

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**

DAIANI CRISTINA CILIÃO ALVES

**Polimorfismo Gênico de HLA-G, HLA-C, IL-18, INF- γ e TNF e
Expressão de HLA-G na Tolerância
ao Alotransplante Renal**

**Ribeirão Preto
2010**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**

DAIANI CRISTINA CILIÃO ALVES

**Polimorfismo Gênico de HLA-G, HLA-C, IL-18, INF- γ e TNF e
Expressão de HLA-G na Tolerância
ao Alotransplante Renal**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
como parte dos requisitos necessários para a
obtenção do título de Mestre em Imunologia**

**Área de Concentração: Imunologia Básica e
aplicada**

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Antonio Donadi

**Ribeirão Preto
2010**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Alves, Daiani Cristina Cilião

Polimorfismo Gênico de HLA-G, HLA-C, IL-18, INF- γ e TNF e Expressão de HLA-G na Tolerância ao Alotransplante Renal

154p., :II; 30 cm

Tese de mestrado apresentado à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP
– Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientador: Eduardo Antonio Donadi

1. Alotransplante renal. 2. Polimorfismo. 3. HLA-G. 4. Citocinas.

ALVES, D. C. C. Polimorfismo Gênico de HLA-G, HLA-C, IL-18, INF- γ e TNF e Expressão de HLA-G na Tolerância ao Alotransplante Renal. Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Imunologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Agradecimentos

Agradecimentos tenho muitos, agradecimentos a pessoas que contribuíram diretamente no meu mestrado, em meu trabalho e ao meu conhecimento, e indiretamente por pequenos e importantes gestos acrescentando ao meu crescimento pessoal nessa etapa que realizei este trabalho que como tudo na vida não se faz sozinho.

Agradeço primeiramente ao Pai, meu senhor Deus pela minha vida e por todas as oportunidades a mim concedidas, oportunidades como essa de realizar mais um sonho, o de me tornar mestre, de conhecer pessoas maravilhosas e com elas aprimorar ainda mais minha paixão pelo conhecimento e de certa forma contribuir na ciência e na saúde das pessoas. Obrigada meu Pai Deus!

Agradeço á toda minha família, em especial a mamãe Marlene, papai João†, ao meu irmão Francisco (Kiko) e irmãs Deborah, Kelly e Rita por todo infinito amor, essencial apoio, todo carinho e companheirismo, pela educação a mim dada, pelo conforto e compreensão nas horas difíceis, que foram e são de importância inestimável em todos os momentos e sentidos da minha vida. Obrigada família que eu tanto amo!

Obrigado especial ao meu namorado Rodrigo que eu amo muito muito muito, pelo amor e carinho, pelo apoio e companheirismo, pelos conselhos e compreensão que são essenciais para minha felicidade plena e que de todas as formas influenciaram nessa etapa tão importante. Obrigada Lindo!

Obrigada a todos os meus amigos que conviveram comigo nessa etapa, a amizade me fortalece, contribui para meu crescimento e faz com que a vida seja plenamente diferente. Obrigada pela verdadeira amizade, pelo companheirismo, pelas festas, pelas risadas e lágrimas. Obrigada especialmente as amigas mais companheiras Andressa, Gabriela, Marcela, Mariane, Nathália. Obrigada aos meus amigos menos presentes, mas não menos importante Ana Cláudia, Andre, Alexandre, Antonio, Bruno, Carol (principalmente por me aconselhar a ir para imuno), Dalila, Dani, Danilo, Elisa, Elyara, Felipe, Fernanda, Flora, Germano,

Juliana, Kamila, Lucas, Maria Fernanda, Mario, Marta, Maurício, Mariane, Rafael Torres, Ricardo, Ronai, Tony (Beraba), Virginia, Virginia Picanço, Viviane, Willian. Obrigada as amigas da faculdade que de longe se fizeram presentes Amanda, Fernanda, Franciele, Gisele, Juliana, Joyce e Melina. A todos os amigos Obrigada!

Obrigada ao meu orientador Dr. Eduardo Antonio Donadi e a minha Co-orientadora Dra. Janaina Cristina de Oliveira Crispim pelos conhecimentos, estímulos, conselhos, críticas, pela confiança em mim depositada e por colaborarem de forma segura neste trabalho;

Obrigada aos colaboradores Dra. Luciana Tanajura Saber e ao Dr. Roberto Costa e as respectivas equipes da UTR-HC (Enfermeiras Raquel, Michele, Andréia, Débora e inúmeros Técnicos de Enfermagem) e ao Laboratório de Patologia da FMRP (Fábio e Flávio). Aos colaboradores e respectivas equipes Obrigada!

Obrigada aos colegas de laboratório (HLA-Hemocentro-FMRP, Imunologia Moléculas-HC-FMRP, Imunologia Moléculas-Anexo-HC-FMRP, e Citologia-UNESP-Araraquara) pelo aprendizado e companheirismo. Obrigada Alessandra, Ana Paula, Breno, Celso, Elviane, Erick, Gustavo, Gustavo, Isabela, João, Neife, Rafael Cita, Rafael Albuquerque, Renata, Rubens, Sandra, Taize, Tarsia e Yara. A todos os colegas de trabalho Obrigada!

Obrigada a Ana, secretária da Imunologia pelas informações e pelo imenso apoio e carinho sempre dedicado a todos os alunos e professores da Imunologia;

Obrigada aos membros da banca de qualificação, Dr. Geraldo Passos, Dr. Fabrício e Dr. Sandro pela disponibilidade e conselhos;

Obrigada aos membros da banca examinadora pela presença, sugestões e correções;

Obrigada aos funcionários da Biblioteca do Hemocentro, Rodrigo, Cíntia e Guilherme, pelo apoio e estrutura que me forneceram.

ALVES, D. C. C. Polimorfismo Gênico de HLA-G, HLA-C, IL-18, INF- γ e TNF e Expressão de HLA-G na Tolerância ao Alosttransplante Renal. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, Ribeirão Preto, 2010.

RESUMO

O transplante renal é o tratamento de escolha para pacientes com doença renal em estágio final. O sucesso para a aceitação de transplante alogênico é dependente da interação de diversos mecanismos imunológicos e genéticos. Dentre os mecanismos relacionados com indução de tolerância, a molécula HLA-G é relatada como moduladora da sinalização extracelular. Diversos sítios genéticos presentes no éxon 8 do gene HLA-G têm sido associados com a expressão do HLA-G, incluindo a inserção/deleção 14-pb e as variações nucleotídicas pontuais +3142 G/C e +3187 G/A. Além do HLA-G, a molécula HLA-C também pode influenciar o curso do transplante, modulando as células do sistema imune, particularmente as células natural killer, cujos receptores podem interagir com as moléculas HLA. Além dessas moléculas, as citocinas IL-18, INF- γ e TNF podem influenciar na modulação da resposta imune frente ao aloenxerto renal, algumas delas modulando a expressão de HLA-G. Neste estudo, foram analisados diversos sítios polimórficos (DNA amplificado hibridado com iniciadores sequência específicos ou sequenciamento de bases nucleotídicas) nos genes que codificam as moléculas HLA-G (14pb D/I, +3003 C/T, +3010 G/C, +3027 A/C, + 3035 C/T, +3142 G/C e +3187 G/A), HLA-C (éxons 2 e 3), IL-18 (-137 C/G e -607 A/G), INF- γ (+874 T/A) e TNF (-308 A/G) em 116 pacientes submetidos ao aloenxerto renal, estratificados segundo a presença de Rejeição aguda (RA; n=17), Rejeição crônica (RC; n=52), Rejeição total (R; n=69) e Sem rejeição (SR; n=47), e ainda, Controles sadios (C; n=202). Em adição, foi avaliada a expressão de HLA-G em biópsias renais, utilizando-se imunohistoquímica, correlacionando-se com os sítios polimórficos avaliados. A análise estatística foi realizada utilizando os softwares Genopop 3,4 e GraphPad InStat. Os resultados mostraram que apesar de ocorrer maior frequência de expressão de HLA-G em aloenxertos renais SR em relação aos com R, não houve diferença significativa. Nos polimorfismos do HLA-G, houve maior frequência do genótipo +3035 CC e menor do +3035 CT na CR e maior frequência do genótipo +3187 GA na R. Quanto à frequência alélica de HLA-Cw, encontramos que o alelo Cw2 é fator de risco para RA, os alelos Cw3 e Cw15 fatores de risco para RC, enquanto os alelos Cw7 e Cw12 fatores de proteção. De acordo com os polimorfismos das citocinas, encontramos que o genótipo -137 CC da IL-18 foi mais frequente na CR e o genótipo -137 GG (alto produtor) menos frequente na RA, enquanto que os genótipos +874 TT do INF- γ e -308 AG do TNF foram mais frequentes na rejeição. Com relação à influência desses fatores na expressão de HLA-G no enxerto renal, na rejeição os alelos Cw4 e Cw14 foram relacionados com ausência da expressão de HLA-G, enquanto que o Cw6 foi relacionado com maior expressão de HLA-G. No grupo SR o alelo Cw4 foi associado com aumento da expressão de HLA-G. Desta forma, diversos sítios polimórficos dos genes HLA-G, HLA-C, IL-18, INF- γ e TNF estiveram associados com a presença de rejeição, no entanto, somente os alelos de HLA-C foram associados com a expressão de HLA-G no aloenxerto renal. Por outro lado, a interação de moléculas tolerogênicas como HLA-G com as citocinas de padrão pró- ou antiinflamatórias precisam ser mais bem estudados quanto aos perfis genéticos e imunológicos na tolerância ao aloenxerto.

Palavras chaves: Polimorfismo Gênico, HLA-G, HLA-C, IL-18, INF- γ , TNF, Alosttransplante Renal

ALVES, D. C. C. HLA-G, HLA-C, IL-18, INF- γ and TNF polymorphism and expression of HLA-G in renal allograft tolerance. Master Thesis - Faculty of Medicine of Ribeirao Preto - USP, Ribeirão Preto, 2010.

ABSTRACT

Renal transplantation is the treatment of choice for patients with end-stage renal disease. Success for the acceptance of allogenic transplantation is dependent on the interaction of several genetic and immunological mechanisms. Among the mechanisms related to tolerance induction, the HLA-G molecule is reported as a modulator of extracellular signaling. Several genetic sites present at the exon 8 of HLA-G gene have been associated with the expression of HLA-G, including the 14-bp nucleotide insertion / deletion and the +3142 G / C and +3187 G / A single nucleotide polymorphisms. Besides HLA-G, HLA-C molecule may also influence the course of transplantation, by modulating the immune system cells, particularly natural killer cells, whose receptors interact with HLA molecules. In addition to these molecules, the cytokines IL-18, IFN- γ and TNF may influence the modulation of the immune response against the renal allograft, some of them modulating the expression of HLA-G. In this study, we analyzed several polymorphic sites (amplified DNA hybridized with sequence specific primers or sequencing of nucleotide bases) in the genes that code the HLA-G molecules (14bp Del / In, +3003 C / T, +3010 G / C + 3027 A / C, C + 3035 / T, +3142 G (+874) and TNF (- γ / C and +3187 G / A), HLA-C, IL-18 (-137 and -607), INF- 238 and -308) in 116 patients undergoing renal allograft, stratified according to the presence of acute rejection (AR, n = 17), chronic rejection (CR, n = 52), total rejection (R, n = 69) and no rejection (NR, n = 47), and also healthy controls (C, n = 202). In addition, we evaluated the expression of HLA-G in renal biopsies, using immunohistochemistry, correlating with the polymorphic sites studied. Statistical analysis was performed using the software Genopop 3.4 and GraphPad InStat. The results showed that although higher expression of HLA-G occur in kidney allografts with NR compared to those with R, no significant difference was observed. Polymorphisms in the HLA-G showed higher frequency of the CC genotype and lower of the +3035 +3035 CT genotypes in CR, and higher frequency of the +3187 GA genotype in R. With respect to HLA-Cw allele frequency, the Cw2 allele was observed as a risk factor for AR, and Cw3 and Cw15 alleles as risk factors for CR, while the Cw12 and Cw7 alleles were associated as protective factors. According to the cytokine polymorphisms, we found that the -137 CC genotype of IL-18 was more frequent in CR and the -137 GG genotype (high producer) less frequent. The TNF -308 AG and +874 TT INF- γ genotypes were more frequent in rejection. Regarding the major influence of these factors on the expression of HLA-G in renal specimens, the Cw4 and Cw14 alleles were associated with absence of HLA-G expression in the rejection group, whereas Cw6 was associated with higher expression of HLA-G in the rejection group. In the NR group, the Cw4 allele was associated with increased expression of HLA-G. In conclusion, several polymorphic sites of the HLA-G, HLA-C, IL-18, INF- γ and TNF genes were associated with the presence of rejection, however, only the HLA-C alleles were associated with expression of HLA-G in the renal allograft. Moreover, the interaction of tolerogenic molecules like HLA-G with cytokines of pro- or antiinflammatory patterns needs to be further studied regarding the genetic and immunological profiles on the tolerance to renal allograft.

Keywords: Gene polymorphism, renal allograft, HLA-G, HLA-C, IL-18, INF- γ , TNF.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mecanismos de reconhecimento de aloantígenos direto e indireto.....	19
Figura 2 -	Características das proteínas HLA-G solúveis e de membrana.....	24
Figura 3-	Comparação de elementos regulatórios cis das regiões promotoras proximais dos HLA clássicos de classe I e HLA-G.....	29
Figura 4 -	Fluxograma da estratégia experimental. Cada procedimento contém a identificação do item e se encontra descrito em Material e Métodos.....	51
Figura 5 -	Expressão de HLA-G em aloenxertos renais.....	72
Figura 6 -	Estrutura genética da região 3' NT do locus do HLA-G.....	74
Figura 7 -	Gel de eletroforese da amplificação da região 3' NT do HLA-G.....	75
Figura 8 -	Cromatograma do sequenciamento da inserção/deleção dos 14 pb da região 3' NT do HLA-G.....	75
Figura 9 -	Cromatograma do sequenciamento dos SNPs +3003 C/T, +3010 G/C, +3027 A/C e +3035 C/T da região 3' NT do HLA-G.....	76
Figura 10 –	Amplificação do PCR-SSP para a posição -137 C/G em gel de acrilamida.....	91
Figura 11 –	Amplificação do PCR-SSP para a posição -607 A/C em gel de acrilamida.....	91
Figura 12 –	Amplificação do PCR-SSP para a posição +874 A/T em gel de acrilamida.....	97
Figura 13 –	Amplificação do PCR-SSP para a posição -238 A/G em gel de acrilamida.....	100
Figura 14 –	Amplificação do PCR-SSP para a posição -308 A/G em gel de acrilamida.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Haplótipos região 3'NT do locus HLA-G e os alelos do HLA-G associados com cada haplótipo.....	35
Tabela 2-	Conversão sorológica das tipificações moleculares de HLA-Cw.....	38
Tabela 3 -	Tabela de HLA-C e seus receptores KIR.....	39
Tabela 4 -	Iniciadores para detecção dos polimorfismos da região 3' NT do HLA-G.....	55
Tabela 5 -	Reagentes e concentrações utilizadas para a amplificação da região 3' NT do HLA-G.....	55
Tabela 6 -	Condições de amplificação da região 3' NT do HLA-G.....	56
Tabela 7 -	Condições de amplificação HLA -A, -B, Cw e -DR.	57
Tabela 8 -	Reagentes utilizados para a amplificação dos SNPs -607 A/C e -137 C/G da IL-18.....	58
Tabela 9 -	Iniciadores para detecção do polimorfismo do SNP -607 A/C da IL-18.....	58
Tabela 10 -	Iniciadores para detecção do polimorfismo do SNP -137 C/G da IL-18.....	59
Tabela 11 -	Condições de amplificação do SNP -607 A/C da IL-18.....	59
Tabela 12 -	Condições de amplificação do SNP -137 C/G da IL-18.....	59
Tabela 13 -	Condições para eletroforese de cada SNP da IL-18.....	60
Tabela 14 -	Seqüências dos primers necessários para reação de tipificação do polimorfismo do SNP +874 A/T do gene do INF- γ	60
Tabela 15 -	Reagentes necessários para uma reação de tipificação do polimorfismo do SNP +874 A/T do gene do INF- γ	60
Tabela 16 -	Perfil de ciclagem do SNP +874 A/T do gene do INF- γ	61
Tabela 17 -	Iniciadores para detecção dos polimorfismos das SNPs -238 A/G do gene do TNF.....	61
Tabela 18 -	Iniciadores para detecção dos polimorfismos das SNPs -308 A/G do gene do TNF.....	62

Tabela 19 -	Concentrações de reagentes utilizados para a amplificação das SNPs -308 A/G do TNF.....	62
Tabela 20 -	Reagentes utilizados para a amplificação das SNPs -238 A/G do TNF.....	63
Tabela 21 -	Perfil de ciclagem do SNP -308 A/G do TNF.....	63
Tabela 22 -	Perfil de ciclagem do SNP -238 A/G do TNF.....	63
Tabela 23 -	Condições para eletroforese de cada loco polimórfico estudado.....	64
Tabela 24 -	Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes submetidos ao aloenxerto renal.....	68
Tabela 25 -	Frequência da expressão de HLA-G no aloenxerto renal de pacientes transplantados.....	73
Tabela 26 -	Probabilidade da expressão de HLA-G no enxerto de pacientes transplantados renais.....	73
Tabela 27 -	Frequência alélica e genotípica do 14pb da região 3'NT do HLA-G.....	77
Tabela 28 -	Probabilidade alélica e genotípica da posição 14pb da região 3' NT do HLA-G entre os pacientes transplantados renais e controle.....	77
Tabela 29 -	Frequência alélica e genotípica posição +3003 da região 3' NT do HLA-G.....	77
Tabela 30 -	Probabilidade alélica e genotípica da posição +3003 da região 3' NT do HLA-G entre os pacientes transplantados renais e controle.....	78
Tabela 31 -	Frequência alélica e genotípica do +3010 da região 3'NT do HLA-G.....	78
Tabela 32 -	Probabilidade alélica e genotípica da posição +3010 da região 3' NT do HLA-G entre os pacientes transplantados renais e controle.....	79
Tabela 33 -	Frequência alélica e genotípica do +3027 da região 3' NT do HLA-G.....	79

Tabela 34 -	Probabilidade alélica e genotípica da posição +3027 da região 3' NT do HLA-G entre os pacientes transplantados renais e controle.....	79
Tabela 35 -	Frequência alélica e genotípica do +3035 da região 3' NT do HLA-G.....	80
Tabela 36 -	Probabilidade alélica e genotípica da posição +3035 da região 3' NT do HLA-G entre os pacientes transplantados renais e controle.....	80
Tabela 37 -	Frequência alélica e genotípica do +3142 da região 3' NT do HLA-G.....	80
Tabela 38 -	Probabilidade alélica e genotípica da posição +3142 da região 3' NT do HLA-G entre os pacientes transplantados renais e controle.....	81
Tabela 39 -	Frequência alélica e genotípica do +3187 da região 3' NT do HLA-G.....	81
Tabela 40 -	Probabilidade alélica e genotípica da posição +3187 da região 3' NT do HLA-G entre os pacientes transplantados renais e controle.....	82
Tabela 41 -	Probabilidades do teste exato de desequilíbrio de ligação (LD) para todos os sítios polimórficos detectados da região 3' NT do HLA-G (LD: $p < 0.005$).....	82
Tabela 42 -	Haplótipos encontrados na região 3'NT do gene HLA-G.....	83
Tabela 43 -	Frequência haplotípica da região 3'NT do HLA-G entre os pacientes transplantados renais e controle.....	83
Tabela 44 -	Probabilidade haplotípica da região 3' NT do HLA-G entre os pacientes transplantados renais e controle.....	83
Tabela 45 -	Frequência e probabilidade haplotípica da região 3'NT do HLA-G em relação à expressão de HLA-G no aloenxerto renal.....	84
Tabela 46 -	Frequência alélica do HLA-Cw na tolerância ao aloenxerto renal.....	86
Tabela 47 -	Probabilidade dos alelos de HLA-Cw entre os diferentes grupos de pacientes transplantados renais e controle.....	88

Tabela 48 -	Frequência alélica dos grupos C1 e C2 do HLA-Cw na tolerância ao aloenxerto renal.....	89
Tabela 49 -	Probabilidade da frequência dos grupos C1 e C2 do HLA-Cw na tolerância ao aloenxerto renal.....	89
Tabela 50 -	Frequência e probabilidade haplotípica da HLA-Cw em relação à expressão de HLA-G no aloenxerto renal.....	90
Tabela 51 -	Frequência alélica e genotípica da posição -137 C/G da IL-18 nos pacientes transplantados renais.....	92
Tabela 52 -	Probabilidade alélica e genotípica da posição -137 C/G da IL-18 nos pacientes transplantados renais e controle.....	93
Tabela 53 -	Frequência alélica e genotípica da posição -607 A/C da IL-18 nos pacientes transplantados renais.....	93
Tabela 54 -	Probabilidade alélica e genotípica da posição -607 A/C nos pacientes transplantados renais.....	94
Tabela 55 -	Probabilidade e frequência gênica e alélica do SNP - 137 da IL-18 em relação à expressão de HLA-G no aloenxerto renal.....	95
Tabela 56 -	Probabilidade e frequência gênica e alélica do SNP -607 da IL-18 em relação à expressão de HLA-G no aloenxerto renal.....	96
Tabela 57 -	Frequência alélica e genotípica da posição +874 A/T do INF- γ nos pacientes transplantados renais.....	98
Tabela 58 -	Probabilidade alélica e genotípica da posição +874 A/T nos pacientes transplantados renais.....	98
Tabela 59 -	Frequência e probabilidade alélica e genotípica do SNP +874 do INF- γ em relação à expressão de HLA-G no aloenxerto renal.....	99
Tabela 60 -	Frequência alélica e genotípica da posição -238 A/G do TNF nos pacientes transplantados renais.....	101
Tabela 61 -	Probabilidade alélica e genotípica da posição -238 A/G do TNF nos pacientes transplantados renais.....	101
Tabela 62 -	Frequência alélica e genotípica da posição -308 A/G do TNF em pacientes transplantados renais.....	102

Tabela 63 -	Probabilidade alélica e genotípica da posição -308 A/G do TNF nos pacientes transplantados renais.....	102
Tabela 64-	Frequência e probabilidade alélica e genotípica do SNP -238 do TNF em relação à expressão de HLA-G no aloenxerto renal.....	103
Tabela 65 -	Frequência e probabilidade alélica e genotípica do SNP -308 do TNF em relação à expressão de HLA-G no aloenxerto renal.....	104

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Frequência alélica do HLA-Cw na tolerância ao aloenxerto renal.....	87
-------------	---	----

APÊNDICE

Apêndice A -	Frequência da expressão de HLA-G no aloenxerto de pacientes transplantados renais.....	145
Apêndice B -	Frequência genotípica do 14pb da região 3'NT do HLA-G.....	145
Apêndice C -	Frequência genotípica do SNP +3010 da região 3'NT do HLA-G.....	145
Apêndice D -	Frequência genotípica do SNP +3035 da região 3'NT do HLA-G.....	146
Apêndice E -	Frequência genotípica do SNP +3187 da região 3'NT do HLA-G.....	146
Apêndice F -	Probabilidade e frequência dos genótipos de haplótipos da região 3'NT do HLA-G em relação à expressão de HLA-G no aloenxerto renal.....	147
Apêndice G -	Probabilidade e frequências alélicas e genotípicas do fragmento de inserção/ deleção dos 14 pb da região 3'NT do HLA-G em relação à expressão de HLA-G no aloenxerto renal.....	148
Apêndice H -	Probabilidade e frequências alélica e genotípicas do SNP +3003 da região 3'NT do HLA-G em relação à expressão de HLA-G no aloenxerto renal.....	149
Apêndice I -	Probabilidade e frequências alélica e genotípicas do SNP +3010 da região 3'NT do HLA-G em relação à expressão de HLA-G no aloenxerto renal.....	150
Apêndice J -	Probabilidade e frequências alélica e genotípicas do SNP +3027 da região 3'NT do HLA-G em relação à expressão de HLA-G no aloenxerto renal.....	151
Apêndice L -	Probabilidade e frequências alélica e genotípicas do SNP +3035 da região 3'NT do HLA-G em relação à expressão de HLA-G no aloenxerto renal.....	152
Apêndice M -	Probabilidade e frequências alélica e genotípicas do SNP +3142 da região 3'NT do HLA-G em relação à expressão de HLA-G no aloenxerto renal.....	153
Apêndice N -	Probabilidade e frequências alélica e genotípicas do SNP +3187 da região 3'NT do HLA-G em relação à expressão de HLA-G no aloenxerto renal.....	154

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. <i>Transplante renal</i>	18
1.2. <i>HLA-G</i>	21
1.3. <i>HLA-Cw</i>	37
1.4. <i>Citocinas, Polimorfismo e Transplante Renal</i>	41
1.4.1. <i>Interleucina-18</i>	42
1.4.2. <i>IFN-γ</i>	44
1.4.3. <i>TNF</i>	45
2. OBJETIVOS	49
2.1. <i>Objetivos gerais</i>	49
2.2. <i>Objetivos específicos</i>	49
3. MATERIAIS E MÉTODOS	51
3.1. <i>Indivíduos estudados</i>	52
3.2. <i>Biópsias renais</i>	52
3.3. <i>Análise histológica</i>	52
3.4. <i>Expressão protéica de HLA-G de membrana no enxerto renal</i>	53
3.5. <i>Extração de DNA</i>	54
3.6. <i>Polimorfismo da região 3'NT do gene HLA-G</i>	55
3.7. <i>Tipificação dos Genes HLA por PCR-SSP</i>	56
3.8. <i>Polimorfismo gênico da IL-18</i>	57
3.9. <i>Polimorfismo gênico do INF-γ</i>	60
3.10. <i>Polimorfismo gênico do TNF</i>	61
3.11. <i>Análise dos resultados</i>	64
4. RESULTADOS	67
4.1. <i>Indivíduos estudados</i>	67
4.2. <i>Expressão protéica de HLA-G de membrana no enxerto renal</i>	67
4.3. <i>Polimorfismo da região 3'NT do gene HLA-G</i>	73
4.4. <i>Tipificação dos Genes HLA -A, -B, -DR e -Cw.</i>	85
4.5. <i>Polimorfismo gênico da IL-18</i>	91
4.5.1 <i>Influência do polimorfismo gênico da IL-18 na rejeição do aloenxerto renal</i>	92
4.5.2 <i>Influência do polimorfismo gênico da IL-18 na expressão de HLA-G no enxerto renal</i>	94
4.6. <i>Polimorfismo gênico do INF-γ</i>	96

4.6.1. Influência do polimorfismo gênico do <i>INF-γ</i> na Rejeição ao aloenxerto renal	96
4.6.2. Influência do polimorfismo gênico do <i>INF-γ</i> na Expressão de HLA-G no aloenxerto renal	98
4.7. Polimorfismo gênico do TNF	99
4.7.1. Influência do polimorfismo gênico do TNF na Rejeição ao aloenxerto renal.....	100
4.7.2. Influência do polimorfismo gênico do TNF na expressão de HLA-G no aloenxerto renal	103
5. DISCUSSÃO	106
5.1. Expressão de HLA-G de membrana no aloenxerto renal	106
5.2. Polimorfismo da região 3'NT do HLA-G	107
5.3. Tipificação dos Genes HLA -A, -B, -DR e -Cw	111
5.4. Polimorfismo da região promotora da IL-18	114
5.5 Polimorfismo da região promotora do <i>INF-γ</i>	116
5.6. Polimorfismo gênico do TNF	117
6. CONCLUSÕES.....	122
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	124



Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Transplante renal

O transplante de órgãos é o tratamento de escolha para vários casos de falência funcional de órgãos, havendo demanda crescente desse procedimento. No Brasil, no ano de 2004, foram realizados 3332 transplantes renais (Censo da Sociedade Brasileira de Nefrologia, 2009).

O desenvolvimento de novas drogas imunossupressoras, associada a melhores técnicas de preservação do órgão e aos cuidados com o paciente contribuíram significativamente para a melhora da sobrevida do enxerto em curto prazo, mas a meia vida do enxerto em longo prazo não aumentou significativamente (MEIER-KRIESCHE et al., 2004), indicando que ainda faltam muitos dados para o entendimento dos processos de rejeição.

A natureza imunológica da rejeição ao enxerto foi reconhecida há mais de quarenta anos, época em que Medawar e Gibson descreveram que enxerto de pele, transplantado entre indivíduos geneticamente díspares, rapidamente apresentavam alterações necróticas, sendo rejeitados. O processo de rejeição é específico, gerando células de memória contra o tecido do doador, havendo intenso infiltrado leucocitário (GIBSON; MEDAWAR, 1943; PAUL et al., 2003).

Respeitadas as rejeições hiperagudas, dependentes da presença de anticorpos pré-formados, a resposta imune do hospedeiro ao transplante alogênico é um fenômeno dependente primordialmente de células T. A resposta T alogênica pode ocorrer de duas maneiras distintas, não mutuamente exclusivas (HALLORAN, 1996). Durante o mecanismo de apresentação chamado de “direto”, moléculas intactas do MHC (complexo principal de histocompatibilidade) do aloenxerto, além de peptídeos derivados de proteínas endógenas, são apresentados as células T do receptor. No mecanismo “indireto”, aloantígenos são processados e apresentados, como alopeptídeos, pelas células apresentadoras de antígenos do receptor e dessa forma apresentadas as suas próprias células T (Figura 1)(SAYEGH; CARPENTER, 1997; MIRENDA et al., 2004).

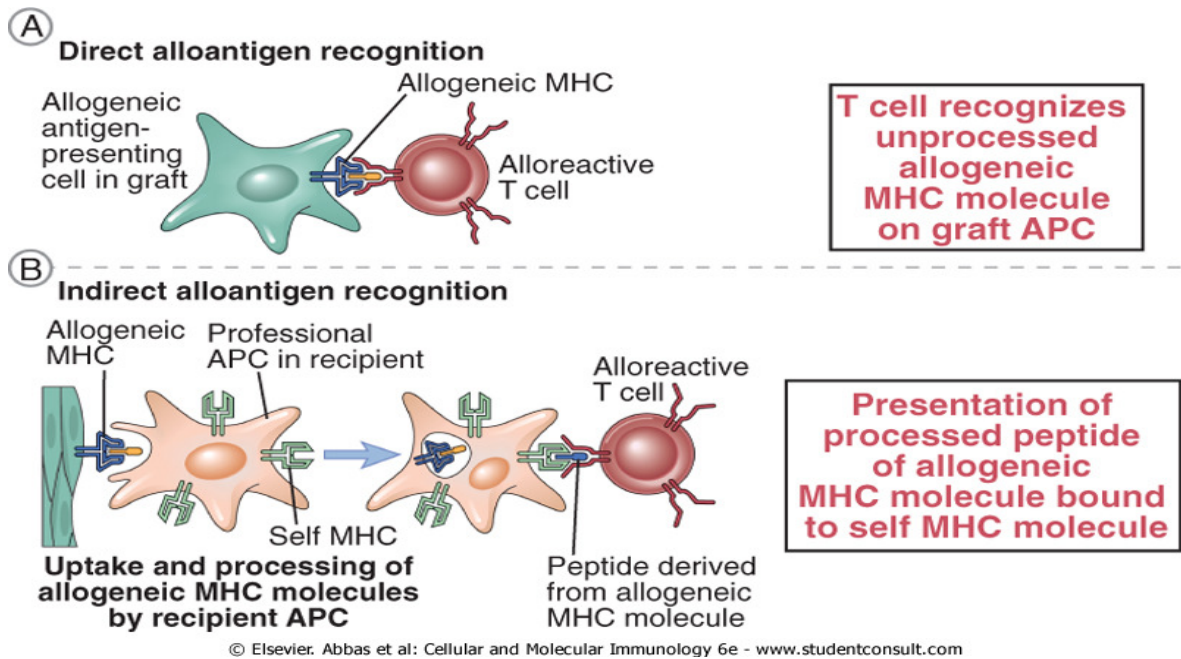


Figura 1 - Mecanismos de reconhecimento de aloantígenos direto e indireto. Fonte: ABBAS et al., 2008.

Acredita-se que, a combinação da Rejeição aguda e da nefropatia crônica do aloenxerto (*CAN - chronic allograft nephropathy*), associadas a não adesão ao tratamento imunossupressor, são causas importantes de perda do enxerto (AZUMA; TILNEY, 1994; PAUL, 1995).

A Rejeição aguda é caracterizada de acordo com três principais critérios: vasculite, tubulite e infiltração intersticial, como definido pela classificação de Banff 97 (RACUSSEN et al., 1999). A infiltração do interstício é composta principalmente por linfócitos T, macrófagos e monócitos (DESVAUX et al., 2004).

Os linfócitos T exercem papel central na Rejeição aguda. As células T ativadas provocam a lise direta das células do enxerto ou produzem citocinas que recrutam e ativam as células inflamatórias, que causam necrose (ANDERS et al., 2003). Nos enxertos vascularizados, como os de rins, as células endoteliais constituem o alvo inicial da Rejeição aguda (DESVAUX et al., 2004). No primeiro estágio da Rejeição aguda, ocorre inflamação do endotélio ou da íntima das artérias de médio calibre, que serve como o principal previsor de falha aguda do enxerto (ANDERS et al., 2003). Ademais, na Rejeição aguda, as subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ podem contribuir para o processo de rejeição, além da família de quimiocinas que favorece a resposta inflamatória (DESVAUX et al., 2004).

A CAN denominada, mais recentemente, pelo novo critério da classificação Banff 2005 (SOLEZ et al., 2007), como um diagnóstico diferencial da lesão crônica do aloenxerto, é caracterizada por fibrose com perda das estruturas normais do órgão, ocorrendo em um prazo prolongado (BECKER et al., 2002). A patogenia da CAN é menos conhecida e, em muitos casos, resulta da proliferação de células da íntima do músculo liso, favorecendo a ocorrência de oclusão arterial do enxerto (REGELE et al., 2002). Esse processo é chamado arteriosclerose acelerada do enxerto, sendo frequentemente observada nos transplante cardíacos e renais mal sucedidos, podendo se desenvolver 6 meses a 1 ano após o transplante (BECKER et al., 2002). Nos rins, essa manifestação inclui obliteração vascular progressiva, glomeruloesclerose, atrofia tubular e fibrose, conduzindo para falência do órgão, e nenhum protocolo imunossupressor tem sido eficaz em preveni-la (BÉRDARD et al., 2003).

Vários fatores de risco têm sido implicados na gênese e evolução da CAN e, dentre eles: destacando-se o grau de histocompatibilidade entre o doador e receptor, tempo de isquemia fria prolongada, frequência e intensidade dos episódios de Rejeição aguda, idade do doador, presença de infecção (principalmente por citomegalovírus-CMV) e dislipidemias (HAYRY; MENNANDER, 1992; HAYRY, 1996; BÉRDARD et al., 2003).

A rejeição ao aloenxerto ocorre devido ao reconhecimento das moléculas de HLA clássicas de classe I e II do doador pelos receptores de células T do receptor. A compatibilidade de HLA foi o primeiro fator relacionado ao doador a ser identificado como preditivo de mortalidade para pacientes transplantados. Sua descoberta permitiu a prática de dar preferência a doadores HLA-idêntidos ao invés de incompatíveis, confirmando assim que doadores não relacionados têm maiores complicações de aceitação do enxerto que doadores relacionados (revisado por ANASETTI, 2008).

Os pacientes transplantados têm diminuição gradual nas estimativas de sobrevivência de aproximadamente 10% para cada incompatibilidade adicional do doador dos locos de HLA-A, -B, -C ou -DR. No entanto o protocolo de seleção de doadores para transplante renal na maioria dos centros é a tipificação de HLA-A, -B e -DR, sendo o HLA-C é tipificado em poucos centros de transplante renal.

A indução de tolerância é o principal objetivo no transplante de órgãos (INMAN et al., 1998; MATHEW et al., 2000; WANG et al., 2001; MATHEW et al.,

2003). Muitos pacientes conseguem boa resposta ao enxerto sob tratamento médico, enquanto outros desenvolvem episódios de Rejeição aguda e sinais de CAN, sugerindo a participação de diversos mecanismos imunológicos e genéticos no controle desta resposta (DAVIES et al., 1996; NIKOLIC; SYKES, 1996; STARZL; DEMETRIS, 1998).

1.2. HLA-G

HLA-G: Gene, função e histórico

Os genes que compõem o Complexo Maior de Histocompatibilidade (*MHC - Major Histocompatibility Complex*) humano têm sido agrupados em regiões designadas de classe I, II e III, de acordo com as suas localizações no braço curto do cromossomo 6. Atualmente, são conhecidos mais de 40 loci no MHC humano (*HLA - Human Leukocyte Antigen*) codificando diversas moléculas, muitas delas diretamente envolvidas na resposta imune. A região de classe I engloba os loci HLA-A, B, C, E, F, G, H, J, K e L (LAWLOR et al., 1990; GERAGHTY, 1993; BODMER et al., 1995).

Embora os genes HLA-A, B e Cw codifiquem as moléculas clássicas de histocompatibilidade presentes em praticamente todas as células nucleadas (LAWLOR et al., 1990; SULLIVAN et al., 2006), os genes HLA-E e F codificam moléculas encontradas em tecidos fetais e em alguns tecidos da fase adulta (WEI; ORR, 1990; GERAGHTY, 1993; GERAGHTY et al., 1990; PYO et al., 2006), enquanto que os genes HLA-G são responsáveis pela síntese de moléculas presentes em tecidos do trofoblasto (LOKE; KING, 1991; KING, 2000; ISHITANI; GERAGHTY, 1992; PARHAM, 1996). O HLA-G, -E e -F são genes não clássicos de classe Ib do sistema HLA (GERAGHTY, 1993; PYO et al., 2006).

Os genes não clássicos Ib são caracterizados por apresentar baixo polimorfismo e distribuição restrita a determinados tecidos, sendo que seu papel vem sendo associado com a regulação da resposta imune (SULLIVAN et al., 2006).

Embora ambas as moléculas HLA clássicas e não-clássicas estejam ligadas a peptídeos, o HLA-G tem um repertório limitado de peptídeos. A pesquisa dos peptídeos isolados a partir de células da placenta revelou que 15% dos peptídeos ligados a molécula HLA-G eram derivadas de uma única proteína relacionadas à citocinas (ISHITANI et al., 2003), e peptídeos obtidos a partir de

células transfectadas eram derivados de um número restrito de proteínas, incluindo proteínas nucleares, histonas (H2A), receptores de citocinas e proteínas ribossomais (DIEHL et al., 1996; LEE et al., 1995). A conformação do complexo HLA-G-peptídeo ligado é semelhante ao observado para as moléculas clássicas, no entanto, o peptídeo é enterrado na fenda do HLA-G (revisto por CLEMENTS et al., 2007). Considerando as características do complexo HLA-G-peptídeo, e a ausência de relatos de HLA-G restritos a células T, a apresentação de peptídeos não é a principal função da molécula HLA-G. Aparentemente, os sítios polimórficos em torno da fenda peptídica não podem influenciar na função de apresentação de antígenos, no entanto, a estrutura molecular das proteínas distintas do HLA-G e os diferentes peptídeos não foram totalmente investigados.

Em relação aos mecanismos envolvidos na indução de tolerância, a molécula HLA-G é relatada como moduladora da sinalização extracelular. Essa molécula vem sendo intensivamente estudada em várias condições patológicas, tais como tumores (WIENDL et al., 2002; ROUAS-FREISS et al., 2005), doenças auto-imunes (MITSDOERFFER et al., 2005), transplante de órgãos (LILA et al., 2000; LILA et al., 2002; CRÉPUT et al., 2003a; CRÉPUT et al., 2003b, CRISPIM et al., 2008) e infecções virais (LOZANO et al., 2002; SOUTO et al., 2010).

O gene HLA-G foi primeiramente clonado em 1987 por Geraghty e colaboradores (GERAGHTY et al., 1987), mas só reconhecido em 1990, quando Ellis e colaboradores verificaram que a molécula atípica HLA de classe I, presente em abundância na interface materno-fetal, era idêntica ao HLA-G (ELLIS et al., 1990). Estudos posteriores confirmaram que o HLA-G era expresso em toda a interface celular, onde células maternas e fetais estavam em contato, por exemplo: células trofoblásticas invasivas, células do endotélio vascular fetal, células do âmnion e no líquido amniótico (LE BOUTEILLER et al., 1999).

As primeiras tentativas de elucidação da importância de HLA-G no controle da resposta imune resultaram de diversos estudos em complicações associadas à gravidez, tais como abortos espontâneos (HVIID et al., 2002; OBER et al., 2003; HVIID et al., 2004; HVIID, 2006). Outros pesquisadores investigam sua expressão nas células do citotrofoblasto, onde sua presença sugere indução de mecanismos de tolerância ao enxerto semi-alogênico fetal pelo sistema imune materno (ROUAS-FREISS et al., 1997).

HLA-G: Formas protéicas, expressão, mecanismos de ação e regulação

O processamento alternativo do mRNA de HLA-G origina múltiplas isoformas por meio da edição alternativa, a partir de um único transcrito primário do mRNA, gerando 4 proteínas de membrana (HLA-G1, -G2, -G3 e -G4) e 3 proteínas solúveis (HLA-G5, -G6 e -G7) (Figura 1) (ISHITANI; GERAGHTY, 1992; PAUL et al., 2000). HLA-G1 é a isoforma completa exibindo estrutura similar as moléculas HLA clássicas ligadas à membrana e associadas com a β 2-microglobulina. A isoforma HLA-G2 não tem o domínio α 2, codificado pelo éxon 3. HLA-G3 perde o éxon 3 e 4 que codificam os domínios α 2 e α 3 e o HLA-G4 perde o éxon 4 que codifica o domínio α 3. As isoformas solúveis HLA-G5 e HLA-G6 estão presentes nos mesmos domínios extraglobulares das HLA-G1 e HLA-G2, respectivamente, mas por conservam o transcrito do íntron 4 que contém um códon de término de leitura que bloqueia a tradução do domínio transmembrana (éxon 5), as isoformas HLA-G5 e HLA-G6 apresentam apenas uma cauda de 21 aminoácidos (LEE et al., 1995). E a isoforma solúvel HLA-G7 resulta da presença de um códon de término de leitura presente no íntron 2 que gera apenas o domínio α 1 ligado a dois aminoácidos. Em todas as transcrições alternativas falta éxon 7. (ISHITANI; PAUL et al., 2000).

A maioria dos alelos HLA-G descritos atualmente podem teoricamente produzir, por splicing alternativo, todas as isoformas ligadas à membrana e solúveis. Em contrapartida, HLA-G * 1:05 N (alelo nulo, G * 0105N) apresenta uma deleção da Citosina (Δ C) no último nucleotídeo do códon 129 ou no primeiro nucleotídeo do códon 130 no éxon 3, provocando mudança no quadro de leitura (OBER; ALDRICH, 1997; SUAREZ et al., 1997), levando a um sinal de parada (TGA) no códon 189 (éxon 4). Este alelo é associado com a formação incompleta das isoformas HLA-G1, -G4 e -G5 que possuem o domínio α 3 e expressão normal das isoformas HLA-G2, -G3 e -G7 que a falta do domínio α 3 (SUAREZ et al., 1997). Outro alelo nulo, G * 1:13 N (* G 0103N), apresenta uma transição C \rightarrow T na primeira base do códon 54 do éxon 2 (domínio α 1) impedindo a formação de um código de parada inicial (TAG), que impede a produção de todas as isoformas ligada à membrana e solúveis ou presumivelmente produz proteínas não-funcionais (LAJOIE et al., 2008). A Figura 2 ilustra as principais características das isoformas de HLA-G e sítios responsáveis pelos padrões de transcrição fisiológicos ou truncados.

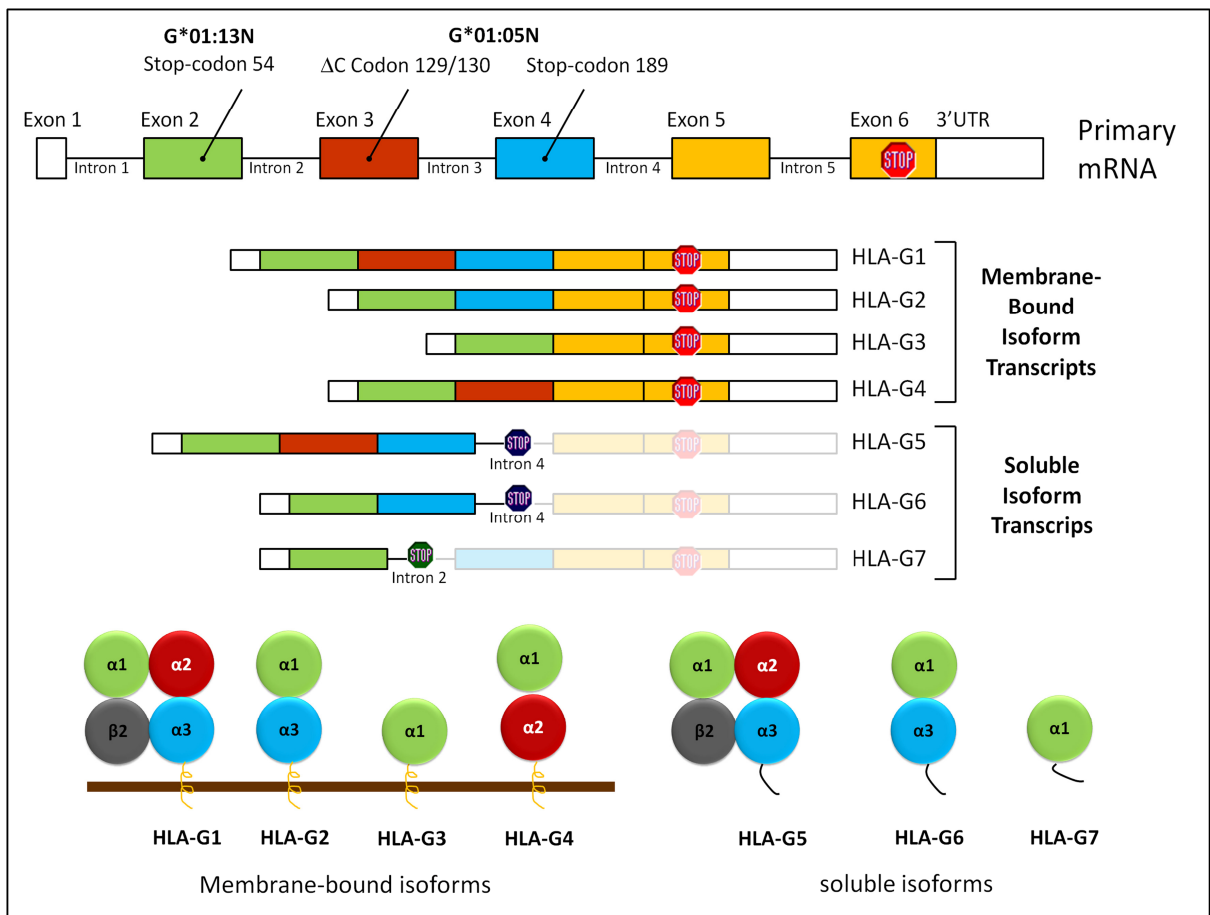


Figura 2 - Características das proteínas HLA-G solúveis e de membrana geradas por edição alternativa de um único transcrito primário do mRNA. Os domínios da cadeia pesada do HLA-G ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, porção transmembrana e cauda citoplasmática) são codificados pelos genes HLA-G (cromossomo 6), e a cadeia leve pela molécula de $\beta 2$ microglobulina é codificada por um gene no cromossomo 15. O éxon 7 é sempre emendado para fora ("spliced"). A parte final do éxon 6 e éxon 8 são sempre transcritas, no entanto, nunca traduzida devido à presença de um códon de término de leitura presente no início do éxon 6 (sinal de stop vermelho), e tem sido considerada como a região de 3' não traduzida do gene (3'UTR). O transcrito primário pode ser emendado para fora ("spliced") em 7 isoformas HLA-G1-G7. HLA-G1 é a molécula completa de HLA-G, HLA-G2 falta o éxon 3, HLA-G3 falta éxons 3 e 4 e HLA-G4 falta éxon 4. HLA-G1-G4 são moléculas de membrana devido à presença de transmembrana e uma cauda citoplasmática codificada pelos éxons 5 e 6. HLA-G5 é semelhante ao HLA-G1, mas mantém íntron 4, HLA-G6 falta éxon 3, mas mantém íntron 4 e HLA-G7 falta éxon 3, mas mantém íntron 2. HLA-G5 e HLA-G6, são formas solúveis devido à presença do íntron 4 que contém um códon de término de leitura presente no éxon 4 (sinal de parada azul), impedindo a tradução da transmembrana e uma cauda citoplasmática. HLA-G7 é solúvel devido à presença do íntron 2, que apresenta um códon de término de leitura (sinal de paragem verde). O alelo G * 1:13 N provavelmente não é expresso, devido à presença de um códon de término de leitura, no éxon 2 (codon 54). A supressão de uma citosina (ΔC) no éxon 3 do alelo G * N 01:05 muda o quadro de leitura levando a um códon de término de leitura no éxon 4. Fonte: Donadi et al., 2010 (ainda não publicado)

HLA-G é expresso de maneira constitutiva em subpopulação de células do citotrofoblasto e tecidos coriônicos (ELLIS et al., 1986; KING et al., 2000; ISHITANI et al., 2003); células tímicas (CRISA et al., 1997); córnea (LE DISCORDE et al., 2003); precursores eritróides e endoteliais (MENIER et al., 2004), células tronco mesenquimais (MSC) de fígado fetal e medula óssea (GÖTHERSTRÖM et al., 2005) e no compartimento endócrino do pâncreas humano (CIRRULLI et al., 2006).

A expressão ectópica da molécula HLA-G pode ser observada em condições patológicas. As conseqüências para o paciente podem ser benéficas, em enxertos (LILA et al., 2000; CRÉPUT et al., 2003; CRISPIM et al., 2008), doenças autoimunes (MITSDOERFFER et al., 2005), e inflamatórias (BARICORDI et al., 2008), ou deletérias, em células cancerosas (ROUAS-FREISS et al., 2005) ou infectadas por vírus (LAFON et al., 2005; SOUTO et al., 2010). Assim sua expressão pode ser detectada em diversas células e tecidos. Dados experimentais demonstram que os linfócitos T, células apresentadoras de antígenos (APCs), células tumorais, tecidos transplantados podem expressar HLA-G na isoforma ligada à membrana ou solúvel (PYO et al., 2006).

Embora os mecanismos pelos quais HLA-G participa do controle da resposta imune não estejam totalmente elucidados, foi descrito, *in vitro*, que a ligação dessa molécula inibe a ação de citólise mediada por células natural killer (NK) (MARCHAL-BRAS-GONCALVES et al., 2001) e por linfócitos T CD8+ (RITEAU et al., 2001). A molécula HLA-G pode induzir as células T CD8+ antígeno específicas e células NK a apoptose através da ligação com o CD8, regulando positivamente a produção de Fas e a interação de Fas/ FasL (assim como fazem também as moléculas HLA-A, -B e -C) (CONTINI et al., 2003; FOURNEL et al., 2000; LILA et al., 2001). A ligação de HLA-G com receptores específicos leva também à inibição da proliferação de células T CD4+ em resposta à estimulação alogênica, além de promover a polarização da resposta imune para um perfil Th2 (BAINBRIDGE et al., 2000; LEROND et al., 2006).

Foi demonstrado ainda que APCs (Células Apresentadoras de Antígenos) expressando HLA-G1 podem induzir imunossupressão de células T CD4+ (LEMAOULT et al., 2004), mostrando que o HLA-G age não somente com efeito inibidor, mas também diminuindo a amplificação clonal e maturação das células T.

As funções inibitórias de HLA-G ocorrem pela interação da molécula HLA-G com receptores de leucócitos, incluindo CD8; LILRB1 (receptor de leucócitos tipo imunoglobulina, subfamília B, membro 1 ou do inglês "*leukocyte immunoglobulin-like receptors B1*") (também chamado ILT-2 [Transcrito tipo imunoglobulina ou do inglês "*Immunoglobulin-Like Trascript-2*"] ou CD85j); LILRB2 (também chamado ILT-4 ou CD85d); e KIR2DL4 (killer cell immunoglobulin-like receptor) (também chamado CD158d) (SHIROISHI et al., 2006, GAO et al., 2000).

O LILRB1 está presente nas populações de linfócitos T, NK, monócitos, macrófagos, linfócitos B e células dendríticas (COLONNA et al., 1997); LILRB2 é específico da linhagem mielóide; e p49/KIR2DL4 é restrito a células NK (COLONNA et al., 1998; ALLAN et al., 1999; LEMAOULT et al., 2005). LILRB1 e LILRB2 interagem também com outras moléculas HLA de classe I, mas a afinidade com a molécula HLA-G é três ou quatro vezes maior. Já o KIR2DL4 é um receptor específico para HLA-G (SHIROISHI et al., 2003).

Os receptores LILRB1, LILRB2 e KIR2DL4 possuem "motifs" intracelulares inibitórios (ITIM do inglês "*inhibitory tyrosine induction motif*"), Uma vez associado ao seu ligante, tais receptores podem promover a inibição de eventos de sinalização desencadeados por receptores estimulatórios (DIETRICH et al., 2001)

A ligação do HLA-G com LILRB inibitórios resulta na fosforilação de seus domínios ITIMs (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) e recrutamento da p56lck e SHP-1, que contém proteínas tirosina fosfatase-1. Isto causa desfosforilação de ITAMs (*immunoreceptor tyrosine-based activating motifs*), que poderiam, na ausência de sinais inibitórios, levar a ativação. (DIETRICH et al., 2001).

LILRB1 e LILRB2 têm vários receptores ITIM na sua cauda citoplasmática (DIETRICH et al., 2001) e se ligam ao domínio $\alpha 3$ e a $\beta 2$ -microglobulina da molécula HLA-G, entretanto LILRB2 se liga com maior afinidade que o LILRB1. LILRB2 se liga mais ao domínio $\alpha 3$ que a $\beta 2$ -microglobulina e os sítios de ligação desses receptores são distintos (SHIROISHI et al., 2006). Mas o sítio de interação do domínio $\alpha 3$ do HLA-G é o mesmo com o CD8 α/α e LILRB. Indicando que a função inibitória do LILRBs pode ser dupla, deslocando CD8 α/α e ativando ITIMs (SHIROISHI et al., 2003).

O gene KIR2DL4 contém uma Arginina no domínio transmembrana e um único ITIM no domínio citoplásmico. Receptores de ativação e inibição são expressos na superfície da maioria das células NK e macrófagos, e a função efetora final depende do equilíbrio entre receptores ativadores e inibidores (HSU et al., 2002). Devido a estas características, o papel da interação KIR2DL4 com HLA-G na modulação da resposta imune tem sido um tema de muito debate (LEMAOULT et al., 2003c; APPS et al., 2008). O domínio $\alpha 1$ das moléculas HLA de classe I é um sítio importante de reconhecimento KIR, entanto, o sítio de ligação do KIR2DL4 para HLA-G permanece desconhecido.

Contudo, a interação da molécula HLA-G com esses receptores não eram suficientes para explicar o mecanismo de escape tumoral dependente de HLA-G. Assim, mais recentemente demonstrou-se que células NK ativadas adquirem a molécula de HLA-G oriundas de células tumorais por meio de um mecanismo denominado de trogocitose, que é um processo rápido que requer contato célula a célula para que ocorra a transferência de material celular e moléculas associadas. Após essa aquisição, as células NK não mais proliferaram, e comportaram-se como células supressoras (CAUMARTIN et al., 2007).

A interação HLA-G-LILRB leva ao desenvolvimento de DCs (Células Dendríticas) tolerogênicas (impedindo a maturação/ ativação da DC mielóide através do rompimento da via de apresentação por MHC classe II) e assim promove indução de células T CD4+ e T CD8 + imunossupressoras e anérgicas (RISTICH et al., 2005).

Um novo subtipo de células supressoras circulantes induzidas por HLA-G1 (LEMAOULT et al., 2004) ou solúvel HLA-G5 (LEROUD et al., 2006), caracterizadas fenotipicamente e funcionalmente como CD3+CD4^{low} e CD3+CD8^{low}, exercem função imunossupressora sobre outros linfócitos T, mediada por um ou mais fatores solúveis tais como a IL-10 (NAJI et al., 2007).

Um efeito apoptótico na angiogênese foi observado por HLA-G induzir células endoteliais a apoptose pela ligação com o receptor CD160 (By55) (FONS et al., 2006).

Foi também relatado que a secreção de HLA-G5 por células tronco mesenquimais humanas participam tanto da inibição das funções de células T e NK como na expansão de células T regulatórias de fenótipo CD4+CD25^{high}FOXP3+ (SELMANI et al., 2007).

O controle da transcrição do HLA-G ocorre via elementos reguladores em CIS, conhecidos por sua importância no controle da transcrição dos genes HLA clássicos: intensificador A, a sequência consenso interferon (ISRE) e o módulo SKY. Os quais se localizam na região promotora do gene e formam um módulo de indução com sítios ligantes para membros da família NF κ B p50, p65 e c-REL, IRF1 e IRF2, ISF1 e ISF2, e Sp1 (fator transcricional das rotas de transativação constitutiva e induzida por citocinas). O módulo SXY é composto por sequências S, X (compreendendo os meio-sítios X1 e X2) e Y ligadas cooperativamente por complexos de multiproteínas (RFX, CREB/ATF e NFY). Em HLA-G, este módulo SXY possui sequências S e X1 homólogas ao HLA de classe I, mas sequências Y e X2 divergentes. Como esse segundo bloco é muito importante para maior formação da ordem do complexo no módulo SXY e para a transativação induzida por CIITA (transativador de classe II), o HLA-G não é induzido por CIITA nem RFX5. Além desses três elementos reguladores, outro elemento de 250 pb que controla a transcrição de HLA-G está localizado a 1000 pb do éxon 1, o que foi observado em placentas de camundongos transgênicos (CAROSELLA; DAUSSET e KIRSZENBAUM, 1996; GOBIN; VAN DEN ELSEN, 2000; ROSSEAU et al., 2004).

Em HLA-G os dois sítios κ B do intensificador A (κ B1 e κ B2) apresentam afinidade somente para a subunidade p50 do NF- κ B, o que não é suficiente para ativar a transcrição, pois não há ligação em níveis significantes com outras porções da NF- κ B que possuam propriedades transativadoras. Em adição, o sítio κ B2 do HLA-G também se liga ao Sp1 (Fator transcricional mediador das rotas de transativação constitutivas e induzidas por citocinas). A região de supressão do intensificador A, a qual tipicamente contém o ISRE em promotores de MHC de classe I, aparentemente está parcialmente ausente em HLA-G. Esta região (a porção 3' do sítio κ B1 e as sequências supressoras) não apresenta qualquer afinidade de ligação com proteínas da família de fatores transcricionais IRF (fator regulador de interferon), mas contém outro sítio de ligação com Sp1. Entretanto, este elemento não pode mediar a expressão de HLA-G induzida por INF- γ . Nenhum outro sítio de ligação para o IRF ou STAT1 (tradutor de sinal e ativador da transcrição) foi identificado nesta região promotora de 220 pb, o que demonstra a não-responsividade do HLA-G ao INF- γ (Figura 3) (GOBIN; VAN DEN ELSEN, 2000).

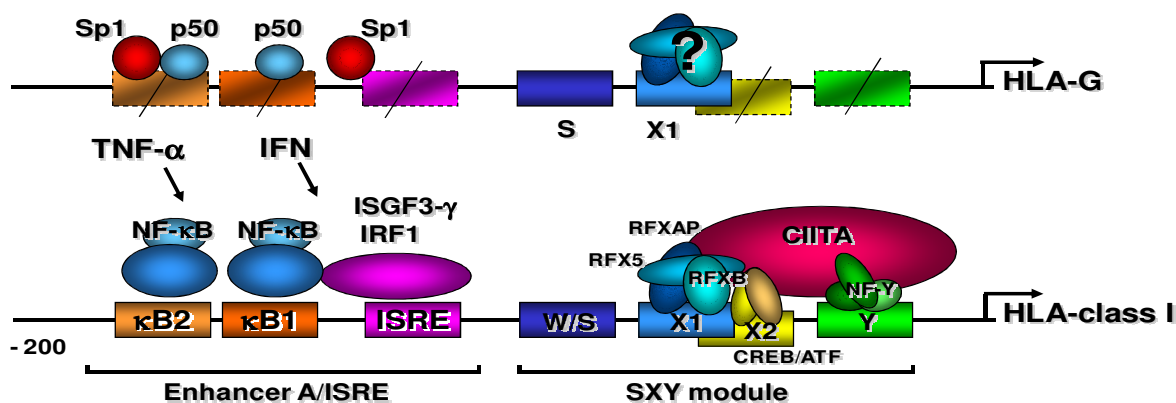


Figura 3 - Comparação de elementos regulatórios cis das regiões promotoras proximais dos HLA clássicos de classe I e HLA-G (200 pares de bases a acima do ATG). Caixas pontilhadas com barras indicam elementos regulatórios mutantes no promotor do HLA-G. Mutações impedem a ligação dos principais fatores aos HLA clássicos de classe I. O complexo RFX se liga a caixa X1 conservada do HLA-G no ensaio de mudança de mobilidade eletroforética, mas não está associado ao promotor HLA-G *in situ*. **Fonte:** Donadi et al. 2010, ainda não publicado.

No trabalho de Moreau e colaboradores, em 2003, foi investigada a influência de fatores epigenéticos sobre a transcrição e expressão da proteína HLA-G. Foi mostrado que o processo de metilação poderia silenciar o gene HLA-G. Já é conhecido o fato de que a repressão mediada por metilação poderia silenciar o gene HLA. O silenciamento de HLA-G pode ocorrer independentemente do silenciamento de outras moléculas HLA de classe I e de classe II, porque estas podem ser tecido-específicas e podem ainda explicar a falta de expressão de HLA-G frente à exposição à citocinas em níveis basais para transcrição.

Citocinas e hormônios produzidos durante a gravidez ou presentes no microambiente tumoral são moduladores da expressão da molécula de HLA-G. IFN- γ aumenta expressão de HLA-G em maior proporção que as moléculas HLA-B e -C, enquanto que IFN- α e IFN- β aumentam HLA-G na mesma proporção que HLA-B e -C (YANG et al., 1996; CHU et al., 1999; LEFEBVRE et al., 1999). IFN- γ , IL-2, GM-CSF em combinação com IFN- γ (ONNO et al., 2000), IL-10 (UROSEVIC et al., 2001; MOREAU et al., 1999; UROSEVIC; DUMMER, 2003), glucocorticóides (MOREAU et al., 2001) e progesterona (YIE et al., 2006a; YIE et al., 2006b) também aumentam a expressão de HLA-G. TNF, NF-kappaB e phorbol 12-myristate 13-acetate diminuem a expressão de HLA-G1 na superfície celular, mas aumentam o HLA-G citoplasmático (ZIDI et al., 2006). Similarmente, condições de stress como choque térmico, arsênio (IBRAHIM et al., 2000) e hipóxia (KILBURN et al., 2000; CHANG et

al., 2003; NAGAMATSU et al., 2004; MOUILLOT et al., 2007), também podem modular a transcrição do gene HLA-G.

O nível de expressão de HLA-G pode variar segundo os sítios polimórficos descritos para esse loco, assim como o repertório de isoformas produzidas pela edição alternativa (REBMANN et al., 2001).

HLA-G: Polimorfismo

Vários trabalhos mostram que o polimorfismo do gene HLA-G pode modular a expressão das isoformas, sendo claramente associadas às variações nos níveis de produção das moléculas HLA-G solúveis no sangue periférico adulto (REBMANN et al., 2001). De modo similar, as decisões da célula acerca da magnitude de produção das isoformas podem depender dos sítios polimórficos do gene e também do microambiente (O'BRIEN et al., 2001; HVIID et al., 2003).

Atualmente, são descritos 46 alelos para HLA-G, que codificam somente 14 proteínas diferentes. (atualizado em 2010, www.anthonynolan.org.uk), onde dois deles foram recentemente descritos pelo nosso grupo de pesquisa (CASTELLI et al., 2007a; CASTELLI et al., 2007b), apresentando então, polimorfismo discreto, quando comparado com os genes HLA de classe Ia (ISHITANI et al., 1999).

Esses alelos parecem se organizar em haplótipos que podem estar relacionados a atividades promotoras distintas resultando em alta ou baixa expressão de HLA-G (OBER et al., 2003; SOLIER et al., 2001; TAN et al., 2005).

Esses níveis de expressão podem ser determinados pela região reguladora que inclui todos os elementos promotores conhecidos e que é considerada única entre os genes HLA (SOLIER et al., 2001). Dentre as principais diferenças está o fato de que a resposta da região promotora do HLA-G para uma variedade de fatores de transcrição difere qualitativamente e quantitativamente da resposta de todos os outros genes HLA de classe I (GOBIN et al., 1998; GOBIN e VAN DEN ELSEN, 2000).

Em um estudo visando caracterizar a variabilidade da região promotora do HLA-G foi observado um nível reduzido de variabilidade na região codificadora, enquanto que a região promotora se mostrou bastante polimórfica. Foram identificados na região promotora 18 SNPs (single nucleotide polymorphisms) que definem oito haplótipos em uma região de aproximadamente 1500pb (OBER et al., 2003), onde 12 destes SNPs apresentam seus alelos menos frequentes com

frequências iguais ou superiores a 35%. A região promotora foi abordada pelos mesmos autores em um segundo estudo, o qual avaliou 1300pb em três amostras populacionais distintas: afro-americanos, euro-americanos e chineses, onde nove SNPs além dos 18 previamente identificados foram encontrados, gerando 13 haplótipos distintos, que quando colocadas em linhagens celulares apresentaram atividades promotoras distintas relacionadas à alta ou baixa expressão (TAN et al., 2005).

O mecanismo de expressão do gene HLA-G são ainda desconhecidos, sendo necessários novos trabalhos para elucidar os mecanismos de controle de expressão e ação da seleção balanceadora nesse loco (MENDES-JUNIOR et al., 2007; TAN et al., 2005).

Alguns alelos da região promotora do HLA-G foram relacionados a níveis de expressão diferenciados de sHLA-G em linhagens celulares (REBMANN et al., 2001; TAN et al., 2005).

O éxon 7 está sempre ausente do mRNA maduro e, devido ao códon de parada de leitura no éxon 6, o 8 éxon não é traduzido, então este segmento de gene foi considerado ser a região 3' não traduzida (3'NT, também conhecida pelo termo em inglês 3'UTR-*untranslated region*) do éxon 8 do RNA maduro. A região 3'NT do HLA-G contém diversos elementos regulatórios (KUERSTEN; GOODWIN, 2003), incluindo sinais de poliadenilação e elementos ricos em AU (ALVAREZ et al., 2009), bem como sinais que regulam a expressão espacial e temporal do mRNA (KUERSTEN; GOODWIN, 2003). Além disso, a região 3'NT apresenta um sinal de poli-A, e vários sítios polimórficos que podem potencialmente influenciar na transcrição e tradução de HLA-G por vários mecanismos diferentes.

Os transcritos primários devem ser processados e ligados por proteínas antes de serem exportados para o citoplasma (AGUILERA, 2005). Neste processo, a proteína Cap é adicionada, íntrons são removidos pelo spliceossoma e as extremidades 3' são clivadas e poliadeniladas. O complexo Cap-binding (CBC) liga-se a estruturas 5' cap monometilada e a proteínas de ligação poli (A) (PAB) na cauda 3' para exportar partículas ribonucleoproteicas mensageiras competentes (mRNPs) necessários para o transporte e tradução do mRNA (KUERSTEN; GOODWIN, 2003; AGUILERA, 2005). As proteínas que se ligam ao mRNA podem influenciar na sua tradução, localização e degradação, assim como qualquer

polimorfismo na região 3'NT de um determinado gene, pode influenciar nas propriedades de ligação dessas proteínas.

A disponibilidade do mRNA para a tradução é sempre equilibrada pela força de retenção e declínio do mRNA, em que os transcritos não-funcionais e nocivos podem ser eliminadas antes da tradução (KUERSTEN; GOODWIN, 2003; AGUILERA, 2005; SOMMER; NEHRBASS, 2005; SAGUEZ et al., 2005). Além disso, a região 3'NT de determinado gene pode ser alvo para microRNAs (miRNAs), que são pequenos RNAs não-codificantes, com cerca de 22 nucleotídeos, que regulam negativamente a expressão gênica por meio da supressão de tradução ou degradação do mRNA, ou ambos (KUERSTEN; GOODWIN, 2003; VEIT; CHIES, 2009),

Na região 3'NT existe um polimorfismo caracterizado pela deleção/inserção de 14 pares de base (pb), sendo que a deleção (D/D) apresenta frequência de 58% e de inserção (I/I) 42% (HARRISON et al., 1993). A deleção de 14pb está associada aos alelos G*010101, G*0102 e G*010401, enquanto que a inserção de 14pb está ligada aos alelos G*010102, G*010103, G*0103, G*0105N e G*0106 (ROUSSEAU et al., 2003).

O polimorfismo de deleção e inserção dos 14 pb está presente no éxon 8 da região 3' não traduzida (NT) do gene HLA-G. Alelos HLA-G apresentando as seqüências com a inserção de 14pb sofrem edição alternativa do RNAm com remoção dos primeiros 92 pares de base do éxon 829 (que incluem os +3003 e +3010), resultando em um transcrito mais instável que pode influenciar na produção da proteína HLA-G (HIBY et al., 1999; O'BRIEN et al., 2001; HVIID et al., 2003; ROUSSEAU et al., 2003). A proporção entre os transcritos -92 e +92 pode variar de acordo com a linhagem celular estudada, sendo 0,5 para a célula JEG-3 (que produz HLA-G endogenamente), e 0,2 para células de melanoma transfectadas - M8, (ROUSSEAU et al., 2003). De forma que essa produção de HLA-G pode ter sido consequência não só desse polimorfismo, mas também de outros polimorfismos em desequilíbrio de ligação com os 14 pb.

Rebmann et al., (2001) mostraram que alelos de HLA-G estavam associados com níveis de sHLA-G no plasma (REBMANN et al., 2001). Os alelos G*010103 e G*0105N que apresentam inserção dos 14-bp são considerados alelos

baixos secretores, enquanto que alelos com ausência dos 14-bp, como o G*010401 são considerados altos secretores de sHLA-G (TAN et al., 2005).

Essa influência nos níveis transcricionais, também contribuiu para alguns quadros patológicos relacionados a gravidez. Estudos demonstram que o genótipo homozigoto para I/I 14pb em mulheres está associado à redução da fertilidade com relação aos tratamentos de fertilização *in vitro*, aumento do risco de abortos recorrentes, aumento do peso do feto e da placenta em relação à idade gestacional e com o desenvolvimento de pré-eclâmpsia em primigestas (O'BRIEN et al., 2001; HVIID, 2004a; HVIID et al., 2004; HYLENIUS et al., 2004).

Tan et al. em 2007 em um estudo de risco de asma, identificaram na região 3'NT do HLA-G um sítio alvo, no SNP +3142 C/G do mRNA, para os microRNAs miR-148a, miR-148b e miR-152, e mostraram que a presença destes miRNA diminuem a expressão da proteína HLA-G solúvel e que o alelo +3142 G resulta no aumento da afinidade de ligação destes miRNA na região 3'NT do mRNA do HLA-G, e portanto na diminuição da expressão da proteína e com pior prognóstico da doença. Mostraram ainda que os níveis de miRNAs miR-148a e miR-148b foram detectados em maior quantidade nas células epiteliais brônquicas em relação a células do citotrofoblasto, que por sua vez tem alta expressão de HLA-G em relação a células epiteliais brônquicas (TAN et al., 2007)

O SNP + 3187 A/G está próximo (4 pb acima) de motivos ricos em AU, que medeiam a degradação do mRNA. Um trabalho demonstrou *in vitro* que o alelo +3187 A está associado à diminuição da estabilidade do mRNA, podendo resultar em diminuição da expressão de HLA-G (YIE et al., 2008).

Uma análise *in silico* revelou que vários miRNAs humanos têm potencial para se ligar a região 3'NT do mRNA do HLA-G e influenciar na expressão de HLA-G. A capacidade de ligação desses miRNAs pode ser influenciada pelos vários polimorfismos presentes na região 3'NT HLA-G, destacando o papel do fragmento de 14 pb e dos SNPs +3003, +3010, +3027 e +3035, que abrangem uma região de apenas 32 nucleotídeos que podem influenciar na ligação de vários miRNAs, assim como o SNP +3142, discutido anteriormente (CASTELLI et al., 2009).

É interessante notar que a inserção de 14 pb é sempre acompanhado pelos alelos +3142 G e +3187 A, ambos já associados à baixa estabilidade do mRNA, indicando que a baixa produção de mRNA associado com a inserção de 14

pb (HVIID et al., 2003) pode também ser uma consequência da presença destes polimorfismos associados ao fragmento de 14 pb (CASTELLI et al., 2009).

Além desses 3 sítios polimórficos (deleção e inserção dos 14 pb, +3142 C/G e + 3187 A/G) outros 5 SNPs da região 3'NT estão sendo pesquisados pelo nosso grupo, +3003 T/C, +3010 C/G, +3027 C/A, +3035 C/T e + 3196 C/G. Com os quais se verificou, na população brasileira, a combinação de 11 haplótipos, presentes na Tabela 1, com os respectivos alelos associados e a frequência dos mesmos (CASTELLI et al., 2009).

Esses estudos mostram a importância da região 3'NT no perfil de expressão do locus do HLA-G. Isto remarca que a presença da inserção dos 14 pb é sempre associada com a presença do alelo +3142 G no mesmo indivíduo (CASTELLI et al., 2009).

Cada um desses haplótipos pode estar associado ou não a um único ou um grupo de polimorfismos na região codificadora e promotora (ALVAREZ et al., 2009; CASTELLI et al., 2009), criando um haplótipo HLA-G estendido. Por exemplo, o alelo +3003 C está associado com outras variações da região 3'NT, incluindo os alelos, deleção de 14 pb, +3142 C e +3187 A, bem como a variação de nucleotídeos da região codificadora típica do alelo G * 01:01:01:05 , e ainda com um polimorfismo específico da região promotora (CASTELLI et al., 2009).

Portanto, ao contrário da região codificadora, a região 3'NT do locus HLA-G apresenta um elevado grau de variação, apresentando diversos sítios polimórficos que podem potencialmente influenciar na estabilidade do mRNA, manutenção, na mobilidade e no padrão de splicing. A expressão de HLA-G é um processo complexo modulado por vários fatores, tais como a eficiência do promotor, impulsionado por polimorfismos 5' do promotor, bem como pela taxa de degradação ou tradução do mRNA, altamente influenciada pelo polimorfismo 3' NT do mRNA. Apesar de vários polimorfismos na região 3'NT do HLA-G serem anteriormente relacionados com a estabilidade ou degradação do mRNA, sua influência parece ocorrer simultaneamente, uma vez que estes alelos são caracteristicamente associados em haplótipos (DONADI et al., 2010, ainda não publicado).

Tabela 1. – Haplótipos região 3'NT do lócus HLA-G e os alelos do HLA-G associados com cada haplótipo.

Haplotype name	Haplotype frequency 2n = 310	HLA-G 3'untranslated region haplotypes								HLA-G allele	Ratio ^a	HLA-G ^b frequency 2n = 216
		14-bp	+3003	+3010	+3027	+3035	+3142	+3187	+3196			
UTR-1	0.258	Del	T	G	C	C	C	G	C	G*01010101/02	1.000	0.236
UTR-2	0.242	Ins	T	C	C	C	G	A	G	G*01010201	0.600	0.153
										G*010114	0.018	0.005
										G*0105N	0.164	0.042
										G*0106 ^c	0.200	0.051
										G*0109	0.018	0.005
UTR-3	0.126	Del	T	C	C	C	G	A	C	G*010401	0.555	0.046
										G*010403	0.055	0.005
										G*010404	0.390	0.032
										G*01010105 ^d	0.955	0.097
UTR-4	0.132	Del	C	G	C	C	C	A	C	G*010109	0.045	0.005
										G*010108	0.095	0.009
UTR-5	0.093	Ins	T	C	C	T	G	A	C	G*0103	0.905	0.088
UTR-6	0.068	Del	T	G	C	C	C	A	C	G*01010101/02	0.095	0.009
										G*01010104	0.762	0.074
										G*01010105 ^d	0.143	0.014
UTR-7	0.055	Ins	T	C	A	T	G	A	C	G*010103	0.889	0.037
										G*010105	0.111	0.005
UTR-8	0.013	Ins	T	G	C	C	G	A	G	G*0106 ^c	1.000	0.014
Others ^e	0.013	—	—	—	—	—	—	—	—	Undefined	—	—

Fonte: Castelli et al. Genes and Immunity (2009).

A análise da expressão da molécula HLA-G, integrada aos dados recentes sobre o polimorfismo do gene e sobre edição alternativa de seu transcrito primário, é particularmente importante para entender as variações da expressão qualitativa e quantitativa observadas em situações patológicas. Os estudos de expressão da molécula HLA-G são relevantes para a possível implementação de estratégias terapêuticas adaptadas para cada situação, isto é, diminuir a expressão em casos de tumores e doenças virais crônicas e aumentá-la em doenças auto-imunes e em transplantes.

CRISPIM et al., (2008) encontraram que o genótipo em homozigose +14/+14 pb foi significativamente alto no grupo com Rejeição aguda quando comparado com o grupo controle saudável. Pode-se hipotetizar, portanto, que análises de outros polimorfismos e estudos funcionais da regulação imune são essenciais para verificar o papel do HLA-G na resposta imune do transplante renal.

HLA-G e transplante

O papel de HLA-G nas reações de rejeição observadas em órgãos transplantados tem sido intensivamente investigado. Os estudos recentes indicam que HLA-G pode ter um importante papel na aceitação de órgãos transplantados, por meio de sua ativação e expressão durante o processo do transplante. A

molécula suprime a resposta imune do receptor, gerando tolerância ao enxerto, e conseqüentemente, diminuindo as rejeições agudas e a rejeição crônica.

A expressão das moléculas HLA-G *in vivo* está associada com melhor aceitação do enxerto em transplante cardíaco (LILA et al., 2000), duplo transplante rim/fígado (CRÉPUT et al., 2003a), fígado (CRÉPUT et al., 2003b; BASTURK et al., 2006) e rim (CRISPIM, et al., 2008).

A presença de moléculas HLA-G em enxertos cardíacos, associada á presença concomitante de moléculas solúveis diminui significativamente o número de episódios de Rejeição agudas e crônicas (LILA et al., 2000, LILA et al., 2002;). Pacientes com duplo transplante rim/fígado que não tiveram rejeição por um período de cerca de um ano expressaram HLA-G nas células epiteliais biliares hepáticas e tubulares renais e depois de um ano a expressão de HLA-G não foi mais localizada no enxerto, mas elevados níveis séricos foram detectados nesses pacientes, (CRÉPUT et al., 2003a; CRÉPUT et al., 2003b). Os pacientes que apresentaram altos níveis séricos de HLA-G apresentam diminuição significativa no número de rejeição e melhor função renal (CRÉPUT et al., 2003b). Aloenxertos renais que expressam a molécula HLA-G tem melhor aceitação do enxerto (CRISPIM, et al., 2008).

Estudos têm permitido concluir que o HLA-G possa influenciar o curso do transplante por dois diferentes mecanismos (ROUAS-FREISS et al., 2003). Primeiro, por meio da inibição da citólise mediada por células NK e T CD8+ (RITEAU et al., 2001). Em outro momento, o HLA-G suprimindo a aloproliferação das células T CD4+ (LILA et al., 2000). E também induzindo apoptose das células T CD8+ ativadas através da ligação com CD8 e via mecanismos dependentes de Fas/ Fas ligante (CONTINI et al., 2003; FOURNEL et al., 2000). Ambos os mecanismos são sugestivos de que a molécula HLA-G modula as principais células envolvidas na rejeição do enxerto (CAROSELLA et al., 2003).

Em culturas celulares provenientes de indivíduos HLA incompatíveis, as células expressando HLA-G1 regulam a reatividade celular. Ainda, células expressando HLA-G1 inibem a resposta proliferativa em cultura mista de linfócitos (RITEAU et al., 1999; BAINBRIDGE et al., 2000; LEMAOUT et al., 2004). APCs transfectadas com o gene HLA-G1 podem induzir anergia de células T e sua diferenciação em células supressoras (LEMAOUT et al., 2004). Resultados

semelhantes foram obtidos quando linfócitos T *naive* foram pré-sensibilizados durante 24 horas com a proteína HLA-G5 (LEROUND et al., 2006).

A ligação de HLA-G no receptor LILRB2 (ILT4) de DCs de camundongos transgênicos diminuiu apresentação de antígenos pelas moléculas de MHC classe II e prolongou significativamente a sobrevida do enxerto (RISTICH et al., 2005).

Um novo subtipo de células supressoras circulantes induzidas pela presença de HLA-G1 (LEMAOULT et al., 2004) ou após tratamento com a proteína solúvel HLAG-5 (LEROUND et al., 2006), atualmente melhor caracterizadas fenotipicamente e funcionalmente como CD3⁺CD4^{low} e CD3⁺CD8^{low}, propõem um novo mecanismo de ação regulatória no transplante, pois apresentam capacidade reduzida de resposta a estímulos alogênicos e exercem função imunossupressora sobre outros linfócitos T, mediada por um ou mais fatores solúveis tais como a IL-10 (NAJI et al., 2007), sendo essas células diretamente envolvidas na aceitação do transplante de fígado, rim e combinado de fígado-rim (NAJI et al., 2007).

O HLA-G pode diminuir a aloproliferação de células T CD4⁺ e T CD8⁺ por bloqueio da progressão do ciclo celular SELMANI et al., 2008; CONTINI et al., 2003; LILA et al., 2001; LE FRIEC et al., 2003; BAHRI et al., 2006). Pode ainda regular negativamente a expressão de co-receptores de células T que são hiporresponsivas a estímulos alogênicos (NAJI et al., 2007).

O conjunto desses dados traz provas das propriedades tolerogênicas da molécula HLA-G e marca sua aplicação potencial como candidato terapêutico apropriado capaz de limitar a rejeição aos aloenxertos.

1.3. HLA-Cw

O HLA-Cw é uma molécula HLA de classe I clássica. Esta molécula é um heterodímero composto de uma cadeia pesada e uma cadeia leve (beta-2 microglobulina). A cadeia pesada é ancorada na membrana. Moléculas de classe I clássicas têm um papel central no sistema imune através da apresentação de peptídeos derivados do lúmen do retículo endoplasmático. Elas são expressas em quase todas as células. A cadeia pesada é de aproximadamente 45 kDa e seu gene está localizado na posição 6p21.3 e contém 8 éxons. O éxon 1 codifica o peptídeo líder, os éxons 2 e 3 codificam os domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$, ambos vinculam o peptídeo, o éxon 4 codifica o domínio $\alpha 3$, o éxon 5 codifica a região transmembrana, e éxons 6 e 7 codificam a cauda citoplasmática. Os polimorfismos do éxon 2 e éxon 3 são

responsáveis pela especificidade de ligação de peptídeos de cada molécula de classe I. Mais de cem alelos HLA-C foram descritas (fornecido pela RefSeq).

Os epítomos HLA-Cw estão reunidos em dois grupos distintos de acordo com o dimorfismo na posição 77 e 80 da hélice- α 1, no Grupo 1 (G1), a molécula HLA-Cw possui o aminoácido lisina na posição 77 e asparagina na posição 80, contendo as proteínas HLA -Cw2, -Cw4, -Cw5 e -Cw6 e no Grupo 2 (G2), a molécula possui o aminoácido asparagina na posição 77 e lisina na posição 80, que contém as proteínas HLA -Cw1, -Cw3(-Cw9 e -Cw10), -Cw7 e -Cw8.

Se os indivíduos forem molecularmente tipificados para o locus HLA-Cw, faz-se necessária a conversão destes dados moleculares em dados sorológicos onde se pode prever a estrutura da proteína, a fim de se estabelecer a qual grupo (G1 ou G2) o indivíduo é pertencente. Tais conversões podem ser estabelecidas a partir da Tabela 2.

Tabela 2. Conversão sorológica das tipificações moleculares de HLA-Cw.

HLA-Cw	
Molecular (DNA)	Sorologia (Proteína)
Cw*01	Cw1
Cw*02	Cw2
Cw*03	Cw9(w3), Cw10(w3)
Cw*04	Cw4
Cw*05	Cw5
Cw*06	Cw6
Cw*07	Cw7
Cw*08	Cw8
Cw*12	indef
Cw*14	Cw1/indef
Cw*15	indef
Cw*16	indef
Cw*17	Cw7/indef
Cw*18	Cw6/indef

Nem todos os dados moleculares possuem dados sorológicos, sendo assim identificados por "indef".

As moléculas HLA-Cw são os principais ligantes dos receptores KIR. Estas proteínas ligam-se a 3 receptores KIR inibidores, (alelos HLA-C do grupo 1 se ligam as proteínas KIR2DL2 e KIR2DL3, enquanto alelos HLA-C do grupo 2 se ligam a proteína KIR2DL1), e a 2 receptores ativadores (alelos HLA-C do grupo 1 se ligam as proteínas KIR2DS1, enquanto alelos HLA-C do grupo 2 se ligam a proteína KIR2DS2) (MANDELBOIM et al., 1997). (Tabela 3).

Os KIR são membros de um grupo de moléculas reguladoras encontradas na superfície das células NK e um subgrupo de células T. Os KIRs foram

previamente identificados por sua habilidade de conferir alguma especificidade na citólise mediada por células NK (HAREL-BELLAN et al., 1986; MORETTA et al., 1990). Esta especificidade se dá através da interação de isotipos de moléculas KIR com moléculas HLA de classe I. Esta interação protege células saudáveis da destruição espontânea causada pela citólise mediada por células NK. Entretanto, outros isotipos de KIR podem estimular esta atividade, dependendo se o KIR contém uma cauda citoplasmática longa (L - inibitória) ou curta (S – ativadora) (CARRINGTON; NORMAN, 2003).

A interação entre as duas moléculas ocorre via domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$ das proteínas HLA de classe I; porções C-terminais do peptídeo ligado a fenda desta última molécula, além dos domínios D1 e D2 do receptor KIR2D. No complexo formado KIR2D-HLA de classe I, o eixo dos domínios D1-D2 da molécula KIR é aproximadamente ortogonal ao eixo do peptídeo ligado ao sulco formado pelas hélices $\alpha 1$ e $\alpha 2$ do HLA, alinhando assim o domínio D1 com a hélice $\alpha 1$ e o D2 com a $\alpha 2$. Os KIR fazem contato com seus ligantes através de alças em sua região inter domínios.

Tabela 3. Tabela de HLA-C e seus receptores KIR

Epítomos HLA-Cw		Receptores KIR		
		INIBIDORES	ATIVADORES	
ASN77 e LYS80	Cw4	Grupo 1 (G1)	2DL1	2DS1
	Cw2			
	Cw5			
	Cw6			
SER77 e ASN80	Cw3	Grupo 2 (G2)	2DL2	2DS2
	Cw1			
	Cw7		2DL3	
	Cw8			

Relações entre receptores KIR e seus ligantes HLA-Cw. Os epítomos HLA-Cw estão reunidos em dois grupos distintos: Grupo 1 ou G1= a molécula HLA-Cw possui o aminoácido lisina na posição 80 (LYS-80) e Grupo 2 ou G2= onde a molécula possui o aminoácido asparagina na mesma posição (ASN-80).

Evidências apontam para forte ligação entre o Grupo 2 do HLA-C e KIR2DL1 comparados ao Grupo 1 do HLA-C e seus KIR correspondentes, podendo a ligação mais forte levar a um efeito inibitório maior. A forte inibição dos alelos do

Grupo 2 do HLA-C levou à hipótese de que estes alelos podem ser benéficos na prevenção de ativação imunológica mediada por NK, no transplante de fígado.

O aumento da afinidade do grupo 2 do HLA-C e seus ligantes, em comparação às interações Grupo 1 HLA-C-KIR, pode ser devido inteiramente ao peptídeo da molécula HLA. Dados sugerem que alguns peptídeos no sulco das moléculas grupo 1 do HLA-C oferecem impedimento conformacional a boa ligação de KIR2DL2 / 3 para moléculas Grupo 1 do HLA-C (MANDELBOIM et al., 1997). A enorme variabilidade na apresentação de peptídeos pode desempenhar um papel na regulação da função das células NK após o transplante.

Outro receptor de HLA-C, e também de HLA-A, -B, -G -E e -F, é o receptor LILB1 (COLONNA et al., 1997), que já foi previamente descrito no tópico de HLA-G, como ligante dessa molécula.

Os alelos de HLA-C vêm sendo estudados quanto a sua suscetibilidade e proteção a doenças auto-imunes e infecciosas. Na Doença de Graves o alelo Cw7 é de susceptibilidade e Cw3 e Cw16 de proteção; na Psoríase (vulgaris) o alelo Cw6 é de susceptibilidade; no câncer cervical (Papiloma Vírus) os alelos Cw2 e Cw5 são de susceptibilidade e Cw7 proteção; na hepatite B os alelos Cw5 e Cw3 são de susceptibilidade e Cw1 proteção; na hepatite C os alelos Cw2, Cw4, Cw5 e Cw7 são de susceptibilidade; na lepra (*M. leprae*) os alelos Cw4 e Cw7 são de susceptibilidade; na dermatite (Vírus T – linfotrópico Humano) o alelo Cw2 é de proteção; e no sarampo (paramixovirus) o alelo alelos Cw5 é de susceptibilidade e Cw9 de proteção (Catálogo da nomenclatura de HLA - Biometrix Diagnóstica, 2009).

Na psoríase, um fator genético determinante para a tolerância pode ser que certos antígenos próprios podem ser apresentados pelos HLA-Cw6 superando ou evitando a tolerância (ELDER et al., 2009).

Outros trabalhos relacionam a diferença dessa proteção ou susceptibilidade à ligação mais forte ou mais fraca dos grupos 1 e 2 de HLA-Cw com seus respectivos KIR. WINTER et al., em 1998 encontraram que a frequência de homozigotos HLA-C1C1 foi maior entre aqueles indivíduos que eliminaram a infecção pelo HCV. Esses indivíduos, que também tinham o haplótipos KIR 2DL3/2DL3, resolviam melhor a infecção. Este grupo postula que estes resultados são devido à interação relativamente fraca inibidora entre HLA-C1-KIR2DL3 e que, portanto, seria superado facilmente por meio de sinais que servem para ativar as células NK, que assim, ajudariam a limpar a infecção (WINTER et al., 1998).

Já Carrington et al., 1999 encontraram que Bw4/C1 estava associado com rápida progressão da AIDS em relação ao Bw4/C2. E que o HLA-B*35 e ou o HLA-Cw*04 prolongaram a sobrevivência de 28 a 40% dos indivíduos em estudo (CARRINGTON et al., 1999). Na opinião de Gaudieri et al., (2005) em uma revisão, é plausível que HLA-B/-C possam variar nos efeitos inibitórios na ativação de KIR, como por exemplo, Bw4/C1 tendo forte inibição e Bw6/C2 fraca inibição dos KIR nos pacientes com HIV (GAUDIERI et al., 2005).

O estado imunogenético tem especial impacto na redução da aloreatividade e na evolução do aloenxerto, no entanto isso não é somente devido à compatibilidade de HLA, mas as moléculas de HLA do receptor também podem ser importantes fatores genéticos que contribuem para a resposta no transplante (WARLE et al., 2005; MARIN et al., 2005) e na aceitação do enxerto ou rejeição (MURO et al., 1997). Moléculas HLA-C são polimórficas e podem funcionar como clássicos antígenos HLA (MOYA-QUILES et al., 2003; FORHN et al., 2001; PEI et al., 2001).

Os alelos de HLA-Cw vêm sendo estudados quanto à compatibilidade de alelos HLA-C entre receptor e doador (FROHN et al., 2001), seus alelos no doador e alelos dos seus ligantes KIR no receptor (PARHAM; MCQUEEN, 2003; SCHELLEKENS et al., 2008; FISCHER et al., 2007), compatibilidade de alelos KIR (CIROCCO et al., 2007) bem como tipificação de alelos HLA-C somente no doador (BIXHARA et al., 2005; HANVESAKUL et al., 2008; MENDEL et al., 2009; TRAN et al., 2009) ou somente no receptor (MOYA-QUILES et al., 2003a, MOYA-QUILES et al., 2003b; MOYA-QUILES et al., 2007) em relação à tolerância e a meia vida do aloenxerto.

1.4. Citocinas, Polimorfismo e Transplante Renal

Os linfócitos T (Th1 e Th2) diferem no padrão de secreção de citocinas e funções efetoras. Ambos os tipos celulares são originados de um precursor comum (Th0) e esta diferenciação é largamente influenciada pelas citocinas presentes no momento do reconhecimento do antígeno. A variabilidade das citocinas (Th1 e Th2/Th3) é associada com a evolução do transplante dependendo do balanço imuno/fisiológico entre as citocinas Th1 e Th2 (LAKKIS, 1998; MINGUELA et al., 1999; KAMINSKA et al., 2005).

Muitos estudos têm sido feitos para definir os mecanismos celulares e moleculares pelos quais as citocinas estão envolvidas no processo de rejeição (KOLEGAR et al., 2007).

Citocinas são potentes moléculas imunomodulatórias que medeiam a resposta imune. Tem sido demonstrado que a produção de citocinas está sob controle genético, e o polimorfismo de muitos genes de citocinas afeta sua atividade transcricional, resultando em variações individuais na produção das mesmas (WILSON et al., 1997). Entretanto, a influência desta variedade na rejeição ao transplante renal permanece controversa (MARDER et al., 2003).

1.4.1. Interleucina-18

A Interleucina-18 (IL-18) é membro da família IL-1 e foi previamente conhecida como um fator indutor do IFN- γ . O gene da IL-18 está situado na região 11q 22.2–22.3 próxima do locus do gene D2 do receptor da dopamina (OKAMURA et al., 1998). A proteína é secretada na forma inativa, pro-IL-18, com peso molecular de 23 kDa, e é convertida na forma ativa, com 18 kDa, pela caspase-1 (LU et al., 2000) e proteinase-3 (SUGAWARA et al., 2001). A IL-18 tem um papel crítico na regulação da resposta imune e pode afetar a polarização de T helper (Th)1 e Th2 (OKAMURA et al., 1998).

A principal função da IL-18 é maturação de células T e natural killers, além disso, promove produção de citocinas Th1 e citotoxicidade (NAKANISHI et al., 2001). Ela é secretada por diferentes tipos celulares predominantemente por macrófagos (PUREN, et al., 1999), queratinócitos (STOLL, et al., 1997), células osteoblásticas (UDAGAWA, et al., 1997, SAHA, et al., 1999), células epiteliais intestinais (TAKEUCHI, et al., 1997), células dendríticas (GARDELLA, et al., 1999, STOLL, et al., 1998), condrócitos (OLEE, et al., 1999), neuroblastomas (HEUER, et al., 1999), e células epiteliais dos túbulos renais (STRIZ, et al., 2005).

A IL-18 liga-se ao receptor IL-18R que é altamente homólogo à família do receptor IL-1R em células T (WU et al., 2003). O IL-18R é expresso em uma variedade de células, incluindo neutrófilos (LEUNG et al., 2001), células NK (HYODO et al., 1999), macrófagos, células endoteliais e células do músculo esquelético (GERDES et al., 2002). A expressão do receptor IL-18R é regulada positivamente pela IL-12 (YOSHIMOTO et al., 1998), enquanto que IL-18 aumenta a expressão do receptor IL-12R, portando a recíproca regulação positiva dos

receptores explica como a IL-12 e a IL-18 sinergizam a produção de IFN- γ pelas células Th1 (TOMINAGA et al., 2000). A expressão do receptor IL-18R é um marcador da expressão de IFN- γ produzidas pelas células NKT (CHAN et al., 2003).

Por outro lado, a proteína de ligação da IL-18 (IL-18BP), secretada constitutivamente, é capaz de se ligar com alta afinidade e neutralizar a IL-18 regulando sua atividade (KIM et al., 2000).

Tem sido mostrado que o polimorfismo do promotor da IL-18 influencia nos níveis da expressão da citocina (GIEDRAITIS, et al., 2001). A região promotora do gene da IL-18 contém sítios de ligação de diferentes fatores transcricionais como o fator de transdutor de sinal e ativador de transcrição-5 (KALINA, et al., 2000), proteína de ligação da seqüência consenso do IFN, PU.1, fator nuclear kB, e proteína ativadora 1.

Foram identificados 5 SNPs na região promotora 2656 G/T, 2607 C/ A, 2137 G/C, 1113 T/G e 1127 C/T, mas somente dois tem relevância funcional. (GIEDRAITIS, et al., 2001). A mudança de C por A na posição 2607 (rs1946518) resulta na falha da ligação da proteína de ligação elemento responsiva do AMPc, enquanto que a substituição na posição 2137 do G por C (rs187238) modifica o sítio de ligação do fator nuclear H4TF-1 para um sítio de ligação desconhecido encontrado no promotor do GM-CSF. Indivíduos homozigotos para o -137G e -607C expressam altos níveis de IL-18 (GIEDRAITIS, et al., 2001).

Varias associações tem sido descritas entre o polimorfismo da região promotora da IL-18 e doenças como: rinite alérgica (KRUSE, et al., 2003; SEBELOVA, et al., 2007), asma atópica (IMBODEN, et al., 2006), eczema atópico (NOVAK, et al., 2005), artrite idiopática juvenil (HEINZMANN, et al., 2004), diabetes tipo 1 (KRETOWSKI, et al., 2002), doença inflamatória intestinal (HAAS, et al., 2005; GLAS, et al., 2005), sarcoidose (ZHOU, et al., 2005; JANSSEN, et al., 2004) e artrite reumatóide (RUEDA, et al., 2005; GRACIE, et al., 2005; PAWLIK, et al., 2006).

A Interleucina-18 (IL-18) inicia um papel chave nas doenças autoimunes, inflamatórias e infecciosas (MCINNES, et al., 2000; STASSEN, et al., 2003; HAAS, et al., 2005) e também pode ter importância nos mecanismos da rejeição ao aloenxerto renal. Pacientes com Rejeição aguda do aloenxerto renal tiveram maiores níveis de IL-18 em comparação com pacientes sem rejeição (STRIZ, et al., 2005), e também com necrose tubular aguda (PARIKH et al., em 2004). A produção de IL-18 mostrou estar correlacionada com um padrão histológico de rejeição em modelo

murino de transplante cardíaco (AFFLECK, et al., 2001), e em transplante renal humano (STRIZ, et al., 2005).

Entretanto, estudos clínicos que mostrem a associação entre a região promotora do gene da IL-18 e Rejeição aguda e crônica são escassos (STRIZ, et al., 2005; KOLESAR, et al., 2007; KIM, et al., 2008) e nenhum trabalho relacionou a sua expressão a expressão de HLA-G no enxerto renal.

1.4.2. IFN- γ

O IFN- γ está localizado na posição 12q14 (MIM # 147570) e medeia resposta imune podendo ter efeitos pro ou antiinflamatórios dependendo do contexto (THAKKINSTIAN et al., 2008). O papel do INF- γ como um indutor da resposta Th1 e na produção de outras citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias já está bem estabelecido (JANEWAY et al., 2002).

YANG et al. (1996) detectaram a indução da expressão do HLA-G, tanto intra quanto extracelularmente pelo INF- γ em células do estroma semelhantes a macrófagos. Perceberam que a proporção de HLA-G em relação aos HLA-B e HLA-C também aumentou, efeito esse não percebido quando as células foram tratadas com INF- α e INF- β (os quais são fracos indutores de HLA-G). Estudos recentes têm indicado que o INF- γ aumenta significativamente a expressão das moléculas não clássicas HLA-E e HLA-G, favorecendo o estabelecimento de mecanismos regulatórios (DERRÉ et al., 2006).

Desta forma, o INF- γ é uma citocina que participa tanto na regulação da resposta imune celular, quanto da ativação de células T. Trabalhos têm demonstrado que a região do íntron 1 do gene do INF- γ é altamente polimórfico por apresentarem regiões de microsátélites (POCIOT et al., 1997; PRAVICA et al., 1999). Essa região possui o alelo 2 que foi associado com alta produção, in vitro (PRAVICA et al., 1999) e in vivo de INF- γ (AWAD et al., 1999).

Mais recentemente, foi caracterizado outro polimorfismo, dessa vez de um único nucleotídeo, no gene desta citocina presente na posição 874 do íntron 1 do gene de INF- γ , onde podem se alternar uma timina ou adenina (+874 A/T) (PRAVICA et al., 2000). A presença de timina na posição mencionada associa-se com repetições de microsátélites e com alta produção da mesma, favorecendo a ligação do fator de transcrição NF- κ B. O genótipo T/T é denominado "Alto Produtor"

enquanto que o genótipo A/A é conhecido por “Baixo Produtor” (PRAVICA et al., 2000).

Este mesmo polimorfismo vem sendo estudado com relação à tolerância ao aloenxerto renal (BRABCOVA et al., 2007; PELLETIER et al., 2000; THAKKINSTIAN et al., 2008; AZARPIRA et al., 2009), mas a sua relação a aceitação do enxerto ainda permanece controversa (THAKKINSTIAN et al., 2008). O INF- γ contribui para maior expressão de HLA-G (DERRÉ et al., 2006), mas nenhum estudo investigou se o polimorfismo +874 do INF- γ encontra-se associado com a expressão da molécula HLA-G em biópsias de pacientes transplantados renais.

1.4.3. TNF

O gene do TNF está localizado dentro da região altamente polimórfica do MHC III, na posição 6p21.3 (MIM # 191160) e medeia resposta imune, podendo ter efeitos pro ou antiinflamatórios dependendo do contexto (THAKKINSTIAN et al., 2008).

Willian em 1968 relatou um fator citotóxico produzido por linfócitos e nomeou-o linfotoxina (LT). (KOLB; GRANGER, 1968) A homologia sequencial e funcional entre o TNF- α e LT levou à renomeação de TNF como TNF- α e LT como TNF- β . TNF- α é hoje denominado somente como TNF e é produzido principalmente como uma proteína disposta em homotrímero estável (KRIEGLER et al., 1998; TANG et al., 1996). Esta forma integrada a membrana (26 kDa) é libertada através de clivagem proteolítica pela enzima metaloprotease conversora de TNF (TACE [*tumor necrosis factor- α -converting enzyme*], também chamada de ADAM17 [metaloproteinase domínio 17]) formando a citocina solúvel homotrimérica (sTNF) (3 x 17 kDa = 51 kDa). A forma trimérica solúvel (sTNF) tende a dissociar em concentrações abaixo da faixa nanomolar, perdendo sua bioatividade (BLACK et al., 1997). Cada molécula contendo 17 kDa é composta por duas folhas β antiparalelas, com pregas β antiparalela, formando uma β -estrutura tipo "rocambolé", típica da família TNF, mas também encontradas em proteínas virais do capsídeo.

TNF se liga a dois receptores: o TNF-R1 (receptor TNF tipo 1; CD120a; p55/60) e o TNF-R2 (receptor TNF tipo 2; CD120b; p75/80). TNF-R1 é expresso na maioria dos tecidos, e pode ser totalmente ativado tanto pela forma ligada à membrana quanto a solúvel trimérica do TNF, enquanto que o TNF-R2 é encontrado

apenas nas células do sistema imunológico, e respondem à forma ligada à membrana do homotrímero o TNF. Como a maioria das informações da sinalização de TNF é derivada do TNF-R1, o papel do TNF-R2 é subestimado.

Em contacto com o seu ligante, os receptores de TNF também formam trímeros, suas pontas se encaixam nos sulcos formando monômeros de TNF. Esta ligação provoca mudança conformacional no receptor, levando à dissociação da proteína inibitória DDOS a partir do domínio de morte intracelular. Essa dissociação permite a adaptação da proteína TRADD (*Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein*) para se ligar no domínio da morte, servindo como uma plataforma para a ligação de uma proteína subsequente. Após ligação da TRADD, três caminhos podem ser iniciados: a) ativação do NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*); b) ativação da MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*) e; c) indução de sinalização de morte (WAJANT et al., 2003; CHEN; GOEDDEL, 2002).

TNF é capaz de induzir morte celular por apoptose, modular o crescimento, induzir diferenciação celular e inibir a replicação viral e tumorigênese (BARBARA et al., 1996). Também tem papel na sépsis, síndrome do choque, injúria tecidual, inflamação, diabetes (YEUNG et al., 1996). A desregulação da produção do TNF implica em uma variedade de doenças humanas, (LOCKSLEY et al., 2001). Grandes quantidades de TNF são liberadas em resposta à lipopolissacarídeos, outros produtos bacterianos, e interleucina-1 (IL-1), e apresenta uma série de ações em vários órgãos e tecidos, em geral, juntamente com IL-1 e IL-6.

O TNF é uma citocina pró-inflamatória e regulador central da imunidade inata e celular. É produzido principalmente por monócitos/macrófagos e em menor escala por mastócitos, células endoteliais, miócitos, tecido adiposo, fibroblastos e tecido neuronal e por células T e B, que podem promover reatividade aloimune pós-transplante por a) estimular macrófagos (HEIDENREICH et al., 1988; HOFFMAN; WEINBERG, 1987); b) regular positivamente moléculas de adesão endotelial; c) promover infiltração de células mononucleares (revisado por LEEUWENBERG et al., 1988), e; d) aumentar a imunogenicidade do enxerto devido à regulação positiva de moléculas MHC de classe I e II (LEEUWENBERG et al., 1988; COLLINS et al., 1986; LAPIERRE et al., 1988). O TNF pode ser também diretamente citotóxico para as células do enxerto por aumentar a infiltração de granulócitos (DECKER et al., 1987;

SMITH et al., 1990). No entanto o TNF também está associado com a expressão da molécula tolerogênica, HLA-G (ZIDI et al., 2006).

Portanto, o nível de produção desta citocina no sítio do aloenxerto pode ser importante para acelerar a rejeição (TURNER et al., 1997; SANKARA et al., 1999). O nível de produção da citocina pode estar associado com polimorfismos da região promotora do gene da citocina (HOFFMANN et al., 2001). O polimorfismo da região promotora pode afetar direta ou indiretamente a ligação de fatores de transcrição e consequentemente aumentar a produção de mRNA regulando a produção da citocina (WILLIAMS et al., 1995)

Há muitos SNPs neste gene, especialmente da região regulatória 5' enquanto que as regiões codificadoras e 3' mostraram alto grau de conservação (WALDRON-LYNCH et al., 1999). Os mais frequentes na população caucasiana estão situados nas posições -238 (D'ALFONSO; RICHIARDI, 1994; WALDRON-LYNCH et al., 1999), -308 (WILSON et al., 1997), -857 (HERRMANN et al., 1998), -863 e -1031 (HIGUCHI et al., 1998) em relação ao sítio de início da transcrição.

Os polimorfismos -238 G/A e -308 G/A do α , estão situados na região flanqueada 5' do gene que contém múltiplos sítios regulatórios (DROUET et al., 1991). O genótipo -308 GG está associado com baixo nível e os genótipos -308 AG e -308 AA com altos níveis do TNF (KROEGER et al., 2000; HUANG et al., 1999). Sendo a produção transcricional do alelo -308 A seis vezes maior que do alelo -308 G (WILSON et al., 1997). Os genótipos -238 AG e -238 AA estão relacionados com alto nível de produção do TNF e o -238 GG com baixo nível (ALTUN et al., 2005).

São inúmeros os trabalhos que correlacionaram o SNPs -308 A/G com a tolerância ao enxerto renal (THAKKINSTIAN et al., 2008,) já com o SNPs -238 A/G são poucos. E nenhum trabalho correlacionou esses polimorfismos com a expressão de HLA-G no aloenxerto renal.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O presente trabalho teve como objetivo estudar a influência dos polimorfismos gênicos HLA-G, HLA-C, IL-18, INF- γ e TNF relacionando-os com o processo de rejeição, e com a expressão protéica da molécula HLA-G no aloenxerto renal.

2.2. Objetivos específicos

❖ Avaliar a associação entre a expressão de HLA-G no enxerto, e a evolução clínica dos transplantados renais com relação à rejeição aguda e crônica.

❖ Avaliar a correlação do polimorfismo gênico da região 3'NT (Não Traduzida) molécula HLA-G: 14pb D/I, +3003 C/T, +3010 G/C, +3027 A/C, + 3035 C/T, +3142 G/C e +3187 G/A com a evolução clínica dos transplantados renais com relação à rejeição aguda e crônica e com grupo controle e a expressão de HLA-G no enxerto.

❖ Avaliar a correlação da tipificação alélica do HLA-Cw com a evolução clínica dos pacientes transplantados renais e a expressão de HLA-G no enxerto.

❖ Avaliar a correlação do polimorfismo gênico de algumas citocinas: IL-18 (-137 C/G e -607 A/G), INF- γ (+874 T/A) e TNF (-308 A/G), com a evolução clínica dos transplantados renais com relação à rejeição aguda e crônica e com grupo controle e a expressão de HLA-G no enxerto.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A estratégia experimental foi realizada de acordo com a Figura 4 .

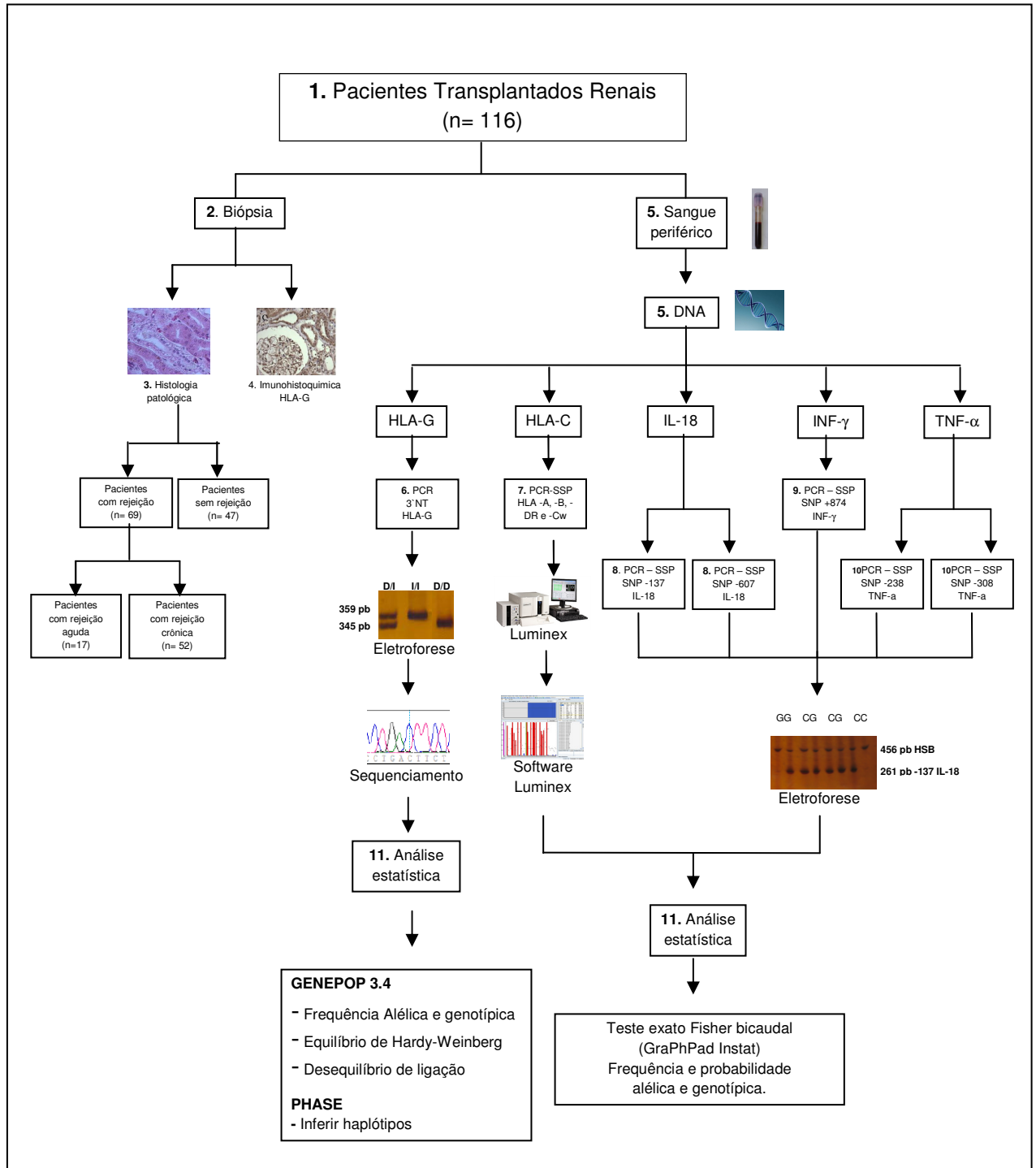


Figura 4 - Fluxograma da estratégia experimental. Cada procedimento contém a identificação do item e se encontra descrito em Material e Métodos.

3.1. Indivíduos estudados

Este estudo veio a dar continuidade ao projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Processo HCRP nº 5953/2004).

Foram estudados, após obtenção do consentimento por escrito, 116 pacientes submetidos ao transplante renal no Serviço de Transplante Renal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP). Desses, 71 eram do sexo masculino e 45 do sexo feminino. Acerca dos receptores, 95 receberam rim de doador falecido, seguindo os critérios adotados pela Central de Notificação, Captação e Distribuição de Órgãos 2 (CNCDO2-Ribeirão Preto-SP) (Resolução SS-94-Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, 2005) e 20 de doadores vivos relacionados.

Como controles normais foram utilizadas amostras de sangue de indivíduos doadores de medula óssea do Hemocentro de Ribeirão Preto para extração de DNA. Amostras soro positivas para AIDS, Hepatite B, Hepatite C, doença de Chagas, sífilis e HTLV I e II foram descartadas e desconsideradas para análise.

Os dados demográficos dos receptores, além de outros fatores como a etiologia da doença que conduziu à perda renal, índice de reatividade contra painel de células (PRA) no pré-transplante, tempo de isquemia fria, tratamento imunossupressor, compatibilidade HLA e ocorrência de infecções virais foram documentados.

3.2. Biópsias renais

O seguimento dos pacientes foi realizado pela equipe médica do Serviço de Transplante Renal do HC-FMRP-USP. As biópsias renais foram realizadas conforme indicação clínica (nefrotoxicidade por drogas, rejeição aguda, CAN, recidiva de glomerulopatia, etc.). Para o controle foram realizadas biópsias de rim normal humano, obtida por autópsia, de indivíduo morto por trauma.

3.3. Análise histológica

O espécime renal foi fixada e inserida em bloco de parafina. Análise histológica foi realizada em cortes de 4 μ de espessura, corado com hematoxilina/eosina, Tricrômico de Masson e prata metenamina. Todas as análises

ópticas foram processadas no Laboratório de Patologia Renal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e analisadas pelo mesmo patologista, conforme a classificação de BANNF 97 (RACUSEN et al., 1999). Após a criteriosa análise histológica, os pacientes foram enquadrados em dois grupos: grupo de rejeição, aqueles que apresentaram rejeição aguda ou CAN, e o grupo sem achados histológicos de rejeição, mas apresentando outros achados histopatológicos isolados, como: necrose tubular aguda, nefrotoxicidade por drogas, fibrose, ou ainda, histologia normal.

3.4. Expressão protéica de HLA-G de membrana no enxerto renal

A avaliação da expressão de antígenos HLA-G em tecido renal foi realizada utilizando-se técnica de imunohistoquímica de amostras parafinadas obtidas de tecido renal proveniente de biópsia de paciente transplantado renal.

Para a pesquisa do HLA-G, no material inserido em parafina foi feita a recuperação antigênica em ácido cítrico 10 mM com rigorosa aferição do pH (6,0), durante 40 minutos.

Posteriormente, seguiu-se o bloqueio da peroxidase endógena, por meio da incubação dos cortes com água oxigenada a 3% em PBS, por 10 minutos. Após as lavagens com PBS, as lâminas foram incubadas com avidina a 0,01% por 15 minutos, em seguida, retirou-se o excesso de avidina e adicionou-se a biotina a 0,1% por 15 minutos, para fazer o bloqueio da biotina endógena. Depois desse procedimento, os cortes foram lavados em PBS, por duas vezes, e incubados com soro de leite a 3% em água destilada (leite desnatado Molico, Nestlé) por 20 minutos, a fim de obter o bloqueio das ligações protéicas inespecíficas. Em seguida, dispensando dessa vez as lavagens, os cortes foram incubados com os anticorpos primários, em câmara úmida, em temperatura de 4°C por uma noite.

O anticorpo utilizado foi o anticorpo policlonal de cabra anti HLA-G (clone 4H84 – cedido gentilmente pelo Serviço de Pesquisa em Hemato-imunologia do Hospital Saint-Louis – Paris, na diluição de 1/100, em PBS, contendo 1% de tween 20 (Sigma, Saint Louis, EUA).

Após esse período, realizaram-se as lavagens consecutivas e, posteriormente, incubação à temperatura ambiente por 45 minutos, com os anticorpos biotinilados (1/500 em PBS/tween), proveniente da Dako Laboratories. Depois de novas lavagens, os cortes foram incubados com o complexo avidina-

biotina-peroxidase (DAKO, Hamburg, Germany) por 45 minutos, à temperatura ambiente.

Posterior às lavagens consecutivas com PBS, procedeu-se à revelação da reação utilizando-se o substrato revelador 3,3 diaminobenzidina (DAB) (DAKO) em PBS, contendo 0,1% de água oxigenada 20 volumes, por 10 minutos, à temperatura ambiente. Posteriormente, as reações foram interrompidas com água destilada e as lâminas coradas com Hematoxilina de Mayer por 3 minutos, à temperatura ambiente. Após serem lavadas com água destilada, as lâminas foram imediatamente montadas com bálsamo do Canadá.

O controle negativo das reações foi realizado através da substituição dos anticorpos primários por PBS. Para se detectar a produção basal dessas moléculas no tecido renal foram utilizadas biópsias de pacientes com rim normal obtido através de autópsia e como controles positivos da reação foram utilizados fragmentos de trofoblasto humano obtido do primeiro trimestre de gravidez.

3.5. Extração de DNA

Para as análises de polimorfismo genético, o DNA genômico foi extraído das amostras de sangue periférico de pacientes transplantados e do grupo controle formado de doadores de medula óssea (TMO), por *salting out*, conforme descrito por MILLER et al., (1988), com algumas modificações. Desta forma, 10 mL do sangue total são transferidos para tubos de polipropileno de 50mL ao qual se adiciona solução tampão de lise de hemácias (0,3M sacarose; 10mM Tris-HCL pH7.5; 5mM MgCl₂; Triton X-100 1%). O hemolisado é homogeneizado por inversão e centrifugado a 6000 x g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante é desprezado e o processo repetido novamente, buscando obter um precipitado livre de hemácias.

Em seguida, são adicionadas ao precipitado 4,5mL de solução tampão de lise de glóbulos brancos (0,075M NaCl; 0.024M Na-EDTA pH 8,0), 125µL de SDS a 10% e 1,1mL de perclorato de sódio a 5,0M. Agita-se o tubo vigorosamente por 10 segundos e adiciona-se 2mL de solução salina saturada (NaCl 6.0M), para extração de proteínas. Em seguida, o tubo é vigorosamente homogeneizado, por 15 segundos e centrifugado a 6000 x g, por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante (contendo o DNA) é transferido para outro tubo de 50 mL, sendo adicionado igual volume (7mL) de isopropanolol absoluto (Merk, Alemanha), para precipitar o DNA.

O precipitado de DNA é removido com pipeta de Pasteur e transferido para um tubo Eppendorf. O excesso de isopropanolol é retirado com pipeta e o precipitado, lavado com 1.5mL de etanol a 70% após 10 minutos de centrifugação, a 6000 x g, a 4°C. Em seguida, despreza-se o etanol e o DNA é seco à temperatura ambiente, com tubo invertido, em papel toalha. Finalmente, hidrata-se o DNA em 100 a 300 µL de água DEPC e quantifica-se o mesmo em espectrofotômetro GeneQuant II (Pharmacia, EUA) com filtro de 260nm. O material é estocado a -20°C até o momento da análise.

3.6. Polimorfismo da região 3'NT do gene HLA-G

A região 3'NT é inicialmente amplificada utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), usando os iniciadores representados na Tabela 4. Os reagentes e as concentrações finais utilizadas estão listados na Tabela 5 e as condições de amplificação estão listadas na Tabela 6.

Tabela 4 - Iniciadores para detecção dos polimorfismos da região 3' NT do HLA-G.

Iniciadores	Seqüência (5'- 3')	Amplicon	Alvo	Referência
HLA8R	GTCTTCCATTTATTTTGTCTCT	345-pb e	3'NT	Bermingham et al. 2000
HLA8F	TGTGAAACAGCTGCCCTGTGT	359-pb	HLA-G	

Tabela 5 - Reagentes e concentrações utilizadas para a amplificação da região 3' NT do HLA-G.

Reagente	Concentração
H ₂ O	
Tampão ^a	1x
MgCl ₂ ^b	1,5 Mm
DNTP ^c	0,2 mM
HLA8R	0,2 pmol
HLA8F	0,2 pmol
Taq polimerase	0,5 U
DNA	200 ng
Volume final	25 µL

^a 20 mM Tris-Cl, pH 8.4, 50 mM KCl,

^b cloreto de magnésio,

^c dNTP 2'deoxinucleosídeo 5' trifosfato

Tabela 6 – Condições de amplificação da região 3' NT do HLA-G.

Temperatura	Tempo	Ciclos
94°C	5'	1X
95°C	45''	
56°C	45''	30X
72°C	25''	
72°C	7'	1X
4°C	∞	

O produto amplificado é verificado por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% corado pela impregnação pela prata, onde a presença de um fragmento de 345-pb e 359-pb indica a presença da deleção ou inserção respectivamente, do polimorfismo de 14-pb. Após a leitura do polimorfismo de 14-pb, o produto de PCR é seqüenciado diretamente em seqüenciador automático 3100 Genetic Analyzer, da Applied Biosystems, o conjunto de reagentes para seqüenciamento BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit e o iniciador HLAG8R.

As seqüências obtidas são alinhadas entre si de forma a se observar todos os pontos de variação entre elas. Cada polimorfismo (14pb D/I, +3003 C/T, +3010 G/C, +3027 A/C, + 3035 C/T, +3142 G/C e +3187 G/A) foi confirmado e analisado individualmente e correlacionados com a evolução clinica dos pacientes transplantados renais.

3.7. Tipificação dos Genes HLA por PCR-SSP (Reação da Cadeia Polimerase - Amplificação Seqüência-específica)

As tipificações HLAs -A, -B -C e -DR são realizadas utilizando kits Micro SSP HLA DNA typing (One Lambda, EUA). Os kits, forneceram misturas prontas (D-mix) de dNTPs e solução tampão de enzima, contém também primers pré-otimizados para amplificação dos grupos de alelos, além de primers para controle interno da reação (gene da β globina humana). Adiciona-se ao tubo D-mix, Taq polimerase na concentração de 5U/ μ L, o primer específico e a amostra de DNA na concentração de 100ng/ μ L com volume final de 10 μ L. Procede-se a ciclagem descrita na Tabela 7 para genotipificação HLA -A, -B, Cw, -DR.

As ampliações são verificadas por eletroforese em gel de agarose a 2,5 %, em tampão TBE, contendo 1µL de brometo de etídeo. A -150V por 5 minutos e as bandas são visualizadas em transiluminador UV.

Tabela 7 – Condições de amplificação HLA -A, -B, Cw e -DR.

Temperatura	Tempo	Ciclos
94°C	2'10'	1X
63°C	1'	
94°C	10''	9X
63°C	1'	
72°C	40''	
94°C	10''	20 X
59°C	50''	
72°C	30''	
72°C	5'	1X
4°C	∞	

Depois de confirmada a amplificação dos produtos da PCR, esses são desnaturados, neutralizados e hibridizados com beads que contém sequências específicas. Essas beads hibridizadas com as sequências nucleotídicas das amostras são posteriormente incubadas com SAPE, contido no Kit e que confere fluorescência às sequências nucleotídicas das beads. Posteriormente faz-se a leitura em aparelho Luminex[®] 100 (One Lambda, EUA) e a subsequente análise pela combinação das beads em software HLA Fusion Research (One Lambda, EUA), que enfim, fornece os alelos para os HLA -A, -B -Cw e -DR.

3.8. Polimorfismo gênico da IL-18

As reações de amplificação para os SNPs -607 C/A e -137 C/G do gene da IL-18 foram realizadas pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase com iniciadores (primers) de seqüência específica (Polymerase Chain Reaction - sequence-specific primers – PCR-SSP) utilizando-se 200 ng de DNA de cada amostra. Os reagentes para cada loco tipificado (-607 A, -607 C, -137 C e -137 G) são colocados em microtubos de 0,2 mL, atingindo o volume final de 10 µL.

Como controle interno, são utilizados os iniciadores HGBA.A e HGBA.S (genes da hemoglobina humana). Todas as reações foram feitas em termociclador Biocycler MJ96G. Os reagentes e as concentrações finais utilizadas estão listados na Tabela 8. Os iniciadores específicos para cada variante estão descritos nas

Tabelas 9 e 10 e as condições de amplificação estão listadas nas Tabelas 11 e 12 e as condições específicas para eletroforese de cada SNP da IL-18 estudado estão descritas na Tabela 13.

Tabela 8 - Reagentes utilizados para a amplificação dos SNPs -607 A/C e -137 C/G da IL-18.

Reagente	Concentração
H ₂ O	
Tampão ^a	1x
MgCl ₂ ^b	1,5 mM
DNTP ^c	0,25 mM
HGBA.S	2 pmol
HGBA.A	2 pmol
607A ou 607C * ou	3 pmol
137C ou 137G *	3 pmol
607.2 ou 137.2 *	3 pmol
Taq polimerase	0,75 U
DNA	200 ng
Volume final	10 µL

^a 20 mM Tris-Cl, pH 8.4, 50 mM KCl, ^b cloreto de magnésio,

^c dNTP 2' deoxinucleosídeo 5' trifosfato.

* Para cada loco é feita a reação em um tubo separados: SNP - 607 A/C (um tubo com o primer específico para o alelo 607 A e outro tubo para o primer específico do alelo 607 C, ambos os tubos com o primer genérico 137.2.; SNP -137 C/G (um tubo com o primer específico para o alelo -137 C e tubo para o primer específico do alelo -137 G, ambos os tubos com o primer genérico 607.2.

Tabela 9 - Iniciadores para detecção do polimorfismo do SNP -607 A/C da IL-18.

Iniciadores	Seqüência (5'- 3')	Amplicon	Alvo	Referência
IL-18 607.3 - IL-18 Genérico	TAACCTCATTGAGGACTTCC			
IL-18 607C - IL-18 Específico	GTTGCAGAAAGTGTAATAATTATTAC	196 pb	IL-18 - 607 A/C	Giedraitis et al., 2001
IL-18 607A - IL-18 Específico	GTTGCAGAAAGTGTAATAATTATTAA			
HGBA.S	CGGTATTTGGAGGTCAGCAC	456 / 436 pb	Controle	Nosso Laboratório
HGBA.A	CCCACCACCAAGACCTACTT		Controle	Nosso Laboratório

Tabela 10 - Iniciadores para detecção do polimorfismo do SNP -137 C/G da IL-18.

Iniciadores	Seqüência (5' - 3')	Amplicon	Alvo	Referência
IL-18 Genérico - IL-18 137.2	AGGAGGGCAAATGCACTGG			
IL-18 Específico - IL-18 137C	CCCCAACTTTTACGGAAGAAAAC	261 pb	IL-18 - 137 G/C	Giedraitis et al., 2001
IL-18 Específico - IL-18 137G	CCCCAACTTTTACGGAAGAAAAG			
HGBA.S	CGGTATTTGGAGGTCAGCAC	456 / 436 pb	Controle	Nosso Laboratório
HGBA.A	CCCACCACCAAGACCTACTT		Controle	Nosso Laboratório

Tabela 11 – Condições de amplificação do SNP -607 A/C da IL-18.

Temperatura	Tempo	Ciclos
94°C	3´	1X
94°C	20´´	
64°C	40´´	7X
72°C	40´´	
94°C	20´´	
57°C	40´´	25 X
72°C	40´´	
72°C	5´	1X
4°C	∞	

Tabela 12 – Condições de amplificação do SNP -137 C/G da IL-18.

Temperatura	Tempo	Ciclos
94°C	3´	1X
94°C	20´´	
68°C	60´´	5X
94°C	20´´	
62°C	20´´	25 X
72°C	40´´	
72°C	5´	1X
4°C	∞	

Tabela 13 - Condições para eletroforese de cada SNP da IL-18.

SNP	Gel	Voltagem	Tempo
IL-18 –607	10% não-desnaturante	230V	1:00 h
IL-18 –137	10% não-desnaturante	230V	1:00 h

3.9. Polimorfismo gênico do INF- γ

O DNA genômico, obtido a partir de células do sangue periférico, é amplificado com iniciadores, como descrito por Pravica e colaboradores (2000), demonstrados na Tabela 14. Os reagentes utilizados para amplificação estão descritos na Tabela 15 e as condições de amplificação estão descritas na Tabela 16. Como controle negativo foram utilizados todos os reagentes acima descritos, exceto o DNA. Para visualização dos produtos amplificados, as amostras foram amplificadas em gel de poliacrilamida a 10% corado por nitrato de prata.

Tabela 14 - Seqüências dos primers necessários para reação de tipificação do polimorfismo da região +874 do gene da citocina INF- γ .

Seqüências Iniciadoras	
"Sense" Genérico	TCAACAAAGCTGATACTCCA
Degenerado "Antisense" T	TTCTTACAACACAAAATCAAATCT
Degenerado "Antisense" A	TTCTTACAACACAAAATCAAATCA
Controle Interno (Hormônio de Crescimento)	GCCTTCCAACCATTCCTTA (Primer 1) TCACGGATTCTGTTGTGTTTC (Primer 2)

Tabela 15 - Reagentes necessários para uma reação de tipificação do polimorfismo da região +874 do gene da citocina INF- γ .

Reagentes	Volume (μ L)
MgCl ^b (50mM)	0,3 μ L
Tampão ^a	1,0 μ L
dNTP ^c (1,25mM)	1,6 μ L
Primer (genérico) (10 mM)	0,25 μ L
Primer (A/T) (10 mM)	0,25 μ L
Controle sense GH1	0,05 μ L
Controle antisense GH2	0,05 μ L
H ₂ O	5,45 μ L
Taq (5 U/ μ L)	0,05 μ L

^a 20 mM Tris-Cl, pH 8.4, 50 mM KCl,

^b cloreto de magnésio,

^c dNTP 2' deoxinucleosídeo 5' trifosfato

Tabela 16 - Perfil de ciclagem do SNP +874 do gene da citocina INF- γ .

Temperatura	Tempo	Ciclos
95°C	1'	
95°C	15''	10X
62°C	50''	
72°C	40''	
95°C	20''	
56°C	50''	
72°C	50''	20X
72°C	10'	

3.10. Polimorfismo gênico do TNF

O polimorfismo de genes promotores do TNF foi avaliado quanto à presença dos SNPs -308A/G e -238A/G, relacionados com atividade transcricional.

Para a detecção destes polimorfismos, realiza-se a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase com iniciadores de seqüência específica (*PCR-SSP – Polymerase Chain Reaction - sequence-specific primers*) utilizando-se 200 ng de DNA de cada amostra. Os iniciadores específicos para cada variante estão descritos nas Tabelas 17 e 18. Adicionalmente, os iniciadores HGBA. A e HGBA. S são utilizados como controle interno de cada reação. Os reagentes estão mostrados nas Tabelas 19 e 20 e os Perfis de ciclagem estão representados nas Tabelas 21 e 22.

Tabela 17 - Iniciadores para detecção dos polimorfismos das SNPs -238 A/G do gene TNF.

Primer	Seqüência (5'- 3')	Amplicon	Alvo	Referencia
TNF 238 UP - TNF Genérico	AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT			TUGLULAR et al., 2003
TNFAS238G - TNF Específico	CCCCATCCTCCCTGCTCC	175 bp	TNF - 238 AG	MARSH et al., 2003
TNFAS238A - TNF Específico	TCCCCATCCTCCCTGCTCT			MARSH et al., 2003
HGBA.S	CGGTATTTGGAGGTCAGCAC	456 / 436 pb	Controle	Nosso Laboratório
HGBA.A	CCCACCACCAAGACCTACTT		Controle	Nosso Laboratório

Tabela 18 - Iniciadores para detecção dos polimorfismos das SNPs -308 A/G do gene TNF.

Primer	Sequência (5' - 3')	Amplicon	Alvo	Referencia
TNFAA 308.2 - TNF Genérico	CAGCGGAAAACCTCCTTGGT			TUGLULAR et al., 2003
TNFAS 308G - TNF Específico	ATAGGTTTTGAGGGGCATGG	259 pb	TNF - 308 AG	MARSH et al., 2003
TNFAS 308A - TNF Específico	ATAGGTTTTGAGGGGCATGA			MARSH et al., 2003
HGBA.S	CGGTATTTGGAGGTCAGCAC	456 / 436 pb	Controle	Nosso Laboratório
HGBA.A	CCCACCACCAAGACCTACTT		Controle	Nosso Laboratório

Tabela 19 - Concentrações de reagentes utilizados para a amplificação das SNPs -308 A/G do TNF.

Reagente	Concentração	Quantidade(μl)
Água		6,41
Tampão	10 X	1,0
MgCl ₂	50 mM	0,3
DNTP	20 mM	0,14
HGBA S	10uM	0,20
HGBA A	10 uM	0,20
308 A ou 308 G*	10uM	0,30
TNF 308.2	10uM	0,30
Taq Polimerase	5 U/ul	0,15
DNA	100ng	1,0
Volume final		9,0

^a 20 mM Tris-Cl, pH 8.4, 50 mM KCl, ^b cloreto de magnésio, ^c dNTP 2'deoxinucleosídeo 5' trifosfato

* Para cada loco é feita a reação em um tubos separados: um tubo com o primer específico para o alelo 308 A e outro tubo para o primer específico do alelo 308 G, ambos os tubos com o primer genérico 308.2.

Tabela 20 - Reagentes utilizados para a amplificação das SNPs -238 A/G do TNF.

Reagente	Concentração	Quantidade(μl)
Água		6,41
Tampão	10 X	1,0
MgCl ₂	50 mM	0,3
DNTP	20 mM	0,14
HGBA S	10uM	0,20
HGBA A	10 uM	0,20
238 A ou 238G	10uM	0,30
TNF 238.2	10uM	0,30
Taq Polimerase	5 U/ul	0,15
DNA	100ng	1,0
Volume final		9,0

^a 20 mM Tris-Cl, pH 8.4, 50 mM KCl, ^b cloreto de magnésio, ^c dNTP 2'deoxinucleosídeo 5' trifosfato

* Para cada loco é feita a reação em um tubos separados: um tubo com o primer específico para o alelo 238 A e outro tubo para o primer específico do alelo 238 G, ambos os tubos com o primer genérico 238.2.

Após a preparação da mistura da reação de amplificação, essas são submetidas a PCR nos seguintes ciclos no termociclador (Applied Biosystems 9700), conforme mostrado na Tabela 3.10.5

Tabela 21 - Perfil de ciclagem do SNP -308 A/G do TNF.

Temperatura	Tempo	Ciclos
94 °C	5'	1X
94 °C	45"	
64 °C	45"	32X
72 °C	1'	
72 °C	5'	1X
4 °C	∞	

Tabela 22 - Perfil de ciclagem do SNP -238 A/G do TNF.

Temperatura	Tempo	Ciclos
94 °C	3'	1X
94 °C	20''	5X
68 °C	60''	
94 °C	20''	
62 °C	20''	25 X
72 °C	40''	
72 °C	5'	1X
4 °C	∞	

Os produtos de amplificação são submetidos à separação por eletroforese em condições desnaturantes, utilizando-se géis de poli-acrilamida acrescidos de glicerol Tabela 3.10.7.

Tabela 23 - Condições para eletroforese de cada loco polimórfico estudado.

SNP	Gel	Voltagem	Tempo
TNF -308	10% não-desnaturante	230V	1:00 h
TNF -238	10% não-desnaturante	230V	1:00 h

3.11. Análise dos resultados

Após a coleta dos dados os mesmos foram codificados, criando-se um banco de dados em EXCEL. A determinação das frequências alélicas e genotípicas foi calculada pela contagem direta.

Para comparações de mais de dois grupos (rejeição aguda, rejeição crônica e sem rejeição) as variáveis sexo, cor da pele, causa da falha renal, match e mismatch de HLA e imunossupressor utilizado, o teste exato foi realizado pelo algoritmo Metropolis (MET) para obter uma estimativa imparcial do exato valor de P para uma determinada Tabela de contingência RXC (no caso de diferenças significativas reveladas por esta última análise, comparações pós-teste de pair-wise foram realizadas com o teste exato de Fisher).

A presença de uma associação significativa entre os sítios polimórficos presentes na região 3'NT foram verificadas por meio de teste de desequilíbrio de ligação implementado no programa GENEPOP 3.4 (Raymond e Rousset 1995). Dada uma associação positiva, porém fase gamética desconhecida, o método PHASE (STEPHENS et al., 2001) é utilizado para inferir os haplótipos dessa região.

A comparação de frequências alélicas ou genotípicas absolutas entre grupos (por exemplo, rejeição, não-rejeição), para identificar eventuais associações, é feita por meio do teste exato de Fisher bi-caudal com auxílio do software GraphPad InStat 3.06 (INC., 2003). A intensidade das associações (susceptibilidade ou resistência) é determinada pelo cálculo de Odds Ratio (OR), acompanhado de intervalo de confiança de 95% (I.C. 95%). Essas análises são realizadas utilizando-se o software GraphPad InStat 3.06 (INC, 1998).

Amplitudes de variação, médias e desvios-padrão de quaisquer variáveis contínuas (ocorrência ou não de expressão, idade, média do percentual de anticorpos, número médio de compatibilidade de HLA, tempo de isquemia e tempo decorrente entre transplante e biópsia e tratamento imunossupressor) foram estimadas utilizando-se novamente o software GraphPad InStat 3.06 (INC., 2003). Para a comparação de médias entre 2 grupos, foram aplicados os testes t de student (paramétrico) ou Mann-Whitney (não-paramétrico) bi-caudais. A comparação de médias entre 3 grupos foi realizada por meio das análises de ANOVA (paramétrica) seguido do pós testes de Tukey ou Kruskal-Wallis (não-paramétrica), seguido do pós testes de Dunn. A decisão entre aplicação de testes paramétricos e não-paramétricos foi baseada no resultado do teste Kolmogorov-Smirnov de normalidade.

Aderências as proporções fenotípicas esperadas sob o Equilíbrio Hardy-Weinberg (HWE) foram testadas pelo método de enumeração completa usando o software GENEPOP 3,4. E para todos os testes utilizados, a hipótese de nulidade foi rejeitada, quando possibilidade de ocorrência casual das diferenças observadas não excedia 5% ($p < 0,05$).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Indivíduos estudados

Foram obtidas amostras sangue periférico, para extração de DNA, de 116 pacientes transplantados renais.

De acordo com as análises histológicas das biópsias, os indivíduos estudados foram separados por grupos: Sem rejeição (n=47), Rejeição aguda (n=17), Rejeição crônica (n=52) e somando-se os dois últimos grupos, Rejeição total (n=69).

Os dados dos pacientes foram coletados e analisados com relação à raça, sexo, idade, tempo de transplante, tipo de doador, reatividade contra painel, tempo de isquemia fria, compatibilidades HLA e tipo de imunossupressor utilizado, estando representados na Tabela 24.1. O único fator com diferença estatisticamente relevante foi em relação ao total de dias após o transplante, verificando-se que o grupo com rejeição crônica se apresenta com maior média de dias pós transplante do que o de rejeição aguda ($p < 0,0001$), e ainda, com o grupo sem rejeição ($p < 0,0001$), o que já era de se esperar, posto que a rejeição aguda ocorre geralmente nos 3 primeiros meses e a crônica, geralmente, após o primeiro ano de transplante. Essas análises caracterizam a homogeneidade de fatores avaliados neste estudo.

Como controles saudáveis, foram obtidas amostras de DNA do sangue periférico de voluntários doadores de medula óssea (n=142, para polimorfismos da região 3' NT e n=202, para tipificação de HLA-Cw e polimorfismos das citocinas).

4.2. Expressão protéica de HLA-G de membrana no enxerto renal

Com intuito de caracterizar se a expressão de HLA-G influenciaria na condição clínica pós-transplante, avaliamos o perfil de expressão dessa molécula em biópsias estratificadas de acordo com a presença ou não de rejeição.

A reação de imunohistoquímica para HLA-G foi possível de ser realizada em 82 biópsias dos 116 pacientes pesquisados. Das quais, no grupo rejeição aguda (n=13), 6 (46,15%) são positivas e 7 (53,84%) negativas; rejeição crônica (n=35), 16 (45,71%) são positivas e 19 (54,29%) negativas; rejeição total (n=48) 22 (45,83%) são positivas e 26 (54,17%) negativas; e Sem rejeição (n=35) 20 (58,82%) são positivas e 14 (41,18%) negativas.

Tabela 24 - Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes submetidos ao aloenxerto renal

	Rejeição			Sem rejeição	<i>p</i> -valores da comparação entre:	
	Aguda	Crônica (CAN)	Total		Aguda / Crônica / Sem rejeição ^a	Rejeição / Sem rejeição ^b
Sexo	(<i>n</i> = 17)	(<i>n</i> = 52)	(<i>n</i> = 69)	(<i>n</i> = 47)		
Homens / Mulheres	6 / 11	34 / 18	40 / 29	31 / 16	0.0674(MET)	0.4406 (FET)
Idade	(<i>n</i> = 17)	(<i>n</i> = 52)	(<i>n</i> = 69)	(<i>n</i> = 47)		
Média (anos)	42.98 ± 14.52	42.95 ± 11.84	42.96 ± 12.45	44.86 ± 12.83	0.7302 (ANOVA)	0.5251 (MW)
Intervalo (anos)	22.65 – 68.30	5.29 – 61.74	5.29 – 68.30	21.81 – 68.23		
Cor da Pele	(<i>n</i> = 17)	(<i>n</i> = 52)	(<i>n</i> = 69)	(<i>n</i> = 47)		
Branco / Mulato / Negro	13 / 3 / 1	38 / 12 / 2	51 / 15 / 3	39 / 8 / 0	0.5106 (MET)	0.3001 (MET)
Causa da Falha Renal	(<i>n</i> = 17)	(<i>n</i> = 52)	(<i>n</i> = 69)	(<i>n</i> = 47)	0.6297 (MET)	1.0000 (MET)
Nefropatia diabética	1	7	8	7		
Nefropatia Lúpica	1	1	2	1		
Doença de Berger	1	1	2	0		
Doença cística renal	2	2	4	0		
Esclerose do glomérulo	0	0	0	1		
Hipertensão	7	14	21	12		
Outros	0	4	4	4		
Não relatado	3	9	12	6		
Desconhecido	4	16	20	16		

	Rejeição			Sem rejeição	<i>p</i> -valores da comparação entre:	
	Aguda	Crônica (CAN)	Total		Aguda / Crônica / Sem rejeição ^a	Rejeição / Sem rejeição ^b
Compatibilidade HLA-A	(<i>n</i> = 17)	(<i>n</i> = 51)	(<i>n</i> = 68)	(<i>n</i> = 45)	0.6835 (MET)	0.9608 (MET)
0	3	18	21	15		
1	11	28	39	25		
2	3	5	8	5		
Compatibilidade HLA-B	(<i>n</i> = 17)	(<i>n</i> = 51)	(<i>n</i> = 68)	(<i>n</i> = 45)	0.4258 (MET)	0.9273 (MET)
0	3	19	22	16		
1	9	28	37	24		
2	5	4	9	5		
Compatibilidade HLA-DRB1	(<i>n</i> = 17)	(<i>n</i> = 51)	(<i>n</i> = 68)	(<i>n</i> = 45)	0.3177 (MET)	0.0873 (MET)
0	1	3	4	7		
1	11	26	37	18		
2	5	22	27	20		
Incompatibilidade HLA	(2 <i>n</i> = 34)	(2 <i>n</i> = 102)	(2 <i>n</i> = 136)	(2 <i>n</i> = 90)	0.7541 (MET)	0.2610 (MET)
HLA-A	17	64	81	55	0.9760 (MET)	0.4297 (FET)
HLA-B	15	66	61	56	0.6900 (MET)	0.2460 (FET)
HLA-DRB1	13	32	45	32	0.6187 (MET)	0.7931 (FET)

	Rejeição			Sem rejeição	<i>p</i> -valores da comparação entre:	
	Aguda	Crônica (CAN)	Total		Aguda / Crônica / Sem rejeição ^a	Rejeição / Sem rejeição ^b
Reatividade contra Painel de Anticorpos	(<i>n</i> = 14)	(<i>n</i> = 33)	(<i>n</i> = 47)	(<i>n</i> = 35)		
0%	10	24	34	23		
1 a 10%	4	3	7	4		
10 a 20%	0	2	2	2		
20 a 30%	0	0	0	3		
30 a 40%	0	1	1	1		
40 a 50%	0	0	0	1		
50 a 60%	0	3	3	1		
Média	2.78 ± 4.57	8.63 ± 18.25	6.36 ± 14.37	8.77 ± 15.25	0.6930 (KW)	0.5255 (MW)
Intervalo	0 – 10	0 – 60	0 – 60	0 – 60		
Tempo de transplante no momento da biópsia	(<i>n</i> = 17)	(<i>n</i> = 52)	(<i>n</i> = 69)	(<i>n</i> = 47)		
Até 2 meses	5	3	8	22		
Entre 2 e 6 meses	4	9	13	9		
Entre 6 meses e 1 ano	1	8	9	6		
Entre 1 e 3 anos	4	18	22	4		
Entre 3 e 10 anos	3	11	14	5		
Entre 10 e 16 anos	0	3	3	1		
Média (Dias)	449.35 ± 643.29	1165.53 ± 1379.7	989.08 ± 1273.5	434.25 ± 907.27	< 0.0001 (KW) ^c	< 0.0001 (MW) ^d
Intervalo (Dias)	7 – 1896	12 – 5659	7 – 5659	5 – 4593		

	Rejeição			Sem rejeição	<i>p</i> -valores da comparação entre:	
	Aguda	Crônica (CAN)	Total		Aguda / Crônica / Sem rejeição ^a	Rejeição / Sem rejeição ^b
Tipo de doador	(<i>n</i> = 16)	(<i>n</i> = 52)	(<i>n</i> = 69)	(<i>n</i> = 47)		
Falecido / Vivo-Relacionado	13 / 3	45 / 7	58 / 11	37 / 10	0.5897 (MET)	0.4729 (FET)
Tempo de Isquemia Fria	(<i>n</i> = 15)	(<i>n</i> = 40)	(<i>n</i> = 55)	(<i>n</i> = 38)		
Média (Horas)	28.13 ± 8.63	25.22 ± 8.49	26.01 ± 8.55	27.34 ± 12.59	0.3395 (KW)	0.9719 (MW)
Intervalo (Horas)	3.66 – 37.00	0.05 – 36.00	0.05 – 37.00	1.00 – 72.00		
Tratamento Imunossupressor	(<i>n</i> = 17)	(<i>n</i> = 52)	(<i>n</i> = 69)	(<i>n</i> = 47)	0.5296 (MET)	0.4708 (FET)
Azatioprine	3	4	7	4	0.4048 (MET)	0.7598 (FET)
Ciclosporina	1	7	8	10	0.5949 (MET)	0.4650 (FET)
Micofenolato	9	43	52	42	0.3199 (MET)	1.0000 (FET)
Prednisone	16	45	61	44	0.7434 (MET)	0.4720 (FET)
Rapamicina/Sirulimus	2	3	5	11	0.1093 (MET)	0.0690 (FET)
Simulec	0	1	1	1	1.0000 (MET)	1.0000 (FET)
Tacrolimus/FK	12	26	38	28	0.5141 (MET)	0.6781 (FET)

^a Comparação entre os três grupos (Rejeição aguda, Rejeição crônica e Sem rejeição) analisadas por one-way ANOVA seguida de múltiplas comparações pos teste, Tukey, Kruskal-Wallis test (KW) seguido de múltiplas comparações pós teste, Dunn's, ou por teste exato que aplica Metropolis algorithm (MET) para obter um estimativa imparcial do exato valor de para uma dada Tabela de contingência RxC (no caso de reveladas diferenças significativas por esta ultima análise, comparações pos teste pair-wise foram feitas com teste exato de Fisher).

^b Comparações entre os grupos Com rejeição e Sem rejeição feitas por media ou teste-t bicaudal, media Mann-Whitney (MW) ou teste exato de Fisher bicaudal (FET) ou por um teste exato que aplica o Metropolis algorithm (MET) para obter uma estimativa imparcial do exato valor de *p* para uma dada Tabela de contingência RxC.

^c pós teste de múltiplas comparações, Dunn's, revelou diferenças significativas na comparação entre os grupos Rejeição aguda vs. Rejeição crônica (*p* < 0.01) e Rejeição crônica vs. Sem rejeição (*p* < 0.001); não foi observada diferença significativa na comparação entre os grupos Rejeição aguda vs. Sem rejeição (*p* > 0.05).

^d Comparação pos teste, Mann-Whitney test (MW), revelou diferenças significativas entre os grupos Rejeição vs. Sem rejeição (*p* < 0.01).

A Figura 5 mostra fotos da imunohistoquímica feita para a proteína HLA-G nos cortes de biópsia renal dos pacientes transplantados e controles. Como controle negativo foi usado amostras de rim normal, de indivíduos que tiveram morte por trauma (Figura 5 C), e como controle positivo amostras de trofoblasto (Figura 5 D). A Figura 4.2.1.A mostra a marcação negativa para o HLA-G em aloenxerto renal com rejeição aguda e a Figura 4.2.1.B, mostra a marcação positiva para o HLA-G em aloenxerto renal sem rejeição. Os principais sítios de expressão da molécula foram às células tubulares renais, sendo que, em alguns casos, detectou-se marcação para HLA-G também em células do glomérulo renal e do interstício.

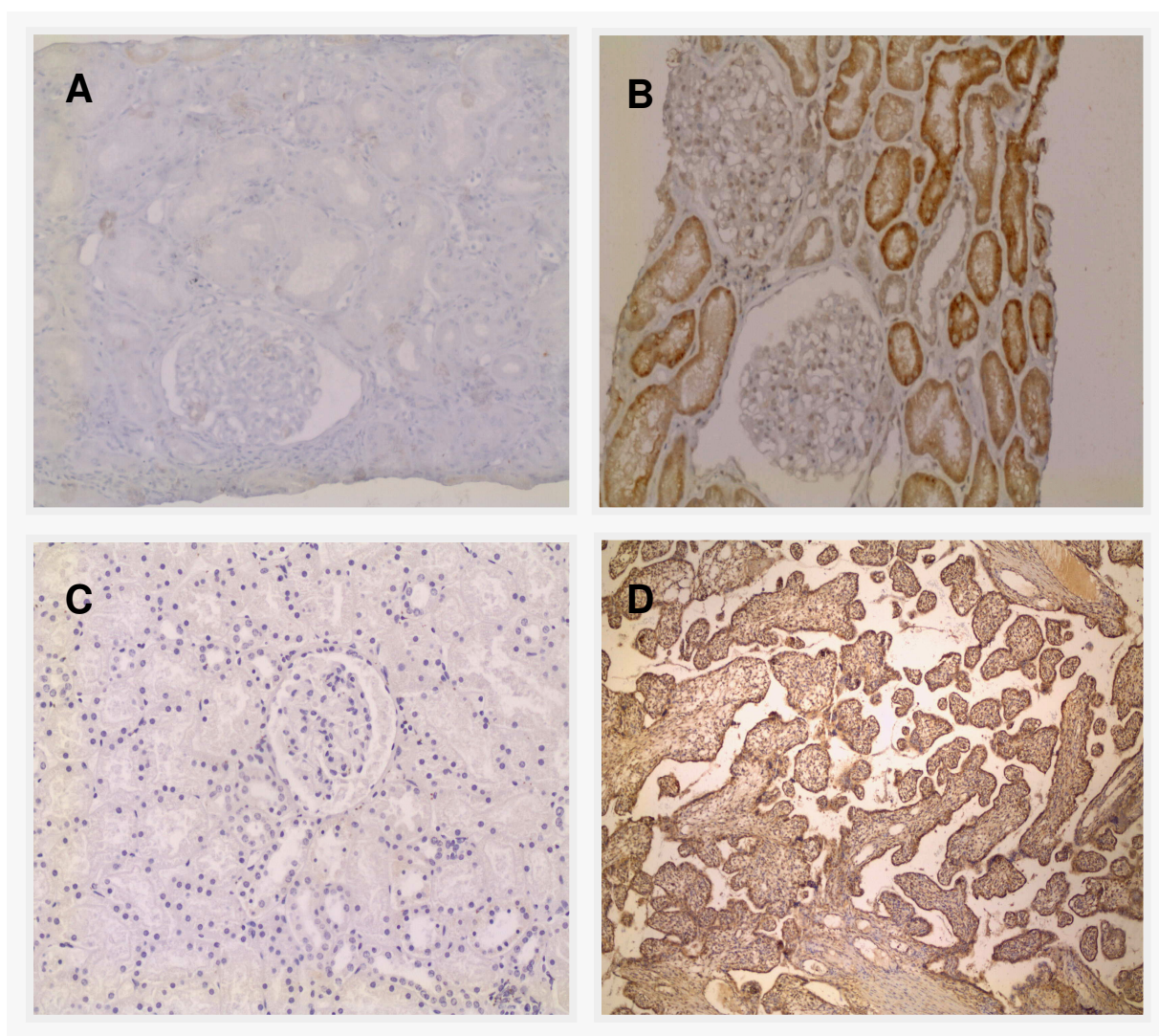


Figura 5 - Expressão de HLA-G em aloenxertos renais. Imunohistoquímica com anticorpo anti-HLA-G (clone 4H84 – cedido gentilmente por Serviço de Pesquisa em Hemato-imunologia do Hospital Saint-Louis - Paris) em biópsias de A - aloenxerto renal com rejeição, HLA-G negativo; B – Aloenxerto renal sem rejeição, HLA-G positivo; C - Controle negativo: rim normal e D – Controle positivo: Trofoblasto. Nota-se imunoreatividade (coloração acastanhada) para HLA-G predominantemente em células tubulares. Método de detecção: Avidina Biotina-Peroxidase (ABC-complexo). Revelação: diaminobenzidina (DAB). Aumento 40 x 10.

O número de pacientes e a frequência da expressão de HLA-G no aloenxerto renal dos diferentes grupos de pacientes transplantados, estão presentes na Tabela 25. E a probabilidade feita pelo Teste Exato de Fisher bicaudal com o software GraphPad InStat 3.06 estão presentes na Tabela 26.

Tabela 25 - Frequência da expressão de HLA-G no aloenxerto renal de pacientes transplantados.

Grupos de pacientes	n	HLA-G+	HLA-G-
Rejeição aguda	13	0.4615	0.5384
Rejeição crônica	35	0.4571	0.5428
Rejeição Total	48	0.4583	0.5417
Sem rejeição	34	0.5882	0.4117

Através da Tabela 25 e do gráfico em Apêndice A é possível notar que os grupos com rejeição (aguda, crônica e total) têm frequência maior de HLA-G negativo, enquanto que o sem rejeição tem frequência maior de HLA-G positivo. Mas como pode ser observado na Tabela 26, de probabilidade de expressão de HLA-G no enxerto renal entre os diferentes grupos de pacientes estudados, a diferença de expressão de HLA-G entre os grupos não foi estatisticamente relevante.

Tabela 26 - Probabilidade da expressão de HLA-G no enxerto de pacientes transplantados renais

Grupos de pacientes	p valor
Rejeição aguda x Rejeição crônica	1.0000
Rejeição aguda x Rejeição Total	0.5203
Rejeição aguda x Sem rejeição	0.5203
Rejeição crônica x Rejeição Total	0.3383
Rejeição crônica x Sem rejeição	0.3383
Rejeição Total x Sem rejeição	0.2704

*p valor pelo Teste Exato de Fisher bicaudal

4.3. Polimorfismo da região 3'NT do gene HLA-G

A variabilidade da região 3'NT do gene HLA-G foi avaliada por seqüenciamento direto do produto de amplificação de 105 pacientes transplantados renais e 142 indivíduos controles normais.

Na Figura 6 está representada a estrutura genética da região 3'NT contendo diversos polimorfismos já descritos, entre eles a presença ou ausência de

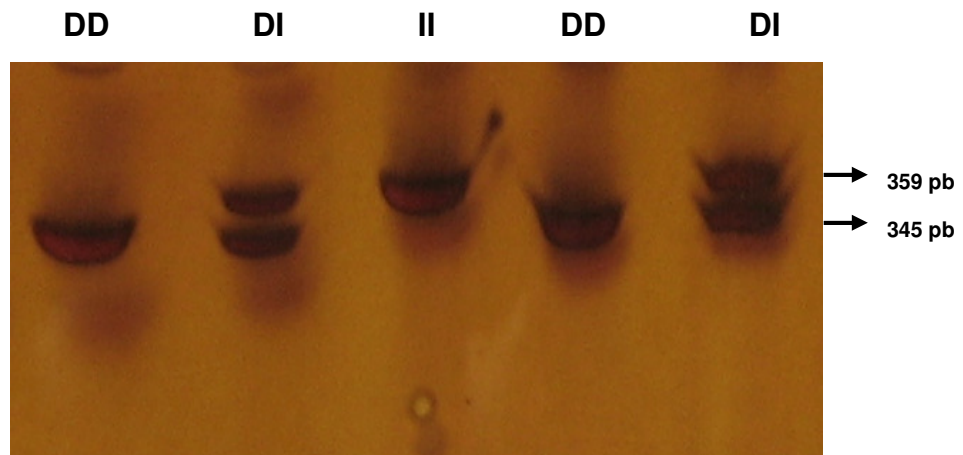


Figura 7 - Gel de eletroforese da amplificação da região 3' NT do HLA-G. (II) Homozigoto para inserção (presença do 14-pb); (DI) Heterozigoto para inserção e deleção; e (DD) Homozigoto para deleção (ausência) dos 14 pb.

Na Figura 9 estão representados cromatogramas dos SNPs +3003 C/T, +3010 G/C, +3027 A/C, +3035 C/T, de 3 amostras, onde a Figura 9.A representa um indivíduo homozigoto para +3003 T/T, +3010 G/G, +3027 C/C e +3035 C/C; a Figura 9.B um indivíduo heterozigoto para +3003 C/T, +3010 G/C e homozigoto para +3027 C/C e +3035 C/C; e a Figura 9.C um indivíduo homozigoto para +3003 T/T e heterozigoto para +3010 G/C, +3027 A/C e +3035 C/T.

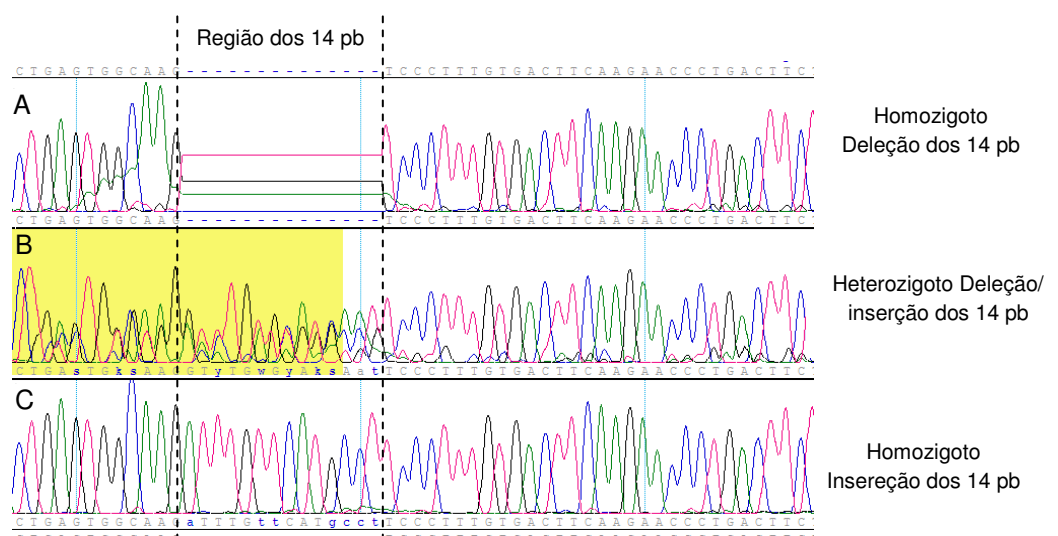


Figura 8 - Cromatograma do sequenciamento da inserção/deleção dos 14 pb da região 3' NT do HLA-G. A) Homozigoto para Deleção dos 14 pb; B) Heterozigoto para Deleção/ inserção dos 14 pb; C) Homozigoto para Inserção dos 14 pb.

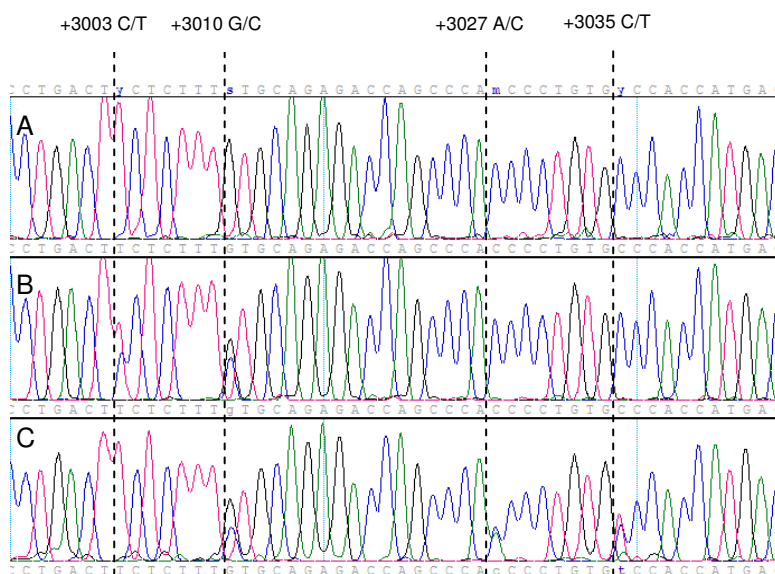


Figura 9 - Cromatograma do sequenciamento dos SNPs +3003 C/T, +3010 G/C, +3027 A/C e +3035 C/T da região 3' NT do HLA-G. A) Homozigoto para +3003 T/T, +3010 G/G, +3027 C/C e +3035 C/C; B) Heterozigoto para +3003 C/T, +3010 G/C e Homozigoto para +3027 C/C e +3035 C/C; C) Homozigoto para +3003 T/T e Heterozigoto para +3010 G/C, +3027 A/C e +3035 C/T .

Após coletados os dados dos genótipos da região 3'NT do HLA-G, os genótipos encontrados foram analisados quanto sua aderência ao Equilíbrio Hardy-Weinberg e o perfil de desequilíbrio de ligação (DL) entre os marcadores. Todos os genótipos aderiram ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, exceto os genótipos da posição +3187, apresentando um excesso de heterozigose. Como se pode observar na Tabela 27 e no gráfico em Apêndice B é possível notar, levando em consideração as baixas frequências da homozigose 14pb Ins/ Ins nos grupos, a diminuição dos homozigotos 14pb Del/Del e aumento do genótipo 14pb Del/Ins entre os pacientes com rejeição aguda em relação aos demais pacientes transplantados, no entanto, não houve diferenças estatisticamente significantes nas frequências alélicas e genotípicas da Inserção/ deleção dos 14pb da região 3' NT do HLA-G entre os diferentes grupos de pacientes transplantados renais e controle (Tabela 28).

Tabela 27 - Frequência alélica e genotípica do 14pb da região 3'NT do HLA-G.

Grupos	n	Alelos		HWE (p valor)	Genótipos		
		14pb Del	14pb Ins		14pb Del / Del	14pb Del / Ins	14pb Ins / Ins
Rejeição aguda	15	0.600	0.400	0.2889	0.267	0.667	0.067
Rejeição crônica	48	0.635	0.365	0.3521	0.438	0.396	0.167
Rejeição	63	0.627	0.373	1.0000	0.397	0.460	0.143
Sem rejeição	41	0.573	0.427	0.7540	0.341	0.463	0.195
Controle	142	0.588	0.412	0.0864	0.380	0.415	0.204

HWE: Aderências as proporções fenotípicas esperadas sob o Equilíbrio Hardy-Weinberg (HWE) (GENEPOP 3,4)

Tabela 28 - Probabilidade alélica e genotípica da posição 14pb da região 3' NT do HLA-G entre os pacientes transplantados renais e controle.

Grupo de Pacientes	Genótipos			Alelos 14pb Del ou Ins
	14pb Del / Del	14pb Del / Ins	14pb Ins / Ins	
Rejeição aguda x Rejeição crônica	0.3655	0.0815	0.6733	0.8293
Rejeição aguda x Sem rejeição	0.7508	0.2329	0.4184	0.2904
Rejeição aguda x Controle	0.5750	0.0984	0.3059	0.1799
Rejeição crônica x Sem rejeição	0.3906	0.6675	0.7864	0.4429
Rejeição crônica x Controle	0.4988	0.8663	0.6758	0.4701
Rejeição x Sem rejeição	0.6794	1.0000	0.7864	0.4698
Rejeição x Controle	0.8768	0.6466	0.7936	0.5124
Sem rejeição x Controle	0.7160	0.5956	1.0000	0.8988

Teste exato de Fisher (GraphPad InStat, INC 2003).

Não houve diferenças relevantes para a frequência alélica e genotípica da posição +3003 da região 3'NT do HLA-G entre os diferentes grupos de pacientes transplantados renais e controle (Tabelas 29 e 30).

Tabela 29 - Frequência alélica e genotípica posição +3003 da região 3' NT do HLA-G.

Grupos	n	Alelos		HWE (p valor)	Genótipos		
		+3003 T	+3003 C		+3003 CC	+3003 CT	+3003 TT
Rejeição aguda	15	0.900	0.100	1.0000	0.000	0.200	0.800
Rejeição crônica	48	0.872	0.128	1.0000	0.000	0.255	0.745
Rejeição	63	0.879	0.121	0.5819	0.000	0.242	0.758
Sem rejeição	41	0.902	0.098	1.0000	0.000	0.195	0.805
Controle	142	0.863	0.137	0.4721	0.007	0.261	0.732

HWE: Aderências as proporções fenotípicas esperadas sob o Equilíbrio Hardy-Weinberg (HWE) (GENEPOP 3,4)

Tabela 30 - Probabilidade alélica e genotípica da posição +3003 da região 3' NT do HLA-G entre os pacientes transplantados renais e controle.

Grupo de Pacientes	Genótipos			Alelos
	+3003 CC	+3003 CT	+3003 TT	C ou T
Rejeição aguda x Rejeição crônica	-	1.0000	1.0000	1.0000
Rejeição aguda x Sem rejeição	-	1.0000	1.0000	1.0000
Rejeição aguda x Controle	1.0000	0.7617	0.7608	0.7795
Rejeição crônica x Sem rejeição	-	0.6154	0.6154	0.6386
Rejeição crônica x Controle	1.0000	1.0000	0.8522	0.8633
Rejeição x Sem rejeição	-	0.6386	0.6386	0.8215
Rejeição x Controle	1.0000	0.8621	0.7311	0.8215
Sem rejeição x Controle	1.0000	0.537	0.4171	0.4536

Teste exato de Fisher (GraphPad InStat, INC 2003).

É possível notar um aumento na frequência do genótipo GC e diminuição na frequência do genótipo CC na rejeição aguda em relação aos demais grupos (Tabela 31 e gráfico em Apêndice C), mas não houve diferenças estatisticamente relevantes para as frequências alélicas e genotípicas da posição +3010 da região 3' NT do HLA-G (Tabela 32).

Tabela 31 - Frequência alélica e genotípica do +3010 da região 3'NT do HLA-G.

Grupos	n	Alelos		HWE (p valor)	Genótipos		
		+3010 C	+3010 G		+3010 GG	+3010 GC	+3010 CC
Rejeição aguda	15	0.561	0.439	0.1418	0.133	0.733	0.133
Rejeição crônica	48	0.500	0.500	0.7726	0.229	0.542	0.229
Rejeição	63	0.500	0.500	0.2138	0.206	0.587	0.206
Sem rejeição	41	0.500	0.500	0.1130	0.122	0.634	0.244
Controle	142	0.528	0.472	0.6177	0.232	0.479	0.268

HWE: Aderências as proporções fenotípicas esperadas sob o Equilíbrio Hardy-Weinberg (HWE) (GENEPOP 3,4)

Tabela 4.3.6 - Probabilidade alélica e genotípica da posição +3010 da região 3' NT do HLA-G entre os pacientes transplantados renais e controle.

Grupo de Pacientes	Genótipos			Alelos
	+3010 GG	+3010 GC	+3010 CC	G ou C
Rejeição aguda x Rejeição crônica	0.7157	0.2382	0.7157	0.5389
Rejeição aguda x Sem rejeição	1.0000	0.5431	0.4809	0.6699
Rejeição aguda x Controle	0.5226	0.1023	0.3564	0.7058
Rejeição crônica x Sem rejeição	0.5722	0.1017	1.0000	1.1195
Rejeição crônica x Controle	1.0000	0.6408	0.7036	0.6387
Rejeição x Sem rejeição	0.7819	0.6849	0.8094	1.1128
Rejeição x Controle	0.7186	0.2252	0.3829	0.6684
Sem rejeição x Controle	0.1309	0.1125	0.8414	0.7071

Teste exato de Fisher (GraphPad InStat, INC 2003).

Como podemos observar na Tabela 33 e 34, não foi encontrada diferença nas frequências alélicas e genóticas da posição +3027 da região 3' NT do HLA-G entre os diferentes grupos de pacientes transplantados renais e controle.

Tabela 33 - Frequência alélica e genotípica do +3027 da região 3' NT do HLA-G.

Grupos	n	Alelos		HWE (<i>p</i> valor)	Genótipos		
		+3027 C	+3027 A		+3027 AA	+3027 AC	+3027 CC
Rejeição aguda	15	1.000	0.000	-	0.000	0.000	1.000
Rejeição crônica	48	0.979	0.021	1.0000	0.000	0.042	0.958
Rejeição	63	0.984	0.016	1.0000	0.000	0.032	0.968
Sem rejeição	41	0.951	0.049	1.0000	0.000	0.098	0.902
Controle	142	0.944	0.056	0.3734	0.007	0.099	0.894

HWE: Aderências as proporções fenotípicas esperadas sob o Equilíbrio Hardy-Weinberg (HWE) (GENEPOP 3,4)

Tabela 34 - Probabilidade alélica e genotípica da posição +3027 da região 3' NT do HLA-G entre os pacientes transplantados renais e controle.

Grupo de Pacientes	Genótipos			Alelos A ou C
	+3027 AA	+3027 AC	+3027 CC	
Rejeição aguda x Rejeição crônica	-	1.0000	1.0000	1.0000
Rejeição aguda x Sem rejeição	-	0.5646	0.5646	0.5722
Rejeição aguda x Controle	1.0000	0.3644	0.3641	0.3803
Rejeição crônica x Sem rejeição	-	0.4081	0.4081	0.4162
Rejeição crônica x Controle	1.0000	0.3663	0.2472	0.2636
Rejeição x Sem rejeição	-	0.2092	0.2092	0.215
Rejeição x Controle	1.0000	0.1562	0.1003	0.0713
Sem rejeição x Controle	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000

Teste exato de Fisher (GraphPad InStat, INC 2003).

Na posição +3035 da região 3'NT do HLA-G, é possível notar maior frequência do genótipo CC rejeição crônica em relação ao Controle ($p = 0.0483$) e menor frequência do genótipo CT na rejeição crônica em relação ao grupo sem rejeição ($p = 0.0314$) e ao Controle ($p = 0.0409$) (Tabelas 35 e 36 e gráfico em Apêndice D), podendo o genótipo CC ser fator de risco e o CT fator de proteção para rejeição crônica.

Tabela 35 - Frequência alélica e genotípica do +3035 da região 3' NT do HLA-G.

Grupos	n	Alelos		HWE (p valor)	Genótipos		
		+3035 C	+3035 T		+3035 CC	+3035 CT	+3035 TT
Rejeição aguda	15	0.867	0.133	1.0000	0.733	0.267	0.000
Rejeição crônica	48	0.927	0.073	0.2093	0.875	0.104	0.021
Rejeição	63	0.913	0.087	0.3793	0.841	0.143	0.016
Sem rejeição	41	0.854	0.146	0.5704	0.707	0.293	0.000
Controle	142	0.852	0.148	1.0000	0.725	0.254	0.021

HWE: Aderências as proporções fenotípicas esperadas sob o Equilíbrio Hardy-Weinberg (HWE) (GENEPOP 3,4)

Tabela 36 - Probabilidade alélica e genotípica da posição +3035 da região 3' NT do HLA-G entre os pacientes transplantados renais e controle.

Grupo de Pacientes	Genótipos			Alelos C ou T
	+3035 CC	+3035 CT	+3035 TT	
Rejeição aguda x Rejeição crônica	0.2310	0.1983	1.0000	0.2908
Rejeição aguda x Sem rejeição	1.0000	1.0000	-	1.0000
Rejeição aguda x Controle	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
Rejeição crônica x Sem rejeição	0.0652	0.0314b	1.0000	0.1453
Rejeição crônica x Controle	0.0483a	0.0409c	1.0000	0.0768
Rejeição x Sem rejeição	0.1403	0.0813	1.0000	0.2575
Rejeição x Controle	0.0785	0.0995	1.0000	0.1106
Sem rejeição x Controle	0.8445	0.6875	1.0000	1.0000

Teste exato de Fisher (GraphPad Instat, INC 2003). *Odd Ratio e Intervalo de Confiança (IC) para os valores de p das respectivas frequências entre os grupos de pacientes e controles analisados. a) Odds ratio = 2.650 95% e IC: 1.044 a 6.729; b) Odds ratio = 0.2810 e 95% e IC: 0.08943 a 0.8830; c) Odds ratio = 0.3424 e 95% e IC: 0.1259 a 0.9312.

Não houve diferenças relevantes para a frequência alélica e genotípica da posição +3142 da região 3' NT do HLA-G entre os diferentes grupos de pacientes transplantados renais e controle (Tabelas 37 e 38).

Tabela 37 - Frequência alélica e genotípica do +3142 da região 3' NT do HLA-G.

Grupos	n	Alelos		HWE (p valor)	Genótipos		
		+3142 G	+3142 C		+3142 GG	+3142 GC	+3142 CC
Rejeição aguda	15	0.500	0.500	0.1418	0.133	0.733	0.133
Rejeição crônica	48	0.500	0.500	0.7726	0.229	0.542	0.229
Rejeição	63	0.500	0.500	0.2138	0.206	0.587	0.206
Sem rejeição	40	0.563	0.437	0.1208	0.250	0.625	0.125
Controle	142	0.539	0.461	1.0000	0.289	0.500	0.211

HWE: Aderências as proporções fenotípicas esperadas sob o Equilíbrio Hardy-Weinberg (HWE) (GENEPOP 3,4)

Tabela 38 - Probabilidade alélica e genotípica da posição +3142 da região 3' NT do HLA-G entre os pacientes transplantados renais e controle.

Grupo de Pacientes	Genótipos			Alelos G ou C
	3142 GG	+3142 GC	+3142 CC	
Rejeição aguda x Rejeição crônica	0.7157	0.2382	0.7157	1.1654
Rejeição aguda x Sem rejeição	0.4772	0.5370	1.0000	0.6680
Rejeição aguda x Controle	0.2410	0.1063	0.7374	0.7046
Rejeição crônica x Sem rejeição	1.0000	0.5170	0.2711	0.4500
Rejeição crônica x Controle	0.4604	0.7386	0.8399	0.5549
Rejeição x Sem rejeição	0.6335	0.8367	0.4253	0.3944
Rejeição x Controle	0.2343	0.2894	1.0000	0.5203
Sem rejeição x Controle	0.6943	0.2095	0.2630	0.7995

Teste exato de Fisher (GraphPad InStat, INC 2003).

Nas Tabelas 39 e 40 e no gráfico em Apêndice E, pode-se notar na posição +3187 da região 3' NT do HLA-G um aumento significativo da frequência no genótipo GA no grupo com rejeição em relação ao grupo controle ($p = 0.0484$).

Esse aumento de frequência do alelo G nos grupos de rejeição associada à quase ausência de indivíduos homozigotos para este alelo acarretou a não aderência do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) em ambos os grupos.

Tabela 39 - Frequência alélica e genotípica do +3187 da região 3' NT do HLA-G.

Grupos	n	Alelos		HWE (<i>p</i> valor)	Genótipos		
		+3187 A	3187 G		3187 GG	+3187 GA	+3187 AA
Rejeição aguda	15	0.700	0.300	0.0366	0.000	0.600	0.400
Rejeição crônica	48	0.698	0.302	0.0060	0.021	0.563	0.417
Rejeição	63	0.698	0.302	0.3988	0.016	0.571	0.413
Sem rejeição	40	0.750	0.250	0.2372	0.025	0.450	0.525
Controle	142	0.750	0.250	0.2646	0.042	0.415	0.542

HWE: Aderências as proporções fenotípicas esperadas sob o Equilíbrio Hardy-Weinberg (HWE) (GENEPOP 3,4)

Tabela 40 - Probabilidade alélica e genotípica da posição +3187 da região 3' NT do HLA-G entre os pacientes transplantados renais e controle.

Grupo de Pacientes	Genótipos			Alelos G ou A
	3187 GG	+3187 GA	+3187 AA	
Rejeição aguda x Rejeição crônica	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
Rejeição aguda x Sem rejeição	1.0000	0.3753	0.5472	0.6312
Rejeição aguda x Controle	1.0000	0.1835	0.4157	0.5172
Rejeição crônica x Sem rejeição	1.0000	0.3919	0.3916	0.5011
Rejeição crônica x Controle	0.6813	0.0938	0.1376	0.3485
Rejeição x Sem rejeição	1.0000	0.3116	0.3127	0.5252
Rejeição x Controle	0.4417	0.0484a	0.0973	0.2782
Sem rejeição x Controle	1.0000	0.7200	0.8594	1.0000

Teste exato de Fisher (GraphPad Instat, INC 2003). *Odd Ratio e Intervalo de Confiança (IC) para os valores de p das respectivas frequências entre os grupos de pacientes e controles analisados. a) Odds ratio= 1.876 e 95% IC: 1.029 a 3.419.

Considerando-se os dados dos marcadores de todas as amostras como um todo (normais e pacientes), todos os marcadores apresentaram um elevado LD entre si (Tabela 41), possibilitando uma inferência probabilística (computacional) de haplótipos.

Tabela 41 - Probabilidades do teste exato de desequilíbrio de ligação (LD) para todos os sítios polimórficos detectados da região 3' NT do HLA-G (LD: $p < 0.005$).

Polimorfismos	14pb D/I	+3003 C/T	+3010 G/C	+3027 A/C	+ 3035 C/T	+3142 G/C	+3187 G/A
14pb D/I	-						
+3003 C/T	0.0000	-					
+3010 G/C	0.0000	0.0000	-				
+3027 A/C	0.0000	0.8805	0.0024	-			
+ 3035 C/T	0.0000	0.0002	0.0000	0.0000	-		
+3142 G/C	0.0000	0.0000	0.0000	0.0026	0.0000	-	
+3187 G/A	0.0000	0.0023	0.0000	0.0632	0.0000	0.0000	-

LD: Desequilíbrio de Ligação (GENEPOP 3,4)

Dada uma associação positiva para a maioria dos marcadores, porém fase gamética desconhecida, o método PHASE foi utilizado para inferir os haplótipos encontrados para a região 3'NT do HLA-G. Os haplótipos encontrados foram nomeados de acordo com um trabalho anterior do grupo (CASTELLI et al., 2009) e estão listados na Tabela 42. A frequência haplotípica e as probabilidades para os diferentes grupos estudados estão representados nas Tabelas 43 e 44, respectivamente.

Tabela 42 - Haplótipos encontrados na região 3'NT do gene HLA-G

Haplótipos	14pb	+3003	+3010	+3027	+3035	+3142	+3187
3'NT-1	D	T	G	C	C	C	G
3'NT-2	I	T	C	C	C	G	A
3'NT-3	D	T	C	C	C	G	A
3'NT-4	D	C	G	C	C	C	A
3'NT-5	I	T	C	C	T	G	A
3'NT-6	D	T	G	C	C	C	A
3'NT-7	I	T	C	A	T	G	A
3'NT-8	I	T	G	C	C	G	A

Apesar de podermos observar aumento na frequência do haplótipo UTR-5 e discreta diminuição da frequência dos haplótipos UTR-3 e UTR-7 no grupo com rejeição aguda em relação aos outros grupos (Tabela 35), não houve diferença estatisticamente relevante na frequência haplotípica dos polimorfismos estudados na região 3'NT do HLA-G.

Tabela 43 - Frequência haplotípica da região 3'NT do HLA-G entre os pacientes transplantados renais e controle.

Grupos	2n	UTR-1	UTR-2	UTR-3	UTR-4	UTR-5	UTR-6	UTR-7	UTR-8
Rejeição aguda	30	0.3000	0.2670	0.1000	0.1000	0.1330	0.1000	0.0000	0.0000
Rejeição crônica	96	0.3020	0.2920	0.1350	0.1250	0.0520	0.0730	0.0210	0.0000
Rejeição Total	126	0.3020	0.2860	0.1270	0.1190	0.0710	0.0790	0.0160	0.0000
Sem rejeição	82	0.2560	0.2800	0.1340	0.0980	0.0980	0.0850	0.0490	0.0000
Controle	284	0.2500	0.2540	0.1270	0.1370	0.0920	0.0740	0.0560	0.0110

Tabela 4.4 – Probabilidade haplotípica da região 3' NT do HLA-G entre os pacientes transplantados renais e controle.

Grupo de Pacientes	Haplótipos região 3'NT do HLA-G								
	UTR-1	UTR-2	UTR-3	UTR-4	UTR-5	UTR-6	UTR-7	UTR-8	
Rejeição aguda x Rejeição crônica	1.0000	1.0000	0.7602	1.0000	0.2150	0.7006	1.0000	-	
Rejeição aguda x Sem rejeição	0.6377	1.0000	0.7560	1.0000	0.7306	0.7192	0.5722	-	
Rejeição aguda x Controle	0.5172	0.8289	1.0000	0.7795	0.5053	0.4895	0.3803	1.0000	
Rejeição crônica x Sem rejeição	0.5091	1.0000	1.0000	0.6386	0.2642	0.7866	1.0000	-	
Rejeição crônica x Controle	0.3485	0.5031	0.8605	0.8633	0.2847	1.0000	0.2636	0.5748	
Rejeição x Sem rejeição	0.5308	1.0000	1.0000	0.8215	0.6062	1.0000	0.2150	-	
Rejeição x Controle	0.2782	0.5437	0.8605	0.7518	0.5699	0.8414	0.0713	0.5560	
Sem rejeição x Controle	0.8862	0.6684	0.8524	0.4536	0.8313	0.8134	0.7917	1.0000	

Teste exato de Fisher (GraphPad Instat, INC 2003).

O próximo passo, após encontrar os haplótipos inferidos de cada paciente e calcular as frequências para cada grupo, foi avaliar se os polimorfismos dos genótipos e haplótipos da região 3'NT do HLA-G teriam alguma relação com a frequência de expressão, feita por imunohistoquímica, do HLA-G no aloenxerto renal. Para isso analisamos um total de 73 pacientes transplantados renais, e como podemos observar na Tabela 45, não encontramos nenhuma relação estatística entre a frequência dos haplótipos dos diferentes grupos estudados e a expressão de HLA-G, assim como para os genótipos de todos os polimorfismos e genótipos de haplótipos (dados em Apêndices F a N).

Mas podemos observar diferenças nas frequências, como por exemplo no haplótipo UTR-6 podemos notar frequência 8 vezes maior de marcação negativa que positiva para HLA-G no grupo rejeição total e no haplótipo UTR-4 podemos notar frequência mais que 5 vezes maior de marcação positiva que negativa para HLA-G no grupo sem rejeição.

Tabela 45 - Frequência e probabilidade haplotípica da região 3'NT do HLA-G em relação à expressão de HLA-G no aloenxerto renal

Grupos	2n	Haplótipos região 3'NT do HLA-G						
		1	2	3	4	5	6	7
Rejeição aguda								
HLA-G -	14	0.2143	0.2143	0.1429	0.0714	0.1429	0.2143	0.0000
HLA-G +	8	0.5000	0.2500	0.0000	0.1250	0.1250	0.0000	0.0000
<i>p valor</i> ^a		0.3426	1.0000	0.5152	1.0000	1.0000	0.2727	-
Rejeição crônica								
HLA-G -	36	0.3333	0.2500	0.0833	0.1389	0.0278	0.1389	0.0278
HLA-G +	28	0.2857	0.2500	0.1786	0.1786	0.0357	0.0357	0.0357
<i>p valor</i> ^a		0.7885	1.0000	0.2821	0.7367	1.0000	0.2190	1.0000
Rejeição Total								
HLA-G -	50	0.3000	0.2400	0.1000	0.1200	0.0600	0.1600	0.0200
HLA-G +	36	0.3333	0.2500	0.1389	0.1667	0.0556	0.0278	0.0278
<i>p valor</i> ^a		0.8156	1.0000	0.7356	0.3135	1.0000	0.0732	1.0000
Sem rejeição								
HLA-G -	26	0.2692	0.3077	0.1923	0.0385	0.0769	0.0385	0.0769
HLA-G +	34	0.2059	0.3235	0.0588	0.1765	0.0882	0.1176	0.0294
<i>p valor</i> ^a		0.7590	1.0000	0.2220	0.1264	1.0000	0.3768	0.5738
Total								
HLA-G -	76	0.2895	0.2632	0.1316	0.0921	0.0658	0.1184	0.0395
HLA-G +	70	0.2714	0.2857	0.1000	0.1714	0.0714	0.0714	0.0286
<i>p valor</i> ^a		0.8551	0.8531	0.6128	0.2182	1.0000	0.4062	1.0000

^a Teste exato de Fisher (GraphPad Instat, INC 2003).

4.4. Tipificação dos Genes HLA -A, -B, -DR e -Cw.

A tipificação do Genes HLA -A, -B, -DR e -Cw foi realizado por kits Micro SSP HLA DNA typing (One Lambda, EUA). A tipificação dos genes HLA -A, -B e -DR foi coletada dos prontuários médicos dos pacientes. Dos 116 pacientes transplantados renais e seus doadores, 113 duplas (receptor/doador) tinham informação sobre o HLA -A, -B e -DR. A análise estatística dos matches de HLA foram demonstrados na Tabela 24.1. Onde se pode observar que não houve diferença estatisticamente relevante entre os match e mismatch de HLA -A, -B e -DR entre os grupos de rejeição (aguda, crônica e total) ou sem rejeição.

A tipificação de HLA-Cw foi realizada para um total de 79 pacientes transplantados renais e 202 pacientes controle.

O número de pacientes analisados em cada grupo, as frequências alélicas e o Equilíbrio Hardy-Weinberg estão representados na Tabela 46, e no Gráfico 1 e as respectivas probabilidades estão presentes na Tabela 47.

Na Tabela 46 pode-se observar que o grupo rejeição não teve aderência às proporções fenotípicas esperadas sob o Equilíbrio Hardy-Weinberg (HWE), (0.0037).

De acordo com os resultados das probabilidades realizadas pelo Teste Exato de Fisher bicaudal através do software GraphPad InStat 3.06, demonstradas na Tabela 4.4.2, o alelo HLA-Cw 2 é um fator de risco para rejeição aguda, pois tem sua frequência estatisticamente elevada em relação aos grupos de rejeição crônica ($p = 0.0115$), sem rejeição ($p = 0.0052$) e Controle ($p = 0.0033$).

Os alelos HLA-Cw 3 e HLA-Cw 15 são fatores de risco para rejeição crônica, pois HLA-Cw 3 têm sua frequência estatisticamente elevada em relação ao grupo controle ($p = 0.0377$) e HLA-Cw 15 em relação ao grupo sem rejeição ($p = 0.0231$).

Enquanto que os alelos HLA-Cw 7 e HLA-Cw 12 são fatores de proteção para rejeição crônica, pois HLA-Cw 7 têm sua frequência estatisticamente reduzida em relação ao grupo Controle ($p = 0.0053$) e HLA-Cw 12 em relação e ao grupo Sem rejeição ($p = 0.0454$).

Tabela 46 – Frequência alélica do HLA-Cw na tolerância ao aloenxerto renal

	Rejeição aguda	Rejeição crônica	Rejeição	Sem rejeição	Controle
2n	24	76	100	62	404
HWE (valor p)	0.3595	0.9795	0.0037	0.4434	0.8534
HLA-Cw1	0.0417	0.0395	0.0400	0.0161	0.0173
HLA-Cw2	0.2500	0.0526	0.1000	0.0323	0.0569
HLA-Cw3	0.0000	0.1447	0.1100	0.1452	0.0693
HLA-Cw4	0.2083	0.1711	0.1800	0.1129	0.1535
HLA-Cw5	0.0000	0.0658	0.0500	0.0645	0.0396
HLA-Cw6	0.1250	0.0921	0.1000	0.0806	0.0990
HLA-Cw7	0.1667	0.1184	0.1300	0.2903	0.2673
HLA-Cw8	0.0417	0.0526	0.0500	0.0000	0.0569
HLA-Cw12	0.0417	0.0132	0.0200	0.1129	0.0644
HLA-Cw14	0.0417	0.0263	0.0300	0.0323	0.0223
HLA-Cw15	0.0000	0.1184	0.0900	0.0161	0.0347
HLA-Cw16	0.0833	0.0526	0.0600	0.0806	0.0817
HLA-Cw17	0.0000	0.0526	0.0400	0.0161	0.0297
HLA-Cw18	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0074

HWE: Aderências as proporções fenotípicas esperadas sob o Equilíbrio Hardy-Weinberg (HWE) (GENEPOP 3,4)

Separando os alelos de HLA-Cw de acordo com os grupos C1, que contém o aminoácido lisina na posição 77 e asparagina na posição 80 (Cw1, 3, 7 e 8) e C2, que possui o aminoácido asparagina na posição 77 e lisina na posição 80 (Cw2, 4, 5 e 6), encontramos que a frequência de pelo menos um alelo do grupo C2 foi maior no grupo com rejeição aguda em relação ao grupo sem rejeição ($p = 0.0168$) como podemos observar nas tabelas 48 e 49.

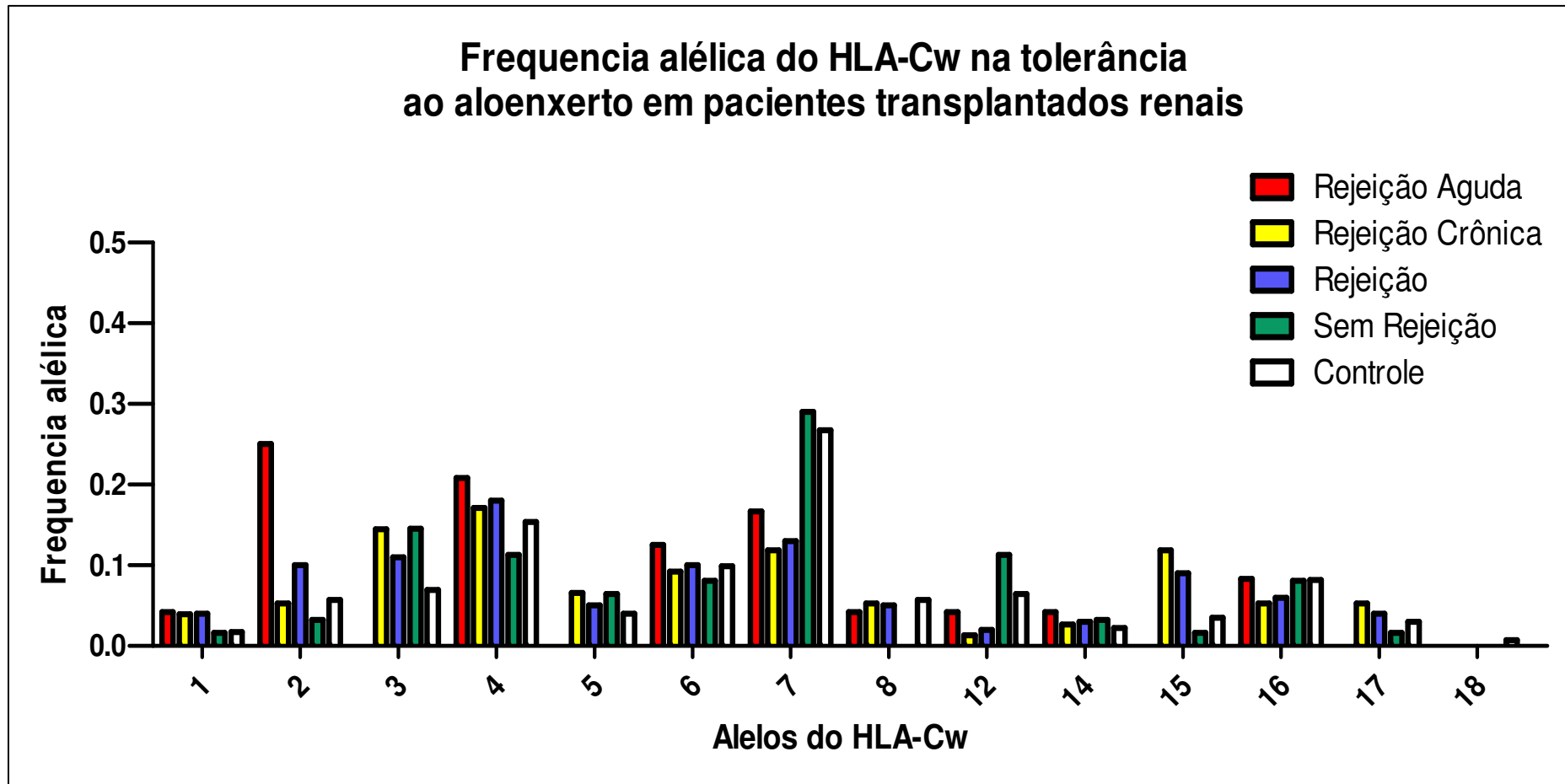


Gráfico 1 – Frequência alélica do HLA-Cw na tolerância ao aloenxerto renal.

Tabela 47 – Probabilidade dos alelos de HLA-Cw entre os diferentes grupos de pacientes transplantados renais e controle.

Alelos HLA-Cw / Grupos	1	2	3	4	5	6	7	8	12	14	15	16	17	18
R Aguda x Rejeição crônica	1.0000	0.0115(a)*	0.0615	0.7618	0.3333	0.6994	0.5060	1.0000	0.4242	0.5652	0.1091	0.628	0.5697	-
R Aguda x Sem rejeição	0.4826	0.0052(b)*	0.0567	0.3024	0.5726	0.6802	0.2829	0.2791	0.4334	1.0000	1.0000	1.0000	0.6500	-
R Aguda x Controle	0.3708	0.0033(c)*	0.3893	0.5601	1.0000	0.7227	0.3451	1.0000	1.0000	0.4420	0.0706	1.0000	1.0000	1.0000
R Crônica x Sem rejeição	0.6274	0.6906	1.0000	0.4667	1.0000	1.0000	0.0544	0.1273	0.0225(h)*	1.0000	0.0231(j)*	0.7311	0.3790	-
R Crônica x Controle	0.1985	1.0000	0.0377(d)*	0.7307	0.3536	1.0000	0.0053(e)*	1.0000	0.1004	0.6883	0.8255	0.4870	0.2979	1.0000
Rejeição x Sem rejeição	0.6500	0.1328	0.6241	0.2738	0.7331	0.7852	0.0474(f)*	0.1574	0.0320(i)*	1.0000	0.0904	0.7499	0.6500	-
Rejeição x Controle	0.2400	0.1195	0.2075	0.5414	0.584	1.0000	0.0038(g)*	1.0000	0.0914	0.7127	0.3787	0.538	0.5353	1.0000
Sem rejeição x Controle	1.0000	0.5568	0.0718	0.5638	0.3229	0.8185	0.8848	0.0571	0.1812	0.6466	0.0103(l)*	1.0000	1.0000	1.0000

Teste exato de Fisher (GraphPad InStat, INC 2003). *Odd Ratio e Intervalo de Confiança (IC) para os valores de p das respectivas frequências dos alelos entre os grupos de pacientes e controles analisados. (a) para Alelo 2, OR = 4.750 e IC95% = 1.461 a 15.447; (b) para Alelo 2, OR = 7.750; IC95% = 1.679 a 35.782; (c) para Alelo 2, OR = 4.391; IC95% = 1.976 a 9.761; (d) para Alelo 3, OR = 2.088 e IC95% = 1.087 a 4.013; (e) para Alelo 7, OR = 0.5200 e IC95% = 0.2725 a 0.9921; (f) para Alelo 7, OR = 0.5200; IC95%: 0.2725 a 0.9921; (g) para Alelo 7, OR = 0.4863 e IC95% = 0.2856 a 0.8280; (h) para Alelo 12, OR = 0.1048 e IC95% = 0.01680 a 1.100; (i) para Alelo 12, OR = 0.1786 e IC95% = 0.03578 a 0.8912; (j) para Alelo 15, OR = 7.342 e IC95% = 0.9556 a 56.413; (l) para Alelo 15; OR = 0.1198; IC95% = 0.01614 a 0.8895

Tabela 48 – Frequência alélica dos grupos C1 e C2 do HLA-Cw na tolerância ao aloenxerto renal

Grupos de pacientes	n	Grupos de alelos HLA-Cw			
		C1	C2	C1/C2	Outros
Rejeição aguda	12	0.1667	0.3333	0.2500	0.0000
Rejeição crônica	38	0.2632	0.1316	0.2895	0.0789
Rejeição	50	0.2400	0.1800	0.2800	0.0600
Sem rejeição	31	0.4194	0.0323	0.3226	0.1290
Controle	202	0.3861	0.1337	0.2574	0.0545

Tabela 49 – Probabilidade da frequência dos grupos C1 e C2 do HLA-Cw na tolerância ao aloenxerto renal

Grupos	Grupos de HLA-Cw			
	C1	C2	C1/C2	O/O
R Aguda x Rejeição Crônica	0.7046	0.1909	1.0000	1.0000
R Aguda x Sem Rejeição	0.1638	0.0168*	0.7272	0.5629
R Aguda x Controle	0.2177	0.0773	1.0000	1.0000
R Crônica x Sem Rejeição	0.2051	0.2128	0.7977	0.6925
R Crônica x Controle	0.1987	1.0000	0.6903	0.4699
Rejeição x Sem Rejeição	0.1368	0.0800	0.8032	0.4190
Rejeição x Controle	0.0692	0.3764	0.7231	1.0000
Sem Rejeição x Controle	0.8436	0.1403	0.5128	0.1216

^a Teste exato de Fisher (GraphPad InStat, INC 2003). *Odd Ratio e Intervalo de Confiança (IC) para os valores de p das respectivas frequência dos alelos entre os grupos de pacientes e controles analisados. * Para o grupo C2, $p = 0.0168$, Odds ratio= 17.143 e 95% CI: 1.649 a 178.18.

Quanto à frequência dos alelos de HLA-Cw em relação à expressão de HLA-G no enxerto renal, podemos observar na Tabela 50 que, o alelo HLA-Cw 4, no grupo rejeição crônica está relacionado com a ausência de expressão de HLA-G ($p = 0.0287$), enquanto que no grupo sem rejeição, ocorre o inverso, há maior frequência da expressão de HLA-G ($p = 0.0153$).

No alelo HLA-Cw 6 podemos observar que, no grupo rejeição total ocorreu maior frequência da expressão ($p = 0.0174$), enquanto que no alelo HLA-Cw 14 ocorreu ausência da expressão ($p = 0.0337$) de HLA-G, e consequentemente no total das biópsias o alelo HLA-Cw 6 também esteve relacionado com maior frequência de expressão ($p = 0.0137$) enquanto que o alelo HLA-Cw 14 esteve relacionado com ausência da expressão de HLA-G tanto para o grupo de rejeição ($p = 0.0337$) quanto para o total ($p = 0.0262$) de biópsias analisadas do aloenxerto renal.

Tabela 50 - Frequência e probabilidade haplotípica da HLA-Cw em relação à expressão de HLA-G no aloenxerto renal

Grupos	2n	Alelos de HLA-Cw													
		1	2	3	4	5	6	7	8	12	14	15	16	17	18
Rejeição aguda															
HLA-G -	20	0.0500	0.0500	0.2500	0.1000	0.1000	0.0000	0.2500	0.0000	0.0500	0.1000	0.0500	0.0000	0.0000	0.0000
HLA-G +	26	0.0000	0.0385	0.1154	0.0769	0.0385	0.1538	0.3077	0.0000	0.1154	0.0000	0.0000	0.1154	0.0385	0.0000
<i>p</i> valor ^a		0.4348	1.0000	0.2674	1.0000	0.5718	0.1213	0.7495	-	0.6216	0.1836	0.4348	0.2464	1.0000	-
Rejeição crônica															
HLA-G -	10	0.0000	0.4000	0.0000	0.4000	0.0000	0.1000	0.0000	0.0000	0.0000	0.2000	0.1000	0.1000	0.0000	0.0000
HLA-G +	12	0.0000	0.0833	0.0000	0.0000	0.0000	0.5000	0.3333	0.0000	0.0833	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<i>p</i> valor ^a		-	0.1353	-	0.0287^c	-	0.0743	0.0964	-	1.0000	0.1948	0.4545	0.4545	-	-
Rejeição Total															
HLA-G -	30	0.0333	0.1667	0.1667	0.2000	0.0667	0.0333	0.1667	0.0000	0.0333	0.1333	0.0667	0.0333	0.0000	0.0000
HLA-G +	38	0.0000	0.0526	0.0789	0.0526	0.0263	0.2632	0.3158	0.0000	0.1053	0.0000	0.0000	0.0789	0.0263	0.0000
<i>p</i> valor ^a		0.4412	0.2272	0.4507	0.1256	0.5792	0.0174^d	0.2591	-	0.3742	0.0337^e	0.1910	0.6245	1.0000	-
Sem rejeição															
HLA-G -	28	0.0357	0.0714	0.1071	0.0357	0.1071	0.0714	0.1071	0.1071	0.0357	0.0357	0.1429	0.1071	0.0357	0.0000
HLA-G +	22	0.0909	0.0000	0.1818	0.3182	0.0000	0.1364	0.0455	0.0455	0.0000	0.0000	0.0909	0.0455	0.0455	0.0000
<i>p</i> valor ^a		0.5757	0.4971	0.6843	0.0153^f	0.2457	0.6428	0.6209	0.6209	1.0000	1.0000	0.6825	0.6209	1.0000	-
Total															
HLA-G -	58	0.0345	0.1207	0.1379	0.1207	0.0862	0.0517	0.1379	0.0517	0.0345	0.0862	0.1034	0.0690	0.0172	0.0000
HLA-G +	60	0.0333	0.0333	0.1167	0.1500	0.0167	0.2167	0.2167	0.0167	0.0667	0.0000	0.0333	0.0667	0.0333	0.0000
<i>p</i> valor ^a		1.0000	0.0918	0.7873	0.7894	0.3960	0.0137^g	0.3377	0.3601	0.6796	0.0262^h	0.1593	1.0000	1.0000	-

^a Teste exato de Fisher (GraphPad InStat, INC 2003). ^c Odd Ratio e Intervalo de Confiança (IC) para os valores de *p* das respectivas frequências entre os grupos de pacientes e controles analisados. c) Odds Ratio: 17.308 95% IC: 0.8015 a 373.73; d) Odds Ratio: 0.09655, 95% IC: 0.01158 a 0.8050; e) Odds Ratio: 13.075, 95% IC: 0.6748 a 253.36; f) Odds Ratio: 0.07937, 95% IC: 0.008893 a 0.7083; g) Odds Ratio: 0.1972, 95% IC: 0.05296 a 0.7343; h) Odds Ratio: 12.439, 95% IC: 0.6715 a 230.42.

4.5. Polimorfismo gênico da IL-18

Para análise do polimorfismo das posições -137 C/G e -607 A/C da IL-18 foi realizada a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase com iniciadores de seqüência específica (*PCR-SSP – Polymerase Chain Reaction - sequence-specific primers*). Os produtos da PCR para os polimorfismos das posições -137 C/G e -607 A/C da IL-18 foram observadas em gel de acrilamida corado com prata (Figura 10 e Figura 11, respectivamente).

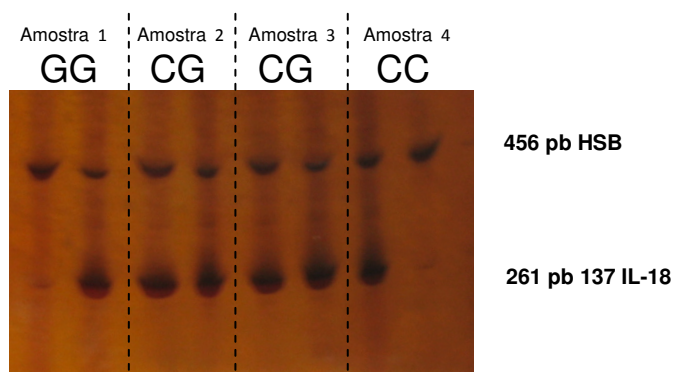


Figura 10 – Amplificação do PCR-SSP para a posição -137 C/G em gel de acrilamida. Para cada amostra foi feita duas reações de PCR, uma com um conjunto de primers específicos para o alelo -137 C e outra reação com outro conjunto de primers específico para o alelo -137 G, adicionado a ambas reações o conjunto de primers para o controle interno da reação (HSB - β -globina). Dessa forma, observaremos uma banda de 456 pb em todas as reações de PCR referente a amplificação da HSB e se o indivíduo for homocigoto -137 GG a primeira reação de PCR não amplifica e a segunda amplifica apresentando uma banda com 261 pb (amostra 1), se for heterocigoto -137 CG, tanto a primeira quanto a segunda reação de PCR amplificam, ambas com uma banda de 261 pb (amostras 2 e 3) e se o indivíduo for homocigoto -137 CC, observaremos a amplificação de uma banda de 261 pb somente para a primeira reação de PCR e a segunda reação não amplifica (amostra 4).

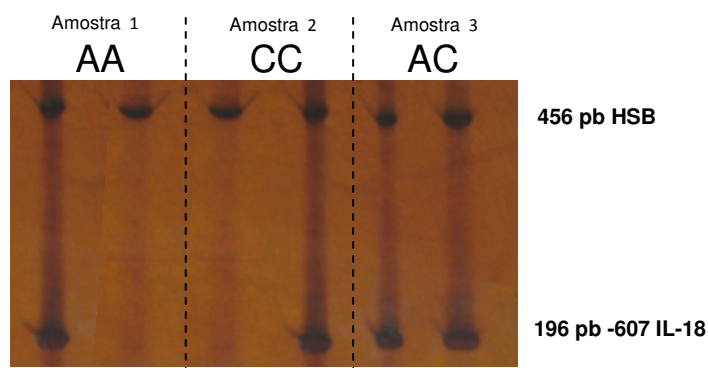


Figura 11 – Amplificação do PCR-SSP para a posição -607 A/C em gel de acrilamida. Para cada amostra foi feita duas reações de PCR, uma com um conjunto de primers específicos para o alelo -607 A e outra com outro conjunto de primers específico para o alelo -607 C, adicionado em ambas as reações o conjunto de primers para o controle interno da reação (HSB - β -globina). Dessa forma, observaremos uma banda de 456 pb em todas as reações de PCR referentes a amplificação da HSB e se o indivíduo for homocigoto -137 AA, observaremos a amplificação de uma banda de 196 pb somente para a primeira reação de PCR e a segunda reação não amplifica (amostra 1), se for homocigoto -137 CC a primeira reação de PCR não amplifica e a segunda amplifica (196 pb) (amostra 2) e se for heterocigoto -137 AC, a primeira e a segunda reação amplificam (amostra 3).

Os resultados foram relacionados com a rejeição e com a expressão de HLA-G no aloenxerto renal.

4.5.1 Influência do polimorfismo gênico da IL-18 na rejeição do aloenxerto renal.

Foi realizada a análise do polimorfismo da posição -137 C/G da IL-18 de 110 pacientes transplantados renais e de 202 pacientes controle.

O resultado da frequência alélica e genotípica para os polimorfismos da posição -137 C/G estão representados na Tabela 51 e a probabilidade dessas frequências na Tabela 52.

Observa-se que a frequência de do alelo -137 C é decrescente e decrescente do alelo -137 G é crescente quando acompanhamos a gravidade do grau rejeição, RA, RC, RT, SR e grupo Controle.

De acordo com a Tabela 52, o alelo -137 C foi mais frequente na rejeição ($p = 0.0014$), principalmente na rejeição aguda ($p = 0.0487$), mas também na rejeição crônica ($p = 0.0043$) em relação ao grupo controle, podendo esse alelo ser um fator de risco para a rejeição.

O genótipo -137 CC é mais frequente na rejeição crônica em relação ao grupo controle ($p = 0.0028$). O genótipo -137 CG é mais frequente na rejeição aguda em relação à rejeição crônica ($p = 0.0442$) e ao grupo controle ($p = 0.0397$), enquanto que, o genótipo -137 GG é menos frequente na rejeição aguda em relação ao grupo Controle ($p = 0.0197$). Então, se o genótipo -137 GG é alto produtor de IL-18, a maior produção dessa citocina pelo receptor pode proteger o enxerto contra rejeição.

Tabela 51 – Frequência alélica e genotípica da posição -137 C/G da IL-18 nos pacientes transplantados renais.

Grupos	n	Alelos		HWE (valor p)	Genótipos		
		-137 C	-137 G		-137 CC	-137 CG	-137 GG
Rejeição aguda	16	0.4688	0.5313	0.3107	0.1250	0.6875	0.1875
Rejeição crônica	50	0.4500	0.5500	0.0974	0.2600	0.3800	0.3600
Rejeição	66	0.4545	0.5455	0.6176	0.2273	0.4545	0.3182
Sem rejeição	44	0.3750	0.6250	0.7478	0.1591	0.4318	0.4091
Controle	202	0.2970	0.7030	1.0000	0.0891	0.4158	0.4950

HWE: Aderências as proporções fenotípicas esperadas sob o Equilíbrio Hardy-Weinberg (HWE) (GENEPOP 3,4)

Tabela 52 – Probabilidade alélica e genotípica da posição -137 C/G da IL-18 nos pacientes transplantados renais e controle.

Grupo de Pacientes	Genótipos			Alelos
	-137 CC	-137 CG	-137 GG	-137 C ou G
Rejeição aguda x Rejeição crônica	0.4878	0.0442 (c)*	0.2345	1.0000
Rejeição aguda x Sem rejeição	1.0000	0.1432	0.1366	0.4025
Rejeição aguda x Controle	0.6463	0.0397 (d)*	0.0197(e)*	0.0487 (g)*
Rejeição crônica x Sem rejeição	0.3139	0.6760	0.6743	0.3043
Rejeição crônica x Controle	0.0028 (a)*	0.7484	0.1130	0.0043 (h)*
Rejeição x Sem rejeição	0.4693	0.8469	0.4162	0.2668
Rejeição x Controle	0.0049 (b)*	0.6673	0.0152 (f)*	0.0014 (i)*
Sem rejeição x Controle	0.1724	0.8673	0.3221	0.1631

Teste exato de Fisher (GraphPad Instat, INC 2003). *Odd Ratio e Intervalo de Confiança (IC) para os valores de p das respectivas frequência dos alelos entre os grupos de pacientes e controles analisados. (a) para genótipo CC, OR = 2.918 e IC 95% = 1.534 a 5.549; (b) para genótipo CC, OR = 2.551 e IC95% = 1.363 a 4.772; (c) para genótipo CG, OR = 1.809 e IC95% = 1.115 a 2.937; (d) para genótipo CG, OR = 1.653 e IC95% = 1.143 a 2.390; (e) para o genótipo GG, OR = 0.3788 e IC95% = 0.1353 a 1.061; (f) para o genótipo GG, OR = 0.6427 e IC95% = 0.4397 a 0.9396; (g) para o alelo C, OR = 2,088 e IC95% = 1,010 a 4,318; (g) para o alelo G, OR = 0,4789 e IC95% = 0,232 a 0,990; (h) para o alelo C, OR = 1,936 e IC95% = 1,237 a 3,031; (h) para o alelo G, OR = 0,5164; IC95% = 0,330 a 0,808; (i) para o alelo C, OR = 1,972 e IC95% = 1,317 a 2,953; (i) para o alelo G, OR = 0,5070 e IC95% = 0,339 a 0,759.

Para a análise do polimorfismo da posição -607 A/C da IL-18 em relação à rejeição, foram estudados de 106 pacientes transplantados renais e de 202 pacientes controle.

A frequência alélica e genotípica da posição -607 A/C da IL-18 está representada na Tabela 53 e a probabilidade dessas frequências está representadas na Tabela 54

Na Tabela 53 pode-se observar que o grupo rejeição não teve aderência às proporções fenotípicas esperadas sob o Equilíbrio Hardy-Weinberg (HWE), ($p = 0.0016$).

Tabela 53 – Frequência alélica e genotípica da posição -607 A/C da IL-18 nos pacientes transplantados renais.

Grupos	n	Alelos		HWE (valor p)	Genótipos		
		-607 A	-607 C		-607 AA	-607 AC	-607 CC
Rejeição aguda	16	0.3750	0.6250	0.0373	0.0000	0.7500	0.2500
Rejeição crônica	49	0.2959	0.7041	0.0377	0.0204	0.5510	0.4286
Rejeição	65	0.3154	0.6846	0.0016	0.0154	0.6000	0.3846
Sem rejeição	41	0.3049	0.6951	0.0071	0.0000	0.6098	0.3902
Controle	202	0.3193	0.6807	0.0061	0.0594	0.5198	0.4208

HWE: Aderências as proporções fenotípicas esperadas sob o Equilíbrio Hardy-Weinberg (HWE) (GENEPOP 3,4)

Tabela 54 – Probabilidade alélica e genotípica da posição -607 A/C nos pacientes transplantados renais.

Grupo de Pacientes	Genótipos			Alelos
	-607 AA	-607 AC	-607 CC	-607 A ou C
Rejeição aguda x Rejeição crônica	1.0000	0.2406	0.2476	0.5113
Rejeição aguda x Sem rejeição	-	0.3713	0.3713	0.5089
Rejeição aguda x Controle	0.6072	0.1162	0.2903	0.5575
Rejeição crônica x Sem rejeição	1.0000	0.6696	0.8302	1.0000
Rejeição crônica x Controle	0.4731	0.7510	1.0000	0.7167
Rejeição x Sem rejeição	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
Rejeição x Controle	0.1982	0.3168	0.5678	1.0000
Sem rejeição x Controle	0.2271	0.3086	0.8622	0.8966

Teste exato de Fisher (GraphPad InStat, INC 2003).

Não houve diferença entre as probabilidades das frequências alélicas e genotípicas da posição -607 A/C da IL-18 entre os grupos de pacientes transplantados renais e grupo controle em relação à rejeição do aloenxerto (Tabela 54).

4.5.2 Influência do polimorfismo gênico da IL-18 na expressão de HLA-G no enxerto renal.

Para análise do polimorfismo do SNP -137 da IL-18 em relação à expressão de HLA-G no aloenxerto foram estudados 78 pacientes transplantados renais. O número de pacientes por grupo, suas frequências e probabilidades alélicas e genotípicas estão presentes na Tabela 55 e 56.

Não foi encontrada nenhuma relação entre as frequências alélica e genotípica do SNP -137 da IL-18 entre os grupos de pacientes transplantados renais e a expressão de HLA-G no aloenxerto renal (Tabela 55), assim como também não houve relação com a rejeição.

Tabela 55 - Probabilidade e frequência gênica e alélica do SNP - 137 da IL-18 em relação à expressão de HLA-G no aloenxerto renal

Grupos de Pacientes	n	Genótipos			HWE <i>p</i> valor ^b	Alelos	
		-137 CC	-137 CG	-137 GG		-137 C	-137 G
Rejeição aguda							
HLA-G -	7	0.0000	0.8571	0.1429	1.0000	0.4286	0.5714
HLA-G +	6	0.1667	0.8000	0.1429	0.6447	0.5000	0.5000
<i>p</i> valor ^a		0.4615	0.5594	1.0000		1.0000	
Rejeição crônica							
HLA-G -	17	0.1765	0.4706	0.3529	0.1637	0.4118	0.5882
HLA-G +	16	0.3125	0.3125	0.3750	1.0000	0.4688	0.5313
<i>p</i> valor ^a		0.4384	0.4813	1.0000		0.8044	
Rejeição Total							
HLA-G -	24	0.1250	0.5833	0.2917	1.0000	0.4167	0.5833
HLA-G +	22	0.2727	0.4091	0.3182	0.1524	0.4773	0.5227
<i>p</i> valor ^a		0.2757	0.3762	1.0000		0.6751	
Sem rejeição							
HLA-G -	14	0.0000	0.5000	0.5000	1.0000	0.2500	0.7500
HLA-G +	17	0.2353	0.2941	0.4706	0.6841	0.3824	0.6176
<i>p</i> valor ^a		0.1075	0.2883	1.0000		0.2910	
Total							
HLA-G -	38	0.0789	0.5526	0.3684	0.5853	0.3553	0.6447
HLA-G +	40	0.2250	0.3500	0.4250	0.3128	0.4000	0.6000
<i>p</i> valor ^a		0.1157	0.1104	0.6494		0.6961	

^a Teste exato de Fisher (GraphPad Instat, INC 2003).

^b Aderências as proporções fenotípicas esperadas sob o Equilíbrio Hardy-Weinberg (HWE) (GENEPOP 3,4).

Para análise do polimorfismo do SNP -607 da IL-18 em relação à expressão de HLA-G no aloenxerto foram estudados 73 pacientes transplantados renais. O número de pacientes por grupo, suas frequências e probabilidades alélicas e genotípicas estão presentes na Tabela 56

Assim como para na posição -137 da IL-18, na posição -607 da IL-18 também não foi encontrada nenhuma relação entre as frequências alélicas e genotípicas entre os grupos de pacientes transplantados renais e a expressão de HLA-G no aloenxerto.

Tabela 56 - Probabilidade e frequência gênica e alélica do SNP -607 da IL-18 em relação à expressão de HLA-G no aloenxerto renal

Grupos de pacientes	n	Genótipos			HWE <i>p</i> valor ^b	Alelos	
		+ 607 AA	+ 607 AG	+ 607 GG		+ 607 A	+ 607 G
Rejeição aguda							
HLA-G -	7	0.0000	0.7143	0.2857	0.2492	0.3571	0.6429
HLA-G +	6	0.0000	0.8333	0.1667	0.2328	0.4167	0.5833
<i>p</i> valor ^a		-	1.0000	1.0000		1.0000	
Rejeição crônica							
HLA-G -	18	0.0000	0.6111	0.3889	0.4393	0.3056	0.6944
HLA-G +	14	0.0000	0.6429	0.3571	0.3958	0.3214	0.6786
<i>p</i> valor ^a		-	1.0000	1.0000		1.0000	
Rejeição Total							
HLA-G -	25	0.0000	0.6400	0.3600	0.1235	0.3200	0.6800
HLA-G +	20	0.0000	0.7000	0.3000	0.2234	0.3500	0.6500
<i>p</i> valor ^a		-	0.7569	0.7569		0.8240	
Sem rejeição							
HLA-G -	11	0.0000	0.8182	0.1818	0.1253	0.4091	0.5909
HLA-G +	17	0.0000	0.5294	0.4706	0.0157	0.2647	0.7353
<i>p</i> valor ^a		-	0.2264	0.2264		0.3800	
Total							
HLA-G -	36	0.0000	0.6944	0.3056	0.0003	0.3472	0.6528
HLA-G +	37	0.0000	0.6216	0.3784	0.0000	0.3108	0.6892
<i>p</i> valor ^a		-	0.6235	0.6235		0.7252	

^a Teste exato de Fisher (GraphPad InStat, INC 2003).

^b Aderências as proporções fenotípicas esperadas sob o Equilíbrio Hardy-Weinberg (HWE) (GENEPOP 3,4).

4.6. Polimorfismo gênico do INF- γ

Para análise do polimorfismo da posição +874 A/T do INF- γ , foi realizada a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase com iniciadores de seqüência específica (*PCR-SSP – Polymerase Chain Reaction - sequence-specific primers*). Os produtos da PCR foram observadas em gel de acrilamida corado com prata (Figura 12). Os resultados foram relacionados com a rejeição e com a expressão de HLA-G no aloenxerto renal.

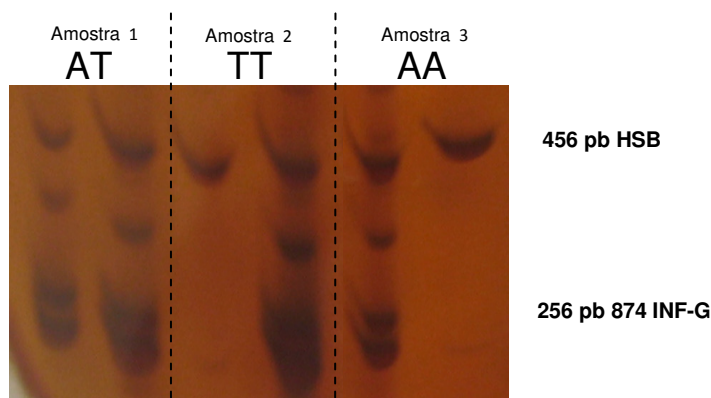


Figura 12 – Amplificação do PCR-SSP para a posição +874 A/T em gel de acrilamida. Para cada amostra foi feita duas reações de PCR, uma com um conjunto de primers específicos para o alelo +874 A e outra com outro conjunto de primers específico para o alelo +874 T, adicionado a ambas o conjunto de primer para o controle interno da reação (HSB - β -globina). Dessa forma, observaremos uma banda de 456 pb em todas as reações de PCR referentes a amplificação da HSB e se o indivíduo for heterozigoto +874 AT (amostra 1), tanto a primeira quanto a segunda reação de PCR amplificam apresentando uma banda de 256 pb, se for homozigoto +874 TT a primeira reação de PCR não amplifica e a segunda amplifica apresentando uma banda de 256 pb (amostra 2) e se for homozigoto +874 AA, observaremos a amplificação de uma banda de 256 pb somente para a primeira reação de PCR e a segunda reação não amplifica (amostra 3).

4.6.1. Influência do polimorfismo gênico do INF- γ na rejeição ao aloenxerto renal

Foram analisados 113 pacientes transplantados renais e 202 indivíduos controle quanto ao polimorfismo da posição +874 A/T do INF- γ .

As frequências alélicas e genotípicas estão representadas na Tabela 57 e as probabilidades destas frequências na Tabela 58.

O genótipo +874 AT é mais frequente em pacientes sem rejeição que no grupo controle ($p = 0.0140$), o genótipo +874 TT é mais frequente na rejeição aguda em relação ao grupo sem rejeição ($p = 0.0661$) e no grupo com rejeição em relação ao grupo sem rejeição ($p = 0.0584$), dessa forma, o genótipo +874 TT é um fator de risco para a rejeição aguda, e se o genótipo +874 TT é alto produtor de INF- γ , então o INF- γ pode favorecer o processo da rejeição.

Tabela 57 – Frequência alélica e genotípica da posição +874 A/T do INF- γ nos pacientes transplantados renais.

Grupos	n	Alelos		HWE (valor p)	Genótipos		
		+874 A	+874 T		+874 AA	+874 AT	+874 TT
Rejeição aguda	16	0.5625	0.4375	0.3476	0.3750	0.3750	0.2500
Rejeição crônica	51	0.5686	0.4314	0.7793	0.3333	0.4706	0.1961
Rejeição	67	0.5672	0.4328	0.4638	0.3433	0.4478	0.2090
Sem rejeição	46	0.6304	0.3696	0.0588	0.3261	0.6087	0.0652
Controle	202	0.5941	0.4059	0.0286	0.3911	0.4059	0.2030

HWE: Aderências as proporções fenotípicas esperadas sob o Equilíbrio Hardy-Weinberg (HWE) (GENEPOP 3,4)

Tabela 58 - Probabilidade alélica e genotípica da posição +874 A/T nos pacientes transplantados renais.

Grupo de Pacientes	Genótipos			Alelos
	+874 AA	+874 AT	+874 TT	+874 A ou T
Rejeição aguda x Rejeição crônica	0.7704	0.5736	0.7275	1.0000
Rejeição aguda x Sem rejeição	0.7648	0.1468	0.0661(b)*	0.5319
Rejeição aguda x Controle	1.0000	1.0000	0.7477	0.7137
Rejeição crônica x Sem rejeição	1.0000	0.2221	0.0762	0.4636
Rejeição crônica x Controle	0.5195	0.4298	1.0000	0.6537
Rejeição x Sem rejeição	1.0000	0.7356	0.0584(c)*	0.4085
Rejeição x Controle	0.5617	0.5695	1.0000	0.6133
Sem rejeição x Controle	0.5013	0.0140(a)*	0.0311(d)*	0.5567

Teste exato de Fisher (GraphPad Instat, INC 2003). *Odd Ratio e Intervalo de Confiança (IC) para os valores de p das respectivas frequência dos alelos entre os grupos de pacientes e controles analisados. (a) para genótipo AT OR = 1.499; IC95%: 1.127 to 1.995 (b) para genótipo TT OR = 3.833; IC95%: 0.9596 to 15.313(c) para genótipo TT OR = 3.204; IC95%: 0.9753 to 10.526(d) para genótipo TT OR = 0.3213; IC95%: 0.1040 to 0.9926

4.6.2. Influência do polimorfismo gênico do INF- γ na Expressão de HLA-G no aloenxerto renal

Para análise do polimorfismo do SNP +874 da INF- γ em relação à expressão de HLA-G no aloenxerto foram estudados 80 pacientes transplantados renais. O número de pacientes por grupo, suas frequências e probabilidades alélicas e genotípicas estão presentes na Tabela 59

Não foi encontrada nenhuma relação entre as frequências alélicas e genotípicas do SNP +874 do INF- γ entre os grupos de pacientes transplantados renais e a expressão de HLA-G no aloenxerto.

Tabela 59 - Frequência e probabilidade alélica e genotípica do SNP +874 do INF- γ em relação à expressão de HLA-G no aloenxerto renal

Grupos de pacientes	n	Genótipos			HWE <i>p</i> valor ^b	Alelos	
		+874 AA	+874 AT	+874 TT		+874 A	+874 T
HLA-G -	7	0.5714	0.1429	0.2857	0.0378	0.6429	0.3571
HLA-G +	6	0.3333	0.7500	0.1250	1.0000	0.5833	0.4167
<i>p</i> valor ^a		0.5921	0.2657	1.0000		1.0000	
Rejeição crônica							
HLA-G -	18	0.3333	0.5000	0.1667	0.1029	0.5833	0.4167
HLA-G +	16	0.1875	0.5625	0.2500	1.0000	0.4688	0.5313
<i>p</i> valor ^a		0.4479	0.7445	0.6815		0.4658	
Rejeição Total							
HLA-G -	25	0.4000	0.4000	0.2000	1.0000	0.6000	0.4000
HLA-G +	22	0.2273	0.5455	0.2273	1.0000	0.5000	0.5000
<i>p</i> valor ^a		0.2301	0.3870	1.0000		0.4068	
Sem rejeição							
HLA-G -	13	0.4615	0.4615	0.0769	0.6661	0.6923	0.3077
HLA-G +	20	0.2500	0.7000	0.0500	1.0000	0.6000	0.4000
<i>p</i> valor ^a		0.2697	0.2755	1.0000		0.6013	
Total							
HLA-G -	38	0.4211	0.4211	0.1579	1.0000	0.6316	0.3684
HLA-G +	42	0.2381	0.6190	0.1429	0.8041	0.5476	0.4524
<i>p</i> valor ^a		0.0980	0.1162	1.0000		0.3353	

^a Teste exato de Fisher (GraphPad Instat, INC 2003).

^b Aderências as proporções fenotípicas esperadas sob o Equilíbrio Hardy-Weinberg (HWE) (GENEPOP 3,4).

4.7. Polimorfismo gênico do TNF

Para análise do polimorfismo das posições -238 A/G e -308 A/G do TNF, foi realizada a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase com iniciadores de seqüência específica (*PCR-SSP – Polymerase Chain Reaction - sequence-specific primers*). Os produtos da PCR para os polimorfismos das posições -238 A/G e -308 A/G do TNF foram observadas em gel de acrilamida corado com prata (Figura 13 e Figura 14, respectivamente). Os resultados foram relacionados com a rejeição e com a expressão de HLA-G no aloenxerto renal

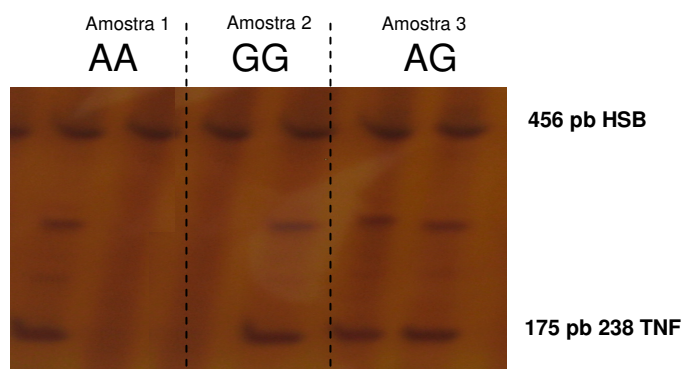


Figura 13 – Amplificação do PCR-SSP para a posição -238 A/G em gel de acrilamida. Para cada amostra foi feita duas reações de PCR, uma com um conjunto de primers específicos para o alelo -238 A e outra com outro conjunto de primers específico para o alelo -238 G, adicionado a ambas as reações o conjunto de primers para o controle interno da reação (HSB - β -globina). Dessa forma, observaremos uma banda de 456 pb em todas as reações de PCR referentes a amplificação da HSB e se o indivíduo for homocigoto -238 AA, observaremos a amplificação de uma banda de 175 pb somente para a primeira reação de PCR e a segunda reação não amplifica (amostra 1), se for homocigoto -238 GG a primeira reação de PCR não amplifica e a segunda amplifica apresentando uma banda de 175 pb e se for heterocigoto -238 AG, tanto a primeira quanto a segunda reação de PCR amplificam (175 pb) (amostra 3).

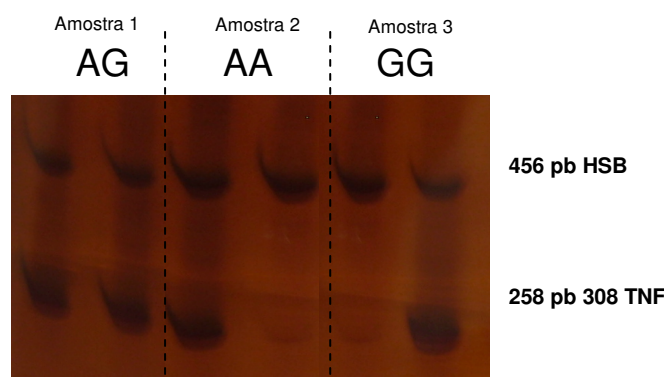


Figura 14 – Amplificação do PCR-SSP para a posição -308 A/G em gel de acrilamida. Para cada amostra foi feita duas reações de PCR, uma com um conjunto de primers específicos para o alelo -308 A e outra com outro conjunto de primers específico para o alelo -308 G, adicionado a ambas as reações o conjunto de primers para o controle interno da reação (HSB - β -globina). Dessa forma, observaremos uma banda de 456 pb em todas as reações de PCR referentes a amplificação da HSB e se for heterocigoto -308 AG, tanto a primeira quanto a segunda reação de PCR amplificam apresentando uma banda de 258 pb (amostra 1), se o indivíduo for homocigoto -308 AA, observaremos a amplificação de uma banda de 258 pb somente para a primeira reação de PCR e a segunda reação não amplifica (amostra 2) e se for homocigoto -308 GG a primeira reação de PCR não amplifica e a segunda amplifica apresentando uma banda de 258 pb (amostra 3).

4.7.1. Influência do polimorfismo gênico do TNF na rejeição ao aloenxerto renal

Para análise do polimorfismo do SNP -238 A/G do TNF em relação à rejeição do aloenxerto renal foram estudados 101 pacientes transplantados renais e 202 controles. O número de pacientes por grupo e frequências alélicas e genotípicas estão presentes na Tabela 60 e probabilidades dessas frequências estão presentes na Tabela 61.

Como podemos observar nas Tabelas 4.7.1.1 e 4.7.1.2., não houve diferença entre as frequências alélicas e genotípicas da posição -238 A/G do TNF entre os grupos de pacientes transplantados renais e grupo controle.

Tabela 60 – Frequência alélica e genotípica da posição -238 A/G do TNF nos pacientes transplantados renais.

Grupos	n	Alelos		HWE (valor p)	Genótipos		
		-238 A	-238 G		-238 AA	-238 AG	-238 GG
Rejeição aguda	16	0.1250	0.8750	1.0000	0.0000	0.2500	0.7500
Rejeição crônica	48	0.1146	0.8854	0.4760	2.0408	0.1875	0.7917
Rejeição	62	0.1172	0.8828	1.0000	1.5625	0.2031	0.7813
Sem rejeição	39	0.1154	0.8846	1.0000	0.0000	0.2307	0.7692
Controle	202	0.0965	0.9035	0.2252	0.0000	0.1931	0.0807

HWE: Aderências as proporções fenotípicas esperadas sob o Equilíbrio Hardy-Weinberg (HWE) (GENEPOP 3,4)

Tabela 61 – Probabilidade alélica e genotípica da posição -238 A/G do TNF nos pacientes transplantados renais.

Grupos de Pacientes	Genótipos			Alelos -238 A ou G
	-238 AA	-238 AG	-238 GG	
Rejeição aguda x Rejeição crônica	1.0000	0.7212	0.7356	1.0000
Rejeição aguda x Sem rejeição	-	1.0000	1.0000	1.0000
Rejeição aguda x Controle	-	0.5270	0.5270	0.5416
Rejeição crônica x Sem rejeição	0.4935	0.7908	0.8010	1.0000
Rejeição crônica x Controle	0.1920	1.0000	0.8404	0.5734
Rejeição x Sem rejeição	1.0000	0.8063	1.0000	1.0000
Rejeição x Controle	0.2406	0.8577	0.7198	0.5038
Sem rejeição x Controle	-	0.6614	0.6614	0.6789

Teste exato de Fisher (GraphPad InStat, INC 2003).

Para análise do polimorfismo do SNP -308 A/G do TNF em relação à rejeição do aloenxerto renal foram estudados 101 pacientes transplantados renais e 202 controles. O número de pacientes por grupo e frequências alélicas e genotípicas estão presentes na Tabela 62 e probabilidades dessas frequências estão presentes na Tabela 63.

Como podemos observar nas Tabelas 4.7.1.3 e 4.7.1.4. O alelo -308 A foi mais frequente na rejeição aguda em relação à rejeição crônica ($p = 0.0348$) e ao grupo Controle ($p = 0.0050$).

O genótipo -308 AG teve maior frequência na rejeição aguda em relação à rejeição crônica ($p = 0.0223$) e ao grupo controle ($p = 0.0008$), e como consequência o grupo com rejeição apresentou maior frequência desse genótipo em relação ao controle ($p = 0.0180$). Enquanto que o genótipo -308 GG teve menor frequência na rejeição aguda em relação à rejeição crônica ($p = 0.0223$), e também em relação ao controle ($p = 0.0016$), e como consequência menor frequência desse genótipo no grupo com rejeição em relação ao controle ($p = 0.0357$) também foi observada. O grupo sem rejeição também teve maior frequência de -308 AG ($p = 0.0262$) e menor frequência de -308 GG ($p = 0.0566$) em relação ao controle.

Tabela 62 – Frequência alélica e genotípica da posição -308 A/G do TNF em pacientes transplantados renais.

Grupos de Pacientes	n	Alelos		HWE (valor p)	Genótipos		
		-308 A	-308 G		-308 AA	-308 AG	-308 GG
Rejeição aguda	16	0.2500	0.7500	0.5130	0.0000	0.5000	0.5000
Rejeição crônica	48	0.0938	0.9063	1.0000	0.0000	0.1875	0.8125
Rejeição	62	0.1328	0.8672	0.5824	0.0000	0.2656	0.7344
Sem rejeição	39	0.1410	0.8590	1.0000	0.0000	0.2683	0.6829
Controle	202	0.0792	0.9208	0.1122	0.0149	0.1287	0.8564

HWE: Aderências as proporções fenotípicas esperadas sob o Equilíbrio Hardy-Weinberg (HWE) (GENEPOP 3,4)

Tabela 63 – Probabilidade alélica e genotípica da posição -308 A/G do TNF nos pacientes transplantados renais.

Grupos de Pacientes	Genótipos			Alelos
	-308 AA	-308 AG	-308 GG	-308 A ou G
Rejeição aguda x Rejeição crônica	-	0.0223(a)*	0.0223(d)*	0.0348(h)*
Rejeição aguda x Sem rejeição	-	0.2108	0.2108	0.1773
Rejeição aguda x Controle	1.0000	0.0008(b)*	0.0016(e)*	0.0050(i)*
Rejeição crônica x Sem rejeição	-	0.3180	0.3180	0.3497
Rejeição crônica x Controle	1.0000	0.3532	0.5020	0.6788
Rejeição x Sem rejeição	-	1.0000	1.0000	1.0000
Rejeição x Controle	1.0000	0.0180(h)*	0.0357(f)*	0.0792
Sem rejeição x Controle	1.0000	0.0262(c)*	0.0566(g)*	0.0851

Teste exato de Fisher (GraphPad InStat, INC 2003). * Odd Ratio e Intervalo de Confiança (IC) para os valores de p das respectivas frequência dos alelos entre os grupos de pacientes e controles analisados. (a) para genótipo AG, OR = 2.667 e IC95% = 1.239 a 5.738; (b) para genótipo AG, OR = 3.885 e IC95% = 2.116 a 7.131; (c) para genótipo AG, OR = 2.064 e IC95% = 1.199 a 3.552; (d) para genótipo AG, OR = 2.191 e IC95% = 1.183 a 4.058; (e) para genótipo GG, OR = 0.6154 e IC95% = 0.3700 a 1.023; (f) para genótipo GG, OR = 0.5838 e IC95% = 0.3565 a 0.9562; (g) para genótipo GG, OR = 0.8575 e IC95% = 0.7323 a 1.004; (h) para genótipo GG, OR = 0.8383 e IC95% = 0.6831 a 1.029, (h) para o alelo A, OR = 3,222 e IC95%: 1,123 a 9,249, (h) para o alelo G, OR = 0,3103 e IC95% = 0,108 a 0,891, (i) para o alelo A, OR = 3,875 e IC95% = 1,610 a 9,324; (i) para o alelo G, OR = 0,2581 e IC95% = 0,107 a 0,621

4.7.2. Influência do polimorfismo gênico do TNF na expressão de HLA-G no aloenxerto renal

Para análise do polimorfismo do SNP -238 A/G do TNF em relação à expressão de HLA-G no aloenxerto foram estudados 70 pacientes transplantados renais. O número de pacientes por grupo, suas frequências e probabilidades alélicas e genotípicas estão presentes na Tabela 4.7.2.1.

Como podemos observar na Tabela 4.7.2.1, não foi encontrada nenhuma relação entre as frequências alélicas e genotípicas do SNP -238 A/G do TNF entre os grupos de pacientes transplantados renais e a expressão de HLA-G no aloenxerto.

Tabela 64- Frequência e probabilidade alélica e genotípica do SNP -238 do TNF em relação à expressão de HLA-G no aloenxerto renal

Grupos de pacientes	n	Genótipos SNP -238 do TNF			HWE p valor ^b	Alelos	
		-238 CC	-238 CG	-238 GG		-238 C	-238 G
Rejeição aguda							
HLA-G -	7	0.0000	0.4286	0.5714	1.0000	0.2143	0.7857
HLA-G +	6	0.0000	0.1667	0.8333	1.0000	0.0833	0.9167
p valor ^a		-	0.5594	0.5594		0.5983	
Rejeição crônica							
HLA-G -	17	0.0000	0.2353	0.7647	1.0000	0.1176	0.8824
HLA-G +	14	0.0000	0.2143	0.7857	-	0.1071	0.8929
p valor ^a		-	1.0000	1.0000		1.0000	
Rejeição Total							
HLA-G -	24	0.0000	0.2917	0.7083	1.0000	0.1458	0.8542
HLA-G +	20	0.0000	0.2000	0.8000	1.0000	0.1000	0.9000
p valor ^a		-	0.7279	0.7279		0.7477	
Sem rejeição							
HLA-G -	10	0.0000	0.2000	0.8000	1.0000	0.1000	0.9000
HLA-G +	16	0.0000	0.3125	0.6875	1.0000	0.1563	0.8438
p valor ^a		-	0.6680	0.6680		0.6936	
Total							
HLA-G -	34	0.0000	0.2647	0.7353	0.5885	0.1324	0.8676
HLA-G +	36	0.0000	0.2500	0.7500	1.0000	0.1250	0.8750
p valor ^a		-	1.0000	1.0000		1.0000	

^a Teste exato de Fisher (GraphPad Instat, INC 2003).

^b Aderências as proporções fenotípicas esperadas sob o Equilíbrio Hardy-Weinberg (HWE) (GENEPOP 3,4).

Para análise do polimorfismo do SNP -308 A/G do TNF em relação à expressão de HLA-G no aloenxerto foram estudados 70 pacientes transplantados renais. O número de pacientes por grupo, suas frequências e probabilidades alélicas e genótípicas estão presentes na Tabela 64.

Assim como para o SNP -238 A/G do TNF, também não foi encontrada nenhuma relação significativa entre as frequências alélicas e genótípicas do SNP -308 A/G do TNF entre os grupos de pacientes transplantados renais e a expressão de HLA-G no aloenxerto (Tabela 65).

Tabela 65 - Frequência e probabilidade alélica e genotípica do SNP -308 do TNF em relação à expressão de HLA-G no aloenxerto renal.

Grupos de pacientes	n	Genótipos			HWE <i>p</i> valor ^b	Alelos	
		-308 CC	-308 CG	-308 GG		-308 C	-308 G
Rejeição aguda							
HLA-G -	7	0.0000	0.4286	0.5714	1.0000	0.2143	0.7857
HLA-G +	6	0.0000	0.6667	0.3333	1.0000	0.3333	0.6667
<i>p</i> valor ^a		-	0.5921	0.5921		0.6652	
Rejeição crônica							
HLA-G -	17	0.0000	0.2353	0.7647	1.0000	0.1176	0.8824
HLA-G +	14	0.0000	0.0000	1.0000	1.0000	0.0000	1.0000
<i>p</i> valor ^a		-	0.1075	0.1075		0.1198	
Rejeição Total							
HLA-G -	24	0.0000	0.2917	0.7083	1.0000	0.1458	0.8542
HLA-G +	20	0.0000	0.2000	0.8000	-	0.1000	0.9000
<i>p</i> valor ^a		-	0.7279	0.7279		0.7477	
Sem rejeição							
HLA-G -	10	0.0000	0.3000	0.7000	1.0000	0.1500	0.8500
HLA-G +	16	0.0000	0.2500	0.7500	1.0000	0.1250	0.8750
<i>p</i> valor ^a		-	1.0000	1.0000		1.0000	
Total							
HLA-G -	34	0.0000	0.2941	0.7059	0.3311	0.1471	0.8529
HLA-G +	36	0.0000	0.2222	0.7778	1.0000	0.1111	0.8889
<i>p</i> valor ^a		-	0.5882	0.5882		1.0000	

^a Teste exato de Fisher (GraphPad Instat, INC 2003).

^b Aderências as proporções fenotípicas esperadas sob o Equilíbrio Hardy-Weinberg (HWE) (GENEPOP 3,4).

Discussão

5. DISCUSSÃO

5.1. Expressão de HLA-G de membrana no aloenxerto renal

A indução de tolerância é o principal objetivo no transplante de órgãos. Muitos pacientes desenvolvem tolerância ao enxerto sob tratamento médico, enquanto outros apresentam episódios de rejeição aguda e sinais de nefropatia crônica, sugerindo o envolvimento de mecanismos imunológicos e genéticos no controle dessa resposta (SALAMA et al., 2001; SULLIVAN et al., 2006).

As primeiras evidências da participação da molécula de HLA-G na indução de tolerância datam de 1990 (ROUAS-FREEIS et al., 1997) e são vários os trabalhos que relataram que a presença de HLA-G em pacientes transplantados, tanto ligada à membrana do aloenxerto quanto sHLA-G no soro está associada com melhor aceitação do transplante.

Em nossos pacientes, apesar de ser observada no grupo sem rejeição maior frequência da expressão de HLA-G e no grupo com rejeição menor frequência dessa expressão, nossos dados estaticamente não mostraram diferença de expressão entre os grupos.

Em transplante de coração humano, sHLA-G foi detectado no soro de 18% desses indivíduos, sendo que a ocorrência de rejeição aguda foi pouco observada em pacientes apresentando altos níveis de HLA-G quando comparados com aqueles com níveis diminuídos de HLA-G. Além disso, pacientes que não apresentavam HLA-G desenvolveram rejeição crônica (LILA et al., 2000).

Em outro trabalho de transplante cardíaco, a expressão de HLA-G na membrana do miocárdio foi associada com poucos episódios de rejeição aguda e ausência de disfunção crônica do enxerto (LILA et al., 2002).

Em transplante combinado de fígado e rim, pacientes que obtiveram concentração de sHLA-G acima de 25 ng/ml, tiveram melhor aceitação do enxerto, (CRÉPUT et al., 2003b).

Um trabalho publicado em 2003 foi o primeiro a estudar a expressão de HLA-G em transplante combinado de fígado e rim, correlacionando com a resposta ao transplante (CRÉPUT et al., 2003a). Assim, indivíduos que apresentaram expressão de HLA-G nas células epiteliais biliares tinham melhor aceitação do enxerto. Em adição, esses autores, notaram que biópsias de enxerto tanto de fígado

quanto de rim que não expressavam HLA-G tinham mais episódios de rejeição aguda quando comparado aos que expressavam HLA-G. Entretanto, neste estudo com transplantados duplos de fígado e rim, em espécimes renais a expressão de HLA-G não pôde ser associada com a evolução do enxerto, devido ao escasso número de biópsias renais estudadas. O que pode ter acontecido também em nosso estudo devido ao baixo número amostral de biópsias.

Qiu et al. (2006) mostraram a presença de sHLA-G no soro de 65 pacientes transplantados renais, relatando associação entre a presença de sHLA-G e níveis diminuídos de anticorpos para moléculas clássicas de HLA.

Crispim et al., (2008) em um estudo com 73 pacientes transplantados renais mostraram expressão diminuída de HLA-G em biópsias apresentando rejeição, ao passo que naquelas sem rejeição observou-se aumento da expressão da molécula.

Brugière et al. (2009) mostraram que a expressão de HLA-G em enxerto de pulmão, principalmente em células brônquicas, influenciaram no estado de aloreatividade dos pacientes.

Concluindo, baseados na hipótese de que o HLA-G é uma molécula tolerogênica e é produzida pelas células epiteliais tubulares de aloenxertos renais (CRISPIM et al., 2008), em nossa casuística a expressão de HLA-G foi encontrada em maior proporção no grupo sem rejeição, no entanto não encontramos uma diferença significativa entre os grupos com e sem rejeição. Embora esse achado não tenha atingido significância, não descartamos a hipótese de que a expressão de HLA-G possa estar associada com a indução de tolerância no microambiente renal, propiciando melhor evolução do aloenxerto, uma vez que o número amostral de pacientes com rejeição aguda foi pequeno.

5.2. Polimorfismo da região 3'NT do HLA-G

O gene HLA-G contém na região 3'NT pelo menos três fatores que regulam a expressão de HLA-G, interferindo na produção de RNAm, e, conseqüentemente, na produção de HLA-G, relacionados com a presença de motivos ricos em AU, um sinal de poli-A, e vários sítios polimórficos que podem potencialmente influenciar na transcrição, tradução ou ambos do HLA-G por mecanismos diferentes. Entre eles, a presença (inserção) ou ausência (deleção) de

um fragmento de 14 pb (polimorfismo INDEL), cujo genótipo -14pb/-14pb tem sido associada à alta produção de HLA-G devido à estabilidade de mRNA (HIBY *et al.*, 1999; O'BRIEN *et al.*, 2001; HVIID *et al.*, 2003; ROUSSEAU *et al.*, 2003). O SNP +3142 C/G, no qual se verificou que o alelo +3142 G pode influenciar no aumento da afinidade de ligação de miRNAs, influenciando na diminuição da expressão do HLA-G (TAN *et al.*, 2007), e ainda, o SNP + 3187 A/G, que por estar próximo (4 pb acima) aos motivos ricos em AU está relacionado com a estabilidade e degradação do mRNA, sendo que a presença do alelo + 3187 A pode ocasionar diminuição da expressão de HLA-G.

Uma análise *in silico* revelou que vários miRNAs humanos têm potencial para se ligar na região 3'NT do mRNA do HLA-G e influenciar na expressão de HLA-G, principalmente pelos polimorfismos do fragmento de 14 pb e SNPs 3003, 3010, 3027 e 3035, que abrangem uma região de apenas 32 nucleotídeos que podem influenciar na ligação de vários miRNAs, assim como o SNP 3142, discutido anteriormente (CASTELLI *et al.*, 2009).

CASTELLI *et al.*, em 2009, estudando os polimorfismos da região 3' NT do HLA-G em 155 doadores de medula óssea da região Nordeste do Estado de São Paulo, encontraram, além dos três sítios polimórficos já conhecidos, 14pb e +3142 C/G, + 3187 A/G outros cinco SNPs +3003 T/C, +3010 C/G, +3027 C/A, +3035 C/T, e + 3196 C/G, produzindo pelo menos 11 combinações (haplótipos). Os autores detectaram forte desequilíbrio de ligação entre vários desses sítios polimórficos, especialmente entre inserção 14 pb, +3142G e + 3187 A, previamente associados com baixa estabilidade de mRNA.

Esses mesmos polimorfismos, com exceção do SNP + 3196 C/G, foram analisados nesse estudo quanto à frequência alélica, genotípica e haplotípica em pacientes transplantados renais. Considerando a INDEL de 14 pares de bases, observamos baixas frequências da homozigose +14pb/+14pb em todos os grupos estudados, e ainda, observamos diminuição dos homozigotos -14pb/-14pb e aumento do genótipo -14pb/+14pb entre os pacientes com rejeição aguda em relação aos demais pacientes transplantados, principalmente em relação aos pacientes sem rejeição, contudo, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Por outro lado, encontramos associação significativa com dois dos 6 SNPs estudados da região 3' NT do HLA-G, ou seja, o +3035 C/T e o + 3187 A/G.

A posição +3035 C/T foi associada com Maior frequência do genótipo +3035 CC na rejeição crônica em relação ao controle, e ainda, menor frequência do genótipo +3035 CT na rejeição crônica em relação ao grupo sem rejeição e ao controle. Levando em consideração a baixa frequência do genótipo +3035 TT, o genótipo +3035 CC é fator de risco e o +3035 CT fator de proteção para rejeição crônica. Pensando ainda na atuação de alvos de miRNAs, Castelli et al., em 2009, encontraram que o mi433 se liga com maior energia de ligação ao alelo +3035 C do que ao alelo +3035 T. Assim, esse miRNA pode influenciar na maior degradação do mRNA do HLA-G no sítio +3035 C e, conseqüentemente, estar associado com menor produção da proteína traduzida por esse alelo. Isso concordaria com o fato de que pacientes com episódios de rejeição apresentaram menor expressão de HLA-G.

Na posição +3187 A/G observamos aumento significativo da frequência do genótipo +3187 GA no grupo com rejeição em relação ao grupo controle, essa frequência se inverte no genótipo +3187 AA, que é menos freqüente na rejeição que no controle (dado não estatisticamente significativo, $p = 0.0973$). Notando-se a baixa frequência do genótipo +3187 GG no grupo amostral, podemos considerar, para este estudo, que o genótipo +3187 GA é um fator de risco para rejeição, enquanto que o genótipo +3187 AA seria de proteção. No entanto, o alelo + 3187 A pode levar a diminuição da expressão de HLA-G por ter mRNA menos estável, o que não concorda com o fato de que nossos pacientes com rejeição apresentarem menor frequência do genótipo +3187 AA.

Não foram encontradas associações nas frequências alélicas e genotípicas nos demais polimorfismos estudados. Também não encontramos associação dos diferentes grupos de pacientes transplantados renais analisados em relação aos haplótipos encontrados, apesar de notarmos que a frequência do haplótipo UTR-1, que contém os alelos +3035 C e + 3187 G, estar aumentada e as frequências dos UTR-5 e UTR-7, que contém os alelos +3035 T e + 3187 A, estarem diminuídos na rejeição em relação ao controle, essa relação não foi estatisticamente significativa ($p = 0.0700$).

Os únicos estudos com os polimorfismos de HLA-G em pacientes transplantados renais, são estudos com o polimorfismo do fragmento de 14 pb da região 3'NT (CRISPIM et al., 2007; PIANCATELLI et al., 2009), e um estudo com os éxons 2 e 3 do HLA-G (PIRRI et al., 2009).

Pirri et al. (2009) pesquisaram os polimorfismos dos éxons 2 e 3 do HLA-G investigando as substituições não sinônimas (que resulta na troca de aminoácido e na codificação de proteína diferente) com relação ao polipeptídeo codificado pela sequência consenso de HLA-G (HLA-G*010101) que estão presentes nos códons 31, 110 e 130, encontrados em alelos HLA-G*0103, HLA-G*010401, HLA-G*010403 ou HLA-G*0105N e os alelos com substituições sinônimas (que resultam no mesmo aminoácido e na codificação da mesma proteína) que compreendem os alelos HLA-G*0101A (HLA-G*010101 e HLA-G*010106), HLA-G*01B (HLA-G*010102 e HLA-G*0106), HLA-G*010103, HLA-G*010107 e HLA-G*010108, com relação aos episódios de rejeição e relataram que os indivíduos com genótipo heterozigoto sinônimo/ não sinônimo apresentaram risco cinco vezes maior de rejeição comparados com homozigotos sinônimo/sinônimo e não sinônimo/ não sinônimo. Como esses alelos estão distribuídos de forma heterogênea entre os alelos que correspondem aos diferentes haplótipos da região 3'NT, não é possível fazer correlações entre estes e os nossos resultados.

Crispim et al., (2007) em um estudo com 83 pacientes transplantados renais encontraram que a frequência do genótipo +14pb/+14pb foi estatisticamente maior em pacientes transplantados renais com rejeição aguda em relação ao Controle saudável.

Torres et al., (2009), em um estudo com 37 pacientes com transplante cardíaco, encontraram um aumento da frequência do genótipo -14pb/-14pb no grupo sem rejeição, estando esse genótipo relacionado com maior produção pré e pós transplante de sHLA-G. Da mesma forma encontraram no grupo com rejeição um aumento na frequência do genótipo +14pb/+14pb, estando esse genótipo e heterozigotos -14pb/+14pb com baixas concentrações do sHLA-G. Essa situação pode indicar o efeito genético dominante do alelo +14pb na redução da estabilidade e produção da proteína. Estando o genótipo +14pb/+14pb em baixa frequência, os autores encontraram diferenças entre genótipo -14pb/-14pb em relação ao -14pb/+14pb. Destacaram ainda que, indivíduos -14pb/-14pb foram considerados melhores absorvedores de ciclosporina, com melhor prognóstico do enxerto e poucos episódios de rejