. É sugerido que esta alteração se deva ao sequestro de moléculas solúveis em coágulos formados em amostras não estabilizadas (RUDSTEIN-SVETLICKY et al., 2006).

Além da expressão em membrana ou solúvel em sangue periférico, a molécula HLA-G pode ser dispersa através de vesículas extracelulares (EVs) secretadas por tipos celulares

específicos (trofoblastos, células estromais mesenquimais e tumorais). As moléculas disseminadas por EVs são atuantes na imunotolerância e na remodelação de tecidos, como nas fases iniciais da gestação (REBMANN et al., 2016) e na promoção do escape da imunidade, no contexto da expressão *de novo* do HLA-G, como detectado em pacientes com tumores ou infecções crônicas.

A expressão das isoformas também interfere na produção de outras moléculas, como o HLA-E, o qual necessita do peptídeo sinal proveniente das moléculas HLA de classe I, como do HLA-G, para ser externalizado e expresso ligado a membrana celular. A análise comparativa de células transfectadas para as isoformas incompletas HLA-G2, -G3 e -G4 *versus* células transfectadas para a isoforma completa, HLA-G1, demonstraram que a expressão desta última isoforma possibilita a maior expressão de HLA-E, que as outras linhagens celulares (ULBRECHT et al., 2004; ZHAO et al., 2012). Como o peptídeo sinal produzido a partir do gene *HLA-G* é igual independente da isoforma produzida, esta diferença na produção foi atribuída a maior capacidade da isoforma completa ligada a membrana, em interagir como chaperona para moléculas HLA-E. A co-expressão de HLA-G e HLA-E parece ser frequente (MORANDI; PISTOIA, 2014), como em células reguladoras, tendo sido observado em células-tronco mesenquimais derivadas de cordão umbilical (STUBBENDORFF et al., 2013) e em células-tronco pluripotentes. Em co-cultura com células T citotóxicas estas células inibem o mecanismo de reconhecimento celular e a ativação da resposta imune (KIM et al., 2013).

As moléculas completas solúveis, do tipo HLA-G5, e as moléculas completas expressas ligada a membrana celular, HLA-G1 (ou solúvel quando clivada, como sHLA-G1), são as isoformas moleculares mais ativas, mais produzidas e estudadas. Ambas apresentam efeito aditivo na inibição da citólise mediada por células NK, sendo HLA-G5 a isoforma mais potente (ZHANG et al., 2014).

Ademais, as isoformas solúveis completas já foram associadas, em diversos trabalhos, a perfis de imunotolerância naturais. No estudo realizado por Jin et al. (2012), foi investigada a manutenção da tolerância a enxertos renais, logo após o transplante (adulto) em 40 pacientes. Com isso, foram analisadas as rejeições e a função renal após três meses do transplante. Entre as amostras que apresentaram elevadas concentrações da isoforma solúvel HLA-G5, foi observada correlação entre os níveis de sHLA-G no soro e uma menor incidência de episódios de rejeição. Portanto, imediatamente após o transplante, o HLA-G possivelmente já participe na indução da tolerância, tendo provável efeito sinérgico aos tratamentos imunossupressores. Esta constatação não significa que baixas concentrações do HLA-G estejam relacionadas a rejeição, mas que

determinados pacientes submetidos a um estresse e alteração fisiológica associada a inflamação, podem ter maior capacidade imunorregulatória que outros.

Já no trabalho de Qiu et al. (2006), foi analisada a presença de sHLA-G no soro de 65 pacientes transplantados renais. No período pré-transplante, foi observada a presença de sHLA-G nestes pacientes adultos. 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 sHLA-G negativo. Por meio destes e outros resultados revisados no QUADRO 2, pesquisadores têm demonstrado que sHLA-G apresenta uma relação positiva com a recuperação e imunorregulação da rejeição nos transplantes.

QUADRO 2 – REVISÃO DE ESTUDOS RELACIONADOS A QUANTIFICAÇÃO DE sHLA-G.

FONTE	AMOSTRA ESTUDADA	PROCESSO ASSOCIADO	FORMA DE ESTUDO	RESULTADOS DOS NÍVEIS DE sHLA-G ENCONTRADOS
Rebmann et al. (1999)	Homens (n=42) e mulheres (n=50).	Relação de alelos <i>HLA-G</i> e níveis plasmáticos de sHLA-G.	Quantificação de sHLA-G no plasma via teste ELISA.	Homens: $24,90 \pm 3,0$ ng/mL e mulheres: $20,10 \pm 2,1$ ng/mL.
Rudstein-Svetlicky et al. (2006)	Amostras de plasma e soro coletadas de 106 indivíduos.	Comparação das quantificações de sHLA-G no plasma e no soro de indivíduos saudáveis.	Quantificação de sHLA-G no plasma e no soro via teste ELISA.	sHLA-G no plasma: $38,60 \pm 5,00$ ng/mL e no soro: $25,00 \pm 4,60$ ng/mL. Foi realizada comparação dos níveis de sHLA-G entre homens e mulheres e não foi evidenciada diferença entre estes grupos.
Luque et al. (2006)	Pacientes transplantados de coração que passaram por tratamento pré e pós-operatório intravenoso (n=19), indivíduos não transplantados (n=20).	Comparações de quantificações de sHLA-G no soro de pacientes com maiores e menores níveis desta molécula e a relação com episódios de rejeição.	Quantificação de sHLA-G no soro via teste ELISA.	Pacientes transplantados do coração com elevada produção de sHLA-G: >50 ng/mL, com baixa: 0-30 ng/mL, indivíduos controles: 18 ng/mL. Foi observada a associação positiva com o aumento da medicação de imunossupressão e o aumento nos níveis de sHLA-G no soro, principalmente 3 semana pós-transplante. Na 1ª semana pós-transplante foi detectado o aumento dos níveis de sHLA-G.
Zarkhin et al. (2011)	Pacientes transplantados pediátricos e adultos de fígado. Destes, 13 com tolerância operacional, 8 pacientes com rejeição, 21 estáveis e 21 indivíduos saudáveis.	Comparação dos níveis de sHLA-G no soro de pacientes pediátricos e adultos, sendo tolerantes, estáveis ou com episódios de rejeição.	Quantificação de sHLA-G no soro via teste ELISA.	Pacientes tolerantes apresentaram: 146,43 ng/mL, pacientes estáveis: 24,57 ng/mL, pacientes com rejeição: 4,45 ng/mL, pacientes controles da ala pediátrica: 1,89 ng/mL e pacientes controles adultos: 7,96 ng/mL. O sHLA-G foi considerado um potencial marcador de pacientes com capacidade de desenvolver a tolerância operacional, principalmente quando o transplante é realizado abaixo dos 19 anos. Também não foi encontrada variação nos níveis de sHLA-G entre homens e mulheres.
Poláková et al. (2011)	Amostras de soro (n=26) e plasma (n=41) de indivíduos saudáveis.	Análise da variação nos níveis de sHLA-G em função do modo pelo qual o sangue é processado anteriormente a análise.	Quantificação de sHLA-G no plasma e soro via teste ELISA com luminol.	As quantificação de sHLA-G obtidas no plasma foram significativamente superiores àquelas obtidas no soro. Os níveis de sHLA-G em homens (RLU $\cong$ 400; n=12) foi inferior ao das mulheres (RLU $\cong$ 500; n=18). RLU: <i>relative light units</i> .
Qiu et al. (2006)	Pacientes transplantados renais (n=66), sendo parte pacientes com rejeição (n=39) e parte de pacientes transplantados estáveis (n=26).	Comparação da presença ou ausência de sHLA-G e anticorpos anti-HLA no soro dos pacientes transplantados.	Quantificação via teste ELISA com a detecção positiva ou negativa de sHLA-G nas amostras de soro com base na amostra controle negativa.	A presença de sHLA-G foi associada a menor quantificação de anticorpos anti-HLA em pacientes sem rejeição. Não foi encontrada diferença com relação ao sHLA-G em pacientes transplantados de doadores vivos <i>versus</i> pacientes transplantados de doadores falecidos.

CONTINUAÇÃO DO QUADRO 2 - REVISÃO DOS ESTUDOS RELACIONADOS A QUANTIFICAÇÃO DE sHLA-G.

FONTE	AMOSTRA ESTUDADA	PROCESSO ASSOCIADO	FORMA DE ESTUDO	RESULTADOS DOS NÍVEIS DE sHLA-G ENCONTRADOS
Rebmann et al. (2009)	Pacientes transplantados renais (n=32), de rim e pâncreas (n=29) e indivíduos saudáveis (n=126).	Comparação entre sHLA-G e sHLA-I, demonstrando qual dentre os dois é o melhor marcador de pacientes com sucesso na aceitação de seus aloenxertos.	Quantificação de sHLA-G no plasma via teste ELISA.	Pacientes transplantados renais apresentaram: 17,3±1,8 ng/mL de sHLA-G pacientes transplantados de rim e pâncreas: 19,6±2,6 ng/ml e indivíduos não transplantados do grupo controle apresentaram: 22,9±1,5 ng/mL de sHLA-G. O sHLA-G demonstrou ser melhor marcador da aceitação de aloenxertos, do que sHLA-I.
Almasood et al. (2011)	Pacientes transplantados do coração (n=82) e grupo controle de indivíduos não transplantados (n=10).	Análise de associação dos níveis de sHLA-G e outros biomarcadores com a classes de falha de enxerto.	Quantificação de sHLA-G no soro via teste ELISA.	Não foi encontrada associação entre sHLA-G e as classes de falha do enxerto. Os indivíduos do grupo controle apresentaram níveis entre 22 a 40 U/mL, equivalente a 8,8 a 16 ng/mL. Os indivíduos transplantados de coração apresentaram níveis de 36 a 98 U/mL, equivalente a 14,4 a 39,2 ng/mL.
Lu et al. (2011)	Pacientes transplantados renais (n=66).	Análise da expressão de HLA-G em células T CD4+ e CD8+ em pacientes estáveis e com rejeição.	Quantificação de HLA-G em células T CD4+ e CD8+ via citometria de fluxo.	Foi detectada a queda na expressão de HLA-G em pacientes estáveis no pós-transplante, seguido de um aumento. Pacientes com rejeição tiveram queda da expressão após o primeiro mês, mas ainda mantiveram a expressão maior que no pré-transplante.
Jin et al. (2012)	Pacientes transplantados renais (n=40), com tratamento pré e pós-operatórios de imunossupressão intravenosa.	Pacientes transplantados renais (n=40), com tratamento pré e pós-operatórios de imunossupressão intravenosa.	Quantificação de sHLA-G no soro via teste ELISA.	Pacientes com níveis elevados apresentaram níveis de sHLA-G de 378,77 ng/mL, pacientes com níveis médios apresentaram de 100 a 200 ng/mL e pacientes com níveis baixos ficaram com 98,69 ng/mL. Pacientes com sHLA-G elevado apresentaram menos episódios de rejeição. Foi evidenciado um papel complementar de sHLA-G atuando em conjunto com as terapias de imunossupressão no contexto do estabelecimento da imunotolerância.

2.2.5 Receptores de HLA-G

A inibição da resposta imune via HLA-G é descrita por sua interação com receptores leucocitários semelhantes a imunoglobulinas da subfamília B, membros 1 e 2 (LILRB1 e LILRB2) e de forma exclusiva com o receptor semelhante a imunoglobulina das células NK, o KIR2DL4 (do inglês *killer cell immunoglobulin-like receptor, 2 domains, long cytoplasmic tail 4*) (SHIROISHI et al., 2003; APPS et al., 2008). Também já foi descrito o potencial de HLA-G em estimular a expressão destes receptores inibidores, incluindo LILRB2, em células apresentadoras de antígeno, NK e células T (LEMAOULT et al., 2005). Além da interação de HLA-G com CD8, atuando na indução da apoptose de células T CD8⁺ e células NK (CONTINI et al., 2003).

A interação com o receptor LILRB1 (ILT2) ocorre por meio dos domínios $\alpha 2$ e $\beta 2m$ de HLA-G. Este receptor é expresso na superfície celular de vários leucócitos, células NK, células linfoides e mieloides. Enquanto, o LILRB2 (ILT4) interage com HLA-G, ligando-se ao domínio $\alpha 3$. Este receptor é expresso em monócitos e células dendríticas, ou seja, em células mieloides, e também ocorre na forma solúvel (BROWN et al., 2004).

Os dois receptores citados apresentam em suas caudas citoplasmáticas motivos inibidores (ITIM, do inglês *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*), os quais são capazes de impedir a transdução de sinais de estimulação, além de poderem interagir com outras moléculas HLA. Entretanto, a interação com HLA-G 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 (SHIROISHI et al., 2003; WU et al., 2009).

Com relação ao LILRB4 (ILT3), este é um receptor com potencial de inibição, associado a tolerância, detectado expresso em monócitos, macrófagos, células dendríticas (CELLA et al., 1997), endoteliais (CORTESINI et al., 2004), e em indivíduos saudáveis, apenas na superfície de plasmoblastos, mas não em células B naïve ou de memória (INUI et al., 2016). É inferido que sua interação se dê com ligantes HLA-A, -B, -C e -G, atuando na imunoregulação, assim como LILRB1 e LILRB2. Quando produzido na forma solúvel, pode reduzir as respostas de proliferação de células endoteliais LILRB4⁺, dependendo da ativação de células T, juntamente com LILRB2 (GLEISSNER et al., 2007; VLAD; SUCIU-FOCA, 2012).

Também foi descrita a existência da interação específica de sHLA-G1 com o receptor CD160, sendo expresso por células endoteliais, inibindo a angiogênese e promovendo apoptose (FONS et al., 2006). O receptor CD160 (BY55) é uma proteína de 181 aminoácidos ancorada a um glicosilfosfatidilinositol (GPI), que compartilha certa homologia com KIR2DL4 e interage via domínio $\alpha 1$ com HLA-G (FOURNEL et al., 2000). Também infere-se que este receptor propicie uma via alternativa de coestimulação de células T que seria mediada via CD28, sendo capaz de induzir células T-CD4⁺, além da proliferação de células T citotóxicas (NIKOLOVA et al., 2002).

Com relação ao receptor KIR2DL4 de HLA-G, este é uma glicoproteína transmembrânica expressa naturalmente por células de diferentes linhagens de NK (uterinas e de sangue periférico) e um subgrupo de células T, capazes de expressar 2 (KIR2D) domínios extracelulares semelhantes a imunoglobulinas, quem contém 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 (HSU *et al.* 2002).

As isoformas HLA-G1 e HLA-G5 foram reportadas sendo endocitadas após interação com o receptor KIR2DL4 de células NK uterinas, durante a gestação (RAJAGOPALAN et al., 2006). A sustentação deste complexo interiorizado em endossomos primários teria a capacidade de mediar a via de ativação do NF κ B, a promoção da transcrição de fatores proinflamatórios e angiogênicos, os quais são importantes para a remodelação dos vasos na interface materno-fetal e implantação do feto (HSU *et al.* 2002; Rajagopalan & Long 2012). Já a manutenção da ligação entre HLA-G e KIR2DL4 na membrana celular teria o efeito contrário, porém este evento *in vivo* ainda é um paradoxo a ser esclarecido (AUGUSTO; PETZL-ERLER, 2015).

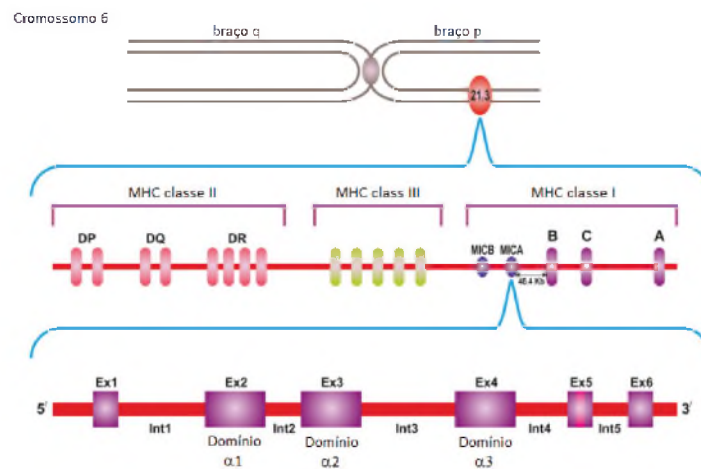
2.3 ESTRUTURA E FUNÇÃO DO GENE *MICA*

O gene *MICA* faz parte da família de genes *MIC* ou genes relacionados à cadeia MHC de classe I. Esta família foi descrita em 1994 por dois grupos de pesquisadores de forma independente, sendo nomeado por um grupo como *Perth beta block transcript 11* ou PERB11 (LEELAYUWAT et al., 1994) e como MIC, pelo outro grupo (BAHRAM et al., 1994). MIC foi o nome adotado pelo Comitê de Nomenclatura de Fatores do Sistema HLA da Organização Mundial da Saúde. Na família, além do gene *MICA*, que é o mais estudado e foco deste trabalho, existe outro gene funcional, o *MICB*, enquanto *MICC*, *MICD*, *MICE*, *MICF* e *MICG* são

considerados pseudogenes (BARANWAL; MEHRA, 2017). A localização gênica de *MICA* a 46,5 kb de *HLA-B* e a 83 kb de *MICB* o torna fisicamente ligado a estes genes. Desta forma, cerca de metade dos portadores do alelo *HLA-B*48:01* não apresentam a produção de MICA e nem MICB, por também serem portadores de deleção de ambos os genes (KATSUYAMA et al., 1999).

Entre as dissimilaridades existentes com os genes do sistema *HLA* está a extensão do gene *MICA*, que é quase quatro vezes maior, equivalente a 11 722 bp, sendo as regiões exônicas intercaladas por longas regiões intrônicas, ao exemplo do íntron 1 que contém 6 840pb. Mas estruturalmente se assemelha a outros genes *HLA* (FIGURA 9), sendo constituído por éxon 1, o qual codifica a sequência líder, os éxons 2, 3 e 4, que codificam para a cadeia α , o éxon 5 que codifica para o segmento transmembrânico e parte da cauda citoplasmática, e o éxon 6 que é transcrito, mas não é traduzido (RISTI; BICALHO, 2017).

FIGURA 9 – LOCALIZAÇÃO E ESTRUTURA DO GENE *MICA*.



FONTE: Adaptado de Baranwal & Mehra (2017).

Nota: Primeiro é apresentado no cromossomo 6 a localização do MHC, depois da região de classe I e do gene *MICA*. A estrutura da região codificadora de *MICA* é mostrada de forma ampliada, expondo os éxons (Ex1 a Ex6) e íntrons (Int1 a Int5), e os principais domínios extracelulares, $\alpha1$, $\alpha2$ a $\alpha3$, codificados respectivamente, pelos éxons, Ex2, Ex3 e Ex4.

A cadeia α do produto gênico MICA é composta por três domínios, dos quais os domínios $\alpha1$ e $\alpha2$ formam uma estrutura semelhante a fenda de ligação de peptídeo, porém se mantém estável na ausência de ligantes e a sua expressão na superfície celular independe da via que requer o transportador associado com processamento de antígeno ou TAP (do inglês *transporter associated with antigen processor*). O domínio $\alpha3$ se assemelha a região constante de imunoglobulinas, no entanto, não se liga covalentemente a $\beta2m$. O segmento

citoplasmático é curto (42 aminoácidos) e direciona a molécula à superfície baso-lateral de células epiteliais polarizadas. Ainda resíduos específicos implicados na ligação ao co-receptor CD8 nas moléculas HLA-I são ausentes em MICA (RISTI; BICALHO, 2017).

O transcrito de *MICA* é constituído por 1 382 bp, com uma matriz de leitura aberta de 1 149 bp, que é traduzido num polipeptídeo de 383 aminoácidos, podendo apresentar variações na quantidade de alanina presentes no segmento transmembrânico devido a existência de polimorfismo na região de microsatélite. A proteína madura apresenta de 360 a 366 aminoácidos e é altamente glicosilada (peso molecular de 65 a 75 kDa) (BARANWAL; MEHRA, 2017).

2.3.1 Evolução do gene *MICA*

Curiosamente, o gene primordial que deu origem a *MIC* parece ter surgido anteriormente à família de genes *HLA* encontrada na região de classe I do complexo MHC, mas algumas similaridades foram mantidas. A partir deste gene prototípico e via eventos envolvendo duplicações sequenciais de seguimentos a montante de todos os membros do *locus* (exceto *MICC*), surgiram os genes *MIC* atuais, os quais apresentam sequências homólogas por identidade. Esta hipótese ainda é apoiada pela conservação das sequências relacionadas a *MIC* em diversos mamíferos, tais como bovinos, suínos, caprinos e outros primatas, exceto em roedores (BAHRAM et al., 1994). Mesmo assim, é inferido que os genes funcionalmente correspondentes a *MIC* nos camundongos seriam os codificadores dos ligantes Rae1 β e o H60, ambos capazes de interagir de forma específica com NKG2D em murinos (DIEFENBACH et al., 2001).

Os genes *MICA* e *MICB* são conservados e apresentam 84% de similaridade (STEINLE, ALEXANDER et al., 2001). Esta semelhança certamente advém da história evolutiva da divisão do gene *MICA* em duas linhagens primordiais (LI e LII), com a derivação do gene *MICB* a partir de LII. Os polimorfismos descritos para *MICA* parecem ter se originado em períodos diferentes. Primeiro, ocorreram alterações na região promotora e depois, na região codificadora, havendo conservação de haplótipos na região promotora, mesmo entre alelos diferentes, quando caracterizado os haplótipos estendidos (LUO et al., 2014; COX et al., 2014).

2.3.2 Polimorfismos do gene *MICA*

Dados apresentados no *Immuno Polymorphism Database* (IPD), demonstram que o gene *MICA* apresenta atualmente 107 variantes alélicas capazes de codificar 82 tipos de proteínas e 2 alelos nulos (MACCARI et al., 2017). Segundo as informações extraídas do *Allele Frequency Net Database* (AFND), há um total de 63 estudos populacionais realizados no mundo inteiro com *MICA* foram registrados (GONZÁLEZ-GALARZA; TAKESHITA, LOUISE Y.C.; et al., 2015). Um total de oito estudos foram realizados no Brasil, sendo dois com populações do estado do Paraná, um relacionado a associação patológica de *MICA* com hanseníase (n = 201) (SACRAMENTO, DO et al., 2012) e outro exclusivamente com descendentes de japoneses (n = 190) (GONZÁLEZ-GALARZA; TAKESHITA, LOUISE Y C; et al., 2015). Também foi realizado estudo com população proveniente do registro de doadores de medula óssea do estado de São Paulo (n = 200) (MARIN et al., 2004), além de outros dois trabalhos focados no estudo antropológico de quatro populações de ameríndios (ZHANG et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2008).

Dentre os polimorfismos mais estudados, por terem possível associação com perfis imunológicos distintos no desenvolvimento de patologias, está a variante *MICA A5.1* (rs41293539) (MIZUKI et al., 1997). Este polimorfismo está localizado no éxon 5 de *MICA*, que codifica para o segmento transmembrana. Esta região do DNA contém um STR (do inglês *short tandem repeat*) formado por trincas de “GCT” que codificam alanina. De acordo com a quantidade de repetições são nomeados os alelos, tal como o alelo *A4* que codifica para quatro alaninas. Com isso, existem descritos além de *A4*, os alelos *A5*, *A6*, *A7*, *A9*, *A10* e o *A5.1*. De forma singular, o alelo *A5.1* é uma variação do alelo *A5*, pois apresenta, além das repetições, uma inserção de guanina ou “GGCT”, o que acarreta na mudança na matriz de leitura do transcrito do gene *MICA* e origina um códon de parada prematuro e a formação de uma glicoproteína estruturalmente truncada (peso molecular de 35 a 45 kDa) (OTA et al., 1997; FODIL et al., 1999).

Os efeitos deste polimorfismo já foram explorados em diversas patologias, como em doenças autoimunes e no câncer (TAMAKI et al., 2007; CHOY; PHIPPS, 2010). *MICA A5.1* também foi associado, quando em homozigose, a maior produção de *MICA* solúvel e a maior produção de *MICA* liberado em vesículas extracelulares, o que foi confirmado com ensaios em células transfectadas com *MICA A5.1* e *MICA A5* (LÜ et al., 2009). Também no estudo de Tonnerre e colaboradores (2016), *MICA A5.1* foi considerado como fator de risco para pacientes

transplantados renais, quando associado à susceptibilidade a reativação do papiloma vírus (HPV).

Outra variação observada em *MICA* é o denominado dimorfismo *MICA-129* (rs1051792, A>G, nucleotídeo 454 no éxon 3), o qual afeta a ligação de *MICA* com o seu principal receptor, o NKG2D expresso em células NK. Este dimorfismo é uma mutação não sinônima de metionina para valina no resíduo 129 do domínio $\alpha 2$ que possibilita a existência de duas isoformas e três fenótipos: *MICA-129 Val/Val*, *MICA-129 Met/Met* e *MICA-129 Val/Met* (ISERNHAGEN; MALZAHN; et al., 2016). Apesar da distância desta variação com o sítio de clivagem de *MICA*, possivelmente esta alteração de aminoácido modifique a conformação e acessibilidade de *MICA* a proteases, tais como a ADAM (do inglês *a disintegrin and metalloproteinase domain-like protein decysin 1*) e a chaperona ERp5 (do inglês *endoplasmic reticulum protein 5*). Ainda, infere-se que a expressão de *MICA* seja afetada por outros polimorfismos, como o já citado *MICA A5.1* e a variação a 5'-URR (rs2596542), na região promotora do gene (LO et al., 2013).

A variante *MICA-129 Met* é reconhecida por ter a capacidade de induzir com maior avidéz e rapidez as células NK após interagir com NKG2D, o que acarreta num maior grau de citotoxicidade e liberação de IFN γ , rápida co-estimulação de células T CD8⁺ via interação conjunta com CD3 e diminuição da expressão de NKG2D (ISERNHAGEN; MALZAHN; et al., 2016). Comparativamente, *MICA-129 Met* apresenta de 10 a 50 vezes maior capacidade de se complexar a NKG2D, que *MICA-129 Val* (STEINLE, A. et al., 2001). Com relação a expressão na superfície celular, *MICA-129 Met* seria menos eficientemente expresso, do que *MICA-129 Val* (ISERNHAGEN; SCHILLING; et al., 2016).

A influência da variação *MICA-129 Val/Met* foi clinicamente explorada no contexto do transplante de células-tronco hematopoiéticas e em ensaios celulares (BOUKOUACI et al., 2009; ISERNHAGEN et al., 2015). Com isso, foi evidenciado que a ativação de células NK ou células T CD8⁺, é dependente de fatores genéticos e das concentrações de *MICA*, ligados a a membrana ou solubilizada via clivagem (STEINLE, ALEXANDER et al., 2001; ISERNHAGEN et al., 2015). Portanto, considerando a presença de menores quantidades de *MICA* expressa ligada a membrana celular, a variante fenotípico *MICA-129 Met* é capaz de estimular fortemente o receptor NKG2D. Em maiores quantidades, a variante *MICA-129 Val* é que apresenta maior potencial em estimular NKG2D. Porém, nesta condição, a variante *MICA-129 Met* está associada a indução da supressão de NKG2D, comprometendo a ativação

de células NK. Portanto, esta regulação fina entre a interação receptor-ligante requer maiores cuidados com relação a interpretação de fenótipos e genótipos, quando associados a diferentes patologias.

Sobre a distribuição alélica do gene *MICA*, o alelo mais frequente entre as populações já estudadas é o *MICA**008 (cerca de 50%) e *MICA**002 (15 a 25%), enquanto em relação ao polimorfismo de STR, o *MICA* A5.1 é a variação mais comumente encontrada nas populações estudadas (GONZÁLEZ-GALARZA; TAKESHITA, LOUISE Y.C.; et al., 2015).

2.3.3 Regulação da expressão do gene *MICA*

A regulação da expressão dos gene *MICA* difere da observada para os genes *HLA* clássicos de classe I. Logo, não é encontrado em sua região promotora o módulo SXY, através do qual fatores transcricionais ativadores se ligam nos genes clássicos, aos quais *MICA* é irresponsivo (GROH et al., 1996). Assim, a transcrição de *MICA* é realizada por meio da sequência CCAAT box, a qual se liga o fator de transcrição nuclear Y (NF-Y, do inglês *nuclear transcriptional factor*) e da sequência GC box que interage com os fatores transcricionais: Sp1, Sp3 e Sp4 (LUO et al., 2014). Também na região promotora proximal do gene, encontra-se o sítio de ligação a NFκB, que responde ao estímulo a TNFα e possivelmente é suficiente para a transativação da transcrição de *MICA*, mesmo existindo outro sítio sobreposto ao íntron 1, ao qual é capaz de se ligar o heterodímero p65(relA)/p50 e o homodímero constituído por p50 de NFκB (CHAUVEAU et al., 2014).

Além disso, a região promotora de *MICA* apresenta um elemento de resposta a choque térmico (HSE, do inglês *heat shock element*), o qual é homólogo ao encontrado no gene de proteína de choque térmico HSP70 (ELSNER et al., 2010). Este elemento é característico de genes que são induzidos pelo estresse (GROH et al., 1996). Ainda, a inibição da expressão de *MICA* ocorre na presença de IFNγ ou hipóxia (ELSNER et al., 2010).

As variações na região promotora de *MICA* ocorrem na forma de 12 haplótipos, incluindo um haplótipo nulo, referente à deleção completa do gene (*MICA*-P12), e o haplótipo mais frequente *MICA*-P7 (LUO et al., 2014; COX et al., 2014). Existem alelos que mantêm um único haplótipo, mas também existem os casos de alelos que podem ter um dentre três possíveis haplótipos. Dentre as variações presentes nesta região, está o polimorfismo localizado no sítio de ligação ao fator transcricional Sp1 (rs259653). A presença de adenina na variante está associada a menor produção de *MICA* solúvel, devido a não ligação de Sp1. Enquanto a

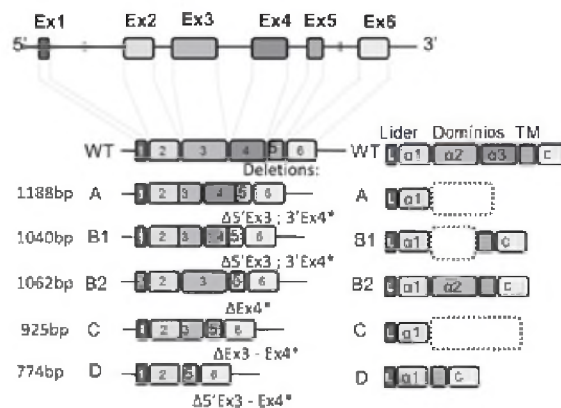
presença de guanina é associado a maior expressão do gene, sendo um fator de proteção para pacientes com hepatocarcinoma induzido por hepatite C (LO et al., 2013).

2.3.4 Expressão e função das isoformas de MICA

A expressão de MICA foi descrita na superfície celular ligada a membrana, assim como na forma solúvel, sendo a isoforma completa, a mais estudada. A isoforma completa ou MICA1 (1161 pb), é derivada do alelo *MICA*001*. Já uma segunda isoforma ou MICA2 (873 pb), proveniente de *MICA*008:01*, a qual devido a presença do polimorfismo de inserção de rs9279200, origina uma proteína truncada, com o domínio $\alpha 3$ deletado (ZOU; STASTNY, 2002). Ambas as isoformas foram descritas partir de linhagens celulares de carcinoma (ZOU; STASTNY, 2002).

Outras cinco isoformas foram recentemente descritas (FIGURA 11), sendo exclusivamente derivadas de dois alelos, o *MICA*015* e o *MICA*017*. Elas foram nomeadas como MICA-A, MICA-B1, MICA-B2, MICA-C e MICA-D, sendo os números de submissão no *National Center for Biotechnology Information GenBaNK BanK It*, respectivamente, 1831421, 1833449, 1833461, 1833464, e 1833466 (GAVLOVSKY et al., 2016).

FIGURA 11 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO GENE *MICA* E DAS ISOFORMAS ORIUNDAS DE *MICA*015* E *MICA*017* (MICA-A, MICA-B1, MICA-B2, MICA-C E MICA-D).



FONTE: Adaptado de GAVLOVSKY (2016).

NOTA: Acima é representado a estrutura da região codificadora de *MICA*, abaixo a esquerda estão os transcritos processados de forma alternativa incluindo o WT (do inglês *wild type*) e a esquerda as respectivas isoformas traduzidas, iniciando pelo peptídeo líder, domínios extracelulares, domínio transmembrana (TM) e cauda citoplasmática (C).

MICA-A e MICA-C não são expressos na superfície celular, pois apresentam deleções nos transcritos de origem e possuem uma nova composição de aminoácidos na região intracelular da proteína. MICA-D possui apenas o domínio $\alpha 1$, e a sua interação com NKG2D impede a ativação de células NK por esta via. De forma similar, MICA-B1 apresenta um domínio $\alpha 2$ alterado, que ao interagir com NKG2D, bloqueia-o. O MICA-B2 é a única isoforma que se assemelha a proteína completa (ou *wild type*), exceto pela ausência do domínio $\alpha 3$. Isso não o impede de ativar NKG2D, fato que também demonstra apenas a importância do domínio $\alpha 2$ nesta interação (GAVLOVSKY et al., 2016).

Funcionalmente, a isoforma completa de MICA não desempenha o papel de apresentação de antígenos a células T, via TCR. Mas esta proteína atua como ligante de NKG2D, o qual é expresso em células NK e células $\gamma\delta$ e $T\alpha\beta$ -CD8⁺. Outro ligante é o receptor de células $\gamma\delta$ ($v\delta 1$ e $v\delta 2$) ou TCR $\gamma\delta$ expresso por população de células T negativas para o receptor TCR $\alpha\beta$ associado a CD3 e proteínas. As células $\gamma\delta$ não reconhecem antígenos, localizam-se nas superfícies epiteliais, sítios de inflamação e infecções microbianas, e podem reconhecer compostos variados, como glicolípídios processados ou não (BAHRAM et al., 1994; GROH et al., 1996; BARANWAL; MEHRA, 2017).

As interações com os receptores TCR $\gamma\delta$ e NKG2D, quando ocorrem com a isoforma expressa ligada a membrana podem induzir a resposta citotóxica ou a secreção de citocinas. Outro mecanismo envolvendo MICA, está relacionado ao seu polimorfismo e dissimilaridades entre indivíduos, como no contexto do transplante (MURO et al., 2012). O papel de MICA solúvel depende de componentes imunológicos existentes no microambiente, no qual se encontra. A existência de anticorpos anti-MICA junto a isoforma solúvel promove a neutralização dos anticorpos por sMICA. Mas caso apenas existam MICA sendo expressos na membrana de células do enxerto induzidas por um processo inflamatório, esta molécula pode ser alvo dos anticorpos e da ativação da resposta imune, via sistema complemento (BOUKOUACI et al., 2009; MING et al., 2015).

Em células, é evidenciada a presença desta molécula em baixos níveis em linhagens epiteliais do intestino e timo, células endoteliais e fibroblastos. Não foram descritos linfócitos T e B, e monócitos expressando os genes *MIC*. Assim como observado para o gene *HLA-G*, a expressão de *MIC* é aumentada em tumores de células de linhagem epitelial (câncer de pulmão, mama, rim, ovário, próstata e carcinomas de colo do útero) (CHOY; PHIPPS, 2010).

É importante ressaltar o papel de MICA no contexto da gestação, que se assemelha ao observado no transplante, por ser o feto uma espécie de aloenxerto. No período inicial, ou de implantação, a regulação fina da resposta imune propicia a invasão do endométrio e fixação da mórula. Nesta condição, a produção de glicoproteínas, como MICA solúvel e expresso na superfície, é fundamental para que ocorra, primeiro a implantação e depois, invasão via estimulação do processo inflamatório (MINCHEVA-NILSSON et al., 2006). Porém, a inflamação em excesso pode causar uma reabsorção fetal e abortamento. Da mesma forma, a inflamação que ocorre a nível tanto local como sistêmico, pode vir a ser um problema no pós-transplante contribuindo para a perda do enxerto.

2.3.5 Receptores expressos por células *natural killers* e a interação de NKG2D com MICA

O principal receptor de MICA é o NKG2D que é expresso pela células *natural killers* (NK). Porém, para compreender o seu papel e o impacto de polimorfismos de *MICA* na interação e ativação de NKG2D é preciso expor os mecanismos celulares nos quais as células NK estão engajadas. O papel delas é atuar como vigilantes de outras células, o que ocorre via interação com moléculas HLA de classe I, expressas por todas as células nucleadas. As células NK, ao detectarem alterações na expressão de HLA de classe I e/ou peptídeos estranhos apresentados, são capazes de promover uma sensibilização prévia ou resposta imune inata via atividade citotóxica ou citolítica. Este mecanismo envolve um complexo sistema de receptores ativadores e inibidores, incluindo o NKG2D (KONJEVIC et al., 2012; SAUNDERS et al., 2015).

Os receptores inibidores são expressos constitutivamente e contém motivos intracitoplasmáticos ITIM (do inglês *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs*), que interrompem a sinalização de ativação intracelular via recrutamento de fosfatases como SHP-1 (do inglês *Src homology 2-containing phosphatase-1*) e SHP-2. Os receptores ativadores contém motivos intracitoplasmáticos ITAM (do inglês *immunoreceptor tyrosine-based activating motif*), que facilitam a associação de moléculas adaptadoras como DAP12 (do inglês *DNAX-activation protein 12*) e DAP10 (do inglês *DNAX-activation protein 10*) (CHANG et al., 1999; SAUNDERS et al., 2015).

As células NK apresentam um conjunto de receptores leucocitários ou LCR (do inglês *leukocyte receptor complex*), cujos genes estão na posição 19q13.4. Estes codificam os receptores KIRs (do inglês *killer cell immunoglobulin-like receptors*), ao exemplo de

KIR2DL4, que é de forma exclusiva, expresso por todas as células NK. Ainda estão incluídos no complexo LCR, os receptores LIR (do inglês *leukocyte immunoglobulin-like receptors*), ao exemplo de LILRB1 e LILRB2 (LANIER, 1998; AUGUSTO; PETZL-ERLER, 2015).

Também existe o complexo de assassinas naturais ou NKC (do inglês *NK-gene complex*), cujos genes estão na posição 12p13.1, formando a família codificadora de proteínas transmembrânicas do tipo II (semelhantes a lectinas do tipo C). Dentro deste complexo está localizado o gene codificador de NKG2D (*KLRK1*), o qual no entanto, apresenta baixa similaridade com outros genes codificadores de receptores do tipo NKG2, além de não se ligar a CD94 (FARAG et al., 2002).

O NKG2D é um receptor com resíduo intracitoplasmático capaz de interagir com molécula adaptadoras como DAP10, recrutando fosfatidilinositol (PI)-3 quinase, promovendo a citotoxicidade. Esta ativação independe de outras vias de inibição, mediadas pelos receptores de células NK, portanto não fica facilmente susceptível à inibição. Este receptor, além de ser expresso constitutivamente por células NK, é expresso por algumas células mieloides. O gene pode ser induzido via IL(interleucina)-15 (FARAG et al., 2002). Os ligantes de NKG2D são MICA, MICB e proteínas ligantes da família UL-16 (ULBP, do inglês *UL 16 binding proteins*) (COSMAN et al., 2001).

A interação NKG2D-MICA foi descrita como influente em processos inflamatórios, induzindo a produção de IFN γ por células NK e promovendo em células T sinais co-estimulatórios antígeno-específicas (BAUER et al., 1999). Estas respostas parecem ocorrer quando a expressão de MICA na membrana é induzida pelo estresse nas seguintes condições fisiopatológicas: diabetes *melitus* tipo I, artrite reumatoide, psoríase, neoplasia, doença de Behcet e doença auto-imune de Addison (MIZUKI et al., 1997; GROH et al., 1999; MURO et al., 2012; BARANWAL; MEHRA, 2017).

No entanto, o papel da interação de MICA solúvel, com NKG2D, parece ser contrário ao apresentado. Em tumores, o sMICA atua como um inibidor competitivo que bloqueia o reconhecimento das moléculas MIC ligadas a membrana, hiporregulando a expressão de NKG2D expresso por células NK e células T (CHOY; PHIPPS, 2010).

2.3.6 O gene codificador de NKG2D e seus polimorfismos

O receptor ativador de células NK, o NKG2D, é codificado pelo gene *KLRK1* (do inglês *killer cell lectin-like receptor, subfamily K, member 1*) (com nomenclatura não oficial: *NKG2D*), localizado no cromossomo 12p13.2 (MCKUSICK-NATHANS INSTITUTE OF GENETIC MEDICINE; SHERRY et al., 2001). Este gene apresenta 10 éxons, sendo os éxons 2 a 4 codificadores dos domínios intracelulares e transmembrana, éxons 5 a 8 codificadores dos domínios extracelulares de ligação (GLIENK E et al., 1998).

Poucas variações foram descritas para este gene. Dentre os polimorfismos de maior representatividade e frequência em estudos populacionais, destacam-se oito por terem efeito sobre o potencial citotóxico de células NK (HAYASHI et al., 2006). Estas variações foram agregadas em dois grupos diferentes: haplobloco 1 ou hb-1 (rs1049174, rs2617160, rs2617170, rs2617171 e rs1983526); haplobloco 2 ou hb-2 (rs2255336, rs2246809, e rs2617169) (RISTI; BICALHO, 2017).

O hb-1 também é subdividido no grupo de baixa citotoxicidade ou *LNKI* (do inglês *natural cytotoxic phenotype 1*) e alta citotoxicidade ou *HNKI* (do inglês *high natural cytotoxic phenotype 1*), o qual pode ser inferido pela análise de uma variação (dbSNP: rs1049174, com a presença de guanina para *HNKI* ou citosina para *LNKI*) (HAYASHI et al., 2006). Interessantemente, o *HNKI* foi associado à maior atividade de células NK de sangue periférico e menor risco de câncer de origem epitelial, devido a maior citotoxicidade das células NK (HAYASHI et al., 2006; ESPINOZA et al., 2009), o que nos transplantes de órgãos sólidos pode vir a ter relação com o risco de desenvolvimento de rejeições imunológicas.

2.4 IMUNOLOGIA DOS TRANSPLANTES

A imunologia tem papel primordial na compreensão do desenvolvimento da rejeição de aloenxertos nos transplantes, principalmente devido às diferenças imunológicas intraespécie observadas na diversidade e incompatibilidade HLA apresentada entre doadores e receptores, quando não singênicos. Esta divergência faz os HLAs incompatíveis assumirem o papel de antígenos, quando apresentado por células do doador, o que é capaz de desencadear uma forte resposta imune no receptor. Portanto, a diversidade de moléculas HLA clássicas de classe I e classe II, mais especificamente HLA-A, HLA-B e HLA-DR, apesar de propiciar uma ampla

capacidade de defesa contra diferentes patógenos, ao apresentar estes a células efetoras (linfócitos), no contexto dos transplantes renais alogênicos e HLAs não pareados entre indivíduos, estes assumem o papel de antígenos. Nesta função, podem induzir a formação de anticorpos específicos anti-HLA do doador (DSA, do inglês *donor specific antibody*). Dentre as incompatibilidades, as diferenças entre HLA-DR têm maior efeito antigênico nos primeiros seis meses após o transplante, já as consequências de incompatibilidades 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 (GARCIA et al., 2015).

Molecularmente, o principal efeito destas glicoproteínas, quando no papel de antígenos, ocorre no contexto do alorreconhecimento, quando elas são expressas pelas células do aloenxerto e podem desencadear uma das duas principais vias, capazes de explicar os eventos que promovem o desenvolvimento da rejeição (SILVA, DA et al., 2017).

Inicialmente, no transplante de órgãos sólidos, a expressão de HLA ocorre principalmente em células endoteliais que apresentam na membrana, moléculas HLA de classe I e, após ativação prévia, devido ao efeito de eventos anteriores, tal como o estímulo da isquemia e reperfusão do órgão, passam a expressar moléculas HLA de classe II, como o HLA-DR (PIOTTI et al., 2014).

Após estes eventos, pode ser desencadeada a via direta do alorreconhecimento de moléculas HLA envolvendo as células dendríticas (CDs) do tecido do doador, que migram até o local onde se encontram as células T inativas do receptor, como os linfonodos. As CDs do doador apresentam aloantígenos HLA que promovem a ativação e diferenciação das células T do paciente em células citotóxicas, além de estimular a produção de citocinas capazes de ampliar a reação imune via ação parácrina e induzir a infiltração de células imunes no aloenxerto. Este mecanismo propicia a forte resposta imune observada nas rejeições celulares mediadas por células T (GARCIA et al., 2015). Geralmente, esta via se desenvolve passado poucos dias, semanas ou até três meses após o transplante e culmina na nomeada rejeição aguda celular (LAND, 2005). Ainda neste contexto, anticorpos produzidos pelo paciente também atuam se ligando à antígenos de 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. Dentre os efeitos desta resposta imune

estão a vasculite, tubulite e infiltração intersticial de células T, monócitos e macrófagos, inflamação e risco de perda do enxerto (INGULLI, 2010).

A via de alorreconhecimento indireto, de moléculas antigênicas HLA, envolve a etapa de internalização celular e processamento destes aloantígenos pelas células apresentadoras de antígenos (APCs, do inglês *antigen-presenting cells*) do paciente transplantado. Estas APCs do paciente migram até os órgãos linfóides, carregando os peptídeos processados na fenda de ligação das moléculas HLA de classe II, apresentando-os as células T via ligação com TCR. Isto resulta na ativação da resposta imune, na propagação, na proliferação e na diferenciação de linhagens de células T-CD4⁺, as quais tem o potencial para interagir com células B, ativando-as. As células T ativadas também passam a produzir citocinas e podem migrar até os sítios inflamatórios (MCCAUGHAN et al., 2012).

A via de alorreconhecimento indireta é um dos mecanismos imunológicos que colaboram com o desenvolvimento das rejeições crônicas ou nefropatia crônica do aloenxerto (AYALA GARCÍA et al., 2012). Ainda, o efeito de fatores imunológicos pouco conhecidos, como a formação de anticorpos anti-MICA, e fatores não imunológicos, tais como a não aderência aos protocolos de imunossupressão, as infecções virais e bacterianas, as neoplasias, o retorno de doenças de base, como a hipertensão e diabetes, além da nefrotoxicidade dos imunossupressores, tudo colabora para o desenvolvimento das rejeições crônicas (OLIVEIRA et al., 2012). Esta rejeição é a principal causa a longo prazo da perda de aloenxertos, podendo se desenvolver após meses ou anos da realização do transplante. Neste caso, o órgão transplantado 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, 2010; PIOTTI et al., 2014; SILVA, DA et al., 2017).

Outro mecanismo possível de ocorrer, no contexto da rejeição, é mediado pela ativação de células NK. Estas células apresentam receptores ativadores e inibidores e o equilíbrio da ligação ou não destes a seus ligantes (como moléculas HLA-C, HLA-E, HLA-G e MICA), pode culminar na ativação ou inibição da célula NK. Na ausência dos ligantes HLA próprios, como no caso das células do aloenxerto, ocorre 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 o consequente desenvolvimento do evento da rejeição (AYALA GARCÍA et al., 2012).

A imunidade inata apresenta um papel relevante nos eventos de rejeição imediatos ao transplante, esta resposta é explicada pela “hipótese da injúria” (LAND, 2005). Segundo esta, o aloenxerto pode ser inicialmente afetado pelas espécies reativas a oxigênio (ROS) durante a reperusão, 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, do inglês *toll like receptor*). Estes receptores TLR estimulam outras vias, levando a transcrição de fatores importantes, como NFκB, AP-1 (proteína ativadora-1) e fatores transcricionais para interferons (CORNELL et al., 2008). A ativação de NF-κB e da proteína AP-1, resulta no estímulo da resposta imune mediada por meio de macrófagos. A ativação de fatores transcricionais para interferons promove alterações na regulação da expressão de genes relacionados a proliferação, diferenciação e apoptose em células importantes para o sistema imune (RE; STROMINGER, 2001; SCHRODER et al., 2004).

Momentos após a realização do transplante, a presença de anticorpos pré-formados (DSAs) na circulação sanguínea do receptor, pode desencadear a rejeição hiperaguda mediada por anticorpos (ABMR, *antibody-mediated rejection*). Estes anticorpos podem estar presentes em função de uma sensibilização prévia (CORNELL et al., 2008). Este tipo de rejeição se inicia após a anastomose dos vasos sanguíneos do paciente com o aloenxerto, quando os anticorpos pré-existent se ligam a antígenos endoteliais do doador. Como resultado, o sistema complemento pode ser ativado, promovendo a trombose intravascular (agregação plaquetária) e oclusão vascular, terminando em lesão isquêmica irreversível do aloenxerto (INGULLI, 2010; LOUPY et al., 2013).

A incompatibilidade ABO pode contribuir para este tipo de rejeição, visto que antígenos ABO são expressos em células endoteliais (CORNELL; SMITH; COLVIN, 2008). No entanto, alguns estudos entre doadores e receptores ABO incompatíveis têm obtido sucesso, quando acompanhado de terapias imunossupressoras eficazes, tais como: indução com dessensibilização prévia via plasmaferese, esplenectomia e rituximab (anticorpo que inibe a ativação de células B) (ROSTAING; KAMAR, 2014; HIGGINS et al., 2015). Já no Brasil, doadores e receptores são mandatoriamente pareados com relação a este sistema, mas se restringe a igualdade total do tipo sanguíneo, com o intuito de não desfavorecer indivíduos do

tipo O (BRASIL, 2009). Logo, não são observadas rejeições associadas a incompatibilidade ABO.

2.4.1 Variáveis clínicas consideradas do pré ao pós-transplante renal

Antes de prosseguir para um transplante, o paciente diagnosticado com falência (insuficiência) renal crônica (quando a taxa de filtração glomerular é inferior a 15mL/min, estágio 5 da doença), deve ser encaminhado pelo nefrologista para a adoção de terapia substitutiva alternativa (hemodiálise ou diálise peritoneal) e inscrição no cadastro técnico único (CTU, fila de espera) específico para transplante renal (BASTOS; KIRSZTAJN, 2011). Existem exceções, como diante da impossibilidade da adoção da terapia alternativa, quando é dada urgência ao transplante renal, podendo ser feito o transplante preemptivo (anterior ao início da terapia substitutiva ou diálise) (GARCIA et al., 2015). Avaliações laboratoriais são conduzidas do período do pré ao pós-transplante, a fim de se manter a função renal estável e a evitar o desenvolvimento de eventos de rejeição do rim transplantado.

A fila de espera para transplante de rim difere dos outros tipos de transplante no Brasil, por não ter uma ordenação por tempo de espera, haja visto que os casos de urgência são raros. No CTU, o paciente recebe uma pontuação relativa às características específicas que possui. Uma das variáveis mais importantes considerada é a compatibilidade entre genes *HLA-A* (0,5 pontos), *-B* (2 pontos), e *-DRB1* (5 pontos), podendo o paciente atingir até 15 pontos pela compatibilidade total destes *loci*, segundo o publicado pela Portaria nº 2.600 - Regulamento Técnico do Sistema Nacional de Transplantes (BRASIL, 2009).

A verificação da compatibilidade genética via genotipagem *HLA-A*, *-B* e *-DRB1* é feita em baixa resolução (a nível do grupo alélico), a qual não detecta alelos *HLA* nulos. Esta caracterização, mesmo que em baixa resolução, dos genes *HLA*, justifica-se por possibilitar o melhor pareamento doador-receptor, diante das inúmeras combinações haplotípicas possíveis. Historicamente, a tipagem *HLA* era conduzida por meio de testes sorológicos, utilizando antisoro em ensaios de citotoxicidade dependente de complemento ou CDC (TERASAKI, 2012). Atualmente, são também utilizadas técnicas moleculares de genotipagem, as quais são mais precisas e podem ser realizadas via sequenciamento, técnicas de hibridização, microarranjo e sequenciamento de nova geração. Existe uma clara relação entre o grau de semelhança ou *matches* HLA e as chances de sobrevivência do aloenxerto transplantado entre doadores vivos relacionados (AYALA GARCÍA et al., 2012). Ainda, o efeito da

compatibilidade *HLA* é aditivo aos efeitos dos imunossupressores, assim quanto maior o número de compatibilidades (para o caso de três *loci*, *HLA-A*, *-B* e *-DRB1*, entre zero e seis), maiores são as chances de sucesso no transplante renal, aliado a menor necessidade do emprego de imunossupressores (CECKA, 2010).

Outro importante fator avaliado e decisivo para que o transplante seja realizado, é a análise da presença de anticorpos pré-formados no pré-transplante. Portanto, para a manutenção do paciente no CTU, é necessária a avaliação periódica (a cada três a seis meses) por meio de exames de detecção destes anticorpos. As metodologias utilizadas podem determinar o painel reativo de anticorpos (PRA), expresso em porcentagem, e também detectar a especificidade dos anticorpos existentes no soro contra doador (GARCIA et al., 2015).

Com relação a análise do PRA, esta consiste na identificação e quantificação de anticorpos anti-*HLA* classe I ou II pré-formados e presentes no soro do paciente via imunoensaio (GARCÍA et al, 2012). O soro do paciente pode ser analisado contra um painel de células representativo da população que contenha o perfil de diferentes tipos de antígenos *HLA* (prova heteróloga), contra linfócitos expressando *HLA* do doador (via imunoensaio CDC ou citometria de fluxo) ou microesferas ligadas a antígenos *HLA*, também representativos da população (imunoensaio em fase sólida). A prova cruzada ou *crossmatch* possibilita a detecção de anticorpos presentes no soro do receptor, que atuam contra antígenos específicos do doador (DSA) (MULLEY; KANELIS, 2011).

Os valores de PRA são monitorados, pois podem se alterar mediante eventos que induzam a resposta imune adaptativa e a produção de anticorpos. Estes eventos podem ser: transfusões sanguíneas, transplantes prévios, infecções virais ou bacterianas e gestações (MISHRA; BALIGA, 2013). O PRA é incluído na pontuação de pacientes em CTU, sendo dado 4 pontos a pacientes com PRA acima de 80% e 2 pontos a pacientes com PRA entre 50 e 70 % (Portaria nº 2.600 - Regulamento Técnico do Sistema Nacional de Transplantes.BRASIL, 2009).

No pós-transplante, o PRA também é utilizado para monitoramento do sistema imunológico do paciente para a prevenção de rejeições, e com a detecção de DSA são delimitadas as incompatibilidades *HLA* permissivas ou não permissivas. 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). Contudo, a interpretação destes resultados deve ser feita cuidadosamente, visto que as mensurações de anticorpos circulantes em sangue periférico podem ser afetadas devido ao método empregado

e podem não refletir a real produção de moléculas e resposta imune do paciente. Por exemplo, a baixa detecção de anticorpos observados num paciente com rejeição pode ser o efeito da formação de imunocomplexos, que concentram anticorpos no aloenxerto e acarretam a hipostimação dos valores de DSA (BORELLI et al., 1999).

Os métodos de detecção de DSA via prova cruzada, apesar de terem evoluído muito em termos de sensibilidade, sendo hoje realizados via ensaios de fase sólida, apresentam suas limitações. Na totalidade de anticorpos detectados, existem aqueles que tem potencial de promover uma rejeição e os que não influenciam no desenvolvimento da rejeição (geralmente associados às incompatibilidades *HLA* permissivas). Ainda variações no método diagnóstico, como as definições de limiar de diagnóstico, padrões clínicos de significância, as limitações na detecção de anticorpos contra antígenos não-*HLA* (ao exemplo do MICA), acabam limitando a interpretação dos resultados deste método, de forma exclusiva (GARCIA et al., 2015; LOUPY et al., 2017).

Outros exames e dados clínicos são requisitados e não afetam a pontuação do paciente no CTU, mas o caracterizam e podem ser levados em consideração. Por exemplo, a caracterização da anatomofisiologia e função renal, a aptidão do indivíduo para a realização da cirurgia, a altura e peso, o tempo em diálise (peritoneal ou hemodiálise) e o tempo de isquemia fria (ou tempo no qual o rim permanece já retirado do doador, em solução de preservação hipotérmica) do enxerto renal, o qual é recomendado que não ultrapasse 24 horas (GARCIA et al., 2015).

É importante ressaltar, que 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 paciente compatível é limitado pelo tempo em que o órgão do indivíduo falecido consegue ser mantido viável antes de ser implantado cirurgicamente (MEDINA-PESTANA et al., 2011).

Também é considerada a idade mais avançada ou não dos pacientes adultos a serem transplantados, o sexo, a existência de doenças de base, o tipo de doador (vivo ou não). Com relação a idade e tipo de doador, 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), comparado ao doador vivo quando é mais velho (cerca de 60 anos) (LAGING et al., 2012). Mas o fato do paciente ser uma criança o

propicia 4 pontos, os portadores de diabetes recebem mais 3 pontos e a realização de transplante prévio fornece mais 10 pontos (Portaria nº 2.600 - Regulamento Técnico do Sistema Nacional de Transplantes) (BRASIL, 2009).

Ainda, existem os casos de transplantes feitos a partir de doadores com critério expandido, como doadores com a função do órgão podendo estar comprometido devido a idade (acima de 60 anos) ou doadores portadores de doenças infectocontagiosas. Esta forma de doação é realizada desde de que consentida formalmente pelo receptor (Portaria nº 2.600 - Regulamento Técnico do Sistema Nacional de Transplantes) (BRASIL, 2009).

Por fim, após a seleção dos 10 a 15 pacientes com maior compatibilidade *HLA* e melhor pontuados, podem ser consideradas as outras variáveis citadas anteriormente (GARCIA et al., 2015).

Com relação ao monitoramento dos pacientes no pós-transplante, o principal exame são as biópsias realizadas em conjunto com técnicas de imuno-histoquímica para detecção de C4d, o qual é importante para a avaliação de casos onde se presume ter rejeição, como a mediada por anticorpos (ABMR) e sistema complemento, sendo este complementar a outras análises que seguem os critérios de Banff (FEUCHT et al., 1993). A detecção de C4d em biópsias é um método clássico para diagnóstico de ABMR, sendo este um fragmento inativo oriundo da degradação tardia de C4b, pertencente a via clássica do complemento. Nesta via, primeiro um antígeno endotelial interage com anticorpos, a região constante destes se ligam a C1, que recruta C4, o qual, quando clivado, produz C4d, e este se mantém estável podendo ser detectado em biópsias. Enquanto a cascata de ativação e clivagem de outras moléculas prossegue, culminando na lise da célula alvo (NADASDY et al., 2005).

A deposição de C4d ocorre em sua maioria nos capilares peritubulares e pode ser detectada via microscopia de imunofluorescência, utilizando um anticorpo monoclonal ou, como já citado, via imuno-histoquímica, usando 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 (COLLINS et al., 1999). A presença de C4d é um importante sinalizador da presença de neutrófilos e de necrose (COLLINS et al., 1999).

Portanto, atualmente a análise histológica auxiliada pela marcação de C4d e mensuração dos níveis de DSA definem o tipo de rejeição a ser tratado e contribuem para a escolha do tipo de terapia que deve ser adotado para o controle da resposta imune nos pacientes transplantados, com risco de perda do enxerto. No Brasil, são comuns os casos em que o

tratamento da rejeição precisa ser iniciado de forma precoce, quando a urgência do paciente se sobrepõe à necessidade do diagnóstico histológico (GARCIA et al., 2015).

Mesmo assim, é importante ressaltar a criteriosidade e firmeza das análises histológicas, a qual se deve a criação previamente mencionada, a Classificação de Banff. Esta foi desenvolvida no Canadá em 1991 em colaboração com diversos especialistas, tais como patologistas, nefrologistas e cirurgiões. Ao longo destes encontros foi possível estabelecer uma categorização, que propiciou o maior detalhamento das rejeições imunológicas clássicas (hiperaguda, aguda, aguda acelerada e crônica), padronizou a identificação dos tipos de rejeição, contribuindo para a homogeneização das análises histológicas, para a comparação das rejeições entre ensaios clínicos (BHOWMIK et al., 2010). Desde sua data de criação, a Classificação de Banff passa por atualizações feitas por meio de encontros periódicos e atualmente não se restringe apenas ao transplante renal, sendo adotada para outros tipos de transplantes de órgãos sólidos, como fígado, coração, pulmão e pâncreas. No último encontro realizado em 2017, foi dada ênfase também a adoção e desenvolvimento de marcadores moleculares para o diagnóstico da rejeição mediada por anticorpos, além dos já adotados métodos histológicos. A classificação atual segundo critérios de Banff pode ser encontrada na última publicação feita em 2017 (LOUPY et al., 2017).

Conhecidas as limitações no diagnóstico da rejeição e na avaliação do risco imunológico de cada paciente é também de grande relevância a exploração de outros mecanismos envolvidos com a aceitação ao enxerto, que possam vir a ser manipulados e monitorados no pós-transplante. Um fato que estimula a busca por marcadores da tolerância advém da sobrevivência de pacientes transplantados por mais de 20 anos sem desenvolver rejeição e que, em muitos casos, deixam de aderir ao tratamento de imunossupressão (CECKA, 2010; GARCIA et al., 2015).

2.4.2 Imunossupressão nos transplantes

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 autoimunes, para o esclarecimento sobre os mecanismos relacionados à sobrevivência de células alteradas em câncer, além do entendimento das rejeições em transplantes (LYNCH; PLATT, 2009; ABBAS, 2012). Nos transplantes são conhecidas duas formas de tolerância, a induzida de forma medicamentosa e a

natural, a qual se destaca neste trabalho por ter potencial em atuar de forma sinérgica com a induzida e por envolver também a atuação imunossupressora da molécula HLA-G e, possivelmente, outras moléculas, como HLA-E e MICA. Portanto, ambas as formas serão abordadas nos próximos itens.

2.4.2.1 Imunossupressão induzida por medicamentos

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. A adoção dos transplantes como terapia para o tratamento de doenças terminais, como é o caso da falência renal crônica, esteve intimamente associada a evolução das terapias imunossupressoras.

No Brasil, são evidenciadas três fases na história dos transplantes, a fase heróica, romântica e a profissional. A primeira fase heróica data de 1964 a 1987, quando foram realizados as primeiras tentativas de transplantes renais no Hospital dos Servidores do Estado no Rio de Janeiro (1964) e no Hospital das Clínicas em São Paulo (1965) (GARCIA et al., 2015). Nesta época, o papel das moléculas HLA como aloantígenos era conhecido, mas limitado, e com o passar dos anos foram descobertos imunossupressores adotados no pós-transplante (ou terapia de manutenção), ao exemplo da adoção combinada da imunossupressão inespecífica de corticosteroides com a azatioprina (AZA) (TAYLOR et al., 2005; RUBIN, 2007).

Os corticosteroides passaram a ser empregados para a imunossupressão em pacientes transplantados, desde 1950 (TAYLOR et al., 2005; RUBIN, 2007). Entre suas variações, estão a prednisona, prednisolona e a metilprednisolona, hormônios sintéticos semelhantes ao cortisol (glicocorticoide) produzido a partir do colesterol, pelo córtex da glândula supra-renal. Estes hormônios sintéticos possuem ação semelhante ao cortisol, porém apresentam potência superior, comparados ao natural. Eles atuam em diversas vias do sistema imune levando a inibição da inflamação, tendo sido empregado primariamente no tratamento da artrite reumatoide, asma, lúpus e psoríase. Este hormônio apresenta atividade mineralocorticoide, induzindo a hiperglicemia, promovendo o aumento da pressão arterial e diminuindo a síntese de proteínas musculares, da pele, dos ossos e de outros tecidos (DAMIANI et al., 1984). Portanto, no transplante pediátrico, são usados de forma limitada e atualmente tem sido avaliado

o seu uso em dias alternados da terapia de manutenção, após o sexto mês do pós-operatório (GARCIA et al., 2015).

Os corticosteroides 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 fluidos, a partir dos compartimentos intravasculares (TAYLOR et al., 2005; ABBAS, 2012).

Já a azatioprina, um análogo de purinas, foi a primeira droga descoberta em 1959 com capacidade de inibir a síntese de ácidos nucleicos e divisão celular, mas ainda de forma inespecífica, com potencial explorado no tratamento de neoplasias, como a leucemia. Este antimetabólito pode ser administrado no tratamento de rejeições em transplantes. A ação desta droga depende da sua conversão em nucleótidos 6-tioguanina, que atuam sobre a molécula de transdução de sinal Rac1, inibindo-a. Esta inibição induz a apoptose dos linfócitos (morte celular programada) (TAYLOR et al., 2005).

A AZA resolveu alguns dos problemas da cortico-dependência e da cortico-resistência. Quando foi desenvolvida por Elion e Hitchings, foi testada em cães transplantados renais pelo Dr. Murray em Boston (RUBIN, 2007). O sucesso deste experimento possibilitou a adoção da AZA como imunossupressor e a combinação com corticosteroide teve maior eficácia, que de forma isolada. Mas entre as limitações do uso deste imunossupressor, está o longo tempo de administração para o alcance da concentração ideal e eficácia. Portanto, outros fármacos foram descobertos, como o micofenolato mofetil (MMF) e o micofenolato sódico (MPS), os quais atuam inibindo a enzima inosina monofosfato desidrogenase, que é importante para a via de síntese de *novos* de purinas de forma específica em células T e B. Portanto, são altamente efetivos na inibição da proliferação celular, quando combinados com outras drogas, na prevenção de rejeições agudas (TAYLOR et al., 2005; JEAN-PAUL, 2011).

Na fase heróica, também teve a descoberta da ciclosporina (CsA), um inibidor de calcineurina (molécula dependente de cálcio), que atua no bloqueio das células T. A CsA é um peptídeo 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 ativação de células T (NFAT, do inglês *nuclear fator of*

activated T-cells), desfosforilando-o, para que migre até o núcleo e induza transcrição de IL-2 (interleucina-2). Com a inibição de calcineurina, é impedida a ativação transcricional de IL-2 e também de outras citocinas (IFN γ e IL-3) que induziriam a diferenciação e proliferação de células T (linfócitos T-*helper* e células T supressoras) (JEAN-PAUL, 2011; BRUNTON et al., 2012). O CsA se mostrou eficiente primeiro no transplante renal, depois no transplante de pâncreas e fígado, e por fim, nos transplantes de coração e pulmão (GARCIA et al., 2015).

Outro fármaco descoberto foi o FK506 ou tacrolimo, semelhante a CsA, é um antibiótico macrolídeo, derivado da fermentação do fungo *Streptomyces tsukubaensis* descoberto no Japão e desenvolvido para o tratamento do transplante de fígado (KINO et al., 1987). Ele se liga a FKBP (proteína de ligação ao FK506) formando também um complexo inibitório da calcineurina. Assim, em meados de 1980, passou a ser utilizado em diversos transplantes de órgãos. Hoje ainda é a droga mais utilizada, tendo efeito imunossupressor superior ao da CsA, mas ambos são nefrotóxicos (JEAN-PAUL, 2011).

Também 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 et al., 2012).

O desenvolvimento de terapias utilizando imunoglobulinas se deu com maior ênfase na terceira fase dos transplantes, em 1990. Mas ainda na primeira fase, foram desenvolvidas duas formas de terapia. Em 1960, a globulina antilinfócito (ALG, do inglês *anti-lymphocyte globulin*) foi produzida a partir do soro de cavalo ou coelho, inoculados com linfócitos humanos utilizados no tratamento de rejeições. Além dos anticorpos monoclonais contra CD3 (Muronab-CD3 ou OKT3), produzidos em 1970. Ambos utilizados no tratamento de rejeições agudas via bloqueio de moléculas coestimulatórias apresentadas na membrana de células T e importantes para a completa ativação destas células, diante da formação do complexo TCR-MHC (SING-LEUNG, 2001; GARCIA et al., 2015).

Ao longo da história dos transplantes, toda essa busca por drogas contribuiu para o conhecimento básico da ativação das células T e trouxe à tona a era moderna dos transplantes,

os quais até 1970, frequentemente culminavam na rejeição aguda celular (TAYLOR et al., 2005). Esta era no Brasil propiciou o estabelecimento dos transplantes como uma forma de terapia segura de tratamento de doenças terminais marcando a transição da fase heróica para a fase romântica (GARCIA et al., 2015).

De 1987 a 1996, deu-se então a segunda fase, ou fase romântica dos transplantes no Brasil, quando veio a tona a necessidade da regulamentação da alocação de órgãos, principalmente daqueles realizados a partir de doadores falecidos, além do estabelecimento do conceito de morte cerebral. Uma série de fatores foram incluídos como sendo fundamentais para o pareamento de doadores e receptores, sendo dado ênfase à compatibilidade do sistema HLA e criação de laboratórios de imunogenética, específicos para a caracterização dos genes *HLA*. Nesta fase, foi fundada a Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos ou ABTO (GARCIA et al., 2015).

A partir de 1997, iniciou-se a fase profissional dos transplantes com a associação de instituições governamentais importantes criadas especificamente para coordenar e financiar os transplantes, tais como o Sistema Nacional de Transplantes ou SNT, estando tudo vinculado ao Sistema Único de Saúde (SUS). Surgiram diretrizes e protocolos de imunossupressão, orientando a adoção de terapias de imunossupressão específicas (GARCIA et al., 2015).

Atualmente, a imunossupressão é mantida em duas etapas, no pré-transplante, na forma de terapia de indução ou inicial e no pós-transplante, como terapia de manutenção. A combinação de fármacos se dá na forma da terapia tríplice, mas pode variar de acordo com o centro transplantador. Os principais fármacos são: os inibidores da calcineurina, os agentes antiproliferativos e os corticosteroides (Portaria nº712 - Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Imunossupressão no Transplante Renal) (BRASIL, 2014).

A terapia baseada em anticorpos monoclonais tem progredido muito. Os anticorpos desenvolvidos em geral tem ação específica contra sinais coestimulatórios de células T e B, contra a tradução de proteínas de adesão celular como ICAM (Efalizumab) e LFA-1 (Alefcept), os quais inibem a adesão e migração transendotelial, anticorpos contra moléculas de membrana CD20 (Rituximab) de células B, o qual induz a lise celular, além de anticorpos inibidores de moléculas importantes para mudança de isotipo mediado por células apresentadoras de antígeno (anti-CD40L) (HALLORAN, 2004). Apesar desta variabilidade de anticorpos, a adoção destes na terapia demanda a sua aprovação após estudos clínicos, nos quais são identificadas as limitações, como a interação medicamentosa, os efeitos colaterais de risco e é feita a avaliação das drogas em comparação com as já disponíveis no mercado.

Com relação aos anticorpos aprovados para uso, além de OKT3, é adotado o ATG (do inglês *anti-thymocyte globulin*), que atua de forma específica e é usado 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 (SING-LEUNG, 2001; ABBAS, 2012). Outra forma de depleção pode ser mediada via anticorpos anti-CD25 (CD25 é o receptor de IL-2), de nome comercial: Basiliximab (anticorpo quimérico) ou Daclizumab (anticorpo humanizado). Este, ao inibir a ligação de IL-2, acaba limitando a expansão clonal e promove a tolerância (BRUNTON et al., 2012). Um potente anticorpo, desenvolvido em 2000 e aprovado para uso clínico apenas em 2011, é o Belatacept (CTLA4Ig). Este é capaz de bloquear a molécula coestimulatória CD28, inibindo de forma seletiva as células T. Ele pode ser utilizado na reversão de rejeições agudas ou na profilaxia destas (WOJCIECHOWSKI; VINCENTI, 2012).

Além disso, outros tratamentos mais intensos de imunossupressão são realizados nos hospitais, como a administração intravenosa de doses altas de imunossupressor, por exemplo o corticosteroide metilprednisolona. Como resultado, tem-se a diminuição muito rápida da inflamação, portanto ele é adotado no pré-transplante na prevenção de rejeições agudas ou para tratá-las (ABBAS, 2012). Após a pulsoterapia, a administração de corticosteroide (prednisona) é continuada via oral.

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 (IVIg), a qual é constituída por um concentrado de imunoglobulinas (95% IgG, 2,5% IgA e resquícios de IgM e outros antígenos de leucócitos humanos) provenientes de múltiplos doadores, que são injetadas no paciente e tem o potencial de interagir com os receptores Fc de células B, dendríticas, NKs, macrófagos e neutrófilos. Esta interação neutraliza anticorpos pré-

formados anti-HLA e impede a ativação de células T e B, que poderiam induzir a fagocitose ou citotoxicidade celular (GLOTZ et al., 2004).

Porém, a finalidade dos estudos com transplantes renais tem sido aumentar a sobrevida do aloenxerto, administrando quantidades mínimas ou nenhum imunossupressor. Assim, é reconhecido que o maior obstáculo é a compreensão das injúrias e dos mecanismos da imunotolerância natural que o sistema imunológico é capaz de desenvolver, em relação ao aloenxerto, além de minimizar os efeitos adversos ou secundários causados pelos imunossupressores, os quais demonstram eficácia no combate de rejeições agudas, mas ainda tem pouco efeito sobre as rejeições crônicas (CORNELL et al., 2008; MORELLI; DIVITO, 2012). Desde o início de 1990, a sobrevida dos aloenxertos renais tem sido maior que 90%, mas apenas 60% destes permanecem funcionais por mais de dez anos (ABBAS, 2012; OLIVEIRA et al., 2012).

2.4.2.2 Mecanismos de imunotolerância natural

Naturalmente, o sistema imune é capaz de manter um equilíbrio dos mecanismos que promovem a resposta imune e defesa do organismo, sem que esta seja capaz de causar lesões aos tecidos próprios, estado este alcançado via mecanismos de tolerância central e periférica. A construção da tolerância central se inicia com o desenvolvimento do indivíduo, quando células T e B precursoras do sistema imune nos órgãos linfoides centrais, passam pelo processo de diferenciação e seleção clonal (educação). De forma mais específica, ocorre primeiro a seleção positiva de células com afinidade ao MHC próprio, mas baixa afinidade a antígenos próprios, seguida pela seleção negativa com a eliminação de células com alta afinidade a antígenos próprios. A educação de células T ocorre no timo, onde timócitos expressam antígenos próprios sob a regulação do gene *AIRE* (do inglês *autoimmune regulator*) (LIU, 2006). Já as células B passam pela seleção clonal na medula óssea e, caso sejam autoreativas, podem ser estimuladas a passarem por um novo rearranjo gênico para a produção de novo receptor com especificidade diferente ou são deletadas via apoptose (CANCRO; KEARNEY, 2004). Mesmo assim permanecem algumas células autoreativas, mas poucas destas tem a capacidade de contribuir para o desenvolvimento de doenças auto-imunes, sendo parte direcionada para a derivação de células imunossupressoras (SCHWARTZ, 2005) .

Ainda existe uma segunda via de aquisição da autotolerância, mediada pelos mecanismos de tolerância periférica, que ocorrem nos linfonodos, baço e tecidos periféricos, originando células imunes com capacidade de imunorregular células autoreativas (WELLS et al., 2001; ABBAS, 2012).

Apenas por volta de 1990 é que as pesquisas passaram a identificar melhor estes componentes do sistema imune envolvidos com os mecanismos da tolerância, tais como as células T reguladoras (Tregs) detectadas em sangue periférico em humanos (MCCAUGHAN et al., 2012). As Tregs podem se originar a partir da diferenciação de células T CD4⁺ provenientes do timo, correspondendo a cerca de 6% das células T-CD4⁺ (DIECKMANN et al., 2001). Outra forma de derivação de células Tregs é da diferenciação de células T naïve periféricas timo-independentes. Os fatores associados a esta diferenciação incluem tolerógenos, como TGF- β (do inglês *transforming growth factor*- β) e IL-10 (CAROSELLA et al., 2011).

As células Tregs diferenciadas podem ser identificadas pela expressão do fator de transcrição FoxP3 (indutor da diferenciação celular, do inglês *foxhead box 3*), da molécula co-estimulatória CD4 e da cadeia α (CD25) do receptor de IL-2 (relacionado ao crescimento, sobrevivência celular, aumento da expressão de FoxP3 e outros genes). Além destas células, foram identificadas outras com potencial imunossupressor, como células B reguladoras, a célula iTreg gerada a partir do estímulo de IL-35 (COLLISON et al., 2010) e células T-CD8⁺ CD28⁻ FOXP3⁺ supressoras, capazes de induzir APCs a expressar receptores inibidores, como ILT3 (LILRB4) e ILT4 (LILRB2) (CAROSELLA et al., 2011).

As células-tronco mesenquimais constituem outra população com capacidade de promover a imunorregulação pela interação celular ou via secreção de fatores, como HLA-G e IL-10. O aumento do estímulo da tolerância ainda pode se dar via interação com CTLA4-Ig e produção de indoleamina 2-3-dioxigenase (IDO) (HOWIE et al., 2014).

Em síntese, as células imunossupressoras podem atuar de diversas formas, como pela produção de tolerógenos, inibição de células efetoras da resposta imune induzindo a morte celular ou a anergia, além de induzir a diferenciação celular (WOOD; SAKAGUCHI, 2003).

Nos transplantes, infere-se que os mecanismos de tolerância ao não próprio (ou ao enxerto) estão associados a tolerância operacional (ASHTON-CHESS et al., 2006a). A primeira forma de induzir a tolerância foi observada em 1953 por Medawar e colegas, num estudo realizado com camundongos. Durante a fase inicial do desenvolvimento dos camundongos e das células do sistema imune, como linfócitos, foi observado que a exposição destes a

aloantígenos estranhos influenciava no processo de amadurecimento do sistema imune e formação da tolerância central. Assim, as células adultas desenvolvidas nesta fase tinham se tornado especificamente tolerantes aos antígenos anteriormente apresentados, sendo estabelecido o microquimerismo ou tolerância adquirida (BILLINGHAM et al., 2010).

Posteriormente, por meio de estudos de incompatibilidade ABO de transplantes renais, foi possível evidenciar o processo de acomodação, quando transplantados incompatíveis com seus doadores e portadores de anticorpos contra estes, passaram a sobreviver com o aloenxerto recebido (CORNELL et al., 2008; LYNCH; PLATT, 2009). Sabe-se que muitos pacientes desenvolvem anticorpos contra os tecidos do doador e, mesmo assim, a maior parte não apresenta rejeição. Portanto, é possível que os anticorpos produzidos não induzam uma resposta imune contra o enxerto e os pacientes estabeleçam uma resistência a danos que seriam mediados pela interação dos anticorpos com o sistema complemento (LYNCH; PLATT, 2009).

Em síntese, os fatores envolvidos com a tolerância periférica parecem contribuir ativamente para a tolerância operacional (ASHTON-CHESS et al., 2006a), enquanto a acomodação parece depender de componentes do sistema imune, que tornam o indivíduo irresponsivo a ativação da resposta imune, mesmo na presença de anticorpos (TANG; PLATT, 2007).

Em análise destes mecanismos *in vivo*, como no transplante com modelo murino, foi observado que células Treg suprimem a ativação de células T próprias que tenham escapado da seleção negativa no timo, além de serem capazes de reprimir a resposta de células T CD4⁺ e CD8⁺, em relação ao enxerto (CORNELL; SMITH; COLVIN, 2008; McCAUGHAN *et al.*, 2012). No transplante em humanos, a expressão de tolerógenos, como o HLA-G, é associada a pacientes que desenvolvem um perfil de tolerância ao enxerto (QIU *et al.*, 2006).

Também as células-tronco tem revelado importante papel na imunomodulação e na criação de microambiente de tolerância, sendo favoráveis ao reparo tecidual (GÜLDNER et al., 2015). Com isso, o efeito regulador temporário da terapia celular nos transplantes tem se mostrado como uma ótima opção para o tratamento de rejeições, amenizando a panimunossupressão e possibilitando a adoção de doses reduzidas de medicamentos, diminuindo os efeitos colaterais destas drogas (GARAKANI; SAIDI, 2017).

Testes já foram conduzidos utilizando estas células, quando de origem autóloga, na terapia de indução em transplante renal. O efeito destas células foi comparado ao efeito do tratamento com Basiliximab (anticorpos monoclonais anti-CD25), avaliando a expansão de células Treg. A terapia celular não foi mais vantajosa, mas também não afetou os pacientes

transplantados (PERICO et al., 2011). De forma similar, células-tronco mesenquimais foram utilizadas no transplante renal, sendo estas extraídas da medula óssea do doador. Como resultado, foi promovido o aumento de IL-10 e expansão de células Treg (LEE et al., 2013).

Os estudos clínicos e de monitoramento voltados para os transplantes evidenciam a existência de mecanismos de tolerância, assim como anteriormente observados em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Porém, é clara a existência de aspectos a serem melhor compreendidos, como a real eficiência, os riscos e a viabilidade de uso destas terapias.

2.4.3 Modelos de estudo da imunologia dos transplantes

Entre outras formas de estudar os eventos imunológicos e não imunológicos associados aos transplantes, está a cultura de células e tecidos, que são os estudos realizados *in vitro* e o uso de animais de laboratório, que se refere aos estudos *in vivo*. Obrigatoriamente, ambos os modelos devem permitir a avaliação de fenômenos biológicos naturais, induzidos ou comportamentais, que possam ser comparados aos fenômenos humanos em questão (FERREIRA et al., 2005).

2.4.3.1 Modelos animais não humanos de estudo da imunologia dos transplantes

O uso de modelo animal de pequeno a grande porte foi base para o desenvolvimento da área dos transplantes. Dentre os vertebrados utilizados nestes estudos, destacam-se os roedores, os quais contribuíram para a elucidação de diversos aspectos imunológicos, como a explicação da tolerância central e a compreensão da rejeição, como sendo um evento imunológico. Porém, existem algumas barreiras que limitam o uso exclusivo de experimentações com estes animais. Outros modelos utilizados para eliminar parte das disparidades citadas foram as ovelhas e os chimpanzés, os quais no entanto foram banidos de experimentações em 2011, além de serem custosos e demandarem tempo, restando os roedores antes de prosseguir com um estudo clínico com humanos (MACCHIARINI et al., 2005; SHULTZ et al., 2012).

Portanto, a partir de murinos atímicos foram iniciados estudos transplantando células hematopoiéticas primárias de humanos, com o intuito de gerar um organismo com sistema imune semelhante ao nosso. Contudo, esta transferência de células não era suportada pelos

murinos. Logo foi descoberta a mutação *Prkdc^{scid}* (*Prkdc* significa *Protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide*, que é uma proteína associada ao reparo do DNA durante a recombinação V(D)J) na linhagem CB17, a qual gera roedores com imunodeficiência grave (SCID, do inglês *severe combined immunodeficiency*), incapazes de produzir células T e B maduras, devido à inibição da recombinação gênica (BOSMA et al., 1983). Porém, ainda estes camundongos não eram tão tolerantes a células humanas transplantadas e as rejeitavam via resposta imune inata, principalmente mediada por células NK (GREINER et al., 1998).

Diante desta dificuldade, camundongos com mutação SCID foram entrecruzados com outras linhagens com limitações diversas associadas ao sistema imune, como mutações nos genes *Rag1*, *Rag2*, $\beta 2m$ e *Prf1*, como o camundongo NOD (do inglês *nonobese diabetic*) (MACCHIARINI et al., 2005).

Muito avanços ocorreram com o uso dos camundongos humanizados e imunodeficientes, especialmente com a linhagem mutada para o *locus* da cadeia γ do receptor de IL-2 (*Il2rg*, também conhecido como γ_c e CD132), o que propiciou a compreensão da importância desta interleucina para a ativação de células efectoras do sistema imune, como de linfócitos T, B e células NK (TRAGGIAI et al., 2004; SHULTZ et al., 2005; ITO et al., 2005)

Diversas linhagens de roedores foram produzidas, incluindo três principais e que variam, dentre outros fatores, na quantidade de células-tronco hematopoiéticas, que são capazes de receber com o transplante. Como exemplo, as linhagens: NOD.Cg-*Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}* (ou NSG), que não expressa o receptor de IL-2; a linhagem NODShi.Cg-*Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Sug}* (ou NOG), que expressa o receptor de IL-2, mas não a sua cauda citoplasmática, fato que limita a continuação da sinalização intracelular mediada pela citocina; e a linhagem C;129S4-*Rag2^{tm1Flv}Il2rg^{tm1Flv}*, que é derivada da mistura de BALB/c com 129 *Rag2^{null}* e não expressa o receptor de IL-2 (SHULTZ et al., 2012).

Entre os fatores que dificultam ainda o uso destes modelos humanizados imunologicamente, estão: as diferenças nos tipos de fatores de crescimento presente em roedores *versus* em humanos, a presença de MHC murino no lugar do HLA, órgãos linfoides pouco desenvolvidos, mecanismos de produção de diferentes classes de imunoglobulinas que diferem dos observados em seres humanos (SHULTZ et al., 2007). Parte destas dissimilaridades foram contornadas via inativação gênica (ou *knock in*) e produção de transgênicos (construção de cDNA e expressão via BACs ou *bacterial artificial chromosomes*), porém estas alterações ainda precisam ser aprimoradas (SHULTZ et al., 2012).

Algumas descobertas feitas por meio de modelos humanizados, incluem a compreensão de eventos da hematopoiese, do sistema imune, de mecanismos de doenças infecciosas e de tumores. Na hematopoiese, foi verificado que células-tronco hematopoiéticas fetais em comparação com as adultas, apresentam maior capacidade em gerar células T regulatórias (Treg), sugerindo a existência de uma estratificação na ontogenia do sistema imune (MOLD et al., 2010). Com relação ao estudo de componentes imunológicos, através do modelo Hu-PBL-SCID (camundongos SCID injetados com células linfoides periféricas de humanos), foi evidenciada a capacidade de células Treg, após expansão *ex vivo*, em controlar a infiltração celular e rejeição em transplantes de ilhotas, pele e artérias (KING et al., 2008; KIRKILES-SMITH et al., 2009; RACKI et al., 2010).

De forma específica, a rejeição do aloenxerto em humanos é estudada usando camundongos BRG Hu-SRC-SCID, no qual a um camundongo recém nascido ou adulto SCID, são injetadas células-tronco hematopoiéticas derivadas do fígado fetal, cordão umbilical, medula óssea ou do sangue periférico, seguido da estimulação com fator estimulante das colônias de granulócitos em humanos ou G-CSF (do inglês *granulocyte-colony stimulating factor*). Entre os resultados de estudos conduzidos com este modelo, foi evidenciada a capacidade de células T CD4⁺ em reconhecer e destruir de forma direta células endoteliais alogênicas, o que pode ser revertido com a adoção de anticorpo neutralizante de IL-6, culminando na geração de células Treg e prevenindo a rejeição (FOGAL et al., 2011).

Com relação aos ensaios que demandam a compreensão dos eventos que dependem do tráfico de células imunes, estes ainda apresentam certas limitações. Visto que, mesmo existindo moléculas de adesão celular compartilhadas inter-espécies (LFA1 e ICAM), que contribuem com esta mobilidade, ainda não é completa a afinidade com as moléculas de adesão dos murinos, devido a características espécie-específicas (JOHNSTON et al., 1990).

Além disso, o estudo da ativação de células NK com camundongos humanizados encontra certas dificuldades. Apesar destas células serem geradas nos modelos animais, elas não são totalmente ativadas e dependem de um estímulo externo mais forte, como IL-15, para desempenharem o seu papel citotóxico (STROWIG et al., 2010). Mas o entendimento de diversos mecanismos associados às células NK foi viável por meio do desenvolvimento de linhagens de camundongos transgênicos não humanizados, com capacidade de expressar de forma constitutiva MICA, por Wiemann et al. (2005). Este grupo criou o camundongo H2-K^b-MICA, o qual já foi utilizado na compreensão da relação da capacidade de MICA em interagir com o seu principal receptor, NKG2D de murinos, expresso tanto em células NK como células

T-CD8⁺ *in vivo*. Isso foi possível, pois os sítios de ligação de MICA e do ligante relacionado em murinos, RAE1, assemelham-se funcionalmente. Com isso, em colaboração com resultados de estudo *in vitro*, foi demonstrada a capacidade de MICA ligado a membrana em ativar a resposta citotóxica (WIEMANN et al., 2005). Também foi observado que a ativação do receptor NKG2D impede o recrutamento de proteínas intracelulares adaptadoras, como DAP10 e DAP12, por outros receptores inibidores, cooperando para a ativação celular mediada por células NK (KOCH et al., 2017).

Já a investigação de modelos animais para HLA-G se iniciou em 1993 (SCHMIDT et al., 1993). Foram criados camundongos transgênicos (H-2K^b/HLA-G) contendo desde a região 5'-URR à região 3'-UTR do gene *HLA-G*, nos quais foram observados diversos aspectos genéticos e fenotípicos constatados em humanos. Apenas em 2003, foi identificado o HLA-G homólogo em camundongos, o Qa-2, codificado pelo gene *Ped*, sendo funcionalmente e morfologicamente semelhante a molécula encontrada em humanos (COMISKEY et al., 2003). Estas similaridades revelaram que seria possível trabalhar com murinos transgênicos positivos ou negativos para Qa-2 (NGUYEN-LEFEBVRE et al., 2016).

Estudos voltados para a compreensão dos papéis dos receptores de HLA-G foram conduzidos com camundongos transgênicos, por exemplo para LILRB2 (ILT4). Neste modelo, a injeção de dímeros de HLA-G5 e tetrâmeros de HLA-G1 promoveram a regulação em células dendríticas de IL-6, suprimindo a expressão de MHC de classe II (LIANG; HORUZSKO, 2003; KITAMURA et al., 2005). Ainda, ensaios realizados com transgênicos para LILRB1 (ILT2) transplantados de pele demonstraram uma maior sobrevida dos animais, maior expressão de PD-1 (do inglês *programmed cell death 1*), o qual é expresso por células T ativas, mas não estimuladas, contribuindo para a manutenção da tolerância periférica a antígenos próprios ou a rejeição de enxertos (SANDNER et al., 2005). Outra análise demonstrou o potencial de HLA-G em induzir a expansão de MDSCs (do inglês *myeloid-derived suppressor cells*) e produção de enzimas imunossupressoras (como arginase I e iNOS2) mediada por ILT4 e ILT2 *in vivo* (ZHANG et al., 2008). Em síntese, foi evidenciado que a injeção de uma única dose de HLA-G antes do transplante de pele tem o potencial de aumentar a sobrevida do enxerto (LEMAOULT et al., 2013). O uso de modelos animais humanizados para HLA-G ainda não foi concretizado, mas possivelmente venha a esclarecer e validar eventos ainda não bem compreendidos (NGUYEN-LEFEBVRE et al., 2016).

2.4.3.2 Modelos celulares de estudo da imunologia dos transplante

Com relação aos estudos conduzidos com modelos celulares, é importante a compreensão dos mecanismos da inflamação e as potenciais vias a serem bloqueadas para limitar o progresso de doenças associados ao dano vascular, como observado na rejeição no transplante (PIOTTI et al., 2014). Este fato advém do envolvimento e comprometimento do endotélio já na primeira etapa que promove a inflamação, também em diversas patologias (SCOTT; BICKNELL, 1993). Além disso, o endotélio tem íntima ligação com os mecanismos imunológicos, que propiciam a migração transendotelial de leucócitos, capazes de causar danos a células que constituem os tecidos do aloenxerto (TAFLIN et al., 2011).

O primeiro modelo de célula endotelial (CE) foi isolado em 1973, a partir do cordão umbilical (HUVECs, do inglês *human umbilical vein endothelial cells*). Este modelo tem sido usado em grande escala por muitos pesquisadores (JAFFE et al., 1973). Apesar destas células serem de fácil manuseio em laboratório, elas divergem das linhagens adultas, por terem fenótipo associado a um microambiente fetal, o qual é imunoprevilegiado (SCOTT; BICKNELL, 1993; BOUÏS et al., 2001).

A descoberta de como isolar as células primárias foi um grande avanço, mas ainda permaneciam dificuldades, como a impossibilidade de utilizar estas células por muitas passagens (não mais que seis), devido as alterações fenotípicas e morte precoce observadas nos estudos *in vitro*. Assim, foram estimuladas as pesquisas para desenvolver células imortalizadas, com características similares às observadas em células primárias, mas levemente alteradas, como as células tumorais, possibilitando que ao longo de diversas gerações, ou passagens, a morfologia e expressão de antígenos se mantivesse estável (BOUÏS et al., 2001).

Diante da heterogeneidade de CEs existentes e a busca por novos modelos celulares mais próximos da realidade, tornaram-se disponíveis diversas linhagens, ao exemplo da diferenciação entre células formadoras dos grandes vasos (como a EA.hy926) *versus* as células da microvasculatura (como a HMEC-I) (BOUÏS et al., 2001).

Especificamente, para o modelo de transplante renal, as células formadoras dos pequenos vasos são as de maior interesse, além de constituírem a unidade funcional renal, os glomérulos (SATCHELL; BRAET, 2009). O isolamento destas CEs glomerulares (HRGEC, do inglês *human renal glomerular endothelial cell*) deu-se em 1984 (MELE et al., 2013). As células primárias HRGECs apresentam o fenótipo mais próximo em relação ao observado *in vivo* e tem papel primordial no desenvolvimento de diversas desordens patofisiológicas que

acomentem os rins, tais como as glomerulopatias, injúrias causadas pela isquemia e reperfusão durante o transplante e rejeições a aloenxertos (NANGAKU et al., 1997). Estudos já foram conduzidos com esta linhagem, auxiliando na compreensão dos eventos observados *in vivo*, de forma mais confiável, evitando a influência de possíveis alterações fenotípicas que linhagens imortalizadas possam apresentar nos resultados. Por exemplo, Matsui et al. (2016), analisaram a relação da fibrose glomerular com o dano da dupla fita de DNA pela análise de biópsias de aloenxerto renal, em colaboração com ensaios *in vitro*, utilizando a linhagem HRGEC. Neste trabalho, foi demonstrado que a fibrose intratável provém do aumento do dano ao DNA (ou DSB, do inglês *double strand DNA*), detectado pela análise da expressão de γ -H2AX, e também pela secreção e acumulação continuada de colágeno tipo VI pelas células endoteliais. Este achado é importante por contribuir para a elucidação de parte dos mecanismos associados a rejeição crônica no transplante renal.

Dentre as células da microvasculatura imortalizadas, tem-se a HMEC-1 (do inglês *human microvascular endothelial cell line-1*), que representa uma das linhagens originadas via transfecção do grande antígeno T, usando SV40 (PRUCKLER et al., 1993). Além desta, existe a linhagem SV-HCEC (CE imortalizada da microvasculatura cerebral) (MURUGANANDAM et al., 1997) e a linhagem ihTERT-HDMEC, que é uma CE oriunda de células sinusóides hepáticas fetais e imortalizadas pela alteração no gene *hTERT* (do inglês *human telomerase reverse transcriptase*) (YANG et al., 1999).

HMEC-1 foi estabelecida a partir de CEs de microvasculatura dérmica humana, sendo também nomeada CDC/EU.HMEC-1. Dentre as outras células citadas, esta linhagem é a mais próxima das linhagens primárias, tendo formato “*cobblestone*”, não dependendo de soro humano para crescer, atingindo densidades de 3 a 7 vezes maiores que as de células primárias, como a HRGEC, secretando vWF (do inglês *von Willebrand Factor*), absorvendo acLDL (do inglês *acetylated low density lipoprotein*), desenvolvendo-se e formando tubos em meio Matrigel, ligando-se a linfócitos, expressando integrinas, ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina, assim como MHC classe II, CD31, CD36, CD44, tPA (do inglês *tissue-type plasminogen activator*), PAI-1, TF (do inglês *tissue factor*), TM e epítomos reconhecidos pelos anticorpos monoclonais EN4 e PAL-E. Os ensaios realizados com esta linhagem incluem a avaliação de drogas anticolesterol (PRUCKLER et al., 1993), as alterações do citoesqueleto decorridas da permeabilidade endotelial durante a inflamação e a análise do estabelecimento da compatibilidade da vasculatura de enxertos (ROBINSON et al., 1995).

Ainda no transplante, CEs da microvasculatura ativam a resposta imune, culminando na rejeição. Esta geralmente é mediada por anticorpos e está associada aos eventos que contribuem para as rejeições crônicas, porém ainda existem mecanismos a serem esclarecidos sobre a sua etiologia. Entre as alterações teciduais a serem exploradas em ensaios *in vitro*, estão: a remodelação da microvasculatura e agregações celulares (monócitos, macrófagos, células NK, neutrófilos e algumas células T) associadas a ativação, proliferação e diferenciação celular (SIS, 2012).

Ensaio *in vitro* revelaram que a rejeição mediada por anticorpos pode independe da ativação de complemento, ativando o endotélio e a inflamação (YAMAKUCHI et al., 2007), em associação com a reação cruzada de apenas duas porções Fab de IgG (F(ab')) quando ligadas ao endotélio. Por meio de experimentos com modelo animal, observou-se que as células NK também estão associadas a este mecanismo (HIROHASHI et al., 2012), levando à perda das fenestras capilares, aumento da membrana basal e efeito isquêmico, tudo sem requerer o complemento. Este mecanismo parece ser mais comum que o esperado, visto que cerca de metade de ABMR não apresenta a deposição de C4d, referente à ativação de complemento (SIS et al., 2007). Mas existem muitos aspectos a serem explorados e compreendidos deste mecanismo, para que possam ser controlados e revertidos, aumentando a sobrevida de aloenxertos (SIS, 2012).

Outra forma de ativação de CEs, tem estas atuando como alvos de células T citotóxicas provenientes do receptor. Atualmente, esta forma de rejeição celular já foi bem elucidada e é bem controlada pela utilização de imunossupressores específicos. Ainda, os eventos iniciais pós-cirúrgicos promovem a produção de citocinas pró-inflamatórias e IFN γ por células T e B ativas que estimulam a expressão de HLA classe I e II pelo endotélio. Logo, estudos *in vitro* que mimetizam este mesmo estado de ativação, fazem uso de IFN γ (PIOTTI et al., 2014).

A exploração das células endoteliais possibilitou a compreensão de mecanismos específicos da resposta imune que levam também à deposição de anticorpos anti-MICA em células endoteliais positivas para MICA (MING et al., 2015). Também foi evidenciado, via ensaios *in vitro*, a influência de citocinas, como TNF α e não IFN γ , na expressão de MICA na superfície de CEs ou na forma solúvel imunorregulando a ativação de células NK, via interação com NKG2D (CHAUVEAU et al., 2014).

Todos estes resultados refletem a importância de CEs, NK e HLAs não clássicos na ativação ou inibição da resposta imune, mas pouco se sabe sobre a capacidade imunorreguladora delas. Alguns estudos recentes revelaram a expressão de receptores

inibidores, ILT3 e ILT4, em células endoteliais tolerogênicas (MANAVALAN et al., 2003), sendo a expressão destes receptores e KIR2DL4, estimulada na presença de HLA-G (LEMAOULT et al., 2005). A expressão de tolerógenos, como HLA-G, pode ser detectada em células endoteliais cardíacas, estando esta expressão relacionada com indução via progesterona (SHESHGIRI et al., 2008). Em contrapartida, a expressão de CD160 por células endoteliais tem revelado outro possível efeito da molécula HLA-G ao interagir com o endotélio, atuando como um agente anti-angiogênico e lítico, segundo trabalho publicado por Fons et al. (2013). O papel de MICA e HLA-G na resposta imune foi avaliado em ensaio *in vitro*, no qual foi demonstrado que MICA expresso na superfície celular é capaz de ativar células NK, mas na presença de HLA-G1 solúvel, esta ativação é inibida (MENIER et al., 2002).

Portanto, os diferentes achados abordados ao longo da revisão demonstram a importância deste trabalho para a elucidação da influência de diversas variáveis no estabelecimento do aloenxerto. Ao exemplo da influência das variáveis do pré-transplante renal e dos genes *HLA-G*, *MICA* e *NKG2D*. Além da busca por fatores que possam afetar o prognóstico de pacientes com doença renal crônica, submetidos ao transplante.

3 RESULTADOS

3.1 CAPÍTULO 1 – SINGULARIDADES DOS FATORES DE RISCO PRÉ-TRANSPLANTE PARA O ALOENXERTO RENAL: ANÁLISE UNIVARIADA E MULTIVARIADA

SINGULARITIES OF PRE-TRANSPLANT RISK FACTORS FOR THE KIDNEY ALLOGRAFT: UNIVARIATE AND MULTIVARIATE ANALYSIS

Running title: Major Pre-Transplant Risk Factors for Kidney Graft

Vanessa Hauer¹, Matilde Risti¹, Bruna L.M. Miranda¹, Carolina M. Pozzi², Fabiana L. de C. Contieri², Ibrahim A. Sadissou³, Eduardo A. Donadi³, Danilo G. Augusto¹, Maria da G. Bicalho¹

¹Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná (UFPR), R. Cel. Francisco H. dos Santos S/N, Centro Politécnico – Jardim das Américas, CP 19071, 81531-980, Curitiba, PR, Brazil.

²Setor de Transplante Renal, Hospital Universitário Evangélico de Curitiba, Alameda Augusto Stellfeld, 1908, Curitiba, 80730-150, Brazil.

³Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Clínica Médica, Divisão de Imunologia Clínica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP), Av. Bandeirantes, 3900 – Monte Alegre, 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Profiling of kidney-transplant patients has changed with the growing advances in transplantation procedures, and a reinterpretation of population-specific epidemiological factors is now essential. To improve the search for donors and recipients in kidney transplantation, we conducted an analysis of more than 20 variables in donor-recipient pairs from a kidney transplant center in southern Brazil. We monitored patients with end-stage kidney disease (glomerular filtration rate under 15 mL/min) undergoing kidney transplantation (n = 67). After pre-selection of the main prediction factors and a univariate analysis, we performed a logistic regression to obtain the best-fit model. Besides the previously known risk predictors, such as donor's age and preformed antibodies, we included new variables, such as clinical declared abortion and three crossed variables between donors and recipients (weight, age and height). Our regression model indicated that the variables of sex, *HLA-B* mismatches and time on dialysis were capable of predicting 70.7% of patients who developed rejection episodes. Given social and biological aspects, our results indicated that the male sex is an important risk factor for kidney allograft rejection, along with *HLA* mismatches.

Key words: Kidney transplantation; Risk factors; Allograft rejection.

Corresponding author: Prof. Maria da G. Bicalho. Phone number: +33 41 3361 1729; email address: mgbicalho@gmail.com. Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (www.ligh.ufpr.br), Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná (UFPR), R. Cel. Francisco H. dos Santos S/N, Centro Politécnico – Jardim das Américas, CP 19071, CEP 81531-980, Curitiba, PR, Brazil.

Introduction

The main current goal for transplantation outcome is improvement of the prognosis for clinical rejection. It has become evident that the profiles of kidney-transplant patients and donors have changed, such as age and events leading to previous sensitization ¹⁻³. Therefore, it is important to find new rejection markers and to consider a comprehensive reinterpretation of epidemiological factors, combined with clinical and etiopathogenetic variables, envisaging successful transplantation outcomes.

Kidney transplantation has been performed in Brazil for over 50 years, and today the country has the world's largest public transplant program ^{4,5}. All patients on the waiting list are registered in a unified national public-health system. The active status of patients on the waiting list, besides a diagnosis of chronic renal failure, includes up-to-date immunodiagnostic exams (repeated every 3 months). All patients are typed for ABO blood antigens and low-resolution *HLA-A*, *HLA-B* and *HLA-DRB1*. Each *HLA* locus receives a specific compatibility score for each allele, i.e., *HLA-A* is 0.5, *HLA-B* is 2 and *HLA-DRB1* is 5, and 15 is the maximum possible score ⁶.

Additionally, every 2 to 3 months in the pre-transplant period, the DSA (donor-specific antibodies) is evaluated. This improves the identification, prior to transplantation, of risk patients who are sensitized ⁷. The presence of DSA against incompatible HLA molecules has proved to play a causative role in the development of antibody-mediated rejection in solid-organ transplantation ². PRA (panel reactive antibody) screening is also performed for all patients on the waiting list, followed by a complement dependent cytotoxicity (CDC) cross match, which evaluates the risk that the patients will react against antigens of his/her possible donor ^{8,9}. Scores are also given; PRA > 80% equals score 4 and 50% < PRA < 70% equals score 2 ⁶.

The events commonly associated with this sensitization include previous transplants ^{3,10}, multiple pregnancies that may induce the production of *de novo* DSAs in titers even higher than in the pre-transplant tests ^{11 12 13} and blood transfusions ¹⁴. In all of these situations, alloimmunization may be a consequence of a humoral immune response, primarily against classical and non-classical HLA antigens ¹⁵. Last, as a tie-breaking criterion among the best-ranked patients, the time on the waiting list is considered (1 point for each year, up to a maximum of 5 points), as well as the nearest geographic area to the potential donor and the availability of a local center to perform the transplant ⁶.

Therefore, all Brazilian patients on the waiting list have to be prepared to transplant, since analyses are first performed considering the patients' results (scores), especially from the *HLA*, ABO and PRA results, in order to prevent post-transplant complications. Immediately thereafter, the recipients with the top 10 to 15 scores are selected. They must be active on the waiting list and have the best profiles in terms of *HLA* histocompatibility with the donor. The two patients with the best results receive kidneys.

Thus, this study evaluated 24 variables collected prior to the kidney transplant in chronic kidney-disease patients and selected the best predictors of rejection episodes. We hypothesized that the current semi-score-based form of evaluation used in the kidney transplant system would be improved, as seen in other international transplant systems. These systems analyze the characteristics of pairs of donors and recipients in order to increase the patient survival rate, as well as to best use the available organs. To test this hypothesis we applied regression analysis in a model with nine carefully selected variables against the condition of having (or not) developed rejection (considering as a clinical diagnosis of rejection, acute cellular rejection, chronic graft nephropathy and chronic glomerulonephritis). This study can improve understanding of the factors that may facilitate the development of rejection episodes and decrease allograft survival. Analysis of these factors could potentially improve the donor-recipient search in kidney transplantation, as well as provide a basis for new analyses to be performed in other transplantation centers.

Methods

Patients and donors

Patients undergoing kidney transplantation ($n = 67$) in end-stage renal disease (glomerular filtration rate under 15 mL/min) were recruited and monitored for four years. For all patients, the pre-transplant immunosuppression was based on intravenous corticosteroid administration (methylprednisolone, 500 mg independently of weight). Patients with an increased immunological risk (re-transplant) for allograft rejection underwent an induction therapy with anti-thymocyte globulin (ATG, 1 to 1.5 mg/ kg/day), initiated a few hours before surgery and lasting 5 to 10 days after the procedure. The treatment with calcineurin inhibitor was discontinued during induction and resumed three days before the end of the induction therapy.

Maintenance therapy was composed of three medications. The first one was a corticosteroid (prednisone) at 1 mg/kg/day (progressively reduced to 5 mg within 30 days after transplantation, independently of weight), initiated 24 h before transplantation for patients with a living donor (PLD) or immediately prior to surgery for patients with a deceased donor (PDD). Additionally, an antiproliferative cell inhibitor (tacrolimus and, after hospital discharge, sirolimus) at 0.10 to 0.15 mg/kg/dose every 12 h (dose adjustments depending on the blood level of toxicity) initiated 36 h before transplantation (PLD) or immediately prior to surgery (PDD). A third medication, an antimetabolite agent (mycophenolate mofetil and, after hospital discharge, mycophenolate sodium) at 360 mg every 12 h, initiated 36 h before transplantation (PLD) or immediately prior to surgery (PDD).

All patients and donors came from the kidney transplantation sector at the Hospital Universitário Evangélico do Paraná (Curitiba, Brazil). The Ethics Committee of the Federal University of Paraná approved this study, in accordance to Brazilian federal laws (approval number CAAE 53627315.0.0000.0102). All participants signed a voluntary and informed consent form.

Variables

Data used for this study were from the pre-transplant period of patients and their donors. The information regarding the development or not of clinical rejection episodes (acute cellular rejection, chronic graft nephropathy and/or chronic glomerulonephritis) was obtained up to 4 years after transplantation, which was carefully followed and analyzed in hospital records. Patients with reported allograft loss or death due to non-immunological reasons, e.g., non-adherence to the immunosuppression treatment or secondary diseases, directly related to the post-transplant risk factors, were not included in the rejection group. Of all 67 monitored patients, nine were excluded from subsequent analyses because the potential risk factors were unknown.

The following data were collected from the patients: age; gender; height; weight; cause of end-stage renal disease (hypertension, diabetes, dyslipidemia, glomerulonephritis or hypertensive nephropathy); the body mass index, identified as underweight, normal weight, overweight or obese; number of previous transplants and blood transfusions; number of clinically declared abortions and pregnancies; time (months) and type of dialysis performed on pre-transplantation (hemodialysis, continuous ambulatory peritoneal dialysis or both); and *HLA*

mismatches (in low-resolution typing of *HLA-A*, *-B* and *-DRB1*, scored from 0 to 2 for each locus mismatch).

Antibodies were detected through the solid-phase Luminex® Map® Labscreen Single Antigen (One Lambda, Canoga, CA, USA) technique, performed by the laboratory associated with the routine examinations of the transplant center. The virtual PRA was calculated by entering all antibody specification results into the online calculator website (<https://www.etril.org/Virtual%20PRA/Default.aspx>), from Eurotransplant. The results are expressed as a percentage of positive reactions against a panel of donor's *HLA* class I (*HLA-A* and *-B*) and class II (*HLA-DR*) antigen specificities. They were grouped into $\geq 30\%$, $>30\%$ to $\leq 50\%$, $>50\%$ to $\leq 80\%$ and $>80\%$.

The presence of antibodies was also considered, based on the positive or negative detection of donor-specific antibodies (DSA) evaluated through a virtual cross-match analysis performed with the HLAMatchmaker program ¹⁶ and based on solid-phase results (independently of the median fluorescence intensity cut-off value, since it may vary greatly between laboratories and it is imperative to consider the immunological history of the patient before determining that a below-detection value is not actually a risk factor) ⁹. The summarized data for transplanted patients and donors are described in **Table 1**.

Advanced age was the only expanded donor criterion from the monitored transplants. The following information was collected: age, gender, type of donor (living or deceased) and allograft cold ischemia time. Three other variables were crossed, and were also included in the form of differences between each donor-recipient pair, as were the differences in height, weight and age.

Data analysis

The refined search for variables that could be associated with rejection episodes (bivariate response: development or not of rejection) was performed from a pre-selection step. This considers the inclusion or exclusion of an explanatory variable in the analysis and is also called the null model ¹⁷. Thus, in the pre-selection step, an individual analysis of each variable against the response variable (rejection episodes) was performed. Categorical and nominal variables were subjected to Pearson's chi-square analysis, while quantitative variables were subjected to the t-test for Equality of Means, preceded by Levene's test for equality of variances. The variables that showed a *p* value less than 0.25 in a univariate analysis (chi-square

or t-test) were retained and were included in the multivariate model for biological prediction. The IBM SPSS software, version 25 was used to perform all the analyses, which are summarized in the flowchart (**Figure 1**).

The logistic regression was applied to predict the best and simplest model to estimate the main risk factors involved in the prognosis for kidney transplantation. Prediction of outliers was performed. The analysis showed the linearity, normality and homogeneity of our data, which are assumptions for logistic regression (further specifications are provided in **Supporting information – Figure 1**).

Analyses were performed through a stepwise selection method and forward condition, considering a p value equal to or less than 0.05 for selection of the main variables predicted in the best model. The model-selection step considered acceptable the Omnibus Test (chi-square test) coefficients lower than 0.05, Nagelkerke's R^2 (pseudo-R-square statistic) higher than 0.300, and Hosmer and Lemeshow Test higher than 0.05). The prediction power demonstrated the ability of the model to detect the rejection episodes, as a percentage, and the Exp (B) (odds ratio) was obtained for the predictors included in the model.

Results

Description of risk predictors for kidney-transplanted patients

The results of the first step in the statistical tests revealed six variables associated with rejection episodes (**Supporting information – Table 1**). The highlighted variables were *HLA-B* ($p = 0.001$) and *HLA-A* ($p = 0.002$) mismatches, recipient's sex ($p = 0.011$), donor's age ($p = 0.011$), time on dialysis ($p = 0.039$), and a trend toward donor-specific antibody ($p = 0.065$) association. Considering the null model, the nine variables that fit the criteria for inclusion in the regression analysis ($p < 0.25$) were recipient's sex, number of abortions, PRA, DSA, time on dialysis, *HLA-A*, *-B* and *-DRB1* mismatches, donor type, donor's age and hypertension.

Defining risk factors for pre-transplant evaluation

Logistic stepwise regression indicated the best and simplest composition of risk variables capable of predicting the development of rejection episodes in pre-transplantation. The prediction power of this model was 70.7% (Omnibus Test of model coefficients lower than

0.001, Nagelkerke's R^2 of 0.398 and Hosmer and Lemeshow Test of 0.141). The following variables were selected to compose the model: time on dialysis in pre-transplant ($p = 0.053$; OR = 1.017; 95% CI = 1.000–1.034), recipient's sex ($p = 0.034$; OR = 4.083; 95% CI = 1.115–14.951) and *HLA-B* mismatches ($p = 0.021$; OR = 3.547; 95% CI = 1.206–10.433). The predictors not included in the model are shown in **Supporting information – Table 2**.

Discussion

Currently, it is still routine in transplants to account for a classical group of rejection-risk variables, without considering intrinsic variations among transplant populations. The proposed new sorting of the main risk predictors highlighted significant common and also new variables to improve the discrimination between high and low risk for developing kidney-rejection episodes in patients still in the pre-transplant phase. Our proposed final model to predict rejection included: mismatches for the *HLA-B* locus (with increases of risk for 1 or 2 incompatibilities), time on dialysis in pre-transplant (with increase of risk in months of therapy) and male sex of the recipient.

The variability and incompatibilities between *HLA-B* alleles among recipients and donors were shown to have a strong influence on our kidney-transplanted patients, even indicating that *HLA-DR* contributes the most to graft survival and function. This importance of *HLA* matches is frequently associated with the success of solid-organ transplants, as found in The Collaborative Transplant Study, with an improvement rate of 20% when there are no *HLA-B* and *HLA-DR* mismatches¹⁸.

However, there is still a lack of consensus on the hierarchy of importance among the classical loci. Some studies even mention *HLA-A* as having a larger role in rejection, and others suggest the importance of the mismatch effect for classes I and II, independently of each other^{19,20}. In addition to the observed heterogeneity for the *HLA-B* locus, there is the linkage disequilibrium with the *HLA-C* gene. Therefore, mismatches of the two loci were previously related to a decrease of kidney allograft survival²¹. Low-resolution genotyping is still used for donor-recipient pairing in the evaluated system, but it decreases the quality of the virtual cross-match²² and fails to detect the existence of null alleles²³. Our results indicated that *HLA-B* incompatibilities have a strong influence on rejection, even stronger than non-genetic variables. Concerning *HLA-DRB1*, most of the patients did not show class II incompatibilities, explaining its non-detection as a risk factor.

The rejection model also included the time on dialysis in pre-transplant as one of the risk predictors. Although it only trended toward significance, inclusion of time on dialysis improved the power of the model, and its importance had previously been detected in the pre-selection step. This relationship has been evaluated for a long time, and it is clear that preemptive transplantation increases the survival of patients undergoing kidney transplantation. However, there is no consensus on whether there is a positive and increasing association with post-transplant risk, or if there is a plateau, in which the patient would no longer have a continuous evolution of the risk.

The significant influence of 31 months of dialysis on the transplant outcome was previously described, but afterward there was no increase in risk. Up to 12 months of dialysis would be an optimum period for a transplant ²⁴. Another analysis found that only the initiation of dialysis was associated with an increase in graft failure ²⁵. In our analyses, of the total number of patients who had been in dialysis for up to 12 months, 72.7% did not develop rejection, and among those who underwent dialysis for longer than 32 months, 63.0% developed rejection; even for over 24 months in dialysis, this outcome predominated, with 58.1% developing rejection. The scoring adds points for patients with a longer time on the waiting list. Generally, this approximates the period during which the patient remained in alternative therapy. Thus, it would be important to clarify how long a period on the waiting list would constitute a risk and a need to increase the patient's score.

Male sex was also an important predictor; 62.5% of all men showed rejection in this study. Male sex is also a risk factor associated with graft loss after five years of transplantation ^{26,27}. A biological explanation for this positive association is the protective effect of hormones in women; for instance, estradiol promotes graft function and decreases cellular infiltration ²⁸. It probably is also related to lifestyle, culture, behavioral factors and the incidence of transplant-related pathologies. This association explains the results, together with the biological factors ²⁹. There is also the tendency of men to take less care with their health, as observed in other studies ³⁰. Hypertension as a cause of end-stage renal disease was associated with a poorer prognosis among men. In this study, 63.4% of all men with hypertension developed rejection, compared with only 30.4% of all hypertensive women. Thus, women after transplantation appear to pay greater attention to their health than do men.

Previous analyses assigned a higher score to the presence of DSA, but not to the classes of PRA ^{31 32}. The involvement of pre-existing donor-specific antibodies, activating the immune response, frequently culminates in irreversible rejections; however, DSA accuracy also depends

on the completeness of the donor *HLA* typing⁹. Thus, PRA, which detects total DSA relative to a population of donors, continues to be the analysis performed most often in patients on the pre-transplant waiting list in Brazil, which is used to monitor and forward sensitized patients for induction therapies in pre-transplant procedures³³.

The number of abortions was another risk predictor that is not often reported, but was selected in the analysis. In fact, the immunological events that surround the fetus and allograft loss are comparable, mainly concerning the inflammation process, as other immune cells and cytokine balance deregulation³⁴. Pregnancy *per se* has previously been associated with the development of naturally acquired pregnancy-induced microchimerism. It is presumed to be developed from the trafficking of T, B and NK cells that may persist a decade later in a woman and in her progeny. In case of a donor-related transplant, the development of tolerance mediated by a previous pregnancy explains how a supposed risk factor is not at all associated with clinical rejection³⁵. Thus, multiple pregnancies, generally considered a risk factor in transplantation, may actually be a sign of a healthy immune system, which is responsive but flexible enough to tolerate fetal allografts and kidney allografts. Evidence from successful post-transplant gestations associated with renal graft stability is consistent with this finding³⁶. Therefore, complications during pregnancy would be a clue in the pre- and post-transplant for the risk of developing rejections due to deregulated immunological mechanisms³⁷. This finding should stimulate more studies concerning this matter, and possible adoption of clinically recorded abortion events as a risk factor in the pre-transplantation evaluation.

The analysis also demonstrated the importance of the donor's age. In recent years, a considerable change in age distribution has occurred, especially in older populations. However, the donor's age is known to negatively influence graft survival, as it overlaps with the development of pathologic lesions with age-related change³⁸. This explains its inclusion as a risk factor in the more important graft survival scores, such as in the Kidney Donor Risk Index used in the Kidney Allocation System, from the United States transplantation system^{39 40}. With donors above 30 years of age, the risk of allograft failure in the recipient gradually begins to increase¹, and above 55 years is an important risk factor⁴¹. A simple stratified analysis of donor's age in patients with rejection was performed in this study. This revealed that in our group the donor's age at risk appears to be lower, starting at 45 years. A total of 35.5% of patients with donors between 18 and 44 years of age had rejection, whereas 63.3% that had donors 45 years old or older had rejection episodes.

The donor age and type (deceased and living) have been investigated in other studies of kidney-transplanted patients⁴². They found that among the deceased-donor transplants, a poorly matched transplant can be offset by a young donor age, and a better match can mitigate the negative impact of an older donor age. Therefore, *HLA* mismatches have primary importance, which is mainly reflected in cases of transplants from older or deceased donors.

Even so, a donor's age above 65 years represents a risk factor for transplant failure⁴³. This finding demonstrates that the expanded criteria must take into account the improvement that patients will have after transplantation compared to remaining on substitute dialysis therapy. Kidney transplantation, among solid-organ transplantations, is still the least restricted with respect to the donor's age, and the present result suggests that this situation should be revised.

Conclusion

Risk factors vary among different groups of patients, which is a result of the variations in priorities of each transplant center and within countries. Different factors, such as DSA, donor's age above 45 years, and time on dialysis, as well as the number of clinical abortions, influence the outcome in kidney transplant patients. In particular, an *HLA-B* mismatch strongly influences the likelihood of rejection and should be considered, just as is done for *HLA-DRB1*. We suggest that *HLA* typing results be interpreted with care, as this is an important factor for patients on the waiting list for kidney transplantation. Therefore, *HLA* incompatibility, male sex, and a long period of time on dialysis can affect the patient after transplantation and result in rejection episodes. Accordingly, it is essential to take a critical look at the maintenance of patients on the waiting list, in order to make the best possible use of the limited number of organs available.

Acknowledgments

We are most grateful to the participants for generously agreeing to provide samples for this study. We would like to thank Dr. Janet W. Reid and Ana L. Cidral for the critical language review. We also thank the Hospital Universitário Evangélico de Curitiba, especially LIGH, for their technical support.

Funding

This study was partly supported by research Ph.D. scholarship funding (No. BEX 10205/14-4) from the CAPES Foundation/Post-Graduate Program in Genetics of UFPR, Ministry of Education of Brazil, Brasília – DF 70.040-020, Brazil.

References

1. Laging, M. *et al.* The relative importance of donor age in deceased and living donor kidney transplantation. *Transpl. Int.* **25**, 1150–7 (2012).
2. Wiebe, C. *et al.* Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant. *Am. J. Transplant* **12**, 1157–67 (2012).
3. Heaphy, E. L. G. *et al.* Risk factors for retransplant kidney recipients: relisting and outcomes from patients' primary transplant. *Am. J. Transplant* **14**, 1356–67 (2014).
4. Pêgo-Fernandes, P. M. & Garcia, V. D. Current status of transplantation in Brazil. *Sao Paulo Med. J.* **128**, 3–4 (2010).
5. Medina-Pestana, J. O. *et al.* Organ transplantation in Brazil in the year 2002. *Transplant. Proc.* **36**, 799–801 (2004).
6. Brasil, M. da S. do. PORTARIA Nº 2.600 – Regulamento Técnico do Sistema Nacional de Transplantes. 206 (2009). Available at: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2009/prt2600_21_10_2009.html.
7. Mishra, M. N. & Baliga, K. V. Significance of panel reactive antibodies in patients requiring kidney transplantation. *Saudi J. Kidney Dis. Transpl.* **24**, 495–9 (2013).
8. Konvalinka, A. & Tinckam, K. Utility of HLA Antibody Testing in Kidney Transplantation. *J. Am. Soc. Nephrol.* **26**, 1489–502 (2015).
9. Tait, B. D. Detection of HLA Antibodies in Organ Transplant Recipients - Triumphs and Challenges of the Solid Phase Bead Assay. *Front. Immunol.* **7**, 570 (2016).
10. Hayanga, J. A. *et al.* Risk factors associated with lung retransplantation: evaluation of a nationwide registry over a quarter century. *Ann. Thorac. Surg.* **98**, 1742–6; discussion 1746–7 (2014).
11. Hönger, G. *et al.* Frequency and determinants of pregnancy-induced child-specific sensitization. *Am. J. Transplant* **13**, 746–53 (2013).
12. Higgins, R. M., Daga, S. & Mitchell, D. A. Antibody-incompatible kidney transplantation in 2015 and beyond. *Nephrol. Dial. Transplant* **30**, 1972–8 (2015).
13. Pratschke, J. *et al.* Immunological risk assessment: The key to individualized immunosuppression after kidney transplantation. *Transplant. Rev. (Orlando)*. **30**, 77–84 (2016).
14. Scornik, J. C. & Meier-Kriesche, H.-U. Blood transfusions in organ transplant patients: mechanisms of sensitization and implications for prevention. *Am. J. Transplant* **11**, 1785–91 (2011).
15. Ming, Y. *et al.* Acute Antibody-Mediated Rejection in Presence of MICA-DSA and Successful Renal Re-Transplant with Negative-MICA Virtual Crossmatch. *PLoS One* **10**, e0127861 (2015).
16. Duquesnoy, R. J. HLAMatchmaker: A molecularly based algorithm for histocompatibility determination. I. Description of the algorithm. *Hum. Immunol.* **63**, 339–352 (2002).
17. Sperandei, S. Understanding logistic regression analysis. *Biochem. Medica* **24**, 12–8 (2014).
18. Opelz, G. Correlation of HLA matching with kidney graft survival in patients with or without cyclosporine treatment. *Transplantation* **40**, 240–3 (1985).
19. Paramesh, A. S. *et al.* The effect of HLA mismatch on highly sensitized renal allograft recipients. *Clin. Transplant.* **24**, E247–52 (2010).
20. Broeders, N. *et al.* A new HLA allocation procedure of kidneys from deceased donors in the current era of immunosuppression. *Transplant. Proc.* **47**, 267–74 (2015).

21. Frohn, C., Fricke, L., Puchta, J. C. & Kirchner, H. The effect of HLA-C matching on acute renal transplant rejection. *Nephrol. Dial. Transplant* **16**, 355–60 (2001).
22. Geneugelijk, K., Wissing, J., Koppenaal, D., Niemann, M. & Spierings, E. Computational Approaches to Facilitate Epitope-Based HLA Matching in Solid Organ Transplantation. *J. Immunol. Res.* **2017**, 9130879 (2017).
23. Elsner, H.-A. & Blasczyk, R. Immunogenetics of HLA null alleles: implications for blood stem cell transplantation. *Tissue Antigens* **64**, 687–95 (2004).
24. Gritane, K. *et al.* Influence of Pretransplant Dialysis Vintage on Repeated Kidney Transplantation Outcomes. *Transplant. Proc.* **50**, 1249–1257 (2018).
25. Prezelin-Reydit, M. *et al.* Prolonged dialysis duration is associated with graft failure and mortality after kidney transplantation: results from the French transplant database. *Nephrol. Dial. Transplant* 1–7 (2018). doi:10.1093/ndt/gfy039
26. Aakhus, S., Dahl, K. & Widerøe, T. E. Cardiovascular morbidity and risk factors in renal transplant patients. *Nephrol. Dial. Transplant* **14**, 648–54 (1999).
27. Øien, C. M. *et al.* Living donor kidney transplantation: the effects of donor age and gender on short- and long-term outcomes. *Transplantation* **83**, 600–6 (2007).
28. Müller, V. *et al.* Sex hormones and gender-related differences: their influence on chronic renal allograft rejection. *Kidney Int.* **55**, 2011–20 (1999).
29. Chen, P.-D. *et al.* Gender differences in renal transplant graft survival. *J. Formos. Med. Assoc.* **112**, 783–8 (2013).
30. Separavich, M. A. & Canesqui, A. M. Saúde do homem e masculinidades na Política Nacional de Atenção Integral à Saúde do Homem: uma revisão bibliográfica. *Saúde Soc.* **22**, 415–28 (2013).
31. Mengel, M., Husain, S., Hidalgo, L. & Sis, B. Phenotypes of antibody-mediated rejection in organ transplants. *Transpl. Int.* **25**, 611–22 (2012).
32. Morath, C., Opelz, G., Zeier, M. & Süsal, C. Prevention of antibody-mediated kidney transplant rejection. *Transpl. Int.* **25**, 633–45 (2012).
33. Castro, C. D., Luoma, A. M. & Adams, E. J. Coevolution of T-cell receptors with MHC and non-MHC ligands. *Immunol. Rev.* **267**, 30–55 (2015).
34. Wilczyński, J. R. Immunological analogy between allograft rejection, recurrent abortion and pre-eclampsia - the same basic mechanism? *Hum. Immunol.* **67**, 492–511 (2006).
35. Gammill, H. S. & Nelson, J. L. Naturally acquired microchimerism. *Int. J. Dev. Biol.* **54**, 531–43 (2010).
36. Framarino Dei Malatesta, M. *et al.* Fertility following solid organ transplantation. *Transplant. Proc.* **39**, 2001–4 (2007).
37. Douglas, N. C., Shah, M., Shah, M. & Sauer, M. V. Fertility and reproductive disorders in female solid organ transplant recipients. *Semin. Perinatol.* **31**, 332–8 (2007).
38. Halloran, P. F., Melk, A. & Barth, C. Rethinking chronic allograft nephropathy: the concept of accelerated senescence. *J. Am. Soc. Nephrol.* **10**, 167–81 (1999).
39. Rao, P. S. *et al.* A comprehensive risk quantification score for deceased donor kidneys: the kidney donor risk index. *Transplantation* **88**, 231–6 (2009).
40. Rosenberger, L. H. *et al.* Donor risk index predicts graft failure reliably but not post-transplant infections. *Surg. Infect. (Larchmt)*. **15**, 94–8 (2014).
41. Matas, A. J. *et al.* 2,500 living donor kidney transplants: a single-center experience. *Ann. Surg.* **234**, 149–64 (2001).
42. Foster, B. J., Dahhou, M., Zhang, X., Platt, R. W. & Hanley, J. A. Relative importance of HLA mismatch and donor age to graft survival in young kidney transplant recipients. *Transplantation* **96**, 469–75 (2013).
43. Rizzari, M. D., Suszynski, T. M., Gillingham, K. J. & Matas, A. J. Consideration of

donor age and human leukocyte antigen matching in the setting of multiple potential living kidney donors. *Transplantation* **92**, 70–5 (2011).

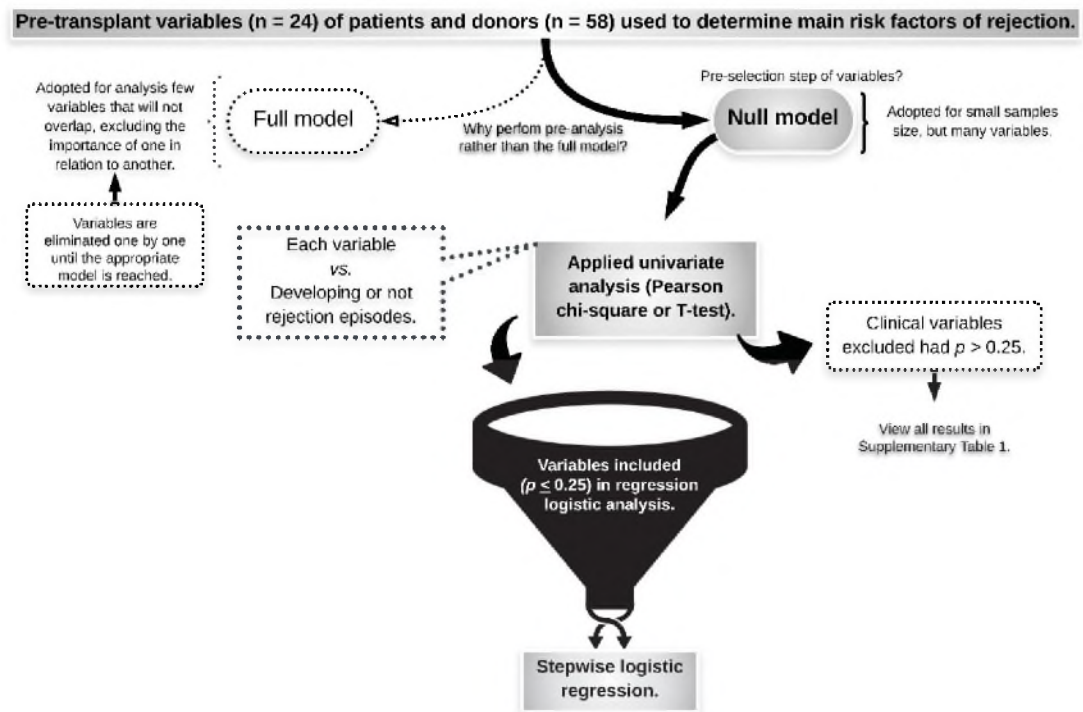
Figures and Tables

Table 1 – Characterization of patients.

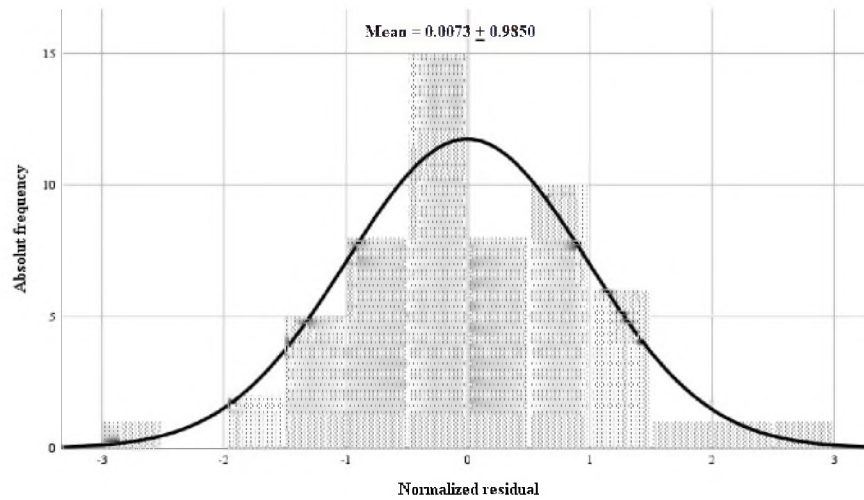
Characteristics	Transplanted patients (n = 58)
Male recipients	55.2 %
Recipient's age	45.05 years (SD =14.09)
Male donors	46.6 %
Living donors	37.9 %
Donor's age	42.72 years (SD = 12.14)
Base diseases	
Hypertension	91.40 %
Diabetes	12.10 %
Dyslipidemias	8.60 %
Glomerulonephritis	43.10 %
Hypertensive nephropathy	15.50 %
Other diseases	55.17 %
Previous transplants	17.20 %
Previous blood transfusion	44.80 %
Multiparous women ¹	50.00 %
Women with clinical abortion ¹	23.10 %
Panel reactive antibody classes	
PRA < 30%	55.20 %
30% ≤ PRA < 50%	12.10 %
50% ≤ PRA < 80%	15.50 %
PRA ≥ 80%	19.00 %
Detection of DSA	13.80 %
HLA mismatches	
HLA-A mismatches - 0/1/2	20.70% /46.60% /32.80%
HLA-B mismatches - 0/1/2	15.50% /56.90% /27.60%
HLA-DRB1 mismatches - 0/1/2	29.30% /53.40% /17.20%
Time on dialysis before transplantation	44 months (SD = 42)
Glomerular filtration rate	8.02 mL/minutes (SD = 7.02)
Cold ischemia time – hours: minutes (mean – SD) ²	16h:37min (SD = 6h:22min)
Rejection episodes (%)	46.55 %
ACR	32.76 %
CGN	5.17 %
ACR and CGN	1.72 %
Chronic glomerulonephritis	5.17 %
Thrombosis	1.72 %
Kidney allograft loss	8.62 %
Death	6.90 %

SD: standard deviation. ESRD: end-stage renal disease. DSA: donor-specific antibody. PRA: panel reactive antibody. ¹Calculated from the total female sample. ²Calculated only for deceased donor. The cold ischemia time for all living donors was a maximum of 1 hour. ACR: Acute cellular rejection. CGN: Chronic graft nephropathy.

Figure 1 – Workflow of the statistical analyses conducted to find the best and simplest composition of risk variables capable of predicting the development of rejection in the pre-transplant patient.



Supporting information – Figure 1 - Analysis of standardized residuals.



Note: Residual analysis (prediction of outliers) from our data was performed. Analysis showed the linearity, normality and homogeneity of variance from our sample, which are assumptions to be included in modeling through logistic regression. The normality and the supposed equal variance were assessed and confirmed through the analysis of standardized residuals. Graph illustrates the absence of outliers, and more than 90% of the standardized residuals (r) conformed to our expectations ($-1.5 < r < +1.5$).

Supporting information – Table 1 – Results of univariate analyses.

Variable	Pearson χ^2	T-test	Lower 95% CI	Upper 95% CI
Recipient's age		0.529	–9.203	4.778
Recipient's sex	0.011			
Body mass index	0.858			
No. of previous transplants		0.525	–0.165	0.320
No. of blood transfusions		0.607	–0.957	1.625
No. of pregnancies		0.612	–2.650	1.593
No. of clinical abortions		0.172	–1.446	0.317
Panel reactive antibody				
PRA < 30%	0.488			
30% ≤ PRA < 50%	0.145			
50% ≤ PRA < 80%	0.991			
PRA ≤ 80%	0.454			
Donor-specific antibody	0.065			
Type of dialysis	0.854			
Time on dialysis		0.039	–42.188	–1.125
Time of cold ischemia		0.289	–7.200	2.130
<i>HLA-A, -B and -DRB1</i> mismatches		0.370	–0.770	–0.026
<i>HLA-A</i> mismatches		0.002	–1.825	–0.421
<i>HLA-B</i> mismatches		0.001	–0.852	–0.221
<i>HLA-DRB1</i> mismatches		0.208	–0.581	–0.129
Type of donor	0.138			
Donor's sex	0.758			
Donor's age		0.011	–13.765	–1.861
Difference in age (patient and donor)		0.392	–7.101	2.823
Difference in weight (patient and donor)		0.859	–4.856	5.806
Difference in height (patient and donor)		0.495	–2.748	5.621
Hypertension	0.249			
Diabetes	0.820			
Dyslipidemia	0.560			
Glomerulonephritis	0.629			
Nephropathy hypertension	0.287			

Supporting information – Table 2 – Predictors not included in the final equation.

Risk predictors	Score ¹	<i>p</i> value
Presence of DSA	2.455	0.117
No. of abortions	2.441	0.118
Donor's age (years)	2.129	0.145
<i>HLA-A</i> mismatches	1.585	0.208
30% ≤ PRA <50%	1.266	0.260
Hypertension	0.506	0.477
<i>HLA-DRB1</i> mismatches	0.067	0.796
Type of donor	0.015	0.903
Overall statistic	10.969	0.203

Note: DSA: Donor Specific Antibody. PRA: Panel-Reactive Antibody.

¹Score: predicts which variable would be significant if included in the model.

3.2 CAPÍTULO 2 – A SUSCETIBILIDADE À DOENÇA RENAL CRÔNICA E O ÊXITO DO ALOENXERTO ESTÃO ASSOCIADOS A POLIMORFISMOS DE *HLA-G* E ISOFORMAS SOLÚVEIS DA MICA E DO HLA-G

SUSCEPTIBILITY TO CHRONIC KIDNEY DISEASE AND ALLOGRAFT OUTCOME ARE ASSOCIATED WITH *HLA-G* POLYMORPHISMS AND SOLUBLE ISOFORMS OF MICA AND *HLA-G*

Vanessa Hauer^{1,2}, Matilde Risti^{1,2}, Bruna L.M. Miranda¹, José S. da Silva¹, Ana L. Cidral¹, Carolina M. Pozzi³, Fabiana L. de C. Contieri³, Ibrahim A. Sadissou⁴, Eduardo A. Donadi⁴, Danillo G. Augusto¹, Maria da G. Bicalho¹

¹Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná (UFPR), R. Cel. Francisco H. dos Santos S/N, Centro Politécnico – Jardim das Américas, CP 19071, 81531-980, Curitiba, PR, Brazil.

²Authors contributed equally to the study.

³Setor de Transplante Renal, Hospital Universitário Evangélico de Curitiba, Alameda Augusto Stelfeld, 1908 Curitiba, 80730-150, Brazil.

⁴Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Clínica Médica, Divisão de Imunologia Clínica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP), Av. Bandeirantes, 3900 – Monte Alegre, 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

The *HLA-G* and *MICA* genes are stimulated under inflammatory conditions and code for molecules (soluble or cell membrane-bound isoforms) that possess immunomodulatory properties. *HLA-G* can interact with inhibitory receptors on T and B cells, blocking their activation. *MICA* is known to be a stress molecule, when interacting with its main receptor NKG2D. We hypothesized that the compositions of different alleles and genotypes are related to the high or low expression of *HLA-G* and *MICA* genes. Once these risk or protection genetic factors are identified regarding pathological conditions, they also would be associated with the *HLA-G* and *MICA*, as soluble biomarkers. In this study, genotypes of the *MICA*, *NKG2D* and *HLA-G* genes were evaluated in a population in southern Brazil, composed of a control group of healthy persons ($n = 75$), patients with chronic kidney disease ($n = 94$), and kidney-transplant patients ($n = 64$). *MICA*, *NKG2D* and *HLA-G* genotyping (alleles and 3'-UTR variations) was performed by PCR-SSOP, qPCR and SBT respectively. Levels of sMICA and sHLA-G were detected in plasma through ELISA. Case-control analysis showed that the haplotype *HLA-G*01:01/UTR-4* reduced the susceptibility to the development of chronic kidney disease ($p = 0.032$). Concerning the group of kidney-transplant patients, the *HLA-G* genotypes +3010 GC (rs1710) and +3142 GC (rs1063320) (both with $p = 0.013$) were associated with a risk for kidney allograft rejection. Nevertheless, the genotype +3010 GG ($p = 0.041$) was associated with kidney allograft acceptance, suggesting that it is a protection factor for rejection. The result for the +3010 variation was also seen in logistic regression analysis (+3010 CG, $p = 0.022$ and +3010 GG, $p = 0.039$), even when all genes were included. Thus, this polymorphism is an important marker with a potential to be explored in relation to the kidney allograft outcome. In addition, the phenotypic analysis revealed that a high production of sHLA-G and sMICA was associated with the development of chronic kidney disease. For patients who were already under continuous pathological stress and underwent a kidney transplant, a high sMICA in pre-transplant proved to favor immunomodulation and allograft acceptance.

Key words: *HLA-G*, *MICA*; genotypes.

Corresponding author: Prof. Maria da G. Bicalho. Phone number: +33 41 3361 1729; email address: mgbicalho@gmail.com. Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (www.ligh.ufpr.br), Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná (UFPR), R. Cel. Francisco H. dos Santos S/N, Centro Politécnico – Jardim das Américas, CP 19071, CEP 81531-980, Curitiba, PR, Brazil.

Introduction

Previous studies on molecules of the major histocompatibility complex showed that non-classical class I genes have been associated with immune regulation [1,2]. Among these genes are *HLA-G* (human leukocyte antigen-G) and *MICA* (major histocompatibility complex class I chain-related gene A). The few studies that concomitantly evaluated those genes left questions to be clarified about their related functions [3,4]. HLA-G and MICA are highlighted, because they have unique functions and are produced in inflammatory conditions [4,5]. Both are expressed on cell membranes and as soluble isoforms (sHLA-G and sMICA) [6,7].

MICA is expressed in various cells, including the thymic medulla and the gastrointestinal epithelium [5,8–12]. HLA-G is expressed in regulatory T-cells and endothelial cells [13]; its expression has also been observed in transplanted specimens and associated with better graft survival [14–18].

The immunomodulatory role of HLA-G is performed mainly through interaction with inhibitory receptors, such as the leukocyte Ig-like receptor family B member 1 (LILRB1) and member 2 (LILRB2) [19]. Soluble HLA-G induces regulatory mechanisms, such as apoptosis of CD8⁺T and NK cells, inhibition of B-cell proliferation, differentiation, and Ig secretion [20]. The membrane-bound HLA-G1 and the secreted soluble HLA-G5 are the most widely investigated isoforms [6,7].

Considering the *HLA-G* genetic variants, the encoded isoforms possess immunomodulatory effects, and proteins generated by the different alleles produce different effects [26]. For example, the *G*01:04* allele group has been associated with increased levels of sHLA-G expression in kidney-transplant patients without acute rejection [27]. The 3'-UTR *HLA-G* region alone (exon 8) has nine polymorphisms with higher frequencies and associations with soluble HLA-G expression and pathological conditions [18]. Therefore, HLA-G expression levels are assumed to be associated with the cumulative effect of linked polymorphisms [28].

The best-described interaction of MICA occurs with the natural killer group 2 member D ligand (NKG2D). This receptor is expressed in NK, $\gamma\delta$ T-cells, and $\alpha\beta$ CD8⁺ T-cell membranes. Soluble MICA may induce internalization and degradation of its receptor [8]. However, the interaction of NKG2D with the membrane MICA can culminate in cytotoxic activity of NK cells and proliferation of immunosuppressive NKG2D⁺CD4⁺T cells [21].

Regarding the *MICA* gene, the number of GCT repetitions at exon 5 constitutes five

different alleles (*MICA-A4*, *A5*, *A5.1*, *A6*, and *A9*). The *A5.1* allele (dbSNP: rs 41293539) contains five GCT repetitions and one insertion, which leads to a frameshift mutation and generates a truncated protein with a differential expression and cellular localization [22]. The *MICA-129 Val/Met* polymorphism (dbSNP: rs1051792) at nucleotide 454 (G>A) leads to a substitution of valine (Val) for methionine at position 129 of the amino acid in the $\alpha 2$ domain of the MICA protein [23]. The *MICA-129 Val/Met* variant can affect NKG2D binding avidity, leading to an alteration in the immune response mediated by NK cells, associated with a differential MICA expression [24]. The *NKG2D* gene has two haploblocks, hb1 and hb2. The first haploblock (hb1) can be discriminated in high and low natural cytotoxic activity haplotypes (*HNK1* and *LNK1*, respectively). *HNK1* (described by the main dbSNP, rs1049174-G) is associated with higher activity of NK cells in the peripheral blood and a lower incidence of cancers originating from epithelial cells [23,25].

The immunomodulatory effects of MICA with NKG2D and HLA-G, together with the scarcity of data on the diversity of genes and their influence on the composition of these molecules, stimulated the development of this study. We hypothesized that different allele compositions would be detected as risk or protection factors for pathological conditions. Once these genetic factors are identified as a risk or protection factor regarding pathological conditions, they also would be associated with HLA-G and MICA, as soluble biomarkers. With this in mind, we compared individuals considered to be healthy and patients with chronic kidney disease or who had undergone a kidney transplant, to evaluate the *MICA*, *NKG2D* and *HLA-G* genotypes as well as the sMICA and sHLA-G levels.

Methods

Sample

The variability of *HLA-G*, *MICA* and *NKG2D* was investigated in individuals from the state of Paraná, southern Brazil. This sample was composed of 169 individuals, divided between a control group of healthy persons (Ct, n = 75) and patients in the end stage of chronic kidney disease (CKD, n = 94). Of the CKD, a total of 64 patients (in the end stage of renal disease, with a glomerular filtration rate under 15 mL/min) had undergone kidney transplantation, and had developed rejection (KTR, n = 28), or had not (KTN, n = 36). The information regarding the development or not of kidney allograft-rejection episodes (such as acute cellular rejection,

chronic allograft nephropathy, and/or chronic glomerulonephritis) was obtained up to 4 years after transplantation.

The characteristics of the population (Ct, CKD and KT patients) are described in **Table 1**. Ethnicity information was evaluated by self-assessment. The patients' ages, the percentage of males and females, and the number of diseases detected were lower for the control individuals compared to the other two pathological groups. Between KTR and KTN, the patients' sex frequencies, donor's age, and frequency of *HLA-B* mismatches were also differently distributed.

All participants gave their signed informed consent before blood collection. The study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Paraná, Brazil and the Evangelical University Hospital of Curitiba, Paraná, Brazil (approval number: 53627315.0.0000.0102).

Immunosuppression protocol from kidney-transplant patients

For all kidney-transplant patients, pre-transplant immunosuppression was based on intravenous corticosteroid administration (methylprednisolone, 500 mg, independently of weight). Patients with increased immunological risk for allograft rejection received induction therapy with anti-thymocyte globulin (ATG). Maintenance therapy was composed of three medications: a corticosteroid (prednisone), an antiproliferative cell inhibitor (tacrolimus, which was replaced by sirolimus after hospital discharge), and an antimetabolite agent (mycophenolate mofetil, which was replaced by mycophenolate sodium after discharge).

***HLA-G, MICA and NKG2D* Genotyping**

Blood samples were collected in tubes containing ethylene-diamine-tetra-acetic acid (EDTA), and DNA was extracted from buffy-coat samples, using a salting-out technique [29].

The genotype of 3'-UTR and coding DNA sequence (CDS) of the *HLA-G* gene were determined through a Sanger sequence. We used the ABI Prism Big Dye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, CA, USA), and analyzed the data in ABI Prism SeqScape software version 2.7 (Applied Biosystems).

Sequence-based typing (SBT) methodology of CDS was performed to take into account three exons of the *HLA-G* gene. These regions were amplified and sequenced using the following primers: i) exon 2, F2E:GGGTCGGGCGGGTCTCAA, in amplification and sequencing reactions, and R2E:TCCGTGGGGCATGGAGGT, only in amplification reaction; ii) exon 3, F3E:CCCAGACCCTCTACCTGGGAGA, only in amplification reaction, and R3E:CTCTCCTTGTGCTAGGCCAGGCTG, in amplification and sequencing reactions; and iii) exon 4, F4E:CCATGAGAGATGCAAAGTGCT, in amplification and sequencing reactions, and R4E:TGCTTTCCTAACAGACATGAT, only in amplification reaction, as adapted from a previous study [30]. All sequences were analyzed based on the official alleles listed in the International Immunogenetics Information System (IMGT) [31].

Amplification the *HLA-G* 3'-UTR was performed using the following primers: HLA-G8F:TGTGAAACAGCTGCCCTGTGT [32] and HGUT.R1:GTCTTCCATTTA TTTTGTCTCT [33]. PCR was carried out in a final volume of 25 µL, containing one unit of Hot Start Go *Taq*[®] DNA-polymerase (Promega, Madison, WI, USA), 1× of Colorless GoTaq[®] Flexi Buffer (Promega), 0.2 mM of each dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 0.4 pmol of each primer, and 25 ng of genomic DNA. The initial denaturation was carried out at 94°C for 5 min, followed by 32 cycles of 95°C for 45 s, 57°C for 45 s and 72°C for 1 min, with a final extension step at 72°C for 7 min. This protocol, adapted from Castelli [33], was used for all samples.

Enzymatic purification of amplicons was performed and they were sequenced using the reverse primer to prevent sequence overlap in heterozygous genotypes for the 14-bp *Ins/Del* (+2960, dbSNP: rs371194629). Including the 14-bp *Ins/del*, a total of 17 sites described in **Table 2** were analyzed and individually annotated in the amplicon.

The polymerase chain reaction – sequence-specific oligonucleotide probes (PCR - SSOP) was used as the first step in *MICA* genotyping, according to the manufacturer's recommendations, as outlined in the LABType[®] MICA kit (One Lambda Inc., Canoga Park, CA, USA). This reaction was analyzed through a flow fluorimeter (LABScan[™] 100, Austin, TX, USA), which employs LUMINEX[®] technology. Analyses were performed with HLA Fusion Software, and *MICA* genotypes were discriminated according to *MICA-129 Val/Met* polymorphism as to the presence or absence (termed wild type in relation to *MICA A5.1* or Wt in this study) of *MICA A5.1* allelic variation at exon 5.

The *NKG2D* gene was typed following the TaqMan[®] allelic discrimination methodology and KLRC4-KLRK1 TaqMan SNP Genotyping Assays (product number: C_9345347_10, Applied Biosystems). The SNP-based genotyping was specific to detect a G>C

(dbSNP: rs1049174) replacement and discriminate the allelic haplotypes *HNK1* and *LNK1*.

ELISA for sHLA-G and sMICA

Soluble HLA-G concentrations were evaluated by a specific sandwich ELISA in plasma, using MEM-G/9 [34], anti-human β 2-microglobulin as capture and detection antibodies, respectively [35]. This reaction recognizes sHLA-G1 and HLA-G5 isoforms. Similarly, sMICA was measured using a commercial kit according to the manufacturer's protocol (DuoSet MICA ELISA, R & D Systems, Minneapolis, MN, USA). Plasma samples and calibrators were added to each well (100 μ L) in duplicate to perform sMICA and sHLA-G measurements. The final concentration was determined from the optical density compared to standard curves (SD). The lower limit of detection for sHLA-G was 6.25 ng/mL and for sMICA was 31.25 pg/mL.

Data analysis

Genotypes obtained for *HLA-G* (3'-UTR and coding sequence regions), *MICA* (*MICA-129 Val/Met* and *MICA A5.1/Wt*) and *NKG2D* (*HNK1* or *LNK1*) were analyzed for different genetic parameters.

The ELB algorithm was used to infer haplotypes for *HLA-G* and *MICA* for each individual, performing two runs, considering each gene individually. *HLA-G* 3'-UTR haplotypes were denominated according to the most recent UTR nomenclature, described by Castelli et al. [28]. The best phase (with reliability above 95%) obtained for *HLA-G* and *MICA* genes separately and individually for each individual was then used to perform analyses including *NKG2D* genotypes. The frequencies of each variation were computed as absolute and relative frequency. Also, the Hardy-Weinberg equilibrium was tested by the exact test of Guo and Thompson [36], for the control group.

Linkage disequilibrium (LD) parameters (p or LOD, D' and r^2) were also estimated and calculated for intragenic variations of *MICA* and *HLA-G*. All parameters were estimated using ARLEQUIN 3.5 software [37], and LD was also analyzed using Haploview software [38].

Fisher's Exact Test (FET) was performed to infer associations among the analyzed genes (alleles and haplotypes) and two pathological conditions (first, the risk for

chronic kidney disease and second, the risk for kidney allograft rejection). Logistic regression was chosen to confirm predictions observed in FET. The case-control analysis was first performed without adjustment for specific variables (e.g. patients' sex frequencies, donor's age and frequencies of *HLA-B* mismatches); after that, adjustments were made to confirm the observed associations.

Furthermore, the amounts of sHLA-G and sMICA obtained for plasma samples from Ct ($n = 75$) were compared with CKD patients ($n = 56$). Pre-transplant plasma samples from KTR and KTN patients ($n = 26$) were also compared. These analyses included a Mann-Whitney U test and median evaluations. A Kruskal-Wallis test was performed to analyze differences of expression among allelic variations.

All association analyses were performed using the software IBM SPSS version 25.

Results

Three haplotype inferences were performed (**Figure 1**) between: (a) *MICA*-129 Val/Met with *MICA* A5.1/Wt; (b) the 17 variations found in 3'-UTR of the *HLA-G* gene, after identification according to UTR nomenclature [28]; and (c) *HLA-G* UTRs with alleles. These analyses were also conducted for *HLA-G* and *MICA*; however, 51.76% of the inferred haplotypes had less than 95% reliability and therefore they could not be included in other analyses. Seven individuals did not achieve reliability in haplotype UTR inference and were excluded. The other inferences originated haplotypes with 95% reliability or higher. The haplotypes formed by inferences were 21 for *HLA-G* UTR, 31 for *HLA-G* coding DNA sequence plus UTR, and 3 for *MICA*.

Four new haplotypes for *HLA-G* 3'-UTR were described, termed UTR-47^{NC}, UTR-48^{NC}, UTR-50^{NC} and UTR-52^{NC} (**Figure 1 (d)**). Also, the following five previously described variations [28] were found to be monomorphic, but with no SNPid (identity): +3044 (A), +3052 (C), +3092 (G), +3107 (C) and +3111 (G). The most frequent *HLA-G* haplotypes inferred for *HLA-G* alleles with UTRs were compared to published data and did not differ in their frequencies (**Figure 1 (e)**).

For each group (Ct, CKD, KTN and KTR) and for all samples, the estimated linkage disequilibrium did not diverge, nor did it diverge with respect to the variations in *cis*. All polymorphic sites found in 3'-UTR of the *HLA-G* gene showed a strong LD between them, except for the polymorphism at position +3227. Of all the analyses performed for each group,

the highest LD was found in the *HLA-G* gene between positions +3010 and +3142, +3142 and 14-bp *Ins/Del*, and *MICA-129 Val/Met* and *MICA A5.1/Wt*, as summarized in **Table 3** and extended in **Supporting information – Table 1**.

The variations found in *cis* were related to their effect when inherited together, as previously described for *HLA-G* [39–44] and *MICA* [45,46]. Thus, +3010 *C* with +3142 *G*, and +3142 *G* with 14-bp *Ins* would be associated with a decrease of *HLA-G* production, whereas +3010 *G* with +3142 *C*, and +3142 *C* with 14-bp *Del* would be associated with an increase. Also, *MICA-129 Met* and *MICA Wt* would be associated with a stronger affinity for NKG2D compared to *MICA-129 Val* and *MICA A5.1*, which would imply a higher production of sMICA. The LDs inferred for *HLA-G* alleles and UTRs were also strong, especially among the *HLA-G*01:03* with UTR-5 or UTR-13, and the *HLA-G*01:04* with UTR-3 (**Supporting information – Table 2**). These haplotypes are also found in other populations [28].

The polymorphic variations observed for the 3'-UTR of the *HLA-G* gene, the *HLA-G* alleles, *MICA* variations, and *NKG2D* haploblocks were analyzed for Hardy-Weinberg Equilibrium in the control group, and all loci were in equilibrium (**Supporting information – Table 3**).

Association of *HLA-G*, *MICA* and *NKG2D* genotypes

Case-control association analyses were performed through a contingency table to first detect significant relationships of alleles, nucleotide variations, haplotypes and/or genotypes. Then, we applied the logistic regression analysis to determine the primary association.

The *HLA-G* haplotype *HLA-G*01:01* UTR-4 ($p = 0.035$) (**Table 4**) and the *MICA-129 Val/Met* ($p = 0.043$, OR = 0.519, 95% CI = 0.280–0.962) genotype were found to be protective factors for the control group *versus* CKD patients, according to FET. Therefore, after adjustments for age and sex, the described association with the *MICA-129 Val/Met* genotype was no longer significant ($p = 0.131$), but the association with the *HLA-G* haplotype was maintained ($p = 0.032$, OR = 0.480, 95% CI = 0.199–0.961). However, logistic regression analysis found that neither association was significant.

For the KTR patients, the association was detected in the genotype evaluation and not at the allelic level (**Table 4**). The risk associations were found for genotypes +3187 *AG* ($p = 0.037$), +3142 *CG* ($p < 0.001$) and +3010 *CG* ($p < 0.001$). A protective association was found for +3010 *GG* ($p = 0.041$). After adjustments for the patients' sex frequencies, donor's age and

HLA-B mismatches, the risk association of +3010 CG and +3142 CG was maintained (both with $p = 0.013$, OR = 5.357, 95% CI = 1.417–20.261), as well as a trend toward +3010 GG as a protective factor ($p = 0.041$, OR = 0.136, 95% CI = 0.016–1.178).

In the logistic regression, including all loci, the genotype +3010 CG was confirmed as a risk factor and +3010 GG as a protective factor for kidney allograft rejection (with $p = 0.005$ and $p = 0.004$ respectively). This association was maintained even after adjustment (+3010 CG, $p = 0.022$ and +3010 GG, $p = 0.039$).

Soluble HLA-G and MICA phenotypes association

The quantitative analyses of sHLA-G and sMICA were performed to evaluate differences between two conditions (**Figure 2 (a) and (c)**). The first evaluation showed higher amounts of both molecules in the CKD group compared to the Ct group ($p < 0.001$ for sMICA, $p = 0.003$ for sHLA-G). Also, the percentage of individuals for which neither molecule had no detection or low expression (under the limit of detection) was higher for the Ct compared to the CKD (**Figure 2 (a-b)**).

Comparison between the KTN and KTR groups showed a difference for sMICA ($p = 0.001$) but no difference for sHLA-G ($p = 0.836$). The percentage of individuals with no detectable sMICA was higher in the KTR group (**Figure 2 (c-d)**).

MICA haplotypes were analyzed in association with sMICA quantification, and no differences were detected ($p = 0.327$). sHLA-G and genetic variations were evaluated for the most frequently detected alleles (*HLA-G*01:01*, *HLA-G*01:04* and *HLA-G*01:03*) and UTRs (UTR-1, -2, -3, -4 and -5), but no differences were observed (respectively, $p = 0.448$ and $p = 0.585$).

Discussion

The Brazilian population is one of the most admixed in the world, and is an enormous repository of genetic variation [47]. Accordingly, differences and new genetic variations can be found throughout the country. In this study, the *MICA*, *NKG2D* and *HLA-G* alleles and described 3'-UTR *HLA-G* gene variations also comprised part of this diversity. For the *HLA-G* gene, a total of 21 UTRs were observed, four of them new. The *HLA-G* haplotype frequencies did not differ from data reported by Castelli et al. (2014). For *MICA*, 3 haplotypes were detected

and the *MICA-129 Met* with *MICA A5.1* was not present. Of the *HLA-G* haplotypes, the combinations of *HLA-G*01:03/UTR-5* or */UTR-13* with *HLA-G*01:04/UTR-3* were most frequent, which is in accordance with the main complete extended haplotypes described [28].

Our case-control analysis included *HLA-G*, *MICA* and *NKG2D* genotype data and quantification of soluble molecules (sHLA-G and sMICA). Regarding the association tests performed for CKD patients, the *HLA-G*01:01/UTR-4* was found to be a protective factor for the development of chronic kidney disease (FET analysis). In particular, UTR-4 has previously been related to higher stability of *HLA-G* transcripts and immunoregulation in successful pregnancies [49].

For the kidney-transplant patients, the *+3010 CG* genotype was associated with kidney allograft rejection. This SNP has the strongest LD with the *+3142* position. Also, the 14-bp *Ins/Del* had high LD with *+3142* and *+3010* SNPs. Thus, concerning variations in *cis*, the composition possibly associated with the risk of kidney allograft rejection by the decrease of *HLA-G* expression would be *+3010 C*, *+3142 G* and 14-bp *Ins*. The presence of *+3010 C* would act as a negative factor (even in the heterozygote), as it is linked to the *+3142 G* variation that promotes greater affinity of *HLA-G* transcripts to microRNAs, leading to a decreased *HLA-G* expression [50]. This effect would be more evident in the presence of 14-bp *Ins*, from which unstable transcripts originate [39]. The analyses were not able to detect a direct relationship regarding the *+3010 CC* and rejection, but twice as many patients who developed episodes of rejection have this genotype compared to the frequencies of *+3010 GG* patients, which was associated as a protection factor. The association of *+3142* with 14-bp *Ins/Del* has been the subject of many studies aiming to identify risk factors [40,41,44,51]. However, we suggest that *+3010* is a marker to predict the simultaneous presence of *+3142 G* with 14-bp *Ins*.

Concerning the difference in the sMICA and sHLA-G production, no allelic differentiation was observed. This shows that the joint analysis of other forms, such as those bound to the membrane, is necessary to perform this type of analysis. However, sMICA and sHLA-G functionally preserve the expression of a similar inflammatory condition [15,52]. Our analysis showed that both molecules are more highly expressed in patients in a stressful condition, such as chronic kidney disease (CKD), compared to the control. Also as expected, in the Ct group the non-detection of sMICA and sHLA-G was more common than in the CKD

group, which reflects the stimulation of immunological changes and production of regulatory molecules (sHLA-G and sMICA) under a pathological condition.

Concerning the kidney-transplant patients, there was evidence of higher production of sMICA in the KTN compared to the KTR group, who developed rejection. Therefore, once the chronic disease is established in the patient, the production of regulatory molecules in the pre-transplant period acts as an immunoregulatory effect contributing to the acceptance of the allograft (**Figure 2 (e)**). Thus, the pre-transplant status of sMICA can potentially influence the successful outcome of the kidney transplantation.

Conclusion

Our study described new *HLA-G* UTR haplotypes, which reinforces the importance of conducting studies that aim to better characterize the diversity of the Brazilian population.

Simultaneous analyses of variants present in the *MICA* gene were not sufficient to demonstrate associations of genotype and phenotype linked to variations in *NKG2D*. Regarding the *HLA-G* gene, the +3010 SNP (rs1710) showed potential as a molecular marker for the characterization of +3142 SNP and 14-bp *Ins/Del* variation, all related to changes in HLA-G production and to kidney allograft rejection.

Our study found no genetic associations of *MICA* with the pathological contexts evaluated, but the increased production of sMICA and sHLA-G was associated with chronic kidney disease. Moreover, a higher sMICA production in the pre-transplant period was found to be associated with a better kidney allograft outcome.

Acknowledgments

We are most grateful to the participants for generously agreeing to provide samples for this study. We also thank the Hospital Universitário Evangélico de Curitiba, especially LIGH and the staff of the Clinical Immunology Division (Ribeirão Preto), for their technical support.

Funding

This work was partly supported by a research Ph.D. scholarship awarded to V. H. (No. BEX 10205/14-4) by the CAPES Foundation/Post-Graduate Program in Genetics of UFPR, Ministry of Education of Brazil, Brasília – DF 70.040-020, Brazil.

References

1. Hayashi T, Imai K, Morishita Y, Hayashi I, Kusunoki Y, Nakachi K. Identification of the NKG2D haplotypes associated with natural cytotoxic activity of peripheral blood lymphocytes and cancer immunosurveillance. *Cancer Res.* 2006;66: 563–70. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2776
2. König L, Kasimir-Bauer S, Hoffmann O, Bittner A-K, Wagner B, Manvailer LFS, et al. The prognostic impact of soluble and vesicular HLA-G and its relationship to circulating tumor cells in neoadjuvant treated breast cancer patients. *Hum Immunol.* 2016;77: 791–9. doi:10.1016/j.humimm.2016.01.002
3. Menier C, Riteau B, Carosella ED, Rouas-Freiss N. MICA triggering signal for NK cell tumor lysis is counteracted by HLA-G1-mediated inhibitory signal. *Int J cancer.* 2002;100: 63–70. doi:10.1002/ijc.10460
4. Racca AL, Veaute CM, Bailat AS, Gaité L, Arriola M, Hajos SE, et al. Expression of HLA-G and MICA mRNA in renal allograft. *Transpl Immunol.* Elsevier B.V.; 2009;21: 10–12. doi:10.1016/j.trim.2009.01.002
5. Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93: 12445–50. doi:10.1073/pnas.93.22.12445
6. LeMaoult J, Le Discorde M, Rouas-Freiss N, Moreau P, Menier C, McCluskey J, et al. Biology and functions of human leukocyte antigen-G in health and sickness*. *Tissue Antigens* 2003;62: 273–284. doi:10.1034/j.1399-0039.2003.00143.x
7. Carosella ED, Moreau P, Lemaoult J, Rouas-Freiss N. HLA-G: from biology to clinical benefits. *Trends Immunol.* 2008;29: 125–32. doi:10.1016/j.it.2007.11.005
8. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999;285: 727–9. doi:10.1126/science.285.5428.727
9. Katsuyama Y, Ota M, Ando H, Saito S, Mizuki N, Kera J, et al. Sequencing based typing for genetic polymorphisms in exons, 2, 3 and 4 of the MICA gene. *Tissue Antigens* 1999;54: 178–84. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10488745>
10. Naruse TK, Romphruk A, Kawata H, Puapairoj C, Kulski JK, Leelayuwat C, et al. Diversity of MICA (PERB11.1) and HLA haplotypes in Northeastern Thais. *Tissue Antigens* 2001;58: 83–9. doi: 10.1034/j.1399-0039.2001.580203
11. Steinle A, Li P, Morris DL, Groh V, Lanier LL, Strong RK. Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics* 2001;52: 279–87. doi:10.1007/s002510100325
12. Muro M, López-Hernández R, Llorente S, Bolarín JM, Martínez P, Boix F, et al. MICA Molecules in Disease and Transplantation, a Double-Edged Sword? *Curr Immunol Rev.* 2012;8: 307–325. doi:10.2174/157339512804806233

13. Sheshgiri R, Rao V, Tumiaty LC, Xiao R, Prodger JL, Badiwala M, et al. Progesterone induces human leukocyte antigen-g expression in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Circulation* 2008;118: S58-64. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.757781
14. Créput C, Durrbach A, Menier C, Guettier C, Samuel D, Dausset J, et al. Human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression in biliary epithelial cells is associated with allograft acceptance in liver-kidney transplantation. *J Hepatol.* 2003;39: 587–94. doi:10.1016/S0168-8278(03)00354-4
15. 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: 2152–6. doi:10.1111/j.1600-6143.2006.01417.x
16. Brugière O, Thabut G, Pretolani M, Krawice-Radanne I, Dill C, Herbreteau A, et al. Immunohistochemical study of HLA-G expression in lung transplant recipients. *Am J Transplant.* 2009;9: 1427–38. doi:10.1111/j.1600-6143.2009.02650.x
17. Almasood A, Sheshgiri R, Joseph JM, Rao V, Kamali M, Tumiaty L, et al. Human leukocyte antigen-G is upregulated in heart failure patients: a potential novel biomarker. *Hum Immunol.* 2011;72: 1064–7. doi:10.1016/j.humimm.2011.08.016
18. Donadi EA, Castelli EC, Arnaiz-Villena A, Roger M, Rey D, Moreau P. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68: 369–95. doi:10.1007/s00018-010-0580-7
19. Carosella ED, Rouas-freiss N, Roux DT, Moreau P, Lemaout J. HLA-G : An Immune Checkpoint Molecule [Internet]. 1st ed. *Advances in Immunology.* Elsevier Inc.; 2015. doi:10.1016/bs.ai.2015.04.001
20. Naji A, Menier C, Morandi F, Agaugue S, Maki G, Ferretti E, et al. Binding of HLA-G to ITIM-Bearing Ig-like Transcript 2 Receptor Suppresses B Cell Responses. *J Immunol.* 2014;192: 1536–46. doi:10.4049/jimmunol.1300438
21. Groh V, Smythe K, Dai Z, Spies T. Fas ligand-mediated paracrine T cell regulation by the receptor NKG2D in tumor immunity. *Nat Immunol.* 2006;7: 755–62. doi:10.1038/ni1350
22. Tonnerre P, Gérard N, Chatelais M, Poli C, Allard S, Cury S, et al. MICA variant promotes allosensitization after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24: 954–66. doi:10.1681/ASN.2012080814
23. Risti M, Bicalho M da G. MICA and NKG2D: Is There an Impact on Kidney Transplant Outcome? *Front Immunol.* 2017;8: 179. doi:10.3389/fimmu.2017.00179
24. Raache R, Belanteur K, Amroun H, Benyahia A, Heniche A, Azzouz M, et al. Association of major histocompatibility complex class 1 chain-related gene A dimorphism with type 1 diabetes and latent autoimmune diabetes in adults in the Algerian population. *Clin Vaccine Immunol.* 2012;19: 557–61. doi:10.1128/CVI.05473-11
25. Espinoza JL, Takami A, Onizuka M, Sao H, Akiyama H, Miyamura K, et al. NKG2D

- gene polymorphism has a significant impact on transplant outcomes after HLA-fully-matched unrelated bone marrow transplantation for standard risk hematologic malignancies. *Haematologica* 2009;94: 1427–34. doi:10.3324/haematol.2009.008318
26. Dias FC, Castelli EC, Collares CVA, Moreau P, Donadi EA. The Role of HLA-G Molecule and HLA-G Gene Polymorphisms in Tumors, Viral Hepatitis, and Parasitic Diseases. *Front Immunol.* 2015;6: 9. doi:10.3389/fimmu.2015.00009
 27. Misra MK, Pandey SK, Kapoor R, Sharma RK, Kapoor R, Prakash S, et al. HLA-G gene expression influenced at allelic level in association with end stage renal disease and acute allograft rejection. *Hum Immunol.* 2014;75: 833–9. doi:10.1016/j.humimm.2014.06.005
 28. Castelli EC, Gerasimou P, Paz MA, Ramalho J, Porto IOP, Lima THA, et al. HLA-G variability and haplotypes detected by massively parallel sequencing procedures in the geographically distinct population samples of Brazil and Cyprus. *Mol Immunol.* 2017;83: 115–26. doi:10.1016/j.molimm.2017.01.020
 29. Lahiri DK, Nurnberger JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 1991;19: 5444. doi:10.1093/nar/19.19.5444
 30. Nardi F da S, Slowik R, Wowk PF, da Silva JS, Gelmini GF, Michelon TF, et al. Analysis of HLA-G polymorphisms in couples with implantation failure. *Am J Reprod Immunol.* 2012;68: 507–14. doi:10.1111/aji.12001
 31. Robinson J, Halliwell JA, Hayhurst JD, Flicek P, Parham P, Marsh SGE. The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases. *Nucleic Acids Res.* 2015;43: D423–31. doi:10.1093/nar/gku1161
 32. Bermingham J, Jenkins D, McCarthy T, O'Brien M. Genetic analysis of insulin-like growth factor II and HLA-G in pre-eclampsia. *Biochem Soc Trans.* 2000;28: 215–9. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10816131>
 33. Castelli EC, Mendes-Junior CT, Deghaide NHS, de Albuquerque RS, Muniz YCN, Simões RT, et al. The genetic structure of 3'untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes. *Genes Immun.* 2010;11: 134–41. doi:10.1038/gene.2009.74
 34. Rebmann V, LeMaout J, Rouas-Freiss N, Carosella ED, Grosse-Wilde H. Report of the Wet Workshop for quantification of soluble HLA-G in Essen, 2004. *Hum Immunol.* 2005;66: 853–63. doi:10.1016/j.humimm.2005.05.003
 35. Menier C, Saez B, Horejsi V, Martinozzi S, Krawice-Radanne I, Bruel S, et al. Characterization of monoclonal antibodies recognizing HLA-G or HLA-E: New tools to analyze the expression of nonclassical HLA class I molecules. *Hum Immunol.* 2003;64: 315–26. doi:10.1016/S0198-8859(02)00821-2
 36. Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 1992;48: 361–72. doi:10.1002/bimj.200390026
 37. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 2007;1: 47–50.

Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19325852>

38. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005;21: 263–5. doi:10.1093/bioinformatics/bth457
39. Rousseau P, Le Discorde M, Mouillot G, Marcou C, Carosella ED, Moreau P. The 14 bp deletion-insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. *Hum Immunol.* 2003;64: 1005–10. doi:10.1016/j.humimm.2003.08.347
40. Vargas RG, Sarturi PR, Mattar SB, Bompeixe EP, Silva J dos S, Pirri A, et al. Association of HLA-G alleles and 3' UTR 14 bp haplotypes with recurrent miscarriage in Brazilian couples. *Hum Immunol.* 2011;72: 479–85. doi:10.1016/j.humimm.2011.02.011
41. Cilião Alves DC, De Oliveira Crispim JC, Castelli EC, Mendes-Junior CT, Deghaide NHS, Barros Silva GE, et al. Human leukocyte antigen-G 3' untranslated region polymorphisms are associated with better kidney allograft acceptance. *Hum Immunol.* 2012;73: 52–9. doi:10.1016/j.humimm.2011.10.007
42. Martelli-Palomino G, Pancotto JA, Muniz YC, Mendes-Junior CT, Castelli EC, Massaro JD, et al. Polymorphic Sites at the 3' Untranslated Region of the HLA-G Gene Are Associated with Differential hla-g Soluble Levels in the Brazilian and French Population. *PLoS One* 2013;8(10): e71742. doi:10.1371/journal.pone.0071742
43. Amodio G, Canti V, Maggio L, Rosa S, Castiglioni MT, Rovere-Querini P, et al. Association of genetic variants in the 3'UTR of HLA-G with Recurrent Pregnancy Loss. *Hum Immunol.* 2016;77: 886–91. doi:10.1016/j.humimm.2016.06.020
44. Rajasekaran A, Shivakumar V, Kalmady S V., Narayanaswamy JC, Subbana M, Venugopal D, et al. The impact of HLA-G 3' UTR variants and sHLA-G on risk and clinical correlates of schizophrenia. *Hum Immunol.* 2016;77: 1166–71. doi:10.1016/j.humimm.2016.08.013
45. Isernhagen A, Schilling D, Monecke S, Shah P, Elsner L, Walter L, et al. The MICA-129Met/Val dimorphism affects plasma membrane expression and shedding of the NKG2D ligand MICA. *Immunogenetics* 2016;68: 109–23. doi:10.1007/s00251-015-0884-8
46. Tonnerre P, Gérard N, Gavlovsky P-J, Mazalrey S, Hourmant M, Cheneau M-L, et al. MICA Mutant A5.1 Influences BK Polyomavirus Reactivation and Associated Nephropathy After Kidney Transplantation. *J Infect Dis.* 2016;214: 807–16. doi:10.1093/infdis/jiw168
47. Passos-Bueno MR, Bertola D, Horovitz DDG, de Faria Ferraz VE, Brito LA. Genetics and genomics in Brazil: a promising future. *Mol Genet Genomic Med.* 2014;2: 280–91. doi:10.1002/mgg3.95
48. Castelli EC, Ramalho J, Porto IOP, Lima THA, Felício LP, Sabbagh A, et al. Insights into HLA-G Genetics Provided by Worldwide Haplotype Diversity. *Front Immunol.* 2014;5: 476. doi:10.3389/fimmu.2014.00476

49. Meuleman T, Drabbels J, van Lith JMM, Dekkers OM, Rozemuller E, Cretu-Stancu M, et al. Lower frequency of the HLA-G UTR-4 haplotype in women with unexplained recurrent miscarriage. *J Reprod Immunol.* 2018;126: 46–52. doi:10.1016/j.jri.2018.02.002
50. Veit TD, Chies JAB. Tolerance versus immune response -- microRNAs as important elements in the regulation of the HLA-G gene expression. *Transpl Immunol.* 2009;20: 229–31. doi:10.1016/j.trim.2008.11.001
51. Zambra FMB, Biolchi V, de Cerqueira CCS, Brum IS, Castelli EC, Chies JAB. Immunogenetics of prostate cancer and benign hyperplasia--the potential use of an HLA-G variant as a tag SNP for prostate cancer risk. *HLA* 2016;87: 79–88. doi:10.1111/tan.12741
52. Li J-J, Pan K, Gu M-F, Chen M-S, Zhao J-J, Wang H, et al. Prognostic value of soluble MICA levels in the serum of patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Chin J Cancer* 2013;32: 141–8. doi:10.5732/cjc.012.10025

Figures and Tables

Table 1 – Demographic characterization of the sample.

Characteristics	Ct (N = 75)	CKD (n = 94)	p	KTN (n = 36)	KTR (n = 28)	p
Male	34.70 %	59.60 %	0.002 ¹	47.20 %	75.00%	0.023 ¹
Age	37.88 years (SD =14.46)	46.77 years (SD =13.44)	<0.001 ¹	44.92 years (SD = 14.27)	46.32 years (SD = 13.67)	0.692
Ethnic group ²						
Mixed race	10.80 %	9.60 %	1.000	8.30 %	17.90 %	0.448
Asian	1.40 %	2.10 %	1.000	2.800 %	0.00 %	1.000
Black	0.00 %	6.40 %	0.034	2.80 %	7.10 %	0.577
Mulatto	0.00 %	2.10 %	0.503	0.00 %	7.10 %	0.187
White	87.80 %	79.80 %	0.211	86.10 %	67.90 %	0.127
Diseases						
Hypertension	16.00 %	90.30 %	<0.001	54.20 %	45.80 %	0.375
Diabetes	2.70 %	23.70 %	<0.001	19.40 %	14.30 %	0.743
Dyslipidemias	2.70 %	16.10 %	0.004	11.10 %	7.10 %	0.688
Glomerulonephritis	0.00 %	37.60 %	<0.001	36.10 %	46.80 %	0.450
Hypertensive nephropathy	0.00 %	14.90 %	<0.001	44.40 %	55.60 %	0.488
Transplant patients				KTN (n = 36)	KTR (n = 28)	
Male donors				41.70 %	50.00 %	0.615
Living donors				41.70 %	25.00 %	0.193
Donor's age			40.39 years (SD = 12.29)		48.18 years (SD = 12.07)	0.014 ¹
Previous transplants				19.40 %	14.30 %	0.743
Previous blood transfusion				50.00 %	35.70 %	0.313
Multiparous women ³				42.11 % ³	71.43 % ³	0.378 ³
Detection of DSA				5.60 %	21.40 %	0.064
HLA mismatches						
HLA-A - 0/1/2			25.00%/41.70%/16.70%		10.70%/42.90%/35.70%	0.141
HLA-B - 0/1/2			22.20%/50.00%/11.10%		00.00%/50.00%/39.30%	0.003 ¹
HLA-DRB1 - 0/1/2			25.00%/50.00%/8.30%		21.40%/42.90%/25.00%	0.227
Unknown			16.70%		10.7%	0.720
Time on dialysis				38 months (SD=33)	55 months (SD=51)	0.100
GFR				7.58 mL/min (SD = 3.44)	7.11 mL/min (SD = 4.86)	0.662
Cold ischemia time ⁴				15h:31min (SD=6h:46min)	14h:44min (SD=8h:21min)	0.754

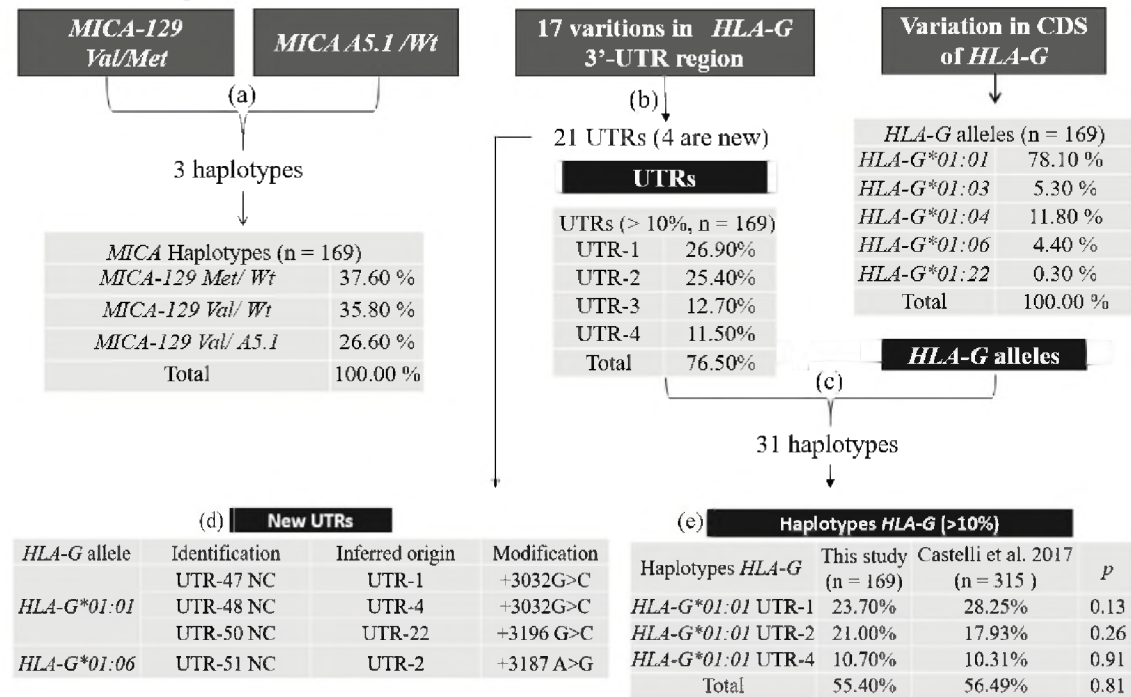
Ct: Control group. CKD: Patients with chronic kidney disease. KTN: Kidney-transplant patients with no rejection. KTR: Kidney-transplant patients who developed episodes of rejection. SD: standard deviation. DSA: donor-specific antibody. GFR: Glomerular filtration rate in pre-transplant. ¹Analyses performed with adjustment for sex and age. ²Ethnicity information was obtained by self-assessment. ³Calculated from the total number of females in the group. ⁴Calculated only for deceased donors. The cold ischemia time for all living donors was a maximum of 1 hour.

Table 2 – The 17 sites of the *HLA-G* 3'-UTR region analyzed in this study.

rs371194629	14-bp <i>Del</i>	14-bp <i>Ins</i>	+2960
rs567747015	<i>C</i>	<i>T</i>	+3001
rs1707	<i>C</i>	<i>T</i>	+3003
rs1710	<i>G</i>	<i>C</i>	+3010
rs17179101	<i>C</i>	<i>A</i>	+3027
rs146339774	<i>G</i>	<i>C</i>	+3032
rs17179108	<i>C</i>	<i>T</i>	+3035
No SNP¹	<i>A</i>	<i>T</i>	+3044
No SNP¹	<i>C</i>	<i>T</i>	+3052
rs180827037	<i>G</i>	<i>T</i>	+3092
No SNP¹	<i>C</i>	<i>G</i>	+3107
No SNP¹	<i>G</i>	<i>A</i>	+3111
rs138249160	<i>T</i>	<i>C</i>	+3121
rs1063320	<i>C</i>	<i>G</i>	+3142
rs9380142	<i>A</i>	<i>G</i>	+3187
rs1610696	<i>C</i>	<i>G</i>	+3196
rs1233331	<i>G</i>	<i>A</i>	+3227

¹Castelli et al. (2017). *Del*: +2960 or 14-bp deletion and *Ins*: +2960 or 14-bp insertion.

Figure 1 –The three steps (a, b and c) of haplotype inference, *HLA-G* allele frequencies, and haplotype frequencies found in all samples (n = 169).



Haplotype inferences: *MICA-129 Val/Met* and *MICA A5.1/Wt* (a), between 17 variations found in 3'-UTR of the *HLA-G* gene (b), and *HLA-G* UTRs and alleles (c). New UTRs described and their inferred origin (d). Similarity of frequencies of *HLA-G* haplotypes with published data from a population in São Paulo [28] (e). *Wt*: wild type, which does not show *MICA A5.1* variation. CDS: coding DNA sequence (exon 2, 3 and 4 of the *HLA-G* gene). *Del*: +2960 or 14-bp deletion and *Ins*: +2960 or 14-bp insertion. NC: new composition.

Table 3 –The most significant results for *HLA-G* 3'-UTR and *MICA* linkage disequilibrium for all groups (Ct, CKD, KTN and KTR).

Locus 1	Locus 2	D'	LOD	r ²	Variants in <i>cis</i>	
+3010 G>C	+3142 C>G	1.000	7.90 to 39.27	0.87 to 1.000	+3010 C and +3142 G	+3010 G and +3142 C
<i>Ins/Del</i> 14bp	+3142 C>G	0.91 to 1.00	5.06 to 18.86	0.42 to 0.62	14-bp <i>Ins</i> and +3142 G	14-bp <i>Del</i> and +3142 C
<i>MICA</i> -129 <i>Val/Met</i>	<i>MICA</i> <i>A5.1/Wt</i>	1.000	2.22 to 6.71	0.19 to 0.27	<i>MICA</i> -129 <i>Met</i> and <i>MICA</i> <i>Wt</i>	<i>MICA</i> -129 <i>Val</i> and <i>MICA</i> <i>A5.1</i>

The significant linkage disequilibrium had an LOD > 3.000 and $p < 0.05$. LOD: is the log of the likelihood odds ratio. Ct: Control group. CKD: Patients with chronic kidney disease. KTN: Kidney-transplant patients with no rejection. KTR: Kidney-transplant patients who developed episodes of rejection. *Wt*: wild type, which does not show *MICA* *A5.1* variation. *Del*: +2960 or 14-bp deletion and *Ins*: +2960 or 14-bp insertion.

Supporting information - Table 1 - The linkage disequilibrium results for *HLA-G* 3'-UTR and *MICA* in each group (Ct, CKD, KTN and KTR).

Ct (n = 75)		95% CI					
Locus 1	Locus 2	D'	LOD	r ²	Low	High	Variations in cis
+3010 G>C	+3142 C>G	1.000	28.470	0.923	0.930	1.000	+3010 C and +3142 G
Ins/Del 14bp	+3142 C>G	1.000	15.970	0.616	0.890	1.000	+3010 G and +3142 C
Ins/Del 14bp	+3196 C>G	0.959	13.470	0.612	0.830	1.000	Del 14bp and +3142 C
Ins/Del 14bp	+3010 G>C	0.885	11.650	0.522	0.730	0.960	Ins 14bp and +3196 G
+3142 C>G	+3196 C>G	1.000	9.520	0.410	0.830	1.000	Del 14bp and +3010 C
+3142 C>G	+3187 A>G	1.000	9.110	0.351	0.820	1.000	+3142 G and +3196 G
+3010 G>C	+3187 A>G	1.000	8.820	0.324	0.810	1.000	+3142 C and +3187 A
+3027 C>A	+3035 C>T	1.000	7.990	0.574	0.730	1.000	+3010 C and +3187 A
MICA-129 Val/Met	MICA A5.1/Wt	1.000	6.990	0.265	0.770	1.000	+3027 C and +3035 C
+3010 G>C	+3196 C>G	0.886	6.910	0.349	0.670	0.960	+3027 A and +3035 T
Ins/Del 14bp	+3187 A>G	1.000	5.900	0.216	0.730	1.000	MICA-129 Met and MICA Wt
+3003 C>T	+3142 C>G	1.000	4.580	0.202	0.670	1.000	+3010 G and +3196 G
+3003 C>T	+3010 G>C	1.000	4.080	0.186	0.640	1.000	Ins 14bp and +3187 A
+3187 A>G	+3196 C>G	1.000	3.340	0.144	0.570	1.000	Del 14bp and +3187 G
CKD (n = 94)		95% CI					
Locus 1	Locus 2	D'	LOD	r ²	Low	High	Variations in cis
+3010 G>C	+3142 C>G	1.000	39.270	0.958	0.950	1.000	+3010 C and +3142 G
+3142 C>G	+3187 A>G	0.964	16.860	0.497	0.840	1.000	+3010 G and +3142 C
Ins/Del 14bp	+3142 C>G	0.965	16.780	0.497	0.840	1.000	+3142 C and +3187 A
Ins/Del 14bp	+3010 G>C	0.964	15.780	0.474	0.840	1.000	Ins 14bp and +3142 G
+3010 G>C	+3187 A>G	0.894	13.900	0.446	0.750	0.960	Del 14bp and +3010 G
Ins/Del 14bp	+3196 C>G	0.862	13.420	0.478	0.720	0.940	Ins 14bp and +3010 C
+3142 C>G	+3196 C>G	1.000	11.780	0.344	0.850	1.000	+3010 C and +3187 A
+3010 G>C	+3196 C>G	1.000	11.140	0.329	0.850	1.000	Del 14bp and +3187 G
Ins/Del 14bp	+3187 A>G	0.943	8.960	0.254	0.750	0.990	+3010 G and +3187 G
MICA-129 Val/Met	MICA A5.1/Wt	1.000	6.710	0.186	0.760	1.000	Ins 14bp and +3187 A
+3027 C>A	+3035 C>T	1.000	6.410	0.319	0.670	1.000	MICA-129 Met and MICA Wt
Ins/Del 14bp	+3035 C>T	0.913	5.700	0.196	0.640	0.980	MICA-129 Val and MICA A5.1
+3187 A>G	+3196 C>G	0.913	5.030	0.153	0.630	0.980	+3027 A and +3035 T
+3035 C>T	+3142 C>G	1.000	4.320	0.125	0.640	1.000	Ins 14bp and +3035 T
+3010 G>C	+3035 C>T	1.000	4.090	0.120	0.630	1.000	Del 14bp and +3187 G
+3003 C>T	+3010 G>C	1.000	3.890	0.131	0.610	1.000	+3187 A and +3196 C
+3003 C>T	+3142 C>G	1.000	3.680	0.125	0.600	1.000	+3035 C and +3142 C
KTN (n = 36)		95% CI					
Locus 1	Locus 2	D'	LOD	r ²	Low	High	Variations in cis
+3010 G>C	+3142 C>G	1.000	18.860	1.000	0.910	1.000	+3010 C and +3142 G
Ins/Del 14bp	+3010 G>C	0.911	6.200	0.421	0.660	0.980	+3010 G and +3142 C
Ins/Del 14bp	+3142 C>G	0.911	6.200	0.421	0.660	0.980	Ins 14bp and +3010 C
+3010 G>C	+3187 A>G	0.906	6.070	0.399	0.640	0.980	Ins 14bp and +3142 G
+3142 C>G	+3187 A>G	0.906	6.070	0.399	0.640	0.980	Del 14bp and +3142 C
+3010 G>C	+3196 C>G	1.000	5.540	0.372	0.710	1.000	+3010 G and +3187 A
+3142 C>G	+3196 C>G	1.000	5.540	0.372	0.710	1.000	+3142 C and +3187 A
Ins/Del 14bp	+3196 C>G	0.672	3.420	0.331	0.390	0.840	+3010 C and +3196 G
+3027 C>A	+3035 C>T	1.000	3.120	0.412	0.480	1.000	+3142 C and +3196 G
Ins/Del 14bp	+3187 A>G	0.860	3.030	0.183	0.470	0.960	Ins 14bp and +3196 G
MICA-129 Val/Met	MICA A5.1/Wt	1.000	2.430	0.219	0.450	1.000	Del 14bp and +3196 C
KTR (n = 28)		95% CI					
Locus 1	Locus 2	D'	LOD	r ²	Low	High	Variations in cis
+3010 G>C	+3142 C>G	1.000	7.900	0.866	0.830	1.000	+3010 C and +3142 G
Ins/Del 14bp	+3196 C>G	1.000	7.180	0.726	0.780	1.000	+3010 G and +3142 C
Ins/Del 14bp	+3142 C>G	1.000	5.060	0.559	0.710	1.000	Ins 14bp and +3196 G
+3142 C>G	+3187 A>G	1.000	4.540	0.552	0.700	1.000	Del 14bp and +3142 C
Ins/Del 14bp	+3010 G>C	1.000	4.010	0.484	0.660	1.000	+3142 C and +3187 A
+3142 C>G	+3196 C>G	1.000	3.380	0.406	0.590	1.000	Ins 14bp and +3010 C
MICA-129 Val/Met	MICA A5.1/Wt	1.000	2.220	0.188	0.400	1.000	Del 14bp and +3187 G

Analysis performed in Haploview. The linkage disequilibrium (LD) considered significant had an LOD > 3.000. LOD: is the log of the likelihood odds ratio. 95% CI relative to D': confidence interval. Ct: Control group. CKD: Patients with chronic kidney disease. KTN: Kidney-transplant patients with no rejection. KTR: Kidney-transplant patients who developed episodes of rejection. Wt: wild type, which does not show *MICA* A5.1 variation. Del: +2960 or 14-bp deletion and Ins: +2960 or 14-bp insertion.

Supporting information - Table 2 - The linkage disequilibrium results for *HLA-G* 3'-UTR and *MICA* in each group (Ct, CKD, KTN and KTR).

Ct (n = 75)					CKD (n = 94)			
<i>p</i>	<i>r</i> ²	D'	UTR	<i>HLA-G</i> alleles	UTR	D'	<i>r</i> ²	<i>p</i>
0.036	0.029	+0.790	UTR-4	<i>HLA-G</i> *01:01	---	---	---	---
<0.001	0.282	+0.583	UTR-5		UTR-5	+0.377	0.142	<0.001
<0.001	0.161	+1.000	UTR-13	<i>HLA-G</i> *01:03	UTR-13	+0.225	0.033	0.012
0.008	0.046	+0.306	UTR-8		---	---	---	---
<0.001	0.194	+0.440	UTR-3		UTR-3	+0.375	0.134	<0.001
0.003	0.056	+1.000	UTR-15	<i>HLA-G</i> *01:04	---	---	---	---
0.01	0.044	+0.731	UTR-1		---	---	---	---
0.009	0.045	+0.533	UTR-2	<i>HLA-G</i> *01:06	UTR-10	+0.225	0.033	0.012
KTN (n = 36)					KTR (n = 28)			
<i>p</i>	<i>r</i> ²	D'	UTR	<i>HLA-G</i> alleles	UTR	D'	<i>r</i> ²	<i>p</i>
0.04	0.058	+0.760	UTR-1	<i>HLA-G</i> *01:01	---	---	---	---
<0.001	0.422	+0.731	UTR-5		UTR-5	+1.000	0.491	<0.001
<0.001	0.189	+1.000	UTR-13	<i>HLA-G</i> *01:03	---	---	---	---
<0.001	0.480	+0.813	UTR-3	<i>HLA-G</i> *01:04	---	---	---	---
0.032	0.064	+0.294	UTR-10	<i>HLA-G</i> *01:06	---	---	---	---

The inferences of *HLA-G* haplotype through ELB algorithm of *HLA-G* alleles with determined UTRs. Analysis performed in Arlequin. The significant linkage disequilibrium had a $p < 0.05$. Ct: Control group. CKD: Patients with chronic kidney disease. KTN: Kidney-transplant patients with no rejection. KTR: Kidney-transplant patients who developed episodes of rejection.

Supporting information - Table 3 – Analyses of Hardy-Weinberg equilibrium performed for *HLA-G* alleles and polymorphisms in 3'-UTR region, *MICA* and *NKG2D* variations in the control group (n = 75).

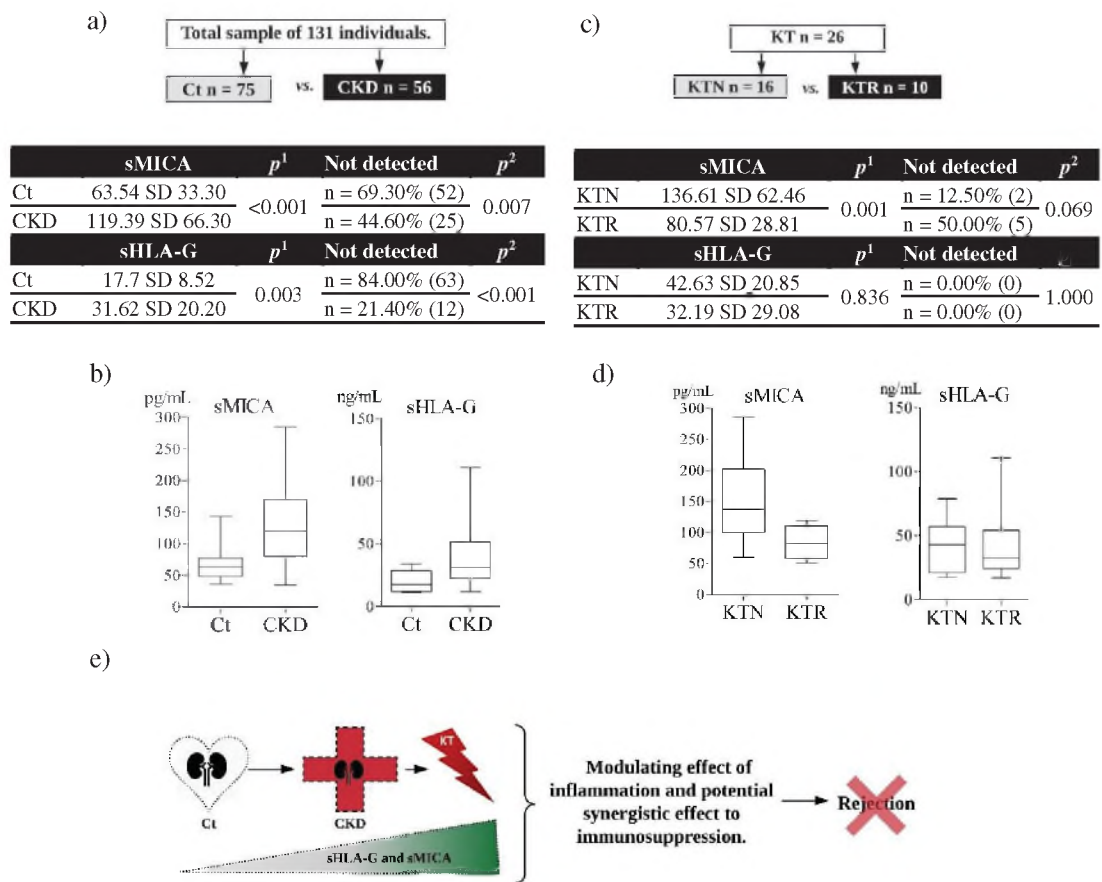
<i>Locus</i>	Observed heterozygosis	Expected heterozygosis		SD
<i>HLA-G</i> 3'-UTR polymorphisms				
<i>HLA-G</i> +2960	0.547	0.486	0.341	<0.001
<i>HLA-G</i> +3003	0.280	0.261	1.000	<0.001
<i>HLA-G</i> +3010	0.507	0.503	1.000	<0.001
<i>HLA-G</i> +3027	0.120	0.114	1.000	<0.001
<i>HLA-G</i> +3035	0.147	0.181	0.144	<0.001
<i>HLA-G</i> +3142	0.520	0.502	0.817	<0.001
<i>HLA-G</i> +3187	0.373	0.367	1.000	<0.001
<i>HLA-G</i> +3196	0.493	0.433	0.285	<0.001
<i>HLA-G</i> +3227	0.133	0.125	1.000	<0.001
<i>HLA-G</i> UTRs	0.867	0.821	0.387	<0.001
<i>HLA-G</i> alleles	0.333	0.356	0.246	<0.001
<i>HLA-G</i> haplotypes ¹	0.907	0.85	0.663	<0.001
<i>MICA</i> -129 Val/Met	0.653	0.661	0.309	<0.001
<i>MICA</i> A5.1/Wt	0.333	0.400	0.156	<0.001
<i>MICA</i> haplotypes	0.533	0.488	0.480	<0.001
<i>NKG2D</i>	0.507	0.456	0.443	<0.001

Positions +3001, +3032, +3044, +3052, +3092, 3107, +3111 and +3121 are monomorphic sites in the control group. ¹*HLA-G* haplotypes: inferred composition through the ELB algorithm of *HLA-G* alleles with determined UTRs. Wt: wild type, which does not show *MICA* A5.1 variation. SD: Standard deviation.

Table 4 - Observed allele frequencies for the *HLA-G*, *MICA* and *NKG2D* genes.

Position	Variation	Ct - 2n = 150	CKD - 2n = 188		KTN - 2n = 72 (%)	KTR - 2n = 56 (%)	
HLA-G 3'-UTR		Relative frequency (%)			Relative frequency (%)		
				<i>p</i>			<i>p</i>
+2960	14-bp <i>Del</i>	59.30	62.80	0.574	62.50	62.50	1.000
	14-bp <i>Ins</i>	40.70	37.20	0.520	37.50	37.50	1.000
+3001	C	100.00	99.50	0.371	---	---	---
	T	0.00	0.50	1.000	---	---	---
+3003	C	15.30	10.10	0.148	11.10	8.80	0.774
	T	84.70	90.90	0.184	88.90	91.20	0.685
+3010	G	49.30	46.30	0.576	45.80	55.60	0.373
	C	50.70	53.70	0.586	54.20	44.40	0.893
+3027	C	94.00	95.70	0.618	94.40	96.40	1.000
	A	6.00	4.30	0.466	5.60	5.60	1.000
+3032	G	100.00	98.90	0.205	---	---	---
	C	0.00	1.10	1.000	---	---	---
+3035	C	90.00	87.80	0.518	87.50	91.10	0.521
	T	10.00	12.20	0.604	12.50	8.90	0.580
+3142	C	47.30	47.30	0.999	45.80	48.20	0.789
	G	52.70	52.70	0.999	54.20	51.80	0.859
+3187	A	76.00	67.60	0.088	70.80	66.10	0.701
	G	24.00	32.40	0.092	29.20	33.90	0.564
+3196	C	68.70	72.3	0.473	69.40	69.60	0.981
	G	31.30	27.70	0.461	30.60	30.40	1.000
+3227	G	93.30	97.30	0.109	95.80	98.20	0.443
	A	6.70	2.70	0.075	4.20	1.80	0.631
HLA-G UTR							
	UTR-1	24.00	29.26	0.324	29.17	25.00	1.000
	UTR-2	28.67	22.87	0.168	23.61	23.21	1.000
	UTR-3	10.67	14.36	0.396	15.28	12.50	0.799
	UTR-4	15.33	8.51	0.060	8.33	8.93	1.000
	UTR-18	2.10	6.70	0.053	---	---	---
HLA-G Alleles							
	<i>HLA-G*01:01</i>	79.33	77.13	0.692	0.79	0.79	1.000
	<i>HLA-G*01:03</i>	4.00	6.38	0.466	0.07	0.02	0.230
	<i>HLA-G*01:04</i>	10.67	12.77	0.613	0.08	0.02	0.268
	<i>HLA-G*01:06</i>	6.00	3.19	0.288	0.04	0.04	0.268
	<i>HLA-G*01:22</i>	0.00	0.53	1.000	0.01	0.00	1.000
HLA-G Haplotypes							
	<i>HLA-G*01:01</i> UTR-1	22.67	24.47	0.702	25.00	23.21	0.839
	<i>HLA-G*01:01</i> UTR-2	21.33	20.74	1.000	19.44	25.00	0.520
	<i>HLA-G*01:01</i> UTR-3	4.00	6.38	0.466	4.17	7.14	0.698
	<i>HLA-G*01:01</i> UTR-4	14.67	7.45	0.035	9.72	7.14	0.755
	<i>HLA-G*01:04</i> UTR-3	5.33	5.85	1.000	6.94	5.36	1.000
	<i>HLA-G*01:04</i> UTR-1	---	---	---	0.00	7.10	0.002
MICA							
	<i>MICA-129 Val</i>	58.70	65.40	0.215	65.3	53.60	0.205
	<i>MICA-129 Met</i>	41.30	34.60	0.202	34.70	46.40	0.180
	<i>MICA A5.1</i>	27.30	26.00	0.793	70.80	82.10	0.138
	<i>MICA Wt</i>	72.70	74.00	0.805	29.20	17.9	0.152
MICA Haplotype							
	<i>MICA-129 Met/ Wt</i>	41.33	34.57	0.215	34.70	46.40	0.280
	<i>MICA-129 Val/ Wt</i>	31.33	39.36	0.139	36.10	35.70	1.000
	<i>MICA-129 Val/ A5.1</i>	27.33	26.06	0.805	29.20	17.90	0.152
NKG2D							
	<i>LNK1</i>	65.33	65.33	0.571	58.33	60.71	0.857
	<i>HNK1</i>	34.67	34.67	0.571	41.67	39.29	0.857

Ct: Control group. CKD: Patients with chronic kidney disease. KTN: Kidney-transplant patients with no rejection. KTR: Kidney-transplant patients who developed episodes of rejection. *Wt*: wild type, which does not show *MICA A5.1* variation. *Del*: +2960 or 14-bp deletion and *Ins*: +2960 or 14-bp insertion. ¹ Zero or not sufficient frequency to perform the calculation.

Figure 2 – Case-control analysis of sMICA and sHLA-G production.

Analyses of sMICA and sHLA-G were performed for control (Ct) *versus* chronic kidney disease (CKD) (a-b), and after kidney transplant (KT) in patients with (KTR) and without (KTN) episodes of rejection (c-d). The production of regulatory molecules, sHLA-G and sMICA, is stimulated in a pathological condition, such as in patients with chronic kidney disease (CKD), but generally not in healthy patients, as observed in Ct. Once the CKD is established, the regulatory molecules in the pre-transplant can act in the post-transplant period as enhancers of immunoregulation, leading to allograft acceptance (e). Mann-Whitney test¹. Chi-square test². SD: Standard deviation.

3.3 CAPÍTULO 3 - ESTUDO PILOTO DO FENÓTIPO DE IMUNOTOLERÂNCIA DE HMEC-1 E HRGEC MEDIADO POR HLA-G

A PILOT STUDY OF THE IMMUNE TOLERANT PHENOTYPE OF HMEC-I AND HRGEC MEDIATED BY HLA-G

HLA (*human leukocyte antigen*)-G are membrane-bound (mHLA-G) or soluble (sHLA-G) immunoregulatory molecules with expression restricted to immune privileged tissues. It can also be expressed in response to inflammation, acting as immune cells activation suppressor through interaction with inhibitory receptors. We hypothesized that the existence of an HLA-G-mediated immune tolerant phenotype impacts allograft rejection. Here, we investigated the tolerant phenotype of endothelial cells (ECs, lineages HMEC-I and HRGEC) under progesterone stimulation. The inhibitory receptors (LILRB1 and LILRB2), mHLA-G and intracellular HLA-G (iHLA-G) were evaluated through flow cytometry. Real time PCR assays were performed in order to detect HLA-G transcripts. ECs were genotyped for *HLA-G* alleles and for present functional alleles. No cell lysis was observed in culture in the presence of exogenous sHLA-G5. With regards to iHLA-G and mHLA-G expression, we observed a heterogeneous expression, even within control cells. In addition to that, we have shown the expression of LILRB2 in a subpopulation of ECs that was not associated with the presence of exogenous sHLA-G concentrations. The detection of mHLA-G in ECs failed, which is probably related to inhibition mediated by cell contact. Thus, culture confluence and the quality of the medium may be determinant for the expression of HLA-G (membrane, intracellular and soluble HLA-G) and evaluation of tolerant phenotype in cell lineages.

Key words: Endothelial cells, iHLA-G and mHLA-G, tolerance.

Introduction

Human leukocyte antigen G (HLA-G) is a non-classical HLA class I molecule encoded by a gene with restricted expression to immune privileged tissues [1–3]. It is able to produce alternative processed transcripts and originate cellular membrane-bound (mHLA-G) or soluble (sHLA-G) protein isoforms. The sHLA-G5 and HLA-G1 (membrane bound molecule or as soluble), have an additive effect on the inhibition of natural killer cell mediated cytotoxicity, with HLA-G5 being the most potent isoform [4]. In addition, HLA-G expression occurs in response to inflammation, suppressing immune cell activation (B, T, NK or dendritic cells) [5].

Upregulation of the *HLA-G* gene differs from other *HLA* genes and is not stimulated by IFN γ [6]. Furthermore, it presents response element indirectly associated with extracellular conditions, as the response element for progesterone, which is an important immunomodulatory steroid hormone responsible for the maintenance of the embryo implantation [7–9]. Afterwards, HLA-G in peripheral blood or biopsies has this similar immunoregulation role in pathological situations. It makes favorable for the establishment of kidney, liver [10], heart [11] and lung [12] allografts.

The cell sources from which HLA-G originates are poorly known, but their ability to bind inhibitory receptors is clear. Inhibitory receptors include the leukocyte Ig-like receptors family – LIRs, LILRB1 (ILT2) and LILRB2 (ILT4) [13]. HLA-G binds the activator receptors CD160, from human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), and human microvascular endothelial cells (HMVEC), and induces cell lysis [14].

Along the immune activation in kidney allograft, the endothelial cells (ECs) lead the rejection response within the pro-inflammatory cytokines and production of HLA classical molecules [15]. Among the cell models used to study those events in the kidney allograft rejection there is the immortalized human dermal mesenchymal endothelial cells-1 (HMEC-1) [16] and the primary human renal glomerular EC (HRGEC) [17].

Therefore, this work investigated HMEC-1 and HRGEC regarding the immune tolerant phenotype, assuming it as the expression of membrane (m)HLA-G, intracellular (i)HLA-G and its inhibitory receptors (LILRB1/LILRB2). This evaluation was performed under normal and inducible microenvironment. This pilot study had the aim to improve the knowledge about the tolerance profile revealed by a restricted population of EC and possibly associated with kidney allograft acceptance.

Methods

Cell culture

HMEC-I (ATCC Number: CRL-3243) was cultured (at 37°C under 5% CO₂) in MCDB-131 medium (ThermoFischer Scientific), supplemented with 12.5% fetal calf serum (FCS), 10 µg/mL hydrocortisone (Sigma-Aldrich), 10 ng/mL epidermal growth factor (Collaborative Biochemical Products Bedford), 4% L-glutamine and 1% penicillin/streptomycin. This cell lineage was used according to supplier recommendations, as they can maintain a normal phenotypic profile up to twenty passages of cell cultures. The known phenotype of this cell includes the up-regulated membrane expression of HLA-DR, ICAM-I (CD54) and PD-L1 (CD274). It is seen for activated ECs under inflammatory conditions *in vivo* after 10 ng/mL of IFN γ for three days. This cell presents characteristics that belong to endothelial cells from large and small vessels [18].

HRGEC was cultured (at 37°C under 5% CO₂) on substrate pre-treated with fibronectin and specific medium, following supplier recommendations (SuperCult® EC Growth Medium Kit-MV supplemented with SuperCult® EC Growth Medium Supplement Kit-MV), and to isolate them was used the Primary Cells Detach (Innoprot). The HRGEC (from INNOPROT, Spain) is a primary EC lineage, isolated from human kidneys. They differ from cells of large vessels and are more similar with cells from microvasculature. They have a higher differentiation ability as is seen *in vivo*, but present a lower survival *in vitro* (ability to expand up to fifteen subpopulations). Those ECs were able to act in glomerular filtration, can express HLA-DR, which is up-regulated under inflammatory conditions associated to kidney diseases or injuries.

Control cells for the detection of mHLA-G, iHLA-G, sHLA-G and HLA-G transcripts expression were used. Those were the melanoma cells transfected with empty plasmid or M8-pcDNA (pcDNA from *Invitrogen Life Technologies*), that are negative for HLA-G expression, cells containing plasmid with full-length HLA-G5 cDNA or M8-HLA-G5 (without transmembrane sequence) and cells containing full-length HLA-G1 cDNA or M8-HLA-G1 (with transmembrane sequence). Those cells were provided by Dr. Nathalie Rouas-Freiss (*Laboratoire de recherche Hémato-Immunologie:URM-E 5, Hôpital Saint-Louis, Paris, France*). Supernatants from M8-HLA-G5 cells containing sHLA-G5 at 50µg/mL were also provided by the same source. M8 cell lineages were cultured (at 37°C, below 5% CO₂) in RPMI

1640 medium with 10% FCS, 2mM L-glutamine, 100 µg/mL hygromycin B. The JEG-3 choriocarcinoma cell line (ATCC Number: HTB-36) was another positive control for *HLA-G* mRNA expression, provided and cultured by Dr. Philippe Moreau (*Laboratoire de recherche Hémato-Immunologie:URM-E 5, Hôpital Saint-Louis, Paris, France*). Those cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM) supplemented with 10% heat inactivated FCS, Fungizone and gentamicin (at 37°C under 5% CO₂).

DNA extraction and *HLA-G* genotyping

HMEC-I and HRGEC cells were genotyped for *HLA-G* in order to predict the existence of functional alleles that would be related to low or high *HLA-G* expression. DNA extractions from cultured cells were carried through salting out technique [19]. Sequences were generated in both directions and they were obtained using ABI Prism Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystem, CA, USA). Analysis were made through *ABI Prism SeqScape* (Applied Biosystems) software, based on official alleles (IMGT/IPD) [20].

Amplification and sequencing primers were: i) exon 2 primer (F2E:GGGTCGGGCGGGTCTCAA and R2E:TCCGTGGGGCATGGAGGT); ii) exon 3 (F3E:CCCAGACCCTCTACCTGGGAGA, used to perform amplification reaction, and F3E:CTCTCCTTGTGCTAGGCCAGGCTG, used to perform amplification and sequencing reactions); and iii) exon 4 (F4E:CCATGAGAGATGCAAAGTGCT, used to perform amplification and sequencing reactions, and R4E:TGCTTTCCCTAACAGAC ATGAT, used to perform amplification reaction), as adapted from Nardi *et al.* [21].

The HMEC-1 and HRGEC lineages respectively presented alleles *HLA-G*01:01:02/HLA-G*01:06* and *HLA-G*01:01:01/HLA-G*01:04:04*. Thus, *HLA-G* phenotypes from those cells were explored considering no influences of the genetic order that could interfere in the protein *HLA-G* constitution.

Flow Cytometry

For the phenotypic analysis of HMEC-1, HRGEC and M8 lineages, the following antibodies were used: for mHLA-G, the MEM-G/9 (phycoerythrin conjugated - PE; EXBIO) and for iHLA-G the 2A12 (not conjugated; EXBIO, together with a secondary antibody, Alexa Fluor® 647 conjugated; ThermoFischer Scientific). Intracellular staining was carried out with

the anti-Human Foxp3 Staining Set APC (clone 236A/E7) (eBioscience). ECs induced with sHLA-G were assessed regarding membrane expression of HLA-DR (allophycocyanin conjugated antibody – APC; BD Pharmingen™), LILRB1 (phycoerythrin conjugated – PE; Beckman Coulter) and LILRB2 (phycoerythrin conjugated – PE; Beckman Coulter). Flow cytometry was carried out on a FACS Canto II (BD Biosciences) and a minimum of 20 000 cells were analyzed for each staining procedure.

Flow cytometry obtained data was analyzed using FlowJo_V10 (Tree Star Inc., Ashland, Oreg., USA) and FACS Diva (BD Biosciences) software. The results were obtained in the form of relative frequencies and standard deviation (SD) of living cells included in fixed quadrant, already known and characteristic for each lineage, besides the acquisition of MFI (median fluorescence intensity) referring to each cell marking. Specific fluorescence index (SFI) was obtained as measure of expression intensity to compare different conditions. SFI is calculated dividing MFI from each condition by the mean fluorescence obtained for the negative control (background fluorescence or isotype) and values above 1.3 were defined as a significant surface expression.

ELISA for sHLA-G from supernatants cells cultures

Soluble HLA-G1 and -G5 concentrations were evaluated by a specific sandwich ELISA in supernatants cell cultures using MEM-G/9, as capture antibody, and anti-human β 2-microglobulin, as a detection antibody [22]. Measurements that fell at or below the minimum detectable specific dose were considered not detectable (sHLA-G under 12.50 ng/mL).

qPCR for *HLA-G* transcripts

ECs induced to express HLA-G and the control lineages (M8-pcDNA, M8-HLA-G1 and JEG-3 choriocarcinoma cell line) had their mRNA analyzed by quantitative PCR (qPCR). Total mRNA was isolated using TRI Reagent (Ambion, Applied Biosystems, Thermo Fischer Scientific). RNA was quantified and transcribed to cDNA (1 μ g RNA/reaction) with SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen Life Technologies).

Quantitative PCR was performed through ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fischer Scientific) and TaqMan gene Expression Assay (Applied Biosystems, Thermo Fischer Scientific). The primers and probe sets used for this assay were:

HLA-G (Hs00365950_g1, encompassing mRNA quantifications from HLA-G1 and -G2 isoforms) and as endogenous control β -actin (Hs99999903_m1) was used.

In addition, a second strategy also based on TaqMan assay (ABI Prism 7000 SDS, Applied Biosystem), but for the analysis and detection of all HLA-G transcripts, was adopted [23], as previously described [24]. Cycles threshold (Ct) were considered as the mean of duplicates and analyzed in *7500 Software v2.0.5*. The differences in relative abundances of mRNA were calculated as $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$ [25].

Evaluation of HMEC-1 and HRGEC in response to the presence of sHLA-G and the inhibitory receptors expression

The anti-proliferative effect of sHLA-G in ECs was analyzed including different concentrations of sHLA-G5 (50 and 500 ng/mL) in culture medium of HMEC-I and HRGEC (80 000 cells/culture, six well plate) in a 2 mL of medium. Those cells were also tested when activated or not activated with IFN γ (10 ng/mL applied always after three hours of cell culture), and its effect was assessed by the detection of HLA-DR expression on the cell surface. HLA-G concentrations were tested along 72 hours of cell culture considering these conditions: all the time with sHLA-G and in the last 24 hours of cell culture with sHLA-G, with or without IFN γ stimulation, summarizing ten conditions (**Figure 1 (a)**). Together, the HMEC-1 phenotype was evaluated based on the membrane expression of inhibitory receptors: LILRB1/LILRB2. This was also performed considering two conditions: all the time with a tolerance cocktail (TC: leukemia inhibitory factor 3400 U/mL, IL-10 at 20 ng/mL with progesterone at 1000 ng/mL, all from *Prepotech*) and with IFN γ stimulation, summarizing three conditions with non-stimulated cells. TC was created to simulate a tolerance environment, similar as observed in perinatal tissues as previously described [26].

Evaluation of HLA-G expression

Preliminary analysis of HLA-G expression in control cells

The selected positive control cells (M8-HLA-G1 and M8-HLA-G5) had a variable expression of mHLA-G, iHLA-G and sHLA-G. Therefore, they were evaluated in relation to the time and cell confluency *versus* HLA-G production to find out the best condition to harvest

and use as positive control. Cells were grown in flasks (75 cm²) for 1, 3 and 4 days (1 million of cells/ 10 mL of total medium). Phenotyping was performed for mHLA-G and iHLA-G expression followed by flow cytometry methodology and sHLA-G quantification through ELISA assay.

Evaluation of HLA-G expression in HMEC-1 and HRGEC

Stimulation of *HLA-G* gene expression was performed in six well plates of 100 000 cells/culture (HMEC-1/HRGEC). Cells were maintained in culture for 24, 54 and 66 hours and were respectively stimulated for 48, 18 and 6 hours with or without inducer (**Figure 1 (b)**). Progesterone (0, 100 and 10 000 ng/mL, Pepotech) was used to induce ECs as previously suggested [27]. At every stimulation with progesterone the culture medium was completely changed (including non-stimulated cells). After stimulation, cells were submitted to flow cytometry to analyze markers (mHLA-G, iHLA-G and LILRB2), and for quantification of HLA-G transcripts. Also, HRGEC lineage was stimulated along 24-hours with progesterone (above-mentioned concentrations); and HLA-G transcripts were analyzed through real-time PCR.

Data analysis

Data were submitted through analysis of variance for evaluation of live cell percentages. For all the other cases, the Kruskal Wallis test or the Mann–Whitney U test was adopted. The *p*-value less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

Endothelial cells normally grow and are activated even in the presence of exogenous sHLA-G

We observed no phenotypic alterations of HMEC-1 and HRGEC growth in the presence of exogenous sHLA-G5 in two concentrations and along 72 hours or 24 hours. In addition, in the different stimulations, the population of live cells and gated for analysis had a

mean of 87.38% (SD 1.69%) for HMEC-1 and 72.00% (SD 3.85%) for HRGEC this considering all ten conditions tested for each cell line. Despite the normal growth, HMEC-1 had a larger proportion of cells compared to HGREC (15.38%, $p < 0.001$).

We further evaluated the ability of sHLA-G to suppress HLA-DR surface expression, after previous IFN γ stimulation. HMEC-1 lineage exhibited normal activation profile of HLA class II in all cytokine stimulated conditions (SFI > 5 for IFN γ stimulated conditions and < 1.3 for non-IFN γ -stimulated conditions, $p = 0.004$ (**Figure 2 (a and b)**). Concerning the cell percentages with membrane detection of HLA-DR, a mean of 26.15% (SD 0.04%) of positive cells was observed, and the lowest percentage of positive cells was that for the isolate IFN γ stimulation (21.30% of HLA-DR $^{+}$ cells).

The presence of HLA-DR on the cell surface was increased in stimulated HRGEC (3.9% SD 0.01%) in comparison to non-IFN γ -activated cells (0.30% SD $< 0.01\%$), in the presence or not of sHLA-G (SFI > 4 for IFN γ stimulated conditions and < 2.5 for non- IFN γ -stimulated conditions, $p = 0.004$).

A subpopulation of endothelial cells expresses the inhibitory receptor of HLA-G

The membrane expression of LILRB2 in EC was not affected by the presence of sHLA-G in both IFN γ -stimulated and non-IFN γ -stimulated cells. Still, the SFI evaluation for LILRB2 $^{+}$ cells (as shown in **Figure 4**) was bigger for HRGEC compared to HMEC-1 in the presence of IFN γ stimulation or not (analyzed LILRB2 SFI for HRGEC vs. HMEC-1 under IFN γ -stimulation, $p = 0.004$ and comparing non-IFN γ -stimulated conditions between cells, $p = 0.006$, **Figure 4**).

The LILRB2 membrane expression for HMEC-1 under TC and IFN γ stimulation revealed a higher percentage of positive cells. The non-stimulated HMEC-1 had the highest detection of LILRB2 (7.91%), followed by TC (5.81%) and IFN γ stimulation (4.63%), (**Figure 5 (a)**). Regarding the detection of LILRB1, that was found only in the peripheral blood mononuclear cell (2.38% of LILRB1 $^{+}$ cells), and used as positive control, but not detected in the endothelial cell lineage (**Figure 5 (b)**).

Evaluation of HLA-G expression

M8-HLA-G1 and M8-HLA-G5 had differences in HLA-G expression

The mHLA-G, iHLA-G and sHLA-G were analyzed for M8-HLA-G1 and M8-HLA-G5; the positive controls were analyzed for HLA-G expression in flow cytometry and ELISA analysis. The M8-HLA-G1, the positive cell control for mHLA-G expression, had the highest mHLA-G surface expression (24.8% of mHLA-G⁺ cells) after 1 day of culture and in low cell confluency. The M8-HLA-G5, the control for iHLA-G expression, had its best HLA-G production (33.70% of iHLA-G⁺ cells and 144.50 ng/mL of sHLA-G detected in supernatants) after 4 days of culture and in high cell confluency. Those two conditions were used to obtain positive HLA-G expression for both cells along performed assays. Intracellular expression stood lower for M8-HLA-G1 cells compared to M8-HLA-G5 in all tested conditions. The M8-HLA-G1 lineage had a time-dependent increase for sHLA-G production, but it was also lower than the one observed for M8-HLA-G5 (**Figure 5**).

HLA-G expression in HMEC-1 and HRGEC

The mHLA-G was found just for M8-HLA-G1 control cell, while other lineages had no significant SFI detection (**Figure 6 (a and b)**). For iHLA-G the following lineages and conditions presented detectable iHLA-G: HMEC-1 after 6 hours at 100 and 10000 ng/mL with PR, HMEC-1 after 48 hours without stimulation, HRGEC after 6 hours without stimulation and with 100 ng/mL of PR (**Figure 6 (c, d, e and f)**). This same HLA-G detection assay was evaluated concerning the LILRB2 surface expression, and endothelial cells presented a homogenous expression of this marker (SFI > 1.3, **Figure 6 (g and h)**).

The qPCR (specific for HLA-G1 and HLA-G2 transcripts) performed for the HRGEC after 24 hours with progesterone present HLA-G expression. The detected fold changes were in accordance with progesterone concentration increase: 4.52 (0 ng/mL), 5.24 (100 ng/mL) and 35.85 (10 000 ng/mL) (**Figure 7**). The other strategy performed to detect HLA-G transcripts presented Cts exceeding 31 cycles and therefore had no detectable amounts of mRNA.

Discussion

Immune tolerant phenotypes have been investigated in different cells types, such as T and B regulatory cells, mesenchymal stem cells, tolerant dendritic cells (DCs) and macrophages [28–30]. All of them were suggested as having an important role in achieving allograft

tolerance, as well as being new targets for immunosuppressive therapy and tolerance induction protocols [31,32].

The phenotypic alterations of tolerogenic DCs are modulated by the LILRB2 receptor interaction with HLA-G [33,34]. Other approaches to find out the tolerogenic potential were also used based on regulatory factors (e. g. IL-10, LIF, progesterone), but HLA-G, with its inhibitory receptors on DC, T and NK cells, is one of the best candidates [26,35,36].

Our investigation considered other approaches. As well as the study by Fons *et al.* [14], which revealed that sHLA-G interaction with CD160 promotes cell lysis of HUVEC and human HMVEC. However, the analyzed ECs in the presence of exogenous sHLA-G had no antiangiogenic effect. A consistent growth and stimulation among the cellular types evaluated was shown.

The ability of the HLA-G molecule to promote phenotypic changes, such as affecting the peptide presentation by MHC class II molecules or even induce an upregulation of LILRB2 expression has been studied [37,38]. However, in our analysis, the IFN γ activated ECs had a normal surface HLA-DR expression even in the presence of exogenous sHLA-G. Moreover, the immunomodulation of HLA-G was associated to its concentration and conformation [38]. But the ECs had no phenotypic alteration of HLA-DR surface expression with lower or higher concentrations of exogenous HLA-G5 in culture.

Concerning the inhibitory receptors (ILT3 and ILT4 (LILRB2)), they were described in ECs from heart allografts and it was associated to the capacity to downregulate alloreactivity inducing tolerogenic responses [39]. The performed analysis with both ECs lineages in presence or not of exogenous HLA-G and IFN γ presented a small subpopulation of LILRB2⁺ cells, which was independent of the presence of HLA-G. The HRGECs, which are phenotypically more similar to cells *in vivo*, had the highest surface expression of this inhibitory receptor. Also LILRB1, that is an important inhibitory receptor found in T, B and NK cell, was analyzed through flow cytometry, but it was not expressed by HMEC-1.

Concerning HLA-G expression, the M8-HLA-G1 and M8-HLA-G5 as controls of mHLA-G and iHLA-G detection, presented many variations. It was shown that a high confluence provide a stress cell culture condition (old medium and high confluence) and may stimulate the soluble isoform production, but downregulate mHLA-G expression through contact cell inhibition. This response could be an explanation for the tumor cells high sHLA-

G expression mechanism used to avoid immunological response [40–42].

The endothelial cells analyzed through flow cytometry for mHLA-G and iHLA-G reached high confluence, and no mHLA-G was detected. But intracellular HLA-G production was observed in “six hours condition” in the presence of fresh medium.

Transcript analyses of HLA-G were not helpful to clarify time related and cell confluence iHLA-G expression. No HLA-G transcripts were detected for HMEC-I assays. Considering the HRGEC, mRNA from HLA-G1 and HLA-G2 isoforms were detected only after 24 hours of stimulation with progesterone. Also HLA-G expression presented an increase progesterone-dependent concentration, collaborating with the findings in human coronary EC by Sheshgiri *et al.* [27]. However, the microenvironment seems to be more influential than the progesterone stimulation pathway.

Conclusion

As a pilot study, we found aspects of HMEC-1 and HRGEC lineages, concerning their immune tolerant phenotype as a subpopulation of LILRB2⁺ cells. Also, ECs normally grew in the presence of exogenous HLA-G and no cell lysis mediated by CD160 was observed, though the presence of this receptor still needs to be confirmed.

Furthermore, LILRB2 was the inhibitory receptor detected in HMEC-1 and HRGEC. The upregulation of this marker [38] or downregulation of HLA-DR mediated by the presence of sHLA-G was not found [37]. Thus, the soluble HLA-G was not able to suppress the production of HLA-DR in activated ECs.

The presence of functional *HLA-G* genotypes was shown for both lineages, but we failed to detect surface HLA-G expression. The intracellular HLA-G was detected with high cell confluence and fresh medium. Thus, cell confluence and the quality of the medium may be determinant for the evaluation of HLA-G cell expression.

References

1. Shaikly VR, Morrison IEG, Taranissi M, Noble C V, Withey AD, Cherry RJ, et al. Analysis of HLA-G in maternal plasma, follicular fluid, and preimplantation embryos reveal an asymmetric pattern of expression. *J Immunol.* 2008;180: 4330–7. doi:180/6/4330 [pii]
2. Yao G-D, Shu Y-M, Shi S-L, Peng Z-F, Song W-Y, Jin H-X, et al. Expression and potential roles of HLA-G in human spermatogenesis and early embryonic development. *PLoS One.* 2014;9: e92889. doi:10.1371/journal.pone.0092889
3. Wiendl H. HLA-G in the Nervous System. *Hum Immunol.* 2007;68: 286–293. doi:10.1016/j.humimm.2006.10.021
4. Zhang W-Q, Xu D-P, Liu D, Li Y-Y, Ruan Y-Y, Lin A, et al. HLA-G1 and HLA-G5 isoforms have an additive effect on NK cytotoxicity. *Hum Immunol. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics;* 2014;75: 182–9. doi:10.1016/j.humimm.2013.11.001
5. Morandi F, Rizzo R, Fainardi E, Rouas-Freiss N, Pistoia V. Recent Advances in Our Understanding of HLA-G Biology: Lessons from a Wide Spectrum of Human Diseases. *J Immunol Res.* 2016;2016: 4326495. doi:10.1155/2016/4326495
6. Lefebvre S, Berrih-Aknin S, Adrian F, Moreau P, Poeta S, Gourand L, et al. A specific interferon (IFN)-stimulated response element of the distal HLA-G promoter binds IFN-regulatory factor 1 and mediates enhancement of this nonclassical class I gene by IFN-beta. *J Biol Chem.* 2001;276: 6133–9. doi:10.1074/jbc.M008496200
7. Yie S, Xiao R, Librach CL. Progesterone regulates HLA-G gene expression through a novel progesterone response element. *Hum Reprod.* 2006;21: 2538–44. doi:10.1093/humrep/del126
8. Yie SM, Li LH, Li GM, Xiao R, Librach CL. Progesterone enhances HLA-G gene expression in JEG-3 choriocarcinoma cells and human cytotrophoblasts in vitro. *Hum Reprod.* 2006;21: 46–51. doi:10.1093/humrep/dei305
9. Moreau P, Flajollet S, Carosella ED. Non-classical transcriptional regulation of HLA-G: an update. *J Cell Mol Med.* 2009;13: 2973–89. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00800.x
10. Créput C, Durrbach A, Menier C, Guettier C, Samuel D, Dausset J, et al. Human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression in biliary epithelial cells is associated with allograft acceptance in liver-kidney transplantation. *J Hepatol.* 2003;39: 587–94. doi:10.1016/S0168-8278(03)00354-4
11. Zeevi A, Lunz JG, Shapiro R, Randhawa P, Mazariegos G, Webber S, et al. Emerging role of donor-specific anti-human leukocyte antigen antibody determination for clinical management after solid organ transplantation. *Hum Immunol. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics;* 2009;70: 645–50.

doi:10.1016/j.humimm.2009.06.009

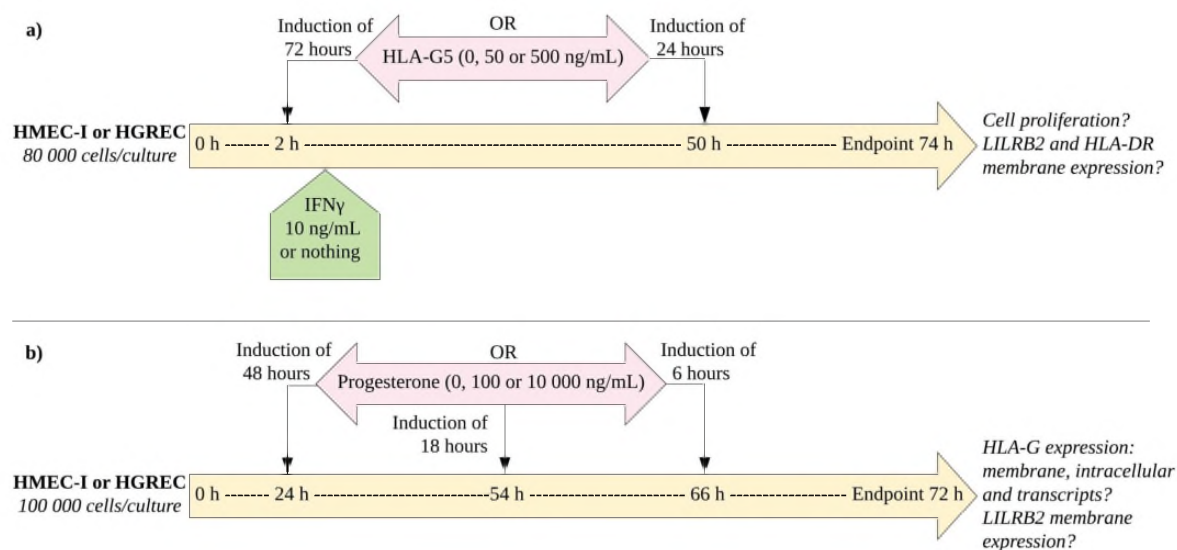
12. Brugière O, Thabut G, Pretolani M, Krawice-Radanne I, Dill C, Herbreteau A, et al. Immunohistochemical study of HLA-G expression in lung transplant recipients. *Am J Transplant*. 2009;9: 1427–38. doi:10.1111/j.1600-6143.2009.02650.x
13. LeMaoult J, Zafaranloo K, Le Danff C, Carosella ED. HLA-G up-regulates ILT2, ILT3, ILT4, and KIR2DL4 in antigen presenting cells, NK cells, and T cells. *FASEB J*. 2005;19: 662–4. doi:10.1096/fj.04-1617fje
14. Fons P, Chabot S, Cartwright JE, Lenfant F, L'Faqihi F, Giustiniani J, et al. Soluble HLA-G1 inhibits angiogenesis through an apoptotic pathway and by direct binding to CD160 receptor expressed by endothelial cells. *Blood*. 2006;108: 2608–15. doi:10.1182/blood-2005-12-019919
15. Danese S, Dejana E, Fiocchi C. Immune regulation by microvascular endothelial cells: directing innate and adaptive immunity, coagulation, and inflammation. *J Immunol*. 2007;178: 6017–22. doi:10.4049/jimmunol.178.10.6017
16. Pruckler JM, Lawley TJ, Ades EW. Use of a human microvascular endothelial cell line as a model system to evaluate cholesterol uptake. *Pathobiology*. 1993;61: 283–7. doi:10.1159/000163806
17. Matsui Y, Sunatani Y, Hayashi N, Okino K, Okushi Y, Mukai K, et al. DNA double-strand breaks induced intractable glomerular fibrosis in renal allografts. *Clin Exp Nephrol*. Springer Japan; 2016;20: 479–88. doi:10.1007/s10157-015-1174-3
18. Xu et al. 1994. HDMEC - XU et al., 1994.pdf.
19. Lahiri DK, Nurnberger JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*. 1991;19: 5444. doi:10.1093/nar/19.19.5444
20. Robinson J, Halliwell JA, Hayhurst JD, Flicek P, Parham P, Marsh SGE. The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases. *Nucleic Acids Res*. 2015;43: D423-31. doi:10.1093/nar/gku1161
21. Nardi F da S, Slowik R, Wowk PF, da Silva JS, Gelmini GF, Michelon TF, et al. Analysis of HLA-G polymorphisms in couples with implantation failure. *Am J Reprod Immunol*. 2012;68: 507–14. doi:10.1111/aji.12001
22. Rebmann V, Switala M, Eue I, Schwahn E, Merzenich M, Grosse-Wilde H. Rapid evaluation of soluble HLA-G levels in supernatants of in vitro fertilized embryos. *Hum Immunol*. 2007;68: 251–8. doi:10.1016/j.humimm.2006.11.003
23. Hiby SE, King A, Sharkey A, Loke YW. Molecular studies of trophoblast HLA-G: polymorphism, isoforms, imprinting and expression in preimplantation embryo. *Tissue Antigens*. 1999;53: 1–13. doi:10.1034/j.1399-0039.1999.530101.x
24. Moreau P, Mouillot G, Rousseau P, Marcou C, Dausset J, Carosella ED. HLA-G gene repression is reversed by demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100: 1191–6. doi:10.1073/pnas.0337539100

25. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25: 402–8. doi:10.1006/meth.2001.1262
26. Peltzer J, Montespan F, Thepenier C, Boutin L, Uzan G, Rouas-Freiss N, et al. Heterogeneous functions of perinatal mesenchymal stromal cells require a preselection before their banking for clinical use. *Stem Cells Dev*. 2015;24: 329–44. doi:10.1089/scd.2014.0327
27. Sheshgiri R, Rao V, Tumiaty LC, Xiao R, Prodger JL, Badiwala M, et al. Progesterone induces human leukocyte antigen-g expression in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Circulation*. 2008;118: S58–64. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.757781
28. Gregori S, Tomasoni D, Pacciani V, Scirpoli M, Battaglia M, Magnani CF, et al. Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood*. 2010;116: 935–44. doi:10.1182/blood-2009-07-234872
29. Antonio M, Gonzalez B, Ramirez Barba EJ, Guani E. Tolerance in Renal Transplantation. *Current Issues and Future Direction in Kidney Transplantation*. InTech; 2013. pp. 463–479. doi:10.5772/54734
30. Hutchinson JA, Riquelme P, Sawitzki B, Tomiuk S, Miqueu P, Zuhayra M, et al. Cutting Edge: Immunological consequences and trafficking of human regulatory macrophages administered to renal transplant recipients. *J Immunol*. 2011;187: 2072–8. doi:10.4049/jimmunol.1100762
31. Ashton-Chess J, Brouard S, Souillou J-P. Is clinical tolerance realistic in the next decade? *Transpl Int*. 2006;19: 539–48. doi:10.1111/j.1432-2277.2006.00339.x
32. Sharma A, Rudra D. Emerging Functions of Regulatory T Cells in Tissue Homeostasis. *Front Immunol*. 2018;9: 883. doi:10.3389/fimmu.2018.00883
33. Chang CC, Ciubotariu R, Manavalan JS, Yuan J, Colovai AI, Piazza F, et al. Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat Immunol*. 2002;3: 237–43. doi:10.1038/ni760
34. Liang S, Horuzsko A. Mobilizing dendritic cells for tolerance by engagement of immune inhibitory receptors for HLA-G. *Hum Immunol*. 2003;64: 1025–32. doi:10.1016/j.humimm.2003.08.348
35. Collison LW, Chaturvedi V, Henderson AL, Giacomini PR, Guy C, Bankoti J, et al. IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat Immunol*. Nature Publishing Group; 2010;11: 1093–101. doi:10.1038/ni.1952
36. Carosella ED, Gregori S, LeMaoult J. The tolerogenic interplay(s) among HLA-G, myeloid APCs, and regulatory cells. *Blood*. 2011;118: 6499–505. doi:10.1182/blood-2011-07-370742
37. Ristich V, Liang S, Zhang W, Wu J, Horuzsko A. Tolerization of dendritic cells by HLA-G. *Eur J Immunol*. 2005;35: 1133–42. doi:10.1002/eji.200425741

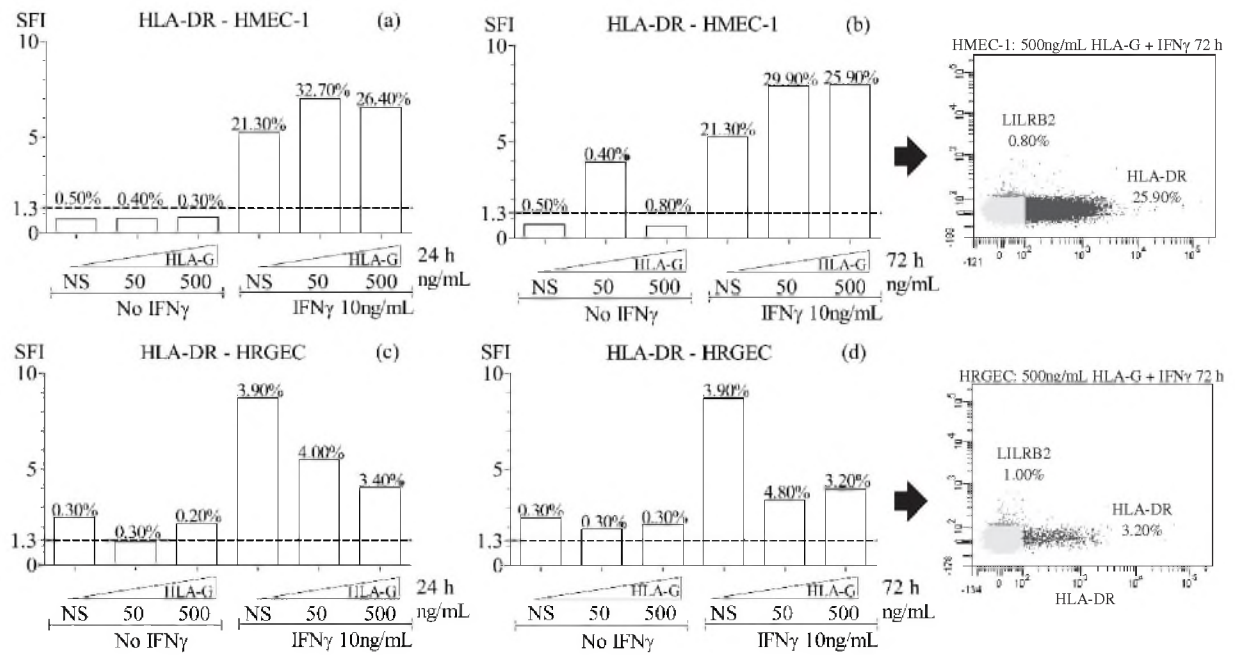
38. Liang S, Ristich V, Arase H, Dausset J, Carosella ED, Horuzsko A. Modulation of dendritic cell differentiation by HLA-G and ILT4 requires the IL-6--STAT3 signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105: 8357–62. doi:10.1073/pnas.0803341105
39. Manavalan JS, Kim-Schulze S, Scotto L, Naiyer AJ, Vlad G, Colombo PC, et al. Alloantigen specific CD8+ CD28- FOXP3+ T suppressor cells induce ILT3+ ILT4+ tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity. *Int Immunol*. 2004;16: 1055–1068. doi:10.1093/intimm/dxh107
40. Rebmann V, König L, Nardi F da S, Wagner B, Manvailer LFS, Horn PA. The Potential of HLA-G-Bearing Extracellular Vesicles as a Future Element in HLA-G Immune Biology. *Front Immunol*. 2016;7: 173. doi:10.3389/fimmu.2016.00173
41. König L, Kasimir-Bauer S, Hoffmann O, Bittner A-K, Wagner B, Manvailer LFS, et al. The prognostic impact of soluble and vesicular HLA-G and its relationship to circulating tumor cells in neoadjuvant treated breast cancer patients. *Hum Immunol*. 2016;77: 791–9. doi:10.1016/j.humimm.2016.01.002
42. Bian X, Si Y, Zhang M, Wei R, Yang X, Ren H, et al. Down-expression of miR-152 lead to impaired anti-tumor effect of NK via upregulation of HLA-G. *Tumor Biol*. 2016;37: 3749–3756. doi:10.1007/s13277-015-3669-7

Figures and Tables

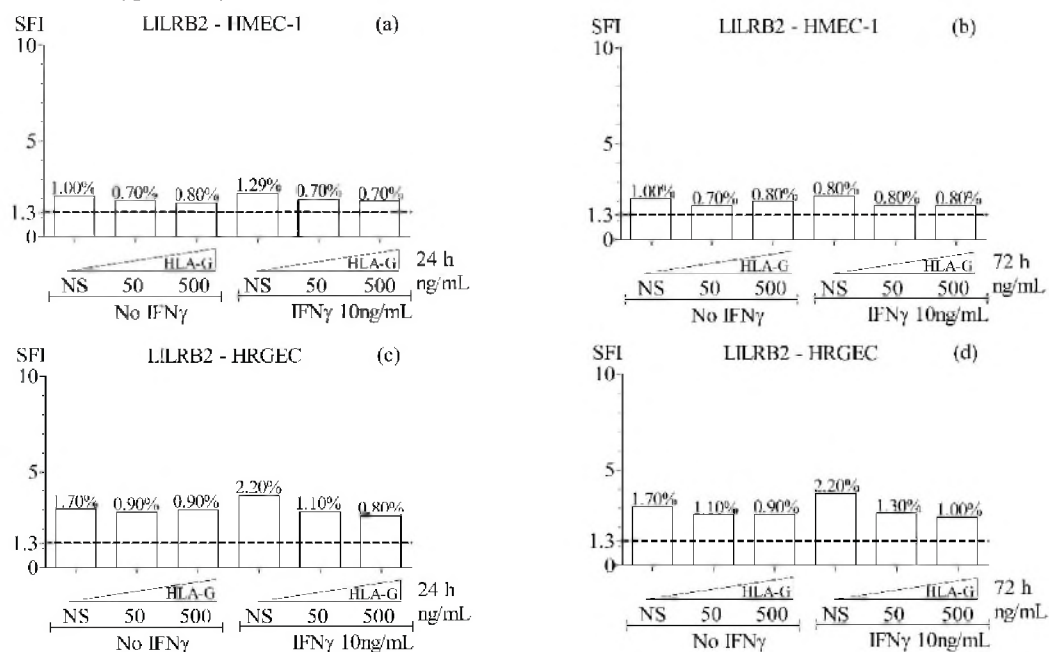
Figure 1 – Main assays performed for HMEC-I and HGREC lineages.



First the evaluation of ECs proliferation in the presence of HLA-G5 was performed. The LILRB2 and HLA-DR membrane expression after IFN γ stimulation were also analyzed **(a)**. Therefore, HLA-G and LILRB2 expression were evaluated after progesterone induction **(b)**.

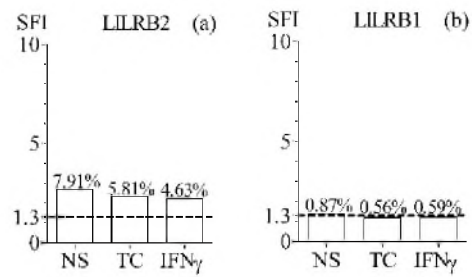
Figure 2 – Phenotypic analysis of HLA-DR in HMEC-1 and HRGEC.

HMEC-1 after 24 hours (a) and 72 hours (b) with HLA-G5 in culture, and also for HRGEC after 24 hours (c) and 72 hours (d). SFI > 1.3 was considered as a positive detection of the marker. NS: non-stimulated cells. One set of conditions assayed.

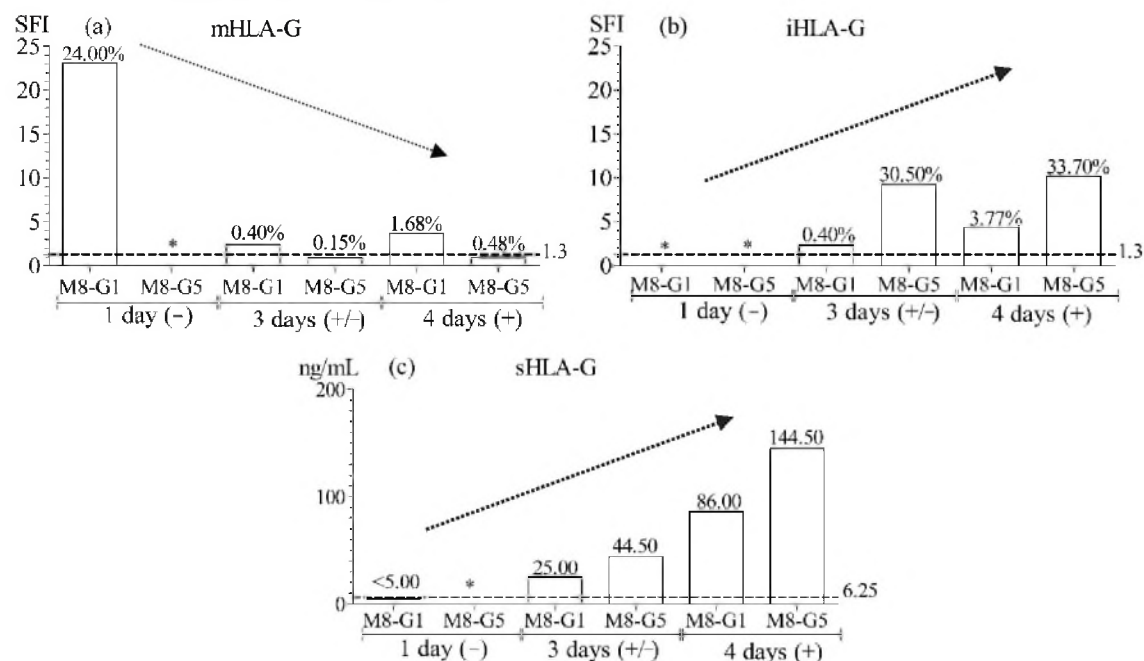
Figure 3 –Phenotypic analysis of LILRB2 in HMEC-1 and HRGEC.

HMEC-1 after 24 hours (a) and 72 hours (b) with sHLA-G5 in culture, and also for HRGEC after 24 hours (c) and 72 hours (d). SFI > 1.3 was considered as a positive detection of the marker. NS: non-stimulated cells. One set of conditions assayed.

Figure 4 –Phenotypic analysis of inhibitory receptors of HLA-G in HMEC-1 with or without stimulation for 72 hours of cell culture

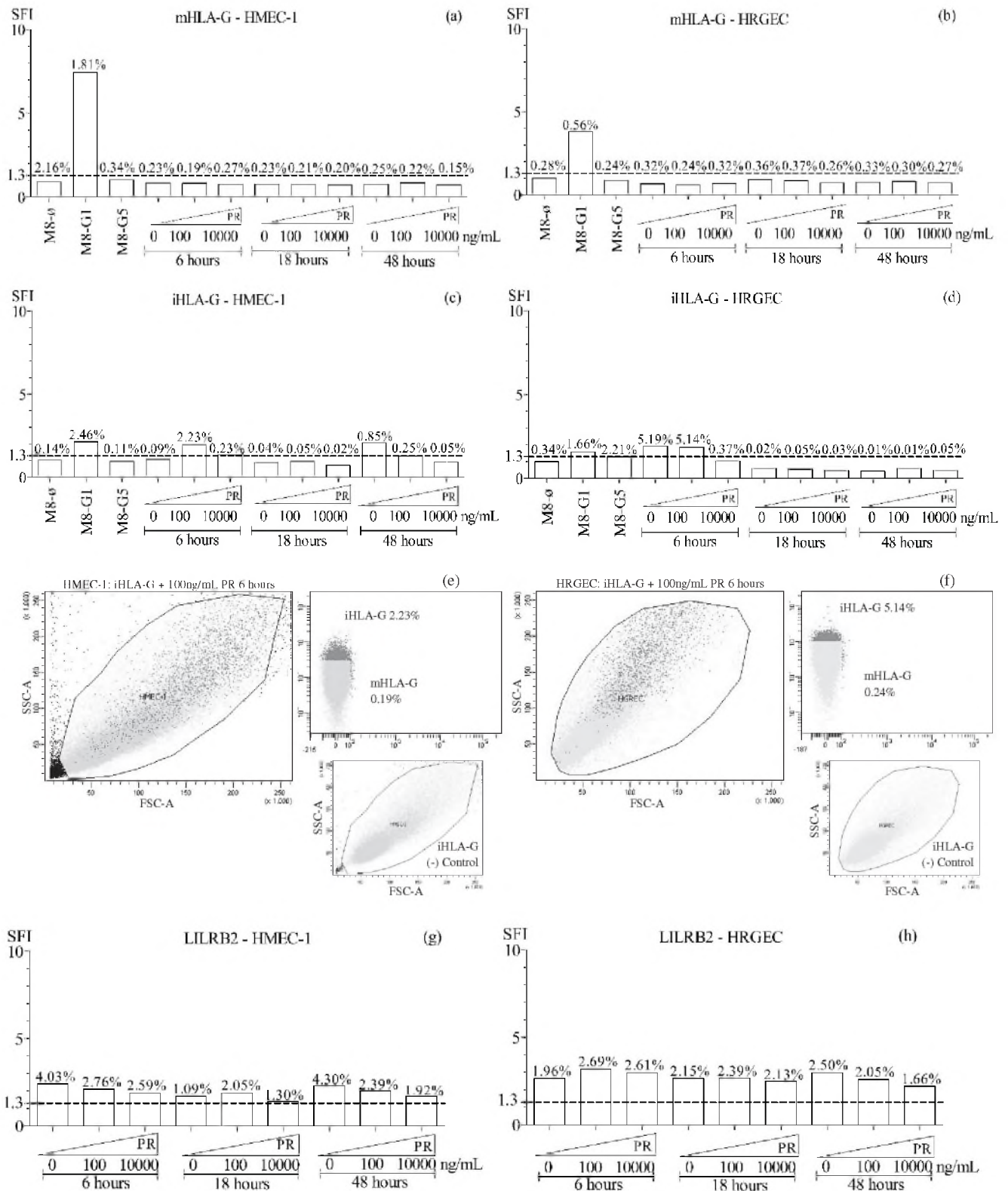


LILRB2 **(a)** and LILRB1 **(b)** detection in non-stimulated (NS) cells, with tolerance cocktail (TC) and IFN γ (10 ng/mL) stimulation. SFI > 1.3 was considered as a positive detection of the marker. One set of conditions assayed.

Figure 5 - Phenotypic analysis of HLA-G expression in melanoma cells.

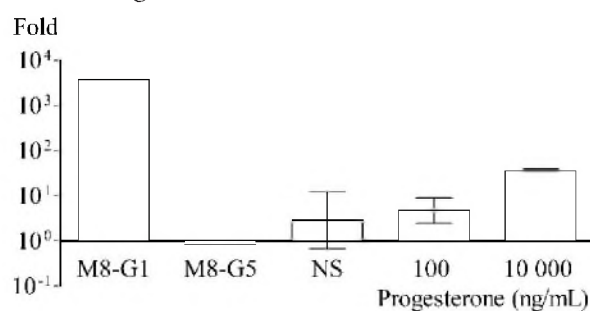
The mHLA-G detection (a), the iHLA-G detection (b) and the sHLA-G detection (c). SFI > 1.3 was considered as a positive detection of the marker. The confluence of the cell cultures were characterized as (-) low, (+/-) medium and (+) high. *Condition not evaluated for the cell lineage. M8-G1: M8-HLA-G1. M8-G5: M8-HLA-G5. mHLA: Membrane HLA-G. iHLA-G: intracellular HLA-G. sHLA-G: soluble HLA-G. One set of conditions assayed.

Figure 6 – Phenotypic analysis of HLA-G expression in endothelial cells after 6, 18 and 48 hours of progesterone (PR) stimulation (0, 100 and 10000 ng/mL).



HMEC-1 expression of mHLA-G (a), iHLA-G (c) and LILRB2 (g). HRGEC expression of mHLA-G (b), iHLA-G (d) and LILRB2 (h). Expression in HMEC-1 (e) and HRGEC (f) with PR for 6 hours. SFI > 1.3 was considered as a positive detection of the marker. PR: Progesterone. mHLA: Membrane HLA-G. iHLA-G: intracellular HLA-G. M8-ø: M8-pcDNA. M8-G1: M8-HLA-G1. M8-G5: M8-HLA-G5. One set of conditions assayed.

Figure 7 – Results of RT-PCR analysis showing relative quantities of HLA-G1 and -G2 transcripts in HRGEC, M8-HLA-G1 and M8-HLA-G5 lineages.



HRGEC after 24 hours with 100 and 10000 ng/mL of progesterone. Error bars represent standard deviation from two assays. Fold change values were converted to Log10 ratio, so the reference (M8pcDNA, fold = 1) assumed a fold of zero. M8-G1: M8-HLA-G1. M8-G5: M8-HLA-G5. NS: Non-stimulated HRGEC. Two sets of conditions assayed.

4 DISCUSSÃO GERAL

Os genes *HLA-G* e *MICA*, são conhecidos por apresentar uma regulação restrita e estarem funcionalmente envolvidos com mecanismos de resposta imune de tolerância ou rejeição, como nos transplantes. O *HLA-G* é expresso tanto ligado a membrana celular, como na forma solúvel, promove a inibição da resposta imune e tolerância. Enquanto *MICA*, apesar de também solúvel ou expresso ligado a membrana celular, apresenta papéis diferenciados dependendo da forma como é produzido. Na forma solúvel pode atuar promovendo mecanismos de escape, inibindo a resposta imune, como observado na tumorigênese (CHOY; PHIPPS, 2010). Mas quando é expresso ligado a membrana celular, é capaz de estimular fortemente o receptor NKG2D e ativar células NK (RISTI; BICALHO, 2017).

A funcionalidade de ambas as moléculas pode ser afetada por conta de variações genéticas. Para o *HLA-G*, diferentes alelos em composição com variações na região 3'-UTR tem sido associados a sua menor ou maior produção (MISRA et al., 2014; RAJASEKARAN et al., 2016). Já *MICA* apresenta duas variações em região codificadora (*MICA-129 Val/Met* e *MICA A5.1/Wt*) que se destacam por estarem relacionadas a diferentes níveis de expressão de *MICA*, e também a maior ou menor afinidade com o seu principal receptor, o NKG2D (TONNERRE et al., 2016; BARANWAL; MEHRA, 2017). Este, por sua vez, também pode ser caracterizado com base na discriminação genética de haploblocos em receptores que apresentam maior (*HNK1*) ou menor (*LNK1*) potencial citotóxico, mediante interação com *MICA* (HAYASHI et al., 2006).

Neste trabalho, a caracterização de variações do gene *MICA* em amostra de população do Sul do Brasil possibilitou a identificação de três haplótipos e a ausência de uma composição, representada por *MICA-129 Met* com *MICA A5.1*. Com relação aos haplótipos do gene *HLA-G*, foram identificados 4 novos UTRs nomeados UTR-47^{NC}, UTR-48^{NC}, UTR-50^{NC} and UTR-52^{NC}. Ainda, a avaliação de *MICA* e *HLA-G* demonstrou que estes se encontram em desequilíbrio de ligação, mas em baixa correlação, fato que poderia existir devido à distância intergênica, aliada à associação funcional entre as moléculas (MENIER et al., 2002).

A análise de caso-controle, evidenciou exclusivamente a associação genética do SNP +3010 (rs1710) com o risco de rejeição nos transplantes. A relação desta variante com o SNP +3142 (rs1063320) e a variação *Ins/Del* 14bp (rs371194629), ambos associados funcionalmente a alteração na expressão de *HLA-G*, sugerem +3010 como um potencial marcador molecular a

ser explorado. Na análise primária (FET) conduzida para pacientes com doença renal crônica, a presença de *HLA-G*01:01/UTR-4* foi identificado como um fator de proteção. Isoladamente o UTR-4 estaria associado com a maior estabilidade dos transcritos de *HLA-G*. Porém em nossa análise confirmatória, conduzida via regressão logística, incluindo todos os fatores genéticos avaliados, este fator não se destacou mais como um fator de proteção.

O estudo de genótipos relacionados à produção de sMICA e sHLA-G não possibilitou a determinação de alelos ou haplótipos associados a maior ou menor produção destas moléculas. No entanto, ambas podem ter o aumento ou a diminuição de sua expressão relacionada também às isoformas expressas ligadas a membrana ou no meio intracelular, os quais não foram avaliados. Com relação à variação na produção de MICA e HLA-G nos contextos patológicos, foi evidenciado que a doença renal crônica está associada a maior produção destas moléculas em comparação a indivíduos controles, sem DRC. Enquanto, no pré-transplante as quantificações de sMICA se mostraram superiores em pacientes que não desenvolveram episódios de rejeição. Este fato é um indício de que a expressão de MICA solúvel uma vez estimulada, no contexto patológico, pode vir a exercer influência na imunorregulação, em conjunto com a imunossupressão, favorecendo o estabelecimento do enxerto renal.

Aliado a caracterização de genes relacionados a resposta imune, a análise de fatores de risco que auxiliem na discriminação de pacientes com maior susceptibilidade ao desenvolvimento de rejeições imunológicas foi o nosso foco. Em especial, a descrição de pacientes e potenciais doadores no pré-transplante é importante por auxiliar na logística e melhor aproveitamento dos órgãos transplantados pelos seus receptores. O Brasil, mesmo sendo referência na realização de transplantes e tendo um sistema unificado, apresenta diversidades regionais, que se refletem numa população de receptores e doadores extremamente heterogênea.

Este trabalho acompanhou, por quatro anos, pacientes transplantados renais pertencentes a centro transplantador do Sul do Brasil (Curitiba, Paraná) e analisou mais de vinte variáveis pré-transplante de doadores e receptores. Estas foram relacionadas com o desenvolvimento ou não de episódios de rejeição imunológica. Foram identificados aspectos importantes que podem auxiliar nos próximos estudos e no aprimoramento da seleção e pareamento de pacientes com potenciais doadores. Os principais fatores de risco incluídos na modelagem com capacidade de prever até 70.7% dos pacientes que desenvolveram episódios

de rejeição foram: o sexo dos receptores, as incompatibilidades *HLA-B* e o tempo de diálise pré-transplante.

Dentre as incompatibilidades, as diferenças entre *HLA-DRB1* têm maior efeito antigênico nos primeiros seis meses após o transplante, mas também as consequências de incompatibilidades *HLA-B* são maiores por volta dos dois anos após o transplante (GARCIA et al., 2015). Portanto, também é importante a compatibilidade *HLA-B*, por exercer grande influência no sucesso dos transplantes renais, estando a frente de outros fatores não genéticos e quando não existem incompatibilidades *HLA-DRB1*.

O sexo masculino também se revelou como influente no desfecho dos pacientes transplantados que culminam em rejeição. Fatores histórico-sociais capazes de afetar o estilo de vida e aspectos biológicos contribuem para a compreensão deste resultado. A avaliação criteriosa deste fator o relaciona principalmente a recorrência de doenças secundárias que acometem o paciente no pós-transplante e permanecem por falta de cuidados-próprios culturalmente associada ao sexo em nosso país (SEPARAVICH; CANESQUI, 2013).

O tempo em diálise pré-transplante também foi identificado como fator de risco, logo pacientes transplantados que tenham ficado por maior tempo em terapia substitutiva pré-transplante tem maior chance de rejeitar o aloenxerto. Com isso, é importante avaliar o real ganho destes pacientes em termos de qualidade de vida antes mesmo de realizarem a cirurgia. É interessante ressaltar que o modelo norte-americano de transplante renal (KAS, *Kidney Allocation System*) foi base para a construção do sistema brasileiro, juntamente com o espanhol (GARCIA et al., 2015). Porém, atualmente o americano considera na seleção de receptores, entre outras informações relevantes para a sua população específica, o ganho em tempo de vida que cada paciente teria com o transplante, antes da realização da cirurgia.

Por fim, foi investigado, em estudo piloto, a existência de fenótipo de tolerância mediado por HLA-G no modelo de células endoteliais (CEs), HMEC-1 e HRGEC. Os ensaios realizados com estes modelos nunca anteriormente explorados com relação ao potencial de tolerogênico, evidenciaram que na presença de sHLA-G exógeno ambas as linhagens se proliferam, não havendo efeito anti-angiogênico já descrito para outra linhagem de CE (FONS et al., 2006). Ainda uma pequena subpopulação destas células apresentaram a expressão em membrana do receptor de HLA-G, o LILRB2, o qual é característico de células que apresentam perfil tolerogênico (MANAVALAN et al., 2003). Contudo, mesmo existindo esta

subpopulação, era inferido que na presença de HLA-G teríamos um aumento da sua expressão em membrana, o que não foi evidenciado. Ainda a presença de HLA-G poderia influenciar a ativação de CEs via supressão da produção de HLA-DR, o que nos ensaios realizados via estimulação com IFN γ , também não foi observado.

A avaliação da expressão de HLA-G de membrana (mHLA-G) e intracelular (iHLA-G) revelou-se heterogênea, mesmo nas células de melanoma transfectadas utilizadas como controle positivo (M8-HLA-G1 e M8-HLA-G5). Fato que exigiu uma análise preliminar criteriosa com relação aos possíveis fatores que estariam interferindo nesta expressão.

Logo, o mHLA-G apenas foi significativamente detectado expresso na linhagem controle M8-HLA-G1 quando esta célula foi analisada via citometria a partir de culturas em baixa confluência celular. Enquanto a produção de iHLA-G foi associado a um maior tempo de cultura celular, sendo observada em HMEC-1 e HRGEC em condições que incluíam a troca de meio nas últimas seis horas pré-análise.

A análise de transcritos de HLA-G tiveram sucesso apenas em ensaio específico realizado com a linhagem HRGEC. Neste experimento a expressão de HLA-G foi positivamente correlacionada com o aumento das concentrações utilizadas de progesterona após apenas um dia de cultura e estimulação. Portanto, a confluência celular e a qualidade do meio são determinantes para a expressão de HLA-G, sendo mais influentes que a via de estimulação com progesterona. Portanto, todos estes achados podem servir de base para novas buscas que visem explorar a funcionalidade, tanto de HLA-G, como de sMICA, na busca pela tolerância natural.

5 CONCLUSÕES GERAIS

No presente estudo as seguintes conclusões merecem ser reportadas:

- A caracterização genética de amostra da população do Sul do Brasil possibilitou a identificação de quatro novos haplótipos (UTR-47^{NC}, UTR-48^{NC}, UTR-50^{NC} e UTR-52^{NC}) para região 3'-UTR do gene *HLA-G*.
- Em estudo de caso-controle para identificação de alelos/genótipos *MICA*, *NKG2D* e *HLA-G* associados a rejeição, nos transplantes renais, evidenciou-se o SNP +3010 (rs7010) como fator de risco para a rejeição com o genótipo +3010 *GC*, e o +3010 *GG*, como fator de proteção.
- A variação +3010 C (rs7010) apresentou forte desequilíbrio de ligação e atração com o +3142 G (rs1063320) e com a variação *Ins* de 14pb (rs371194629). Estando este dois últimos associados a baixa expressão de *HLA-G* total e risco de rejeição nos transplantes renais, o que sugere como potencial marcador a ser explorado a variação +3010.
- A análise de associação entre alelos/haplótipos e a produção de sMICA e sHLA-G não foram conclusivas e requerem mais métodos avaliativos, além da detecção em plasma, para a caracterização da associação de alelos e fenótipos.
- A produção das moléculas imunorreguladoras, sHLA-G e sMICA, ocorre em situações de estresse contínuo, tal como em pacientes com doença renal crônica.
- Uma vez que tenha ocorrido a elevação na expressão de sMICA, no pré-transplante, esta com seu potencial efeito imunorregulador, foi associada ao menor risco de desenvolvimento de episódios de rejeição.
- Ainda, o sexo masculino, a incompatibilidade *HLA-B* e o tempo de diálise, foram identificados como sendo os principais fatores de risco pré-transplante associados com o desenvolvimento de episódios de rejeição.
- A tolerância mediada por *HLA-G* avaliada *in vitro* possibilitou a identificação de pequenas subpopulações de HMEC-1 e HRGEC capazes de expressar LILRB2, característico de células com perfil tolerogênico.
- O microambiente e a confluência celular exercem grande influência na expressão de mHLA-G, iHLA-G e sHLA-G, mesmo na presença de reconhecidos indutores, como a progesterona.

REFERÊNCIAS

- AAKHUS, S.; DAHL, K.; WIDERØE, T. E. Cardiovascular morbidity and risk factors in renal transplant patients. **Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 14, n. 3, p. 648–54, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10193814>%5Cn<http://ndt.oxfordjournals.org/content/14/3/648.full.pdf>>. .
- ABBAS, A. K. **Imunologia celular e molecular**. 7^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- ALEGRE, E.; RIZZO, R.; BORTOLOTTI, D.; et al. Some basic aspects of HLA-G biology. **Journal of immunology research**, v. 2014, p. 657625, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24818168>>. .
- ALMASOOD, A.; SHESHGIRI, R.; JOSEPH, J. M.; et al. Human leukocyte antigen-G is upregulated in heart failure patients: a potential novel biomarker. **Human immunology**, v. 72, n. 11, p. 1064–7, 2011. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2011.08.016>>. .
- ALVAREZ, M.; PIEDADE, J.; BALSEIRO, S.; RIBAS, G.; REGATEIRO, F. HLA-G 3'-UTR SNP and 14-bp deletion polymorphisms in Portuguese and Guinea-Bissau populations. **International journal of immunogenetics**, v. 36, n. 6, p. 361–6, 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1744-313X.2009.00875.x>>. .
- AMODIO, G.; CANTI, V.; MAGGIO, L.; et al. Association of genetic variants in the 3'UTR of HLA-G with Recurrent Pregnancy Loss. **Human immunology**, v. 77, n. 10, p. 886–891, 2016. The Authors. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2016.06.020>>. .
- ANTONIO, M.; GONZALEZ, B.; RAMIREZ BARBA, E. J.; GUANI, E. Tolerance in Renal Transplantation. **Current Issues and Future Direction in Kidney Transplantation**. p.463–479, 2013. InTech. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/current-issues-and-future-direction-in-kidney-transplantation/tolerance-in-renal-transplantation>>. .
- APPS, R.; GARDNER, L.; MOFFETT, A. A critical look at HLA-G. **Trends in immunology**, v. 29, n. 7, p. 313–21, 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471490608001324>>. .
- ASHTON-CHESS, J.; BROUARD, S.; SOULILLOU, J.-P. Is clinical tolerance realistic in the next decade? **Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation**, v. 19, n. 7, p. 539–48, 2006a. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1432-2277.2006.00339.x>>. .
- ASHTON-CHESS, J.; BROUARD, S.; SOULILLOU, J.-P. Is clinical tolerance realistic in the next decade? **Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation**, v. 19, n. 7, p. 539–48, 2006b. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature15393>>. .
- AUGUSTO, D. G.; PETZL-ERLER, M. L. KIR and HLA under pressure: evidences of coevolution across worldwide populations. **Human genetics**, v. 134, n. 9, p. 929–40, 2015. Springer Berlin Heidelberg. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00439-015->

1579-9>. .

AYALA GARCÍA, M. A.; GONZÁLEZ YEBRA, B.; LÓPEZ FLORES, A. L.; GUANÍ GUERRA, E. The major histocompatibility complex in transplantation. **Journal of transplantation**, v. 2012, p. 842141, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22778908>>. .

BAHRAM, S.; BRESNAHAN, M.; GERAGHTY, D. E.; SPIES, T. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 14, p. 6259–63, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8022771>>. .

BARANWAL, A. K.; MEHRA, N. K. Major Histocompatibility Complex Class I Chain-Related A (MICA) Molecules: Relevance in Solid Organ Transplantation. **Frontiers in immunology**, v. 8, n. FEB, p. 182, 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.00182/full>>. .

BARRETT, J. C.; FRY, B.; MALLER, J.; DALY, M. J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 21, n. 2, p. 263–5, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15297300>>. .

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281–97, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744438>>. .

BARTEL, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell**, v. 136, n. 2, p. 215–33, 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867409000087>>. .

BASTOS, M. G.; KIRSZTAJN, G. M. Chronic kidney disease: importance of early diagnosis, immediate referral and structured interdisciplinary approach to improve outcomes in patients not yet on dialysis. **Jornal brasileiro de nefrologia : 'orgao oficial de Sociedades Brasileira e Latino-Americana de Nefrologia**, v. 33, n. 1, p. 93–108, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21541469>>. .

BAUER, S.; GROH, V.; WU, J.; et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. **Science (New York, N.Y.)**, v. 285, n. 5428, p. 727–9, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.285.5428.727>>. .

BENACERRAF, B. Role of MHC gene products in immune regulation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 212, n. 4500, p. 1229–38, 1981. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6165083>>. .

BERMINGHAM, J.; JENKINS, D.; MCCARTHY, T.; O'BRIEN, M. Genetic analysis of insulin-like growth factor II and HLA-G in pre-eclampsia. **Biochemical Society transactions**, v. 28, n. 2, p. 215–9, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10816131>>. .

BHOWMIK, D. M.; DINDA, A. K.; MAHANTA, P.; AGARWAL, S. K. The evolution of the Banff classification schema for diagnosing renal allograft rejection and its implications for clinicians. **Indian journal of nephrology**, v. 20, n. 1, p. 2–8, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20535263>>. .

BIAN, X.; SI, Y.; ZHANG, M.; et al. Down-expression of miR-152 lead to impaired anti-tumor effect of NK via upregulation of HLA-G. **Tumor Biology**, v. 37, n. 3, p. 3749–3756, 2016.

BILLINGHAM, R. E.; BRENT, L.; MEDAWAR, P. B. “Actively acquired tolerance” of foreign cells. 1953. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 184, n. 1, p. 5–8, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20028658>>. .

BLASCHITZ, A.; LENFANT, F.; MALLET, V.; et al. Endothelial cells in chorionic fetal vessels of first trimester placenta express HLA-G. **European journal of immunology**, v. 27, n. 12, p. 3380–8, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9464826>>. .

BLUMBERG, R. S.; WAL, Y. VAN DE; CLAYPOOL, S.; et al. The multiple roles of major histocompatibility complex class-I-like molecules in mucosal immune function. **Acta odontologica Scandinavica**, v. 59, n. 3, p. 139–44, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11501882>>. .

BOREL, J. F.; KIS, Z. L. The discovery and development of cyclosporine (Sandimmune). **Transplantation proceedings**, v. 23, n. 2, p. 1867–74, 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2053181>>. .

BORELLI, S. D.; FERREIRA, E.; OLIVEIRA, A. M.; et al. Specific sHLA in healthy donors and donor-specific sHLA in renal transplant patients. **Human immunology**, v. 60, n. 5, p. 430–4, 1999. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0198885999000129>>. .

BOSMA, G. C.; CUSTER, R. P.; BOSMA, M. J. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. **Nature**, v. 301, n. 5900, p. 527–30, 1983. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6823332>>. .

BOUŠ, D.; HOSPERS, G. A. P.; MEIJER, C.; MOLEMA, G.; MULDER, N. H. Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. **Angiogenesis**, v. 4, n. 2, p. 91–102, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11806248>>. .

BOUKOUACI, W.; BUSSON, M.; PEFFAULT DE LATOUR, R.; et al. MICA-129 genotype, soluble MICA, and anti-MICA antibodies as biomarkers of chronic graft-versus-host disease. **Blood**, v. 114, n. 25, p. 5216–24, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19786616>>. .

BOUTEILLER, P. LE; SOLIER, C. Is antigen presentation the primary function of HLA-G? **Microbes and infection**, v. 3, n. 4, p. 323–32, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11334750>>. .

BOYSON, J. E.; ERSKINE, R.; WHITMAN, M. C.; et al. Disulfide bond-mediated dimerization of HLA-G on the cell surface. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 25, p. 16180–5, 2002. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.212643199>>. .

BRASIL, M. DA S.-S. DE A. À S.-. PORTARIA Nº 712 - Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Imunossupressão no Transplante Renal . , p. 41, 2014. Disponível em: <[file:///C:/Users/Vanessa/Google Drive/2018 - Escrita da tese/Base para tese/pcdt-transplante-renal-2012-republicado2014.pdf](file:///C:/Users/Vanessa/Google%20Drive/2018%20-%20Escrita%20da%20tese/Base%20para%20tese/pcdt-transplante-renal-2012-republicado2014.pdf)>. .

BRASIL, M. DA S. DO. PORTARIA Nº2.600 - Regulamento Técnico do Sistema Nacional de Transplantes. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2009/prt2600_21_10_2009.html>. .

BROEDERS, N.; RACAPÉ, J.; HAMADE, A.; et al. A new HLA allocation procedure of kidneys from deceased donors in the current era of immunosuppression. **Transplantation proceedings**, v. 47, n. 2, p. 267–74, 2015. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2014.12.018>>. .

BROWN, D.; TROWSDALE, J.; ALLEN, R. The LILR family: modulators of innate and adaptive immune pathways in health and disease. **Tissue antigens**, v. 64, n. 3, p. 215–25, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15304001>>. .

BRUGIÈRE, O.; THABUT, G.; PRETOLANI, M.; et al. Immunohistochemical study of HLA-G expression in lung transplant recipients. **American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons**, v. 9, n. 6, p. 1427–38, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19656137>>. .

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

BUKUR, J.; JASINSKI, S.; SELIGER, B. The role of classical and non-classical HLA class I antigens in human tumors. **Seminars in cancer biology**, v. 22, n. 4, p. 350–8, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2012.03.003>>. .

CANCRO, M. P.; KEARNEY, J. F. B cell positive selection: road map to the primary repertoire? **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 173, n. 1, p. 15–9, 2004. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.173.1.15>>. .

CAROSELLA, E. D.; GREGORI, S.; LEMAOULT, J. The tolerogenic interplay(s) among HLA-G, myeloid APCs, and regulatory cells. **Blood**, v. 118, n. 25, p. 6499–505, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21960588>>. .

CAROSELLA, E. D.; MOREAU, P.; LEMAOULT, J.; ROUAS-FREISS, N. HLA-G: from biology to clinical benefits. **Trends in immunology**, v. 29, n. 3, p. 125–32, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18249584>>. .

CAROSELLA, E. D.; ROUAS-FREISS, N.; ROUX, D. T.; MOREAU, P.; LEMAOULT, J. **HLA-G : An Immune Checkpoint Molecule**. 1st ed. Elsevier Inc., 2015.

CARTHEW, R. W.; SONTHEIMER, E. J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 642–55, 2009. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.035>>. .

CASTELLI, E. C.; GERASIMOU, P.; PAZ, M. A.; et al. HLA-G variability and haplotypes detected by massively parallel sequencing procedures in the geographically distinct population samples of Brazil and Cyprus. **Molecular immunology**, v. 83, p. 115–126, 2017. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2017.01.020>>. .

CASTELLI, E. C.; MENDES-JUNIOR, C. T.; DEGHAIDE, N. H. S.; et al. The genetic structure of 3'untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes. **Genes**

and immunity, v. 11, n. 2, p. 134–41, 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/gene.2009.74>>. .

CASTELLI, E. C.; RAMALHO, J.; PORTO, I. O. P.; et al. Insights into HLA-G Genetics Provided by Worldwide Haplotype Diversity. **Frontiers in immunology**, v. 5, n. OCT, p. 476, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25339953>>. .

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. 734068, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24741620>>. .

CASTIGLIA, Y. M. M. Disfunção Renal Após Transplante. In: SBA (Ed.); **Medicina Perioperatória**. p.583–587, 2005. Rio de Janeiro. Disponível em: <[http://www.saj.med.br/uploaded/File/artigos/Disfuncao renal apos transplante.pdf](http://www.saj.med.br/uploaded/File/artigos/Disfuncao%20renal%20apos%20transplante.pdf)>. .

CASTRO, C. D.; LUOMA, A. M.; ADAMS, E. J. Coevolution of T-cell receptors with MHC and non-MHC ligands. **Immunological reviews**, v. 267, n. 1, p. 30–55, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26284470>>. .

CECKA, J. M. HLA matching for organ transplantation...why not? **International journal of immunogenetics**, v. 37, n. 5, p. 323–7, 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1744-313X.2010.00957.x>>. .

CELLA, M.; DÖHRING, C.; SAMARIDIS, J.; et al. A novel inhibitory receptor (ILT3) expressed on monocytes, macrophages, and dendritic cells involved in antigen processing. **The Journal of experimental medicine**, v. 185, n. 10, p. 1743–51, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9151699>>. .

CELSI, F.; CATAMO, E.; KLEINER, G.; et al. HLA-G/C, miRNAs, and their role in HIV infection and replication. **BioMed research international**, v. 2013, n. 2, p. 693643, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2013/693643>>. .

CHANG, C. C.; CIUBOTARIU, R.; MANAVALAN, J. S.; et al. Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. **Nature immunology**, v. 3, n. 3, p. 237–43, 2002. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ni760>>. .

CHANG, C.; DIETRICH, J.; HARPUR, A. G.; et al. Cutting edge: KAP10, a novel transmembrane adapter protein genetically linked to DAP12 but with unique signaling properties. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 163, n. 9, p. 4651–4, 1999. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/163/9/4651.full>>. .

CHANG, C.; MURPHY, S. P.; FERRONE, S. Differential in vivo and in vitro HLA-G expression in melanoma cells: potential mechanisms. **Human immunology**, v. 64, n. 11, p. 1057–63, 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0198885903005457>>. .

CHAUVEAU, A.; TONNERRE, P.; PABOIS, A.; et al. Endothelial cell activation and proliferation modulate NKG2D activity by regulating MICA expression and shedding. **Journal of innate immunity**, v. 6, n. 1, p. 89–104, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23860405>>. .

CHEN, C. Y.; SHYU, A. B. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. **Trends in biochemical sciences**, v. 20, n. 11, p. 465–70, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8578590>>. .

CHEN, D.; GYLLENSTEN, U. MICA polymorphism: biology and importance in cancer. **Carcinogenesis**, v. 35, n. 12, p. 2633–42, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25330802>>. .

CHEN, P.-D.; TSAI, M.-K.; LEE, C.-Y.; et al. Gender differences in renal transplant graft survival. **Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi**, v. 112, n. 12, p. 783–8, 2013. Elsevier Taiwan LLC. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfma.2013.10.011>>. .

CHOY, M.-K.; PHIPPS, M. E. MICA polymorphism: biology and importance in immunity and disease. **Trends in molecular medicine**, v. 16, n. 3, p. 97–106, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2010.01.002>>. .

CILIÃO ALVES, D. C.; OLIVEIRA CRISPIM, J. C. DE; CASTELLI, E. C.; et al. Human leukocyte antigen-G 3' untranslated region polymorphisms are associated with better kidney allograft acceptance. **Human Immunology**, v. 73, n. 1, p. 52–59, 2012.

CIRULLI, V.; ZALATAN, J.; MCMASTER, M.; et al. The class I HLA repertoire of pancreatic islets comprises the nonclassical class Ib antigen HLA-G. **Diabetes**, v. 55, n. 5, p. 1214–22, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16644675>>. .

COLLINS, A. B.; SCHNEEBERGER, E. E.; PASCUAL, M. A.; et al. Complement activation in acute humoral renal allograft rejection: diagnostic significance of C4d deposits in peritubular capillaries. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 10, n. 10, p. 2208–14, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10505698>>. .

COLLISON, L. W.; CHATURVEDI, V.; HENDERSON, A. L.; et al. IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. **Nature immunology**, v. 11, n. 12, p. 1093–101, 2010. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ni.1952>>. .

COMISKEY, M.; GOLDSTEIN, C. Y.; FAZIO, S. R. DE; et al. Evidence that HLA-G is the functional homolog of mouse Qa-2, the Ped gene product. **Human immunology**, v. 64, n. 11, p. 999–1004, 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0198885903005408>>. .

CONTINI, P.; GHIO, M.; POGGI, A.; et al. 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**, v. 33, n. 1, p. 125–34, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12594841>>. .

CORNELL, L. D.; SMITH, R. N.; COLVIN, R. B. Kidney transplantation: mechanisms of rejection and acceptance. **Annual review of pathology**, v. 3, n. 1, p. 189–220, 2008. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151508>>. .

CORTESINI, N. S.-F.; COLOVAI, A. I.; MANAVALAN, J. S.; et al. Role of regulatory and suppressor T-cells in the induction of ILT3+ ILT4+ tolerogenic endothelial cells in organ allografts. **Transplant immunology**, v. 13, n. 2, p. 73–82, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15380537>>. .

COSMAN, D.; MÜLLBERG, J.; SUTHERLAND, C. L.; et al. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. **Immunity**, v. 14, n. 2, p. 123–33, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11239445>>. .

COX, S. T.; MADRIGAL, J. A.; SAUDEMONT, A. Diversity and characterization of polymorphic 5' promoter haplotypes of MICA and MICB genes. **Tissue antigens**, v. 84, n. 3, p. 293–303, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24962621>>. .

CRÉPUT, C.; DURRBACH, A.; MENIER, C.; et al. 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, n. 4, p. 587–94, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12971970>>. .

CRISA, L.; MCMASTER, M. T.; ISHII, J. K.; FISHER, S. J.; SALOMON, D. R. Identification of a thymic epithelial cell subset sharing expression of the class Ib HLA-G molecule with fetal trophoblasts. **The Journal of experimental medicine**, v. 186, n. 2, p. 289–98, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9221758>>5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2198976&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. .

DAHL, M.; HVIID, T. V. F. Human leucocyte antigen class Ib molecules in pregnancy success and early pregnancy loss. **Human reproduction update**, v. 18, n. 1, p. 92–109, 2012. Disponível em: <<http://academic.oup.com/humupd/article/18/1/92/856055/Human-leucocyte-antigen-class-Ib-molecules-in>>. .

DAMIANI, D.; SETIAN, N.; DICHTCHEKENIAN, V. Corticosteróides - conceitos básicos e aplicações clínicas. **Pediatria (São Paulo)**, v. 6, p. 160–166, 1984.

DANESE, S.; DEJANA, E.; FIOCCHI, C. Immune regulation by microvascular endothelial cells: directing innate and adaptive immunity, coagulation, and inflammation. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 178, n. 10, p. 6017–22, 2007. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/178/10/6017.full>>. .

DAUSSET, J. [Iso-leuko-antibodies]. **Acta haematologica**, v. 20, n. 1–4, p. 156–66, 1958. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13582558>>. .

DAUSSET, J. The major histocompatibility complex in man. **Science (New York, N.Y.)**, v. 213, n. 4515, p. 1469–74, 1981. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6792704>>. .

DAUSSET, J.; BRUN, A. LE; SASPORTES, M. [Lymphocyte mixed culture reaction (LMC) between parents and children with the same HL-A phenotype. Hypothesis of a genetic recognition system]. **Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences. Serie D: Sciences naturelles**, v. 275, n. 20, p. 2279–82, 1972. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4630937>>. .

DIAS, F. C.; CASTELLI, E. C.; COLLARES, C. V. A.; MOREAU, P.; DONADI, E. A. The Role of HLA-G Molecule and HLA-G Gene Polymorphisms in Tumors, Viral Hepatitis, and Parasitic Diseases. **Frontiers in immunology**, v. 6, n. FEB, p. 9, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25699038>>. .

DIECKMANN, D.; PLOTTNER, H.; BERCHTOLD, S.; BERGER, T.; SCHULER, G. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. **The Journal of experimental medicine**, v. 193, n. 11, p. 1303–10, 2001. Disponível em: <<http://jem.rupress.org/content/193/11/1303.full%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2193384/pdf/010432.pdf>>. .

DIEFENBACH, A.; JENSEN, E. R.; JAMIESON, A. M.; RAULET, D. H. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 165–71, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11557981>>. .

DIEHL, M.; MÜNZ, C.; KEILHOLZ, W.; et al. Nonclassical HLA-G molecules are classical peptide presenters. **Current biology : CB**, v. 6, n. 3, p. 305–14, 1996. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982202004815>>. .

DISCORDE, M. LE; MOREAU, P.; SABATIER, P.; LEGEAIS, J.-M.; CAROSELLA, E. D. Expression of HLA-G in human cornea, an immune-privileged tissue. **Human immunology**, v. 64, n. 11, p. 1039–44, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14602233>>. .

DONADI, E. A.; CASTELLI, E. C.; ARNAIZ-VILLENA, A.; et al. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 68, n. 3, p. 369–95, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21107637>>. .

DOUGLAS, N. C.; SHAH, M.; SHAH, M.; SAUER, M. V. Fertility and reproductive disorders in female solid organ transplant recipients. **Seminars in perinatology**, v. 31, n. 6, p. 332–8, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18063116>>. .

DUNHAM, I.; SARGENT, C. A.; TROWSDALE, J.; CAMPBELL, R. D. Molecular mapping of the human major histocompatibility complex by pulsed-field gel electrophoresis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 20, p. 7237–41, 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3118362>>. .

DUQUESNOY, R. J. HLAMatchmaker: A molecularly based algorithm for histocompatibility determination. I. Description of the algorithm. **Human Immunology**, v. 63, n. 5, p. 339–352, 2002.

ELSEN, P. J. VAN DEN; HOLLING, T. M.; STOEP, N. VAN DER; BOSS, J. M. DNA methylation and expression of major histocompatibility complex class I and class II transactivator genes in human developmental tumor cells and in T cell malignancies. **Clinical immunology (Orlando, Fla.)**, v. 109, n. 1, p. 46–52, 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521661603002006>>. .

ELSNER, H.-A.; BLASZCZYK, R. Immunogenetics of HLA null alleles: implications for blood stem cell transplantation. **Tissue antigens**, v. 64, n. 6, p. 687–95, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15546342>>. .

ELSNER, L.; FLÜGGE, P. F.; LOZANO, J.; et al. The endogenous danger signals HSP70 and MICA cooperate in the activation of cytotoxic effector functions of NK cells. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 14, n. 4, p. 992–1002, 2010. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20569278>>. .

ESPINOZA, J. L.; TAKAMI, A.; ONIZUKA, M.; et al. NKG2D gene polymorphism has a significant impact on transplant outcomes after HLA-fully-matched unrelated bone marrow transplantation for standard risk hematologic malignancies. **Haematologica**, v. 94, n. 10, p. 1427–34, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19794085>>. .

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary bioinformatics online**, v. 1, p. 47–50, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19325852>>. .

EZEAKILE, M.; PORTIK-DOBOS, V.; WU, J.; et al. HLA-G dimers in the prolongation of kidney allograft survival. **Journal of immunology research**, v. 2014, p. 153981, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24741575>>. .

FAINARDI, E.; BORTOLOTTI, D.; BOLZANI, S.; et al. Cerebrospinal fluid amounts of HLA-G in dimeric form are strongly associated to patients with MRI inactive multiple sclerosis. **Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)**, v. 22, n. 2, p. 245–9, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26084349>>. .

FARAG, S. S.; FEHNIGER, T. A.; RUGGERI, L.; VELARDI, A.; CALIGIURI, M. A. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. **Blood**, v. 100, n. 6, p. 1935–47, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12200350>>. .

FEDER, J. N.; PENNY, D. M.; IRRINKI, A.; et al. The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 4, p. 1472–7, 1998. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=19050&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

FERREIRA, L. M.; HOCHMAN, B.; BARBOSA, M. V. J. [Experimental models in research]. **Acta cirurgica brasileira**, v. 20 Suppl 2, n. Supl.2, p. 28–34, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16283025>>. .

FEUCHT, H. E.; SCHNEEBERGER, H.; HILLEBRAND, G.; et al. Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. **Kidney international**, v. 43, n. 6, p. 1333–8, 1993. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S008525381558068X>>. .

FLAJOLLET, S.; PORAS, I.; CAROSELLA, E. D.; MOREAU, P. RREB-1 is a transcriptional repressor of HLA-G. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 183, n. 11, p. 6948–59, 2009. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.0902053>>. .

FODIL, N.; PELLET, P.; LALOUX, L.; et al. MICA haplotypic diversity. **Immunogenetics**, v. 49, n. 6, p. 557–60, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10380703>>. .

FOGAL, B.; YI, T.; WANG, C.; et al. Neutralizing IL-6 reduces human arterial allograft rejection by allowing emergence of CD161+ CD4+ regulatory T cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 187, n. 12, p. 6268–80, 2011. Disponível em:

<<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1003774>>. .

FONS, P.; CHABOT, S.; CARTWRIGHT, J. E.; et al. Soluble HLA-G1 inhibits angiogenesis through an apoptotic pathway and by direct binding to CD160 receptor expressed by endothelial cells. **Blood**, v. 108, n. 8, p. 2608–15, 2006. Disponível em: <<http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2005-12-019919>>. .

FORONI, I.; RITA, A.; FILIPE, B.; et al. HLA-E, HLA-F and HLA-G — The Non-Classical Side of the MHC Cluster. **HLA and Associated Important Diseases**. p.61–109, 2014. InTech. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/hla-and-associated-important-diseases/hla-e-hla-f-and-hla-g-the-non-classical-side-of-the-mhc-cluster>>. .

FOSTER, B. J.; DAHHOU, M.; ZHANG, X.; PLATT, R. W.; HANLEY, J. A. Relative importance of HLA mismatch and donor age to graft survival in young kidney transplant recipients. **Transplantation**, v. 96, n. 5, p. 469–75, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23759881>>. .

FOURNEL, S.; HUC, X.; AGUERRE-GIRR, M.; et al. Comparative reactivity of different HLA-G monoclonal antibodies to soluble HLA-G molecules. **Tissue antigens**, v. 55, n. 6, p. 510–8, 2000. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1034/j.1399-0039.2000.550602.x>>. .

FRAMARINO DEI MALATESTA, M.; ROSSI, M.; ROCCA, B.; et al. Fertility following solid organ transplantation. **Transplantation proceedings**, v. 39, n. 6, p. 2001–4, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17692676>>. .

FROHN, C.; FRICKE, L.; PUCHTA, J. C.; KIRCHNER, H. The effect of HLA-C matching on acute renal transplant rejection. **Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 16, n. 2, p. 355–60, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11158412>>. .

GAMMILL, H. S.; NELSON, J. L. Naturally acquired microchimerism. **The International journal of developmental biology**, v. 54, n. 2–3, p. 531–43, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19924635>>. .

GARAKANI, R.; SAIDI, R. F. Recent Progress in Cell Therapy in Solid Organ Transplantation. **International journal of organ transplantation medicine**, v. 8, n. 3, p. 125–131, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28924460>>A<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5592099>>. .

GARCIA, C. D.; PEREIRA, J. D.; D, G. V. **Doação e transplante de órgãos e tecidos e bioética**. 1st ed. São Paulo: Segmento Farma, 2015.

GARZIERA, M.; SCARABEL, L.; TOFFOLI, G. Hypoxic Modulation of HLA-G Expression through the Metabolic Sensor HIF-1 in Human Cancer Cells. **Journal of immunology research**, v. 2017, p. 4587520, 2017. Hindawi. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2017/4587520>>. .

GAVLOVSKY, P.-J.; TONNERRE, P.; GÉRARD, N.; et al. Alternative Splice Transcripts for MHC Class I-like MICA Encode Novel NKG2D Ligands with Agonist or Antagonist Functions. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 197, n. 3, p. 736–46, 2016. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1501416>>. .

GENEUGELIJK, K.; WISSING, J.; KOPPENAAAL, D.; NIEMANN, M.; SPIERINGS, E. Computational Approaches to Facilitate Epitope-Based HLA Matching in Solid Organ Transplantation. **Journal of immunology research**, v. 2017, p. 9130879, 2017. Hindawi Publishing Corporation. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28286782>>. .

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**, v. 84, p. 9145, 1987.

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 the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 24, p. 9145–9, 1987. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.84.24.9145>>. .

GLEISSNER, C. A.; ZASTROW, A.; KLINGENBERG, R.; et al. IL-10 inhibits endothelium-dependent T cell costimulation by up-regulation of ILT3/4 in human vascular endothelial cells. **European journal of immunology**, v. 37, n. 1, p. 177–92, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17163451>>. .

GLIENKE, J.; SOBANOV, Y.; BROSTJAN, C.; et al. The genomic organization of NKG2C, E, F, and D receptor genes in the human natural killer gene complex. **Immunogenetics**, v. 48, n. 3, p. 163–73, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9683661>>. .

GLOTZ, D.; ANTOINE, C.; JULIA, P.; et al. Intravenous immunoglobulins and transplantation for patients with anti-HLA antibodies. **Transplant international: official journal of the European Society for Organ Transplantation**, v. 17, n. 1, p. 1–8, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14685653>>. .

GOBIN, S. J.; ELSEEN, P. J. VAN DEN. Transcriptional regulation of the MHC class Ib genes HLA-E, HLA-F, and HLA-G. **Human immunology**, v. 61, n. 11, p. 1102–7, 2000. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0198-8859\(00\)00198-1](https://doi.org/10.1016/S0198-8859(00)00198-1)>. .

GONÇALVES, A. S.; OLIVEIRA, J. P.; OLIVEIRA, C. F. P.; et al. Relevance of HLA-G, HLA-E and IL-10 expression in lip carcinogenesis. **Human immunology**, v. 77, n. 9, p. 785–90, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26723902>>. .

GONEN-GROSS, T.; ACHDOUT, H.; GAZIT, R.; et al. Complexes of HLA-G protein on the cell surface are important for leukocyte Ig-like receptor-1 function. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 171, n. 3, p. 1343–51, 2003. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.171.3.1343>>. .

GONZÁLEZ-GALARZA, F. F.; TAKESHITA, L. Y. C.; SANTOS, E. J. M.; et al. Allele frequency net 2015 update: New features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse drug reaction associations. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D784–D788, 2015.

GONZÁLEZ-GALARZA, F. F.; TAKESHITA, L. Y. C.; SANTOS, E. J. M.; et al. Allele frequency net 2015 update: new features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse drug reaction associations. **Nucleic acids research**, v. 43, n. Database issue, p. D784–8, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25414323>>. .

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

<<http://doi.wiley.com/10.1002/path.1700440313>>. .

GREGORI, S.; TOMASONI, D.; PACCIANI, V.; et al. Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. **Blood**, v. 116, n. 6, p. 935–44, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20448110>>. .

GREINER, D. L.; HESSELTON, R. A.; SHULTZ, L. D. SCID mouse models of human stem cell engraftment. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 16, n. 3, p. 166–77, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9617892>>. .

GRITANE, K.; JUSINSKIS, J.; MALCEVS, A.; et al. Influence of Pretransplant Dialysis Vintage on Repeated Kidney Transplantation Outcomes. **Transplantation proceedings**, v. 50, n. 5, p. 1249–1257, 2018. Elsevier Inc. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2018.01.056>>. .

GROH, V.; BAHRAM, S.; BAUER, S.; et al. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 22, p. 12445–50, 1996. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=38011&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

GROH, V.; RHINEHART, R.; SECRIST, H.; et al. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 12, p. 6879–84, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10359807>>. .

GROH, V.; SMYTHE, K.; DAI, Z.; SPIES, T. Fas ligand-mediated paracrine T cell regulation by the receptor NKG2D in tumor immunity. **Nature Immunology**, v. 7, n. 7, p. 755–762, 2006.

GÜLDNER, A.; MARON-GUTIERREZ, T.; ABREU, S. C.; et al. Expanded endothelial progenitor cells mitigate lung injury in septic mice. **Stem cell research & therapy**, v. 6, n. 1, p. 230, 2015. Stem Cell Research & Therapy. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13287-015-0226-7>>. .

GUMABAY, F. M.; NOVAK, M.; BANSAL, A.; et al. Pre-transplant history of mental health concerns, non-adherence, and post-transplant outcomes in kidney transplant recipients. **Journal of psychosomatic research**, v. 105, n. June 2017, p. 115–124, 2018. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jpsychores.2017.12.013>>. .

GUO, S. W.; THOMPSON, E. A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, v. 48, n. 2, p. 361–72, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1637966>>. .

HALLORAN, P. F. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. **The New England journal of medicine**, v. 351, n. 26, p. 2715–29, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15616206>>. .

HALLORAN, P. F.; MELK, A.; BARTH, C. Rethinking chronic allograft nephropathy: the concept of accelerated senescence. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 10, n. 1, p. 167–81, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9890324>>.

HARTONO, C.; MUTHUKUMAR, T.; SUTHANTHIRAN, M. Noninvasive diagnosis of acute rejection of renal allografts. **Current opinion in organ transplantation**, v. 15, n. 1, p. 35–41, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19935064>>. .

HAYANGA, J. A.; YANG, J.; ABOAGYE, J.; et al. Risk factors associated with lung retransplantation: evaluation of a nationwide registry over a quarter century. **The Annals of thoracic surgery**, v. 98, n. 5, p. 1742–6; discussion 1746–7, 2014. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.athoracsur.2014.06.033>>. .

HAYASHI, T.; IMAI, K.; MORISHITA, Y.; et al. Identification of the NKG2D haplotypes associated with natural cytotoxic activity of peripheral blood lymphocytes and cancer immunosurveillance. **Cancer research**, v. 66, n. 1, p. 563–70, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16397273>>. .

HEAPHY, E. L. G.; POGGIO, E. D.; FLECHNER, S. M.; et al. Risk factors for retransplant kidney recipients: relisting and outcomes from patients' primary transplant. **American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons**, v. 14, n. 6, p. 1356–67, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24731101>>. .

HIBY, S. E.; KING, A.; SHARKEY, A.; LOKE, Y. W. Molecular studies of trophoblast HLA-G: polymorphism, isoforms, imprinting and expression in preimplantation embryo. **Tissue antigens**, v. 53, n. 1, p. 1–13, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10082426>>. .

HIGGINS, R. M.; DAGA, S.; MITCHELL, D. A. Antibody-incompatible kidney transplantation in 2015 and beyond. **Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 30, n. 12, p. 1972–8, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25500804>>. .

HIROHASHI, T.; CHASE, C. M.; PELLE, P. DELLA; et al. A novel pathway of chronic allograft rejection mediated by NK cells and alloantibody. **American Journal of Transplantation**, v. 12, n. 2, p. 313–321, 2012.

HÖNGER, G.; FORNARO, I.; GRANADO, C.; et al. Frequency and determinants of pregnancy-induced child-specific sensitization. **American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons**, v. 13, n. 3, p. 746–53, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23311303>>. .

HORTON, R.; WILMING, L.; RAND, V.; et al. Gene map of the extended human MHC. **Nature reviews. Genetics**, v. 5, n. 12, p. 889–99, 2004. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrg1489>>. .

HOWIE, D.; WALDMANN, H.; COBBOLD, S. Nutrient Sensing via mTOR in T Cells Maintains a Tolerogenic Microenvironment. **Frontiers in immunology**, v. 5, n. AUG, p. 409, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25221554>>. .

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.

Immunological reviews, v. 190, p. 40–52, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12493005>>. .

HUTCHINSON, J. A.; RIQUELME, P.; SAWITZKI, B.; et al. Cutting Edge: Immunological consequences and trafficking of human regulatory macrophages administered to renal transplant recipients. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 187, n. 5, p. 2072–8, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21804023>>. .

HVIID, T. V. F.; 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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16698426>>. .

IKENO, M.; SUZUKI, N.; KAMIYA, M.; et al. LINE1 family member is negative regulator of HLA-G expression. **Nucleic acids research**, v. 40, n. 21, p. 10742–52, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23002136>>. .

INGULLI, E. Mechanism of cellular rejection in transplantation. **Pediatric nephrology (Berlin, Germany)**, v. 25, n. 1, p. 61–74, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21476231>>. .

INUI, M.; SUGAHARA-TOBINAI, A.; FUJII, H.; et al. Tolerogenic immunoreceptor ILT3/LILRB4 paradoxically marks pathogenic auto-antibody-producing plasmablasts and plasma cells in non-treated SLE. **International immunology**, v. 28, n. 12, p. 597–604, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27742834>>. .

ISERNHAGEN, A.; MALZAHN, D.; BICKEBÖLLER, H.; DRESSEL, R. Impact of the MICA-129Met/Val Dimorphism on NKG2D-Mediated Biological Functions and Disease Risks. **Frontiers in immunology**, v. 7, n. DEC, p. 588, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28018354>>. .

ISERNHAGEN, A.; MALZAHN, D.; VIKTOROVA, E.; et al. The MICA-129 dimorphism affects NKG2D signaling and outcome of hematopoietic stem cell transplantation. **EMBO molecular medicine**, v. 7, n. 11, p. 1480–502, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26483398>>. .

ISERNHAGEN, A.; SCHILLING, D.; MONECKE, S.; et al. The MICA-129Met/Val dimorphism affects plasma membrane expression and shedding of the NKG2D ligand MICA. **Immunogenetics**, v. 68, n. 2, p. 109–23, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26585323>>. .

ITO, T.; ITO, N.; SAATHOFF, M.; et al. Immunology of the human nail apparatus: the nail matrix is a site of relative immune privilege. **The Journal of investigative dermatology**, v. 125, n. 6, p. 1139–48, 2005. Elsevier Masson SAS. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.0022-202X.2005.23927.x>>. .

IVANOVA-TODOROVA, E.; MOURDJEVA, M.; KYURKCHIEV, D.; et al. HLA-G expression is up-regulated by progesterone in mesenchymal stem cells. **American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)**, v. 62, n. 1, p. 25–33, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19527229>>. .

JAFFE, E. A.; NACHMAN, R. L.; BECKER, C. G.; MINICK, C. R. Culture of human

endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. **The Journal of clinical investigation**, v. 52, n. 11, p. 2745–56, 1973. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4355998>>. .

JEAN-PAUL, S. The History of Kidney Transplantation: Past, Present and Future (with Special References to the Belgian History). In: IntechOpen (Ed.); **Understanding the Complexities of Kidney Transplantation**, 2011.

JIN, H.-L.; LI, C.-R.; XIAO, L.; et al. Clinical relevance of sHLA-G-mediated with better graft acceptance in early posttransplantation. **Transplantation proceedings**, v. 44, n. 5, p. 1259–61, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22663996>>. .

JOHNSTON, S. C.; DUSTIN, M. L.; HIBBS, M. L.; SPRINGER, T. A. On the species specificity of the interaction of LFA-1 with intercellular adhesion molecules. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 145, n. 4, p. 1181–7, 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2199576>>. .

KATSUYAMA, Y.; OTA, M.; ANDO, H.; et al. Sequencing based typing for genetic polymorphisms in exons, 2, 3 and 4 of the MICA gene. **Tissue antigens**, v. 54, n. 2, p. 178–84, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10488745>>. .

KILBURN, B. A.; WANG, J.; DUNIEC-DMUCHOWSKI, Z. M.; et al. Extracellular matrix composition and hypoxia regulate the expression of HLA-G and integrins in a human trophoblast cell line. **Biology of reproduction**, v. 62, n. 3, p. 739–47, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10684818>>. .

KIM, E.; MANZAR, G.; ZAVAZAVA, N. Human iPS cell-derived hematopoietic progenitor cells induce T-cell anergy in in vitro-generated alloreactive CD8(+) T cells. **Blood**, v. 121, n. 26, p. 5167–75, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23687092>>. .

KING, M.; PEARSON, T.; SHULTZ, L. D.; et al. A new Hu-PBL model for the study of human islet alloreactivity based on NOD-scid mice bearing a targeted mutation in the IL-2 receptor gamma chain gene. **Clinical immunology (Orlando, Fla.)**, v. 126, n. 3, p. 303–14, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18096436>>. .

KINO, T.; HATANAKA, H.; MIYATA, S.; et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. **The Journal of antibiotics**, v. 40, n. 9, p. 1256–65, 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2445722>>. .

KIRKILES-SMITH, N. C.; HARDING, M. J.; SHEPHERD, B. R.; et al. Development of a humanized mouse model to study the role of macrophages in allograft injury. **Transplantation**, v. 87, n. 2, p. 189–97, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2776641/>>. .

KITAMURA, H.; KAMON, H.; SAWA, S.-I.; et al. IL-6-STAT3 controls intracellular MHC class II alphabeta dimer level through cathepsin S activity in dendritic cells. **Immunity**, v. 23, n. 5, p. 491–502, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16286017>>. .

KLEIN, J.; FIGUEROA, F. Evolution of the major histocompatibility complex. **Critical reviews in immunology**, v. 6, n. 4, p. 295–386, 1986. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0167569986900897>>. .

KLEIN, J.; SATO, A. The HLA system. First of two parts. **The New England journal of medicine**, v. 343, n. 10, p. 702–9, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10974135>>. .

KOCH, C.; KIM, Y.; ZÖLLER, T.; BORN, C.; STEINLE, A. Chronic NKG2D Engagement In Vivo Differentially Impacts NK Cell Responsiveness by Activating NK Receptors. **Frontiers in immunology**, v. 8, n. NOV, p. 1466, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29163533>>. .

KÖNIG, L.; KASIMIR-BAUER, S.; HOFFMANN, O.; et al. The prognostic impact of soluble and vesicular HLA-G and its relationship to circulating tumor cells in neoadjuvant treated breast cancer patients. **Human immunology**, v. 77, n. 9, p. 791–9, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26796737>>. .

KONJEVIC, G.; JURISIC, V.; JOVIC, V.; et al. Investigation of NK cell function and their modulation in different malignancies. **Immunologic research**, v. 52, n. 1–2, p. 139–56, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22442005>>. .

KONVALINKA, A.; TINCKAM, K. Utility of HLA Antibody Testing in Kidney Transplantation. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 26, n. 7, p. 1489–502, 2015. Disponível em: <<http://www.jasn.org/cgi/doi/10.1681/ASN.2014080837>>. .

KULSKI, J. K.; DUNN, D. S.; GAUDIERI, S.; SHIINA, T.; INOKO, H. Genomic and phylogenetic analysis of the human CD1 and HLA class I multicopy genes. **Journal of molecular evolution**, v. 53, n. 6, p. 642–50, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11677624>>. .

LAGING, M.; KAL-VAN GESTEL, J. A.; WETERING, J. VAN DE; et al. The relative importance of donor age in deceased and living donor kidney transplantation. **Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation**, v. 25, n. 11, p. 1150–7, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29163533>>. .

LAHIRI, D. K.; NURNBERGER, J. I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic acids research**, v. 19, n. 19, p. 5444, 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1681511>>. .

LAND, W. G. Injury to allografts: innate immune pathways to acute and chronic rejection. **Saudi journal of kidney diseases and transplantation : an official publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, Saudi Arabia**, v. 16, n. 4, p. 520–39, 2005. Disponível em: <<http://www.sjkdt.org/article.asp?issn=1319-2442;year=2005;volume=16;issue=4;spage=520;epage=539;aulast=Land%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18202507>>. .

LANIER, L. L. NK cell receptors. **Annual review of immunology**, v. 16, p. 359–93, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9597134>>. .

LAPERROUSAZ, S.; TIERCY, S.; VILLARD, J.; FERRARI-LACRAZ, S. HLA and non-HLA polymorphisms in renal transplantation. **Swiss medical weekly**, v. 142, p. w13668, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22936316>>. .

LEE, H.; PARK, J. B.; LEE, S.; et al. Intra-osseous injection of donor mesenchymal stem cell (MSC) into the bone marrow in living donor kidney transplantation; a pilot study. **Journal of**

translational medicine, v. 11, n. 1, p. 96, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23578110>>. .

LEELAYUWAT, C.; TOWNEND, D. C.; DEGLI-ESPOSTI, M. A.; ABRAHAM, L. J.; DAWKINS, R. L. A new polymorphic and multicopy MHC gene family related to nonmammalian class I. **Immunogenetics**, v. 40, n. 5, p. 339–51, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7927538>>. .

LEFEBVRE, S.; BERRIH-AKNIN, S.; ADRIAN, F.; et al. A specific interferon (IFN)-stimulated response element of the distal HLA-G promoter binds IFN-regulatory factor 1 and mediates enhancement of this nonclassical class I gene by IFN-beta. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 9, p. 6133–9, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11087747>>. .

LEFRANC, M.-P.; DUPRAT, E.; KAAS, Q.; et al. IMGT unique numbering for MHC groove G-DOMAIN and MHC superfamily (MhcSF) G-LIKE-DOMAIN. **Developmental and comparative immunology**, v. 29, n. 11, p. 917–38, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15936075>>. .

LEFRANC, M. P. IMGT, the International ImMunoGeneTics Information System. **Cold Spring Harb Protocols**, v. 6, p. 595–603, 2011. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>>. Acesso em: 24/1/2018.

LEMAOULT, J.; DAOUYA, M.; WU, J.; et al. Synthetic HLA-G proteins for therapeutic use in transplantation. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 27, n. 9, p. 3643–51, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23752205>>. .

LEMAOULT, J.; DISCORDE, M. LE; ROUAS-FREISS, N.; et al. Biology and functions of human leukocyte antigen-G in health and sickness*. **Tissue Antigens**, v. 62, n. 4, p. 273–284, 2003. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1034/j.1399-0039.2003.00143.x>>. .

LEMAOULT, J.; ZAFARANLOO, K.; DANFF, C. LE; CAROSELLA, E. D. HLA-G up-regulates ILT2, ILT3, ILT4, and KIR2DL4 in antigen presenting cells, NK cells, and T cells. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 19, n. 6, p. 662–4, 2005. Disponível em: <<http://www.fasebj.org/cgi/doi/10.1096/fj.04-1617fje>>. .

LEWIS, B. P.; BURGE, C. B.; BARTEL, D. P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. **Cell**, v. 120, n. 1, p. 15–20, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15652477>>. .

LI, J.-J.; PAN, K.; GU, M.-F.; et al. Prognostic value of soluble MICA levels in the serum of patients with advanced hepatocellular carcinoma. **Chinese journal of cancer**, v. 32, n. 3, p. 141–8, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3845598&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

LIANG, S.; HORUZSKO, A. Mobilizing dendritic cells for tolerance by engagement of immune inhibitory receptors for HLA-G. **Human immunology**, v. 64, n. 11, p. 1025–32, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14602231>>. .

LIANG, S.; RISTICH, V.; ARASE, H.; et al. Modulation of dendritic cell differentiation by HLA-G and ILT4 requires the IL-6--STAT3 signaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 24, p. 8357–62, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18550825>><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2448841&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

LIU, Y.-J. A unified theory of central tolerance in the thymus. **Trends in immunology**, v. 27, n. 5, p. 215–21, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16580260>>. .

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–8, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609>>. .

LO, P. H. Y.; URABE, Y.; KUMAR, V.; et al. Identification of a functional variant in the MICA promoter which regulates MICA expression and increases HCV-related hepatocellular carcinoma risk. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e61279, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23593449>>. .

LOUPY, A.; HAAS, M.; SOLEZ, K.; et al. The Banff 2015 Kidney Meeting Report: Current Challenges in Rejection Classification and Prospects for Adopting Molecular Pathology. **American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons**, v. 17, n. 1, p. 28–41, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27862883>>. .

LOUPY, A.; LEFAUCHEUR, C.; VERNEREY, D.; et al. Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. **The New England journal of medicine**, v. 369, n. 13, p. 1215–26, 2013. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1302506>>. .

LÜ, M.; XIA, B.; GE, L.; et al. Role of major histocompatibility complex class I-related molecules A* A5.1 allele in ulcerative colitis in Chinese patients. **Immunology**, v. 128, n. 1 Suppl, p. e230–6, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19016911>>. .

LU, N.; ZHANG, Y.; ZOU, X.; et al. HLA-G on peripheral blood CD4(+) T lymphocytes: a potential predictor for acute renal rejection. **Transplant international: official journal of the European Society for Organ Transplantation**, v. 24, n. 11, p. 1103–11, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21848900>>. .

LUO, J.; TIAN, W.; PAN, F.; LIU, X.; LI, L. Allelic and haplotypic diversity of 5'promoter region of the MICA gene. **Human immunology**, v. 75, n. 4, p. 383–8, 2014. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2013.12.010>>. .

LUQUE, J.; TORRES, M. I.; AUMENTE, M. D.; et al. Soluble HLA-G in heart transplantation: their relationship to rejection episodes and immunosuppressive therapy. **Human immunology**, v. 67, n. 4–5, p. 257–63, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16720205>>. .

LYNCH, R. J.; PLATT, J. L. Escaping from rejection. **Transplantation**, v. 88, n. 11, p. 1233–6, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19996920>>. .

MACCARI, G.; ROBINSON, J.; BALLINGALL, K.; et al. IPD-MHC 2.0: an improved inter-species database for the study of the major histocompatibility complex. **Nucleic acids research**, v. 45, n. D1, p. D860–D864, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27899604>>. .

MACCHIARINI, F.; MANZ, M. G.; PALUCKA, A K.; SHULTZ, L. D. Humanized mice: are we there yet? **The Journal of experimental medicine**, v. 202, n. 10, p. 1307–11, 2005. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2212979&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

MANAVALAN, J. S.; KIM-SCHULZE, S.; SCOTTO, L.; et al. Alloantigen specific CD8+ CD28- FOXP3+ T suppressor cells induce ILT3+ ILT4+ tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity. **International Immunology**, v. 16, n. 8, p. 1055–1068, 2004.

MANAVALAN, J. S.; ROSSI, P. C.; VLAD, G.; et al. High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells. **Transplant immunology**, v. 11, n. 3–4, p. 245–58, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12967778>>. .

MARIN, M. L. C.; SAVIOLI, C. R.; YAMAMOTO, J. H.; KALIL, J.; GOLDBERG, A. C. MICA polymorphism in a sample of the São Paulo population, Brazil. **European journal of immunogenetics : official journal of the British Society for Histocompatibility and Immunogenetics**, v. 31, n. 2, p. 63–71, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15086345>>. .

MARTELLI-PALOMINO, G.; PANCOTTO, J. A.; MUNIZ, Y. C.; et al. Polymorphic Sites at the 3' Untranslated Region of the HLA-G Gene Are Associated with Differential hla-g Soluble Levels in the Brazilian and French Population. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–10, 2013.

MAS, V. R.; DUMUR, C. I.; SCIAN, M. J.; GEHRAU, R. C.; MALUF, D. G. MicroRNAs as biomarkers in solid organ transplantation. **American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons**, v. 13, n. 1, p. 11–9, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23136949>>. .

MATAS, A J.; PAYNE, W. D.; SUTHERLAND, D. E.; et al. 2,500 living donor kidney transplants: a single-center experience. **Annals of surgery**, v. 234, n. 2, p. 149–64, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11505060>>. .

MATSUI, Y.; SUNATANI, Y.; HAYASHI, N.; et al. DNA double-strand breaks induced intractable glomerular fibrosis in renal allografts. **Clinical and experimental nephrology**, v. 20, n. 3, p. 479–88, 2016. Springer Japan. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26440363>>. .

MCCAUGHAN, J. A.; MCKNIGHT, A. J.; COURTNEY, A. E.; MAXWELL, A. P. Epigenetics: time to translate into transplantation. **Transplantation**, v. 94, n. 1, p. 1–7, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22437848>>. .

MCDEVITT, H. O.; BENACERRAF, B. Genetic control of specific immune responses. **Advances in immunology**, v. 11, p. 31–74, 1969. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4908392>>. .

MCKUSICK-NATHANS INSTITUTE OF GENETIC MEDICINE, J. H. U. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Disponível em: <<https://omim.org/>>. Acesso em: 1/1/2018.

MEDINA-PESTANA, J. O.; VAZ, M. L. S.; PARK, S. I.; et al. Organ transplantation in Brazil in the year 2002. **Transplantation proceedings**, v. 36, n. 4, p. 799–801, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15194276>>. .

MEIER-KRIESCHE, H. U.; PORT, F. K.; OJO, A. O.; et al. Effect of waiting time on renal transplant outcome. **Kidney international**, v. 58, n. 3, p. 1311–7, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10972695>>. .

MELE, D. A.; SALMERON, A.; GHOSH, S.; et al. BET bromodomain inhibition suppresses TH17-mediated pathology. **The Journal of experimental medicine**, v. 210, n. 11, p. 2181–90, 2013. Disponível em: <www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20142182>. .

MENGEL, M.; HUSAIN, S.; HIDALGO, L.; SIS, B. Phenotypes of antibody-mediated rejection in organ transplants. **Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation**, v. 25, n. 6, p. 611–22, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22533649>>. .

MENIER, C.; RITEAU, B.; CAROSELLA, E. D.; ROUAS-FREISS, N. MICA triggering signal for NK cell tumor lysis is counteracted by HLA-G1-mediated inhibitory signal. **International journal of cancer**, v. 100, n. 1, p. 63–70, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12115588>>. .

MENIER, C.; SAEZ, B.; HOREJSI, V.; et al. Characterization of monoclonal antibodies recognizing HLA-G or HLA-E: New tools to analyze the expression of nonclassical HLA class I molecules. **Human Immunology**, v. 64, n. 3, p. 315–326, 2003.

MEULEMAN, T.; DRABELLS, J.; LITH, J. M. M. VAN; et al. Lower frequency of the HLA-G UTR-4 haplotype in women with unexplained recurrent miscarriage. **Journal of reproductive immunology**, v. 126, p. 46–52, 2018. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jri.2018.02.002>>. .

MINCHEVA-NILSSON, L.; NAGAEVA, O.; CHEN, T.; et al. Placenta-derived soluble MHC class I chain-related molecules down-regulate NKG2D receptor on peripheral blood mononuclear cells during human pregnancy: a possible novel immune escape mechanism for fetal survival. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 176, n. 6, p. 3585–92, 2006. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.176.6.3585>>. .

MING, Y.; HU, J.; LUO, Q.; et al. Acute Antibody-Mediated Rejection in Presence of MICA-DSA and Successful Renal Re-Transplant with Negative-MICA Virtual Crossmatch. **PloS one**, v. 10, n. 5, p. e0127861, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26024219>>. .

MISHRA, M. N.; BALIGA, K. V. Significance of panel reactive antibodies in patients requiring kidney transplantation. **Saudi journal of kidney diseases and transplantation : an official publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, Saudi Arabia**, v. 24, n. 3, p. 495–9, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23640620>>. .

MISRA, M. K.; PANDEY, S. K.; KAPOOR, R.; et al. HLA-G gene expression influenced at allelic level in association with end stage renal disease and acute allograft rejection. **Human**

Immunology, v. 75, n. 8, p. 833–839, 2014. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2014.06.005>>. .

MIZUKI, N.; OTA, M.; KIMURA, M.; et al. Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: a strong association of six GCT repetitions with Behçet disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 4, p. 1298–303, 1997. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=19785&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

MOLD, J. E.; VENKATASUBRAHMANYAM, S.; BURT, T. D.; et al. Fetal and adult hematopoietic stem cells give rise to distinct T cell lineages in humans. **Science (New York, N.Y.)**, v. 330, n. 6011, p. 1695–9, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1196509>>. .

MORANDI, F.; PISTOIA, V. Interactions between HLA-G and HLA-E in Physiological and Pathological Conditions. **Frontiers in immunology**, v. 5, n. August, p. 394, 2014. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4141331&tool=pmcentrez&rendertype=abstract%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25202308%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4141331>>. .

MORANDI, F.; RIZZO, R.; FAINARDI, E.; ROUAS-FREISS, N.; PISTOIA, V. Recent Advances in Our Understanding of HLA-G Biology: Lessons from a Wide Spectrum of Human Diseases. **Journal of immunology research**, v. 2016, p. 4326495, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27652273>>. .

MORATH, C.; OPELZ, G.; ZEIER, M.; SÜSAL, C. Prevention of antibody-mediated kidney transplant rejection. **Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation**, v. 25, n. 6, p. 633–45, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22587522>>. .

MOREAU, P.; ADRIAN-CABESTRE, F.; MENIER, C.; et al. 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: an update. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 13, n. 9B, p. 2973–89, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19508383>>. .

MOREAU, P.; MOUILLOT, G.; ROUSSEAU, P.; et al. HLA-G gene repression is reversed by demethylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 3, p. 1191–6, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12552087>>. .

MORELLI, A. E.; DIVITO, S. J. Cell-Based Therapies in the Prevention of Solid Organ Transplant Rejection. **American Journal of Immunology**, v. 8, n. 2, p. 52–64, 2012. Disponível em: <<http://thescipub.com/pdf/10.3844/ajisp.2012.52.64>>. .

MÜLLER, V.; SZABÓ, A.; VIKLICKY, O.; et al. Sex hormones and gender-related differences: their influence on chronic renal allograft rejection. **Kidney international**, v. 55, n.

5, p. 2011–20, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10231466>>. .

MULLEY, W. R.; KANELIS, J. Understanding crossmatch testing in organ transplantation: A case-based guide for the general nephrologist. **Nephrology (Carlton, Vic.)**, v. 16, n. 2, p. 125–33, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21272123>>. .

MÜNZ, C.; NICKOLAUS, P.; LAMMERT, E.; et al. The role of peptide presentation in the physiological function of HLA-G. **Seminars in cancer biology**, v. 9, n. 1, p. 47–54, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10092550>>. .

MURO, M.; LOPEZ-HERNANDEZ, R.; LLORENTE, S.; et al. MICA Molecules in Disease and Transplantation, a Double-Edged Sword? **Current Immunology Reviews**, v. 8, n. 4, p. 307–325, 2012. Disponível em: <<http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=1573-3955&volume=8&issue=4&spage=307>>. .

MURUGANANDAM, A.; HERX, L. M.; MONETTE, R.; DURKIN, J. P.; STANIMIROVIC, D. B. Development of immortalized human cerebromicrovascular endothelial cell line as an in vitro model of the human blood-brain barrier. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 11, n. 13, p. 1187–97, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9367354>>. .

NADASDY, G. M.; BOTT, C.; COWDEN, D.; et al. Comparative study for the detection of peritubular capillary C4d deposition in human renal allografts using different methodologies. **Human pathology**, v. 36, n. 11, p. 1178–85, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16260271>>. .

NAJI, A.; MENIER, C.; MORANDI, F.; et al. Binding of HLA-G to ITIM-Bearing Ig-like Transcript 2 Receptor Suppresses B Cell Responses. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 4, p. 1536–1546, 2014. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1300438>>. .

NANGAKU, M.; ALPERS, C. E.; PIPPIN, J.; et al. A new model of renal microvascular endothelial injury. **Kidney international**, v. 52, n. 1, p. 182–94, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9211361>>. .

NARDI, F. DA S.; KÖNIG, L.; WAGNER, B.; et al. Soluble monomers, dimers and HLA-G-expressing extracellular vesicles: the three dimensions of structural complexity to use HLA-G as a clinical biomarker. **HLA**, v. 88, n. 3, p. 77–86, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27440734>>. .

NARDI, F. DA S.; SLOWIK, R.; WOWK, P. F.; et al. Analysis of HLA-G polymorphisms in couples with implantation failure. **American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)**, v. 68, n. 6, p. 507–14, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23009094>>. .

NARUSE, T. K.; ROMPHRUK, A.; KAWATA, H.; et al. Diversity of MICA (PERB11 . 1) and HLA haplotypes in Northeastern Thais. , p. 83–89, 2001.

NGUYEN-LEFEBVRE, A. T.; AJITH, A.; PORTIK-DOBOS, V.; et al. Mouse models for studies of HLA-G functions in basic science and pre-clinical research. **Human immunology**, v. 77, n. 9, p. 711–9, 2016. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2016.02.012>>. .

NIKOLOVA, M.; MARIE-CARDINE, A.; BOUMSELL, L.; BENSUSSAN, A. BY55/CD160 acts as a co-receptor in TCR signal transduction of a human circulating cytotoxic effector T lymphocyte subset lacking CD28 expression. **International immunology**, v. 14, n. 5, p. 445–51, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11978774>>. .

NORMAN, P. J.; NORBERG, S. J.; GUETHLEIN, L. A.; et al. Sequences of 95 human MHC haplotypes reveal extreme coding variation in genes other than highly polymorphic HLA class I and II. **Genome research**, v. 27, n. 5, p. 813–823, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28360230>>. .

ÖBER, C.; ALDRICH, C. L.; CHERVONEVA, I.; et al. Variation in the HLA-G promoter region influences miscarriage rates. **American journal of human genetics**, v. 72, n. 6, p. 1425–35, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12721954>>. .

ØIEN, C. M.; REISAETER, A. V.; LEIVESTAD, T.; et al. Living donor kidney transplantation: the effects of donor age and gender on short- and long-term outcomes. **Transplantation**, v. 83, n. 5, p. 600–6, 2007. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00007890-200703150-00015>>. .

OLIVEIRA, L. A.; RIBAS, F.; BICALHO, M. G.; TSUNETO, L. T.; PETZL-ERLER, M. L. High frequencies of alleles MICA*020 and MICA*027 in Amerindians and evidence of positive selection on exon 3. **Genes and immunity**, v. 9, n. 8, p. 697–705, 2008. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/gene.2008.65>>. .

OLIVEIRA, M. I. G. DE; SANTOS, A. M. DOS; FILHO, N. S. Survival analysis and associated factors to mortality of renal transplant recipients in a University Hospital in Maranhão. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 34, n. 3, p. 216–225, 2012. Disponível em: <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/0101-2800.20120002>>. .

OPELZ, G. Correlation of HLA matching with kidney graft survival in patients with or without cyclosporine treatment. **Transplantation**, v. 40, n. 3, p. 240–3, 1985. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3898488>>. .

OTA, M.; KATSUYAMA, Y.; MIZUKI, N.; et al. Trinucleotide repeat polymorphism within exon 5 of the MICA gene (MHC class I chain-related gene A): allele frequency data in the nine population groups Japanese, Northern Han, Hui, Uygur, Kazakhstan, Iranian, Saudi Arabian, Greek and Italian. **Tissue antigens**, v. 49, n. 5, p. 448–54, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9174136>>. .

OTTEN, H. G.; VERHAAR, M. C.; BORST, H. P. E.; HENÉ, R. J.; ZUILEN, A. D. VAN. Pretransplant donor-specific HLA class-I and -II antibodies are associated with an increased risk for kidney graft failure. **American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons**, v. 12, n. 6, p. 1618–23, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22404993>>. .

PAN, G.-H.; CHEN, Z.; XU, L.; et al. Low-dose tacrolimus combined with donor-derived mesenchymal stem cells after renal transplantation: a prospective, non-randomized study.

Oncotarget, v. 7, n. 11, p. 12089–101, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2693381>>. .

PARAMESH, A. S.; ZHANG, R.; BABER, J.; et al. The effect of HLA mismatch on highly sensitized renal allograft recipients. **Clinical transplantation**, v. 24, n. 6, p. E247-52, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20682021>>. .

PARK, B.; AHN, K. An essential function of tapasin in quality control of HLA-G molecules. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 16, p. 14337–45, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12582157>>. .

PASSOS-BUENO, M. R.; BERTOLA, D.; HOROVITZ, D. D. G.; FARIA FERRAZ, V. E. DE; BRITO, L. A. Genetics and genomics in Brazil: a promising future. **Molecular genetics & genomic medicine**, v. 2, n. 4, p. 280–91, 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/mgg3.95>>. .

PAYNE, R.; TRIPP, M.; WEIGLE, J.; BODMER, W.; BODMER, J. A NEW LEUKOCYTE ISOANTIGEN SYSTEM IN MAN. **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology**, v. 29, p. 285–95, 1964. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14278475>>. .

PÊGO-FERNANDES, P. M.; GARCIA, V. D. Current status of transplantation in Brazil. **Sao Paulo medical journal = Revista paulista de medicina**, v. 128, n. 1, p. 3–4, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20512272>>. .

PELTZER, J.; MONTESPAÑ, F.; THEPENIER, C.; et al. Heterogeneous functions of perinatal mesenchymal stromal cells require a preselection before their banking for clinical use. **Stem cells and development**, v. 24, n. 3, p. 329–44, 2015. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/scd.2014.0327>>. .

PERICO, N.; CASIRAGHI, F.; INTRONA, M.; et al. Autologous mesenchymal stromal cells and kidney transplantation: a pilot study of safety and clinical feasibility. **Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN**, v. 6, n. 2, p. 412–22, 2011. Disponível em: <<http://cjasn.asnjournals.org/cgi/doi/10.2215/CJN.04950610>>. .

PIOTTI, G.; PALMISANO, A.; MAGGIORE, U.; BUZIO, C. Vascular endothelium as a target of immune response in renal transplant rejection. **Frontiers in immunology**, v. 5, n. OCT, p. 505, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25374567>>. .

POLÁKOVÁ, K.; BANDŽUCHOVÁ, E.; RUSS, G. Impact of blood processing on estimation of soluble HLA-G. **Neoplasma**, v. 58, n. 4, p. 337–42, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21520991>>. .

PORTO, I. O. P.; MENDES-JUNIOR, C. T.; FELÍCIO, L. P.; et al. MicroRNAs targeting the immunomodulatory HLA-G gene: a new survey searching for microRNAs with potential to regulate HLA-G. **Molecular immunology**, v. 65, n. 2, p. 230–41, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2015.01.030>>. .

PRATSCHKE, J.; DRAGUN, D.; HAUSER, I. A.; et al. Immunological risk assessment: The key to individualized immunosuppression after kidney transplantation. **Transplantation reviews (Orlando, Fla.)**, v. 30, n. 2, p. 77–84, 2016. The Authors. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trre.2016.02.002>>. .

PREZELIN-REYDIT, M.; COMBE, C.; HARAMBAT, J.; et al. Prolonged dialysis duration is associated with graft failure and mortality after kidney transplantation: results from the French transplant database. **Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, n. March, p. 1–7, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29579221>>. .

PRUCKLER, J. M.; LAWLEY, T. J.; ADES, E. W. Use of a human microvascular endothelial cell line as a model system to evaluate cholesterol uptake. **Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology**, v. 61, n. 5–6, p. 283–7, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8297494>>. .

QIU, J.; TERASAKI, P. I.; MILLER, J.; et al. Soluble HLA-G expression and renal graft acceptance. **American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons**, v. 6, n. 9, p. 2152–6, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16780545>>. .

RAACHE, R.; BELANTEUR, K.; AMROUN, H.; et al. Association of major histocompatibility complex class 1 chain-related gene A dimorphism with type 1 diabetes and latent autoimmune diabetes in adults in the Algerian population. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 4, p. 557–561, 2012.

RACCA, A. L.; VEAUTE, C. M.; BAILAT, A. S.; et al. Expression of HLA-G and MICA mRNA in renal allograft. **Transplant Immunology**, v. 21, n. 1, p. 10–12, 2009. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trim.2009.01.002>>. .

RACKI, W. J.; COVASSIN, L.; BREHM, M.; et al. NOD-scid IL2rgamma(null) mouse model of human skin transplantation and allograft rejection. **Transplantation**, v. 89, n. 5, p. 527–36, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2901915/>>. .

RAJAGOPALAN, S.; BRYCESON, Y. T.; KUPPUSAMY, S. P.; et al. Activation of NK cells by an endocytosed receptor for soluble HLA-G. **PLoS biology**, v. 4, n. 1, p. e9, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16366734>>. .

RAJAGOPALAN, S.; LONG, E. O. KIR2DL4 (CD158d): An activation receptor for HLA-G. **Frontiers in immunology**, v. 3, n. AUG, p. 258, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22934097>>. .

RAJASEKARAN, A.; SHIVAKUMAR, V.; KALMADY, S. V.; et al. The impact of HLA-G 3' UTR variants and sHLA-G on risk and clinical correlates of schizophrenia. **Human immunology**, v. 77, n. 12, p. 1166–1171, 2016. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2016.08.013>>. .

RAO, P. S.; SCHAUBEL, D. E.; GUIDINGER, M. K.; et al. A comprehensive risk quantification score for deceased donor kidneys: the kidney donor risk index. **Transplantation**, v. 88, n. 2, p. 231–6, 2009. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00007890-200907270-00013>>. .

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. 37692–9, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11477091>>. .

REBMANN, V.; BARTSCH, D.; WUNSCH, A.; et al. Soluble total human leukocyte antigen class I and human leukocyte antigen-G molecules in kidney and kidney/pancreas transplantation. **Human immunology**, v. 70, n. 12, p. 995–9, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19651178>>. .

REBMANN, V.; KÖNIG, L.; NARDI, F. DA S.; et al. The Potential of HLA-G-Bearing Extracellular Vesicles as a Future Element in HLA-G Immune Biology. **Frontiers in immunology**, v. 7, n. MAY, p. 173, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27199995>>. .

REBMANN, V.; LEMAOULT, J.; ROUAS-FREISS, N.; CAROSELLA, E. D.; GROSSE-WILDE, H. Report of the Wet Workshop for quantification of soluble HLA-G in Essen, 2004. **Human Immunology**, v. 66, n. 8, p. 853–863, 2005.

REBMANN, V.; NARDI, S.; WAGNER, B.; HORN, P. A. HLA-G as a Tolerogenic Molecule in Transplantation and Pregnancy. **Journal of Immunology Research**, v. 2014, 2014. Hindawi Publishing Corporation.

REBMANN, V.; PFEIFFER, K.; PÄSSLER, M.; et al. Detection of soluble HLA-G molecules in plasma and amniotic fluid. **Tissue Antigens**, v. 53, n. 1, p. 14–22, 1999.

REBMANN, V.; PFEIFFER, K.; PÄSSLER, M.; et al. Detection of soluble HLA-G molecules in plasma and amniotic fluid. **Tissue antigens**, v. 53, n. 1, p. 14–22, 1999. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1034/j.1399-0039.1999.530102.x>>. .

REBMANN, V.; SWITALA, M.; EUE, I.; et al. Rapid evaluation of soluble HLA-G levels in supernatants of in vitro fertilized embryos. **Human immunology**, v. 68, n. 4, p. 251–8, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17400060>>. .

RISTI, M.; BICALHO, M. DA G. MICA and NKG2D: Is There an Impact on Kidney Transplant Outcome? **Frontiers in immunology**, v. 8, n. FEB, p. 179, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28289413>>. .

RISTICH, V.; LIANG, S.; ZHANG, W.; WU, J.; HORUZSKO, A. Tolerization of dendritic cells by HLA-G. **European journal of immunology**, v. 35, n. 4, p. 1133–42, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15770701>>. .

RIZZARI, M. D.; SUSZYNSKI, T. M.; GILLINGHAM, K. J.; MATAS, A. J. Consideration of donor age and human leukocyte antigen matching in the setting of multiple potential living kidney donors. **Transplantation**, v. 92, n. 1, p. 70–5, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21659945>>. .

RIZZO, R.; TRENTINI, A.; BORTOLOTTI, D.; et al. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) generates soluble HLA-G1 by cell surface proteolytic shedding. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 381, n. 1–2, p. 243–55, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23737137>>. .

ROBINSON, J.; HALLIWELL, J. A.; HAYHURST, J. D.; et al. The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases. **Nucleic acids research**, v. 43, n. Database issue, p. D423–31, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25414341>>. .

ROBINSON, K. A.; CANDAL, F. J.; SCOTT, N. A.; ADES, E. W. Seeding of vascular grafts

with an immortalized human dermal microvascular endothelial cell line. **Angiology**, v. 46, n. 2, p. 107–13, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7702194>>. .

ROSENBERGER, L. H.; GILLEN, J. R.; HRANJEC, T.; et al. Donor risk index predicts graft failure reliably but not post-transplant infections. **Surgical infections**, v. 15, n. 2, p. 94–8, 2014. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/sur.2013.035>>. .

ROSTAING, L.; KAMAR, N. Can we prevent donor-specific antibodies from developing after ABO-incompatible kidney transplantation? **Kidney international**, v. 85, n. 2, p. 245–7, 2014. Elsevier Masson SAS. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24487367>>. .

ROUSSEAU, P.; DISCORDE, M. LE; MOUILLOT, G.; et al. 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. 1005–10, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14602228>>. .

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 reviews**, v. 59, n. 4, p. 289–359, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18160700>>. .

RUDSTEIN-SVETLICKY, N.; LOEWENTHAL, R.; HOREJSI, V.; GAZIT, E. HLA-G levels in serum and plasma. **Tissue antigens**, v. 67, n. 2, p. 111–6, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16441481>>. .

SABBAGH, A.; LUISI, P.; CASTELLI, E. C.; et al. Worldwide genetic variation at the 3' untranslated region of the HLA-G gene: balancing selection influencing genetic diversity. **Genes and immunity**, v. 15, n. 2, p. 95–106, 2014. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/finder/10.1038/gene.2013.67>>. .

SACRAMENTO, W. S. DO; MAZINI, P. S.; FRANCESCHI, D. A. S.; et al. Frequencies of MICA alleles in patients from southern Brazil with multibacillary and paucibacillary leprosy. **International journal of immunogenetics**, v. 39, n. 3, p. 210–5, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22168250>>. .

SANDNER, S. E.; CLARKSON, M. R.; SALAMA, A. D.; et al. Role of the programmed death-1 pathway in regulation of alloimmune responses in vivo. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 174, n. 6, p. 3408–15, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15749874>>. .

SANTOS, P. S. C.; SCHINEMANN, J. A.; GABARDO, J.; BICALHO, M. DA G. New evidence that the MHC influences odor perception in humans: a study with 58 Southern Brazilian students. **Hormones and behavior**, v. 47, n. 4, p. 384–8, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15777804>>. .

SANTOS, P. S. C.; SEKI UEHARA, C. J.; ZIEGLER, A.; UCHANSKA-ZIEGLER, B.; BICALHO, M. DA G. Variation and linkage disequilibrium within odorant receptor gene clusters linked to the human major histocompatibility complex. **Human immunology**, v. 71, n. 9, p. 843–50, 2010. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2010.06.011>>. .

SATCHELL, S. C.; BRAET, F. Glomerular endothelial cell fenestrations: an integral

component of the glomerular filtration barrier. **American journal of physiology. Renal physiology**, v. 296, n. 5, p. F947-56, 2009. Disponível em: <<http://ajprenal.physiology.org/content/296/5/F947>>. .

SAUNDERS, P. M.; VIVIAN, J. P.; O'CONNOR, G. M.; et al. A bird's eye view of NK cell receptor interactions with their MHC class I ligands. **Immunological reviews**, v. 267, n. 1, p. 148–66, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26284476>>. .

SCHMIDT, C. M.; EHLENFELDT, R. G.; ATHANASIOU, M. C.; et al. 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 (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 151, n. 5, p. 2633–45, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8360483>>. .

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, n. 2, p. 163–89, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14525967>>. .

SCHWARTZ, R. H. Natural regulatory T cells and self-tolerance. **Nature immunology**, v. 6, n. 4, p. 327–30, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15785757>>. .

SCORNIK, J. C.; MEIER-KRIESCHE, H.-U. Blood transfusions in organ transplant patients: mechanisms of sensitization and implications for prevention. **American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons**, v. 11, n. 9, p. 1785–91, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21883910>>. .

SCOTT, P. A.; BICKNELL, R. The isolation and culture of microvascular endothelium. **Journal of cell science**, v. 105 (Pt 2, p. 269–73, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8408265>>. .

SEPARAVICH, M. A.; CANESQUI, A. M. Saúde do homem e masculinidades na Política Nacional de Atenção Integral à Saúde do Homem: uma revisão bibliográfica. **Saúde e Sociedade**, v. 22, n. 2, p. 415–428, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-12902013000200013&lng=pt&tlng=pt>. .

SHAIKLY, V. R.; MORRISON, I. E. G.; TARANISSI, M.; et al. Analysis of HLA-G in maternal plasma, follicular fluid, and preimplantation embryos reveal an asymmetric pattern of expression. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 180, n. 6, p. 4330–7, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18322247>>. .

SHAN, J.; FENG, L.; LUO, L.; et al. MicroRNAs: potential biomarker in organ transplantation. **Transplant immunology**, v. 24, n. 4, p. 210–5, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trim.2011.03.004>>. .

SHARMA, A.; RUDRA, D. Emerging Functions of Regulatory T Cells in Tissue Homeostasis. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 883, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29887862>>. .

SHERRY, S. T.; WARD, M. H.; KHOLODOV, M.; et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 1, p. 308–11, 2001. Disponível em:

<<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/29.1.308>>. .

SHESHGIRI, R.; RAO, V.; TUMIATI, L. C.; et al. Progesterone induces human leukocyte antigen-g expression in vascular endothelial and smooth muscle cells. **Circulation**, v. 118, n. 14 Suppl, p. S58-64, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18824770>>.

SHIROISHI, M.; TSUMOTO, K.; AMANO, K.; et al. 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. 8856–61, 2003. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0043205005&partnerID=tZOtx3y1>>. .

SHULTZ, L. D.; BREHM, M. A.; GARCIA-MARTINEZ, J. V.; GREINER, D. L. Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges. **Nature reviews. Immunology**, v. 12, n. 11, p. 786–98, 2012. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nri3311>>. .

SHULTZ, L. D.; ISHIKAWA, F.; GREINER, D. L. Humanized mice in translational biomedical research. **Nature reviews. Immunology**, v. 7, n. 2, p. 118–30, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17259968>>. .

SHULTZ, L. D.; LYONS, B. L.; BURZENSKI, L. M.; et al. Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 174, n. 10, p. 6477–89, 2005. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.174.10.6477>>. .

SILVA, J. S. DA; WOWK, P. F.; POERNER, F.; SANTOS, P. S. C.; BICALHO, M. DA G. Absence of strong linkage disequilibrium between odorant receptor alleles and the major histocompatibility complex. **Human immunology**, v. 74, n. 12, p. 1619–23, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23974053>>. .

SILVA, M. B. DA; CUNHA, F. F. DA; TERRA, F. F.; CAMARA, N. O. S. Old game, new players: Linking classical theories to new trends in transplant immunology. **World journal of transplantation**, v. 7, n. 1, p. 1–25, 2017. Disponível em: <<http://www.wjgnet.com/2220-3230/full/v7/i1/1.htm>>. .

SIMPSON, E. Medawar's legacy to cellular immunology and clinical transplantation: a commentary on Billingham, Brent and Medawar (1956) "Quantitative studies on tissue transplantation immunity. III. Actively acquired tolerance". **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 370, n. 1666, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25750245>>. .

SING-LEUNG, L. An Update on Immunosuppressive Medications in Transplantation. **Journal of Kidney**, v. 06, n. 04, 2001. Disponível em: <<https://www.omicsonline.org/open-access/an-update-on-crossmatch-techniques-in-transplantation-2472-1220-1000160-97525.html>>. .

SINGER, G.; REBMANN, V.; CHEN, Y.-C.; et al. HLA-G is a potential tumor marker in malignant ascites. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 9, n. 12, p. 4460–4, 2003. Disponível em:

<<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/9/12/4460.abstract>>. .

SIS, B. Endothelial molecules decipher the mechanisms and functional pathways in antibody-mediated rejection. **Human immunology**, v. 73, n. 12, p. 1218–25, 2012. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2012.07.332>>. .

SIS, B.; CAMPBELL, P. M.; MUELLER, T.; et al. Transplant glomerulopathy, late antibody-mediated rejection and the ABCD tetrad in kidney allograft biopsies for cause. **American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons**, v. 7, n. 7, p. 1743–52, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17564636>>. .

SNELL, G. D. Methods for the study of histocompatibility genes. **Journal of genetics**, v. 49, n. 2, p. 87–108, 1948. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18893744>>. .

SOLIER, C.; MALLET, V.; LENFANT, F.; et al. HLA-G unique promoter region: functional implications. **Immunogenetics**, v. 53, n. 8, p. 617–25, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16236759>>. .

SPERANDEI, S. Understanding logistic regression analysis. **Biochemia medica**, v. 24, n. 1, p. 12–8, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24627710>>. .

STEINLE, A.; LI, P.; MORRIS, D. L.; et al. Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. , p. 279–287, 2001.

STEINLE, A.; LI, P.; MORRIS, D. L.; et al. Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. **Immunogenetics**, v. 53, n. 4, p. 279–87, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11491531>>. .

STROWIG, T.; CHIJOKE, O.; CARREGA, P.; et al. Human NK cells of mice with reconstituted human immune system components require preactivation to acquire functional competence. **Blood**, v. 116, n. 20, p. 4158–67, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20671122>>. .

STUBBENDORFF, M.; DEUSE, T.; HUA, X.; et al. Immunological properties of extraembryonic human mesenchymal stromal cells derived from gestational tissue. **Stem cells and development**, v. 22, n. 19, p. 2619–29, 2013. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/scd.2013.0043>>. .

TAFLIN, C.; CHARRON, D.; GLOTZ, D.; MOONEY, N. Immunological function of the endothelial cell within the setting of organ transplantation. **Immunology letters**, v. 139, n. 1–2, p. 1–6, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21641935>>. .

TAIT, B. D. Detection of HLA Antibodies in Organ Transplant Recipients - Triumphs and Challenges of the Solid Phase Bead Assay. **Frontiers in immunology**, v. 7, n. DEC, p. 570, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28018342>>. .

TAMAKI, S.; SANEFUZI, N.; OHGI, K.; et al. An association between the MICA-A5.1 allele and an increased susceptibility to oral squamous cell carcinoma in Japanese patients. **Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology**, v. 36, n. 6, p. 351–6, 2007.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17559497>>. .

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. 3619–28, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11797094>>. .

TANG, A. H.; PLATT, J. L. Accommodation of grafts: implications for health and disease. **Human immunology**, v. 68, n. 8, p. 645–51, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17678718>>. .

TAYLOR, A. L.; WATSON, C. J. E.; BRADLEY, J. A. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 56, n. 1, p. 23–46, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16039869>>. .

TERASAKI, P. I. A personal perspective: 100-year history of the humoral theory of transplantation. **Transplantation**, v. 93, n. 8, p. 751–6, 2012. Disponível em: <<papers2://publication/uuid/2339AACD-9D92-4ABD-807A-35DC47367B56>>. .

TONNERRE, P.; GÉRARD, N.; CHATELAIS, M.; et al. MICA variant promotes allosensitization after kidney transplantation. **Journal of the American Society of Nephrology: JASN**, v. 24, n. 6, p. 954–66, 2013. Disponível em: <<http://www.jasn.org/cgi/doi/10.1681/ASN.2012080814>>. .

TONNERRE, P.; GÉRARD, N.; GAVLOVSKY, P.-J.; et al. MICA Mutant A5.1 Influences BK Polyomavirus Reactivation and Associated Nephropathy After Kidney Transplantation. **The Journal of infectious diseases**, v. 214, n. 5, p. 807–16, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27130430>>. .

TRAGGIAI, E.; CHICHA, L.; MAZZUCHELLI, L.; et al. Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. **Science (New York, N.Y.)**, v. 304, n. 5667, p. 104–7, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15064419>>. .

TREIBER, T.; TREIBER, N.; MEISTER, G. Regulation of microRNA biogenesis and function. **Thrombosis and haemostasis**, v. 107, n. 4, p. 605–10, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22318703>>. .

TURK, W. J. R.; KIMANI, J.; BIELAWNY, T.; et al. Associations of human leukocyte antigen-G with resistance and susceptibility to HIV-1 infection in the Pumwani sex worker cohort. **AIDS (London, England)**, v. 27, n. 1, p. 7–15, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23032415>>. .

ULBRECHT, M.; MAIER, S.; HOFMEISTER, V.; et al. Truncated HLA-G isoforms are retained in the endoplasmic reticulum and insufficiently provide HLA-E ligands. **Human immunology**, v. 65, n. 3, p. 200–8, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15041158>>. .

VARGAS, R. G.; SARTURI, P. R.; MATTAR, S. B.; et al. Association of HLA-G alleles and 3' UTR 14 bp haplotypes with recurrent miscarriage in Brazilian couples. **Human Immunology**, v. 72, n. 6, p. 479–485, 2011.

VEIT, T. D.; CHIES, J. A. B. Tolerance versus immune response -- microRNAs as important

elements in the regulation of the HLA-G gene expression. **Transplant immunology**, v. 20, n. 4, p. 229–31, 2009. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trim.2008.11.001>>. .

VEN, K. VAN DER; PFEIFFER, K.; SKRABLIN, S. HLA-G polymorphisms and molecule function--questions and more questions--a review. **Placenta**, v. 21 Suppl A, p. S86-92, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10831130>>. .

VLAD, G.; SUCIU-FOCA, N. Induction of antigen-specific human T suppressor cells by membrane and soluble ILT3. **Experimental and molecular pathology**, v. 93, n. 3, p. 294–301, 2012. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2012.09.011>>. .

WANG, J.; PANTOPOULOS, K. Regulation of cellular iron metabolism. **The Biochemical journal**, v. 434, n. 3, p. 365–81, 2011. Disponível em: <<http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BJ20101825>>. .

WARREN, E. H.; ZHANG, X. C.; LI, S.; et al. Effect of MHC and non-MHC donor/recipient genetic disparity on the outcome of allogeneic HCT. **Blood**, v. 120, n. 14, p. 2796–806, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22859606>>. .

WELLS, A D.; LI, X. C.; STROM, T. B.; TURKA, L. A. The role of peripheral T-cell deletion in transplantation tolerance. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 356, n. 1409, p. 617–23, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11375065>>. .

WIEBE, C.; GIBSON, I. W.; BLYDT-HANSEN, T. D.; et al. Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant. **American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons**, v. 12, n. 5, p. 1157–67, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22429309>>. .

WIEMANN, K.; MITTRÜCKER, H.-W.; FEGER, U.; et al. Systemic NKG2D down-regulation impairs NK and CD8 T cell responses in vivo. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 175, n. 2, p. 720–9, 2005. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.175.2.720>>. .

WIENDL, H. HLA-G in the Nervous System. **Human Immunology**, v. 68, n. 4, p. 286–293, 2007.

WILCZYŃSKI, J. R. Immunological analogy between allograft rejection, recurrent abortion and pre-eclampsia - the same basic mechanism? **Human immunology**, v. 67, n. 7, p. 492–511, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16829304>>. .

WOJCIECHOWSKI, D.; VINCENTI, F. Belatacept for prevention of acute rejection in adult patients who have had a kidney transplant: an update. **Biologics : targets & therapy**, v. 6, p. 385–93, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3496190&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

WOOD, K. J.; SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. **Nature reviews. Immunology**, v. 3, n. 3, p. 199–210, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12658268>>. .

WU, J.; ZHANG, W.; HERNANDEZ-LOPEZ, P.; et al. Isoforms of human leukocyte antigen-G and their inhibitory receptors in human kidney allograft acceptance. **Human immunology**, v. 70, n. 12, p. 988–94, 2009. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2009.07.023>>. .

XU ET AL. 1994. HDMEC - XU et al., 1994.pdf. .

YAMAKUCHI, M.; KIRKILES-SMITH, N. C.; FERLITO, M.; et al. Antibody to human leukocyte antigen triggers endothelial exocytosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 4, p. 1301–6, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17229850>>. .

YANG, J.; CHANG, E.; CHERRY, A. M.; et al. Human endothelial cell life extension by telomerase expression. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 37, p. 26141–8, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10473565>>. .

YAO, G.-D.; SHU, Y.-M.; SHI, S.-L.; et al. Expression and potential roles of HLA-G in human spermatogenesis and early embryonic development. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e92889, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24667226>>. .

YIE, S.; LI, L.; LI, G.; XIAO, R.; LIBRACH, C. L. Progesterone enhances HLA-G gene expression in JEG-3 choriocarcinoma cells and human cytotrophoblasts in vitro. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 21, n. 1, p. 46–51, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16210391>>. .

YIE, S. M.; LI, L. H.; LI, G. M.; XIAO, R.; LIBRACH, C. L. Progesterone enhances HLA-G gene expression in JEG-3 choriocarcinoma cells and human cytotrophoblasts in vitro. **Human Reproduction**, v. 21, n. 1, p. 46–51, 2006.

YIE, S.; XIAO, R.; LIBRACH, C. L. Progesterone regulates HLA-G gene expression through a novel progesterone response element. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 21, n. 10, p. 2538–44, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16684846>>. .

ZAMBRA, F. M. B.; BIOLCHI, V.; CERQUEIRA, C. C. S. DE; et al. Immunogenetics of prostate cancer and benign hyperplasia--the potential use of an HLA-G variant as a tag SNP for prostate cancer risk. **HLA**, v. 87, n. 2, p. 79–88, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26889902>>. .

ZARKHIN, V.; BEZCHINSKY, M.; LI, L.; SARWAL, M. M. Soluble human leukocyte antigen-G in pediatric renal transplantation. **Transplantation**, v. 92, n. 1, p. e1-2, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21691191>>. .

ZEEVI, A.; LUNZ, J. G.; SHAPIRO, R.; et al. Emerging role of donor-specific anti-human leukocyte antigen antibody determination for clinical management after solid organ transplantation. **Human immunology**, v. 70, n. 8, p. 645–50, 2009. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2009.06.009>>. .

ZHANG, W.-Q.; XU, D.-P.; LIU, D.; et al. HLA-G1 and HLA-G5 isoforms have an additive effect on NK cytotoxicity. **Human immunology**, v. 75, n. 2, p. 182–9, 2014. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2013.11.001>>. .

ZHANG, W.; LIANG, S.; WU, J.; HORUZSKO, A. Human inhibitory receptor immunoglobulin-like transcript 2 amplifies CD11b+Gr1+ myeloid-derived suppressor cells that promote long-term survival of allografts. **Transplantation**, v. 86, n. 8, p. 1125–34, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20402989>>. .

ZHANG, Y.; LAZARO, A. M.; ZOU, Y.; et al. MICA polymorphism in South American Indians. **Immunogenetics**, v. 53, n. 10–11, p. 900–6, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11862390>>. .

ZHAO, L.; TEKLEMARIAM, T.; HANTASH, B. M. Reassessment of HLA-G isoform specificity of MEM-G/9 and 4H84 monoclonal antibodies. **Tissue antigens**, v. 80, n. 3, p. 231–8, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22738368>>. .

ZOU, Y.; STASTNY, P. Alternatively spliced forms of MICA and MICB lacking exon 3 in a human cell line and evidence of presence of similar RNA in human peripheral blood mononuclear cells. **Immunogenetics**, v. 54, n. 9, p. 671–4, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12466900>>. .

APÊNDICE A - TCLE DOS PACIENTES NÃO TRANSPLANTADOS COM DOENÇA RENAL CRÔNICA E DOS PACIENTES TRANSPLANTADOS



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) com idade igual ou superior a 18 anos, a participar do estudo intitulado "Estudo do efeito de produtos moleculares e de genótipos de genes associados com a evolução pós-transplante, prognóstico e episódios de rejeição em pacientes transplantados renais", que visa analisar a "OCORRÊNCIA DE VARIAÇÃO EM GENES e o MONITORAMENTO DE MOLECULAS PRODUZIDAS PARTIR DESTES GENES EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS". A tipagem destes genes 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 relevantes que diferenciem pacientes transplantados renais de pacientes não transplantados auxiliando no diagnóstico de eventos de rejeição.

a) O objetivo desta pesquisa é investigar a possível relação entre a tolerância ou não ao transplante e genes associados a resposta imune, monitorando também, via quantificação, moléculas produzidas a partir destes genes 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 transplante, ou mesmo para outras pessoas que venham a necessitar de transplante, os resultados obtidos com este estudo poderão auxiliar no diagnóstico de eventos de rejeição.

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 obter dados de 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-DPB1 (realizada na rotina do pré-transplante), existência de doenças basais e realização de transfusão(s) sanguínea(s) prévia.

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal _____

Pesquisadores Responsáveis _____

Orientador _____ Orientados _____

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



- d) Cada paciente 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 N° 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, Doutoranda responsável por este estudo: Vanessa Hauer - <vanessa.hauer@yahoo.com>, Doutoranda: Matilde Risti - <matilderisti@gmail.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 _____

Pesquisadores Responsáveis _____

Orientador _____ Orientados _____

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 POS-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 trará 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^a Fabiana L. C. Contieri, Orientadora deste estudo: Prof^a. Dr^a. Maria da Graça Bicalho, Doutoranda responsável por este estudo: Vanessa Hauer, Doutoranda: Matilde Risti, 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 e autorizo o acesso ao meu prontuário.

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

Curitiba, ____ de _____ 20__

Assinatura dos Pesquisadores Responsáveis

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

APÊNDICE B - TCLE DOS INDIVÍDUOS DO GRUPO CONTROLE



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) com idade igual ou superior a 18 anos, saudável, não gestante, não portador de doença renal crônica e não transplantado, a participar do estudo intitulado "Estudo do efeito de produtos moleculares e de genótipos de genes associados com a evolução pós-transplante, prognóstico e episódios de rejeição em pacientes transplantados renais", que visa analisar a "OCORRÊNCIA DE VARIAÇÃO EM GENES e o MONITORAMENTO DE MOLECULAS PRODUZIDAS PARTIR DESTES GENES EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS". A tipagem destes genes 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 relevantes que diferenciem pacientes transplantados renais de indivíduos saudáveis auxiliando no diagnóstico de eventos de rejeição.

a) O objetivo desta pesquisa é investigar a possível relação entre a tolerância ou não ao transplante e genes associados a resposta imune, monitorando também, via quantificação, moléculas produzidas a partir destes genes 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 transplante, ou mesmo para outras pessoas que venham a necessitar de transplante, os resultados obtidos com este estudo poderão auxiliar no diagnóstico de eventos de rejeição.

c) Optando por participar desta pesquisa, será necessário o fornecimento de uma amostra de sangue, a qual será colhida mediante campanha de recrutamento voluntário. Também será necessária a coleta de alguns dados através de questionário que será aplicado no momento do recrutamento. Os dados a serem coletados serão: nome completo, informações para re-contato (endereço, telefone e e-mail), sexo, data de nascimento, estatura, peso, etnia, tipo sanguíneo ABO, fator Rh, existência de doenças de base não renal, tipo de medicação de uso contínuo adotada e realização de transfusão(s) sanguínea(s) prévia. Indivíduos do sexo feminino recrutadas terão os seguintes dados reprodutivos coletados: número de gestações, número de abortos, fase do período reprodutivo em que se encontram e anticoncepcionais adotados.

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal _____

Pesquisadores Responsáveis _____

Orientador _____ Orientados _____

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 POS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



- d) Cada paciente 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 mediante campanha de recrutamento voluntário 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 e nos locais de sensibilização disponibilizados para campanha. Os procedimentos serão realizados pela farmacêutica-bioquímica apta Suelen Camargo Zeck (CRF: 22400, <suelenzeck@gmail.com>). 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 será voluntária.
- 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, Doutoranda responsável por este estudo: Vanessa Hauer - <vanessa.hauer@yahoo.com>, Doutoranda: Matilde Pisti - <matilderisti@gmail.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 _____

Pesquisadores Responsáveis _____

Orientador _____ Orientados _____

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 trará prejuízo para o(a) Sr(a).

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^a Fabiana L. C. Contieri, Orientadora deste estudo: Prof^a. Dr^a. Maria da Graça Bicalho, Doutoranda responsável por este estudo: Vanessa Hauer, Doutoranda: Matilde Risti, 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 de 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 divulgada 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 Responsável

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

APÊNDICE C - INSTRUMENTO DE AVALIAÇÃO APLICADO AOS INDIVÍDUOS DO GRUPO CONTROLE



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



INSTRUMENTO DE AVALIAÇÃO

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

INFORMAÇÕES PARA RECONTATO

Telefone residencial: _____ Telefone celular: _____

Endereço residencial: _____ Cidade/Estado: _____

Endereço de e-mail: _____

INFORMAÇÕES A SEREM UTILIZADAS NA PESQUISA

Data de nascimento: _____ Peso: _____ Altura: _____

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

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

DOENÇAS / CONDIÇÕES CRÔNICAS

- | | | |
|---|--|---|
| ☐ hipertensão arterial | ☐ pedras no rim (cálculo) | ☐ hipercolesterolemia |
| ☐ diabetes <i>mellitus</i> congênita | ☐ tabagista | ☐ hipertireoidismo |
| ☐ diabetes <i>mellitus</i> adquirida | ☐ ex-tabagista | ☐ hipotireoidismo |
| ☐ histórico - doença de chagas | ☐ histórico - toxoplasmose | ☐ histórico - hepatite |
| ☐ herpes - EBV (Vírus Epstein-Barr) | ☐ HIV | ☐ câncer |
| ☐ outras doenças/condições | ☐ doença auto-imune diversa | |

Qual (s)? _____ Qual(s)? _____

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

a) _____	d) _____	g) _____
b) _____	e) _____	h) _____
c) _____	f) _____	i) _____

QUESTÕES APENAS A SEREM RESPONDIDAS PELAS MULHERES

Em qual período reprodutivo se encontra? ☐ período fértil ☐ perimenopausa ☐ menopausa

Número de gestações: ☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ou mais

Número de abortos: ☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ou mais

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

No momento está grávida? Sim ☐ / Não ☐

Método(s) contraceptivo(s) adotado(s)? ☐ pílula ☐ DIU ou SIU ☐ anel vaginal
☐ preservativo ☐ injeção anticoncepcional ☐ nenhum

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal _____

Pesquisadores Responsáveis _____

Orientador _____ Orientados _____

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

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO PROJETO DE PESQUISA

UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ -



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: INVESTIGAÇÃO DE POTENCIAIS BIOMARCADORES PARA O PROGNÓSTICO DA ACEITAÇÃO DE ALOENXERTO RENAL

Pesquisador: Maria da Graça Bicalho

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 3

CAAE: 53627315.0.0000.0102

Instituição Proponente: Programa de Pós-Graduação em Genética

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

FUND COORD DE APERFEICOAMENTO DE PESSOAL DE NIVEL SUP

Programa de Pós-Graduação em Genética

Universidade Federal do Paraná - Setor de Ciências da Saúde/ SCS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.891.312

Apresentação do Projeto:

Estudo intitulado "INVESTIGAÇÃO DE POTENCIAIS BIOMARCADORES PARA O PROGNÓSTICO DA ACEITAÇÃO DE ALOENXERTO RENAL" sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria da Graça Bicalho e com colaboração de ALESSANDRO PIRRI, Eni Alcantara Picchioni (Bompeixe), FABIANA LOSS DE CARVALHO CONTIERI, JOSE SAMUEL DA SILVA, Matilde Risti, Renata Slowik, Vanessa Hauer e Suelen com doença renal crônica não transplantados também será realizado pelas enfermeiras aproveitando as mesmas coletas de monitoramento pré-transplante.

Este estudo ora apresentado é parte complementar de projeto intitulado: GENÓTIPOS HLA-G E NIVEIS PLASMÁTICOS DE sHLA-G EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS E SUA RELAÇÃO COM A EVOLUÇÃO DO PÓS-TRANSPLANTE e já aprovado por este CEP sob CAAE: 12386313.9.0000.0102).

Objetivo da Pesquisa:

Investigar fenótipos/genótipos com potencial de biomarcadores que estejam associados a HLA-G, HLA-C e MICA no contexto da resposta imune em pacientes transplantados renais.

Objetivos Específicos

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Terreo

Bairro: Alto da Glória

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

CEP: 80.060-240

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ -



Continuação do Parecer: 1.891.312

Determinar os genótipos dos genes HLA-G, HLA-C e KIR, MICA e NKGD2, os quais são genes relevantes para o desenvolvimento da resposta imune. Estes genes serão analisados fenotipicamente e genotipicamente em 300 pacientes transplantados renais e seus doadores, em 300 pacientes com doença renal crônica não transplantados e em 300 indivíduos saudáveis. Serão estabelecidas as frequências alélicas e genotípicas destes genes. Os produtos dos genes analisados encontrados nos fluidos biológicos (como sangue, suor, saliva e urina) dos participantes recrutados também serão quantificados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Esta pesquisa não trará risco aos indivíduos constituintes dos grupos amostrais, além do desconforto ocasionado pela coleta de amostra de sangue. É importante ressaltar que a equipe de enfermagem disposta para recrutamento e coleta está apta para contornar o desconforto da coleta de amostra, além de estar disponível a prestar esclarecimentos sobre a pesquisa.

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, dados provenientes do instrumento de avaliação ou das amostras coletadas, os quais serão codificados de modo a proteger a identidade dos indivíduos recrutados.

Não existirão benefícios num curto prazo aos participantes. Porém num prazo maior de tempo, caso estes participantes realizem novos transplantes 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 os protocolos de manutenção pós-transplante com o intuito de aumentar a sobrevida do aloenxerto.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisadora principal, Profa. Dra. Maria da Graça Bicalho apresenta uma emenda ao projeto em tela tendo em vista alteração no grupo de médicos responsáveis pelo Setor de Transplantes no Hospital Universitário Evangélico de Curitiba. O segundo motivo da emenda, foi a adição do Hospital Angelina Caron como instituição co-participante. Com isso, tivemos de reanalisar todos os nossos documentos anexos à Plataforma Brasil e os atualizar. Assim, perante o apresentado e em respeito aos novos participantes, solicitamos a colocação de todos os nomes envolvidos em novo parecer com o desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

Pesquisador Principal:

Drª Profa. Maria da Graça Bicalho

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo

Bairro: Alto da Glória

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

CEP: 80.060-240

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

**UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ -**



Continuação do Parecer: 1.891.312

Colaboradores:

Colaboradores:

Pesquisadores e estudantes do Programa de Pós-Graduação em Genética da UFPR -

Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade - LIGH: Doutoranda Matilde Risti, Doutoranda Vanessa Hauer e Mestranda Bruna Laís Maurício de Miranda.

Colaboradores pertencentes ao LIGH: Profa. Dra. Eni Alcantara Picchioni, Profa. Dra. Danielle Malheiros Ferreira Msc. Alessandro Pirri, farmacêutica-bioquímica Suelen Camargo Zeck, Msc. José Samuel da Silva, Msc. Renata Slowik, e Dra. Geórgia Fernanda Gelmini.

Hospital Universitário Evangélico de Curitiba - HUEC: Dra. Carolina Maria Pozzi e Dr. Maurus Vinicius Stier Serpe.

Hospital Angelina Caron - HAC: Dr. Carlos Gustavo Ving Chong Marrnanillo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram originalmente anexados.

Recomendações:

Ver considerações finais

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pesquisador Principal: Profa. Dra. Maria da Graça Bicalho

Colaboradores:

Pesquisadores e estudantes do Programa de Pós-Graduação em Genética da UFPR -

Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade - LIGH: Doutoranda Matilde Risti, Doutoranda Vanessa Hauer e Mestranda Bruna Laís Maurício de Miranda.

Colaboradores pertencentes ao LIGH: Profa. Dra. Eni Alcantara Picchioni, Profa. Dra. Danielle Malheiros Ferreira Msc. Alessandro Pirri, farmacêutica-bioquímica Suelen Camargo Zeck, Msc. José Samuel da Silva, Msc. Renata Slowik, e Dra. Geórgia Fernanda Gelmini.

Hospital Universitário Evangélico de Curitiba - HUEC: Dra. Carolina Maria Pozzi e Dr. Mauru Vinicius Stier Serpe.

Hospital Angelina Cruron - HAC: Dr. Carlos Gustavo Wing Chong Marmanillo.

Emenda e Justificativa aceitas.

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

**UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ -**



Continuação do Parecer: 1.891.312

Projeto em condições de ser aprovado

É obrigatório retirar na secretaria do CEP/SD uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com carimbo onde constará data de aprovação por este CEP/SD, sendo este modelo reproduzido para aplicar junto ao participante da pesquisa.

O TCLE deverá conter duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma cópia ficará com o participante da pesquisa (Carta Circular nº. 003/2011CONEP/CNS).

Considerações Finais a critério do CEP:

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais e final, sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos, através da Plataforma Brasil - no modo: NOTIFICAÇÃO. Demais alterações e prorrogação de prazo devem ser enviadas no modo EMENDA. Lembrando que o cronograma de execução da pesquisa deve ser atualizado no sistema Plataforma Brasil antes de enviar solicitação de prorrogação de prazo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_845506_E2.pdf	16/12/2016 17:33:32		Aceito
Outros	2016_12_16_Emendaassinada.pdf	16/12/2016 17:31:05	Vanessa Hauer	Aceito
Outros	Carta_Justificativa_Emenda.pdf	29/08/2016 17:51:21	Vanessa Hauer	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_CEP_CORRIGIDO_Setembro_2016.doc	11/08/2016 11:25:17	Vanessa Hauer	Aceito
Outros	Check_List_2016.pdf	10/08/2016 11:32:20	Vanessa Hauer	Aceito
Outros	3_Analise_de_Merito.pdf	10/08/2016 11:31:25	Vanessa Hauer	Aceito
Outros	2_Oficio_de_Encaminhamento_de_Ata_de_Aprovacao.pdf	10/08/2016 11:30:49	Vanessa Hauer	Aceito

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo
Bairro: Alto da Glória
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-7259

CEP: 80.060-240

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

**UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ -**



Continuação do Parecer: 1.891.312

Outros	2_Ata_de_Aprovacao_do_Projeto.pdf	10/08/2016 11:30:03	Vanessa Hauer	Aceito
Declaração de Pesquisadores	11_Termo_de_Compromisso_para_Inicio_da_Pesquisa.pdf	10/08/2016 11:27:43	Vanessa Hauer	Aceito
Declaração de Pesquisadores	9_Declaracao_de_Tornar_Publico_os_Resultados.pdf	10/08/2016 11:27:27	Vanessa Hauer	Aceito
Declaração de Pesquisadores	8_Termo_de_Confidencialidade.pdf	10/08/2016 11:26:46	Vanessa Hauer	Aceito
Declaração de Pesquisadores	4_Declaracao_de_Concordancia_do_Orientador.pdf	10/08/2016 11:26:35	Vanessa Hauer	Aceito
Declaração de Pesquisadores	1_Oficio_do_Pesquisador_ao_CEP.pdf	10/08/2016 11:26:13	Vanessa Hauer	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	6_Concordancia_da_Instituicoes_Coparticipantes.pdf	10/08/2016 11:25:21	Vanessa Hauer	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	13_Termo_de_Compromisso_para_a_Utilizacao_de_Dados_ou_Arquivos.pdf	10/08/2016 11:24:56	Vanessa Hauer	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	12_Termo_de_Guarda_de_Material_Biologico.pdf	10/08/2016 11:24:32	Vanessa Hauer	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	10_Declaracao_de_uso_Especifico_de_Material_Dados_Coletados.pdf	10/08/2016 11:24:13	Vanessa Hauer	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	15_TCLE_Saudaveis_2016.doc	10/08/2016 11:21:47	Vanessa Hauer	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	15_TCLE_HAC_2016.doc	10/08/2016 11:20:53	Vanessa Hauer	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	15_TCLE_HUEC_2016.doc	10/08/2016 11:20:42	Vanessa Hauer	Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto.pdf	22/05/2015 05:56:51		Aceito
Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_909407.pdf	27/03/2015 11:43:08		Aceito

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ -



Continuação do Parecer: 1.891.312

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 16 de Janeiro de 2017

Assinado por:
IDA CRISTINA GUBERT
(Coordenador)

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Terreo

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br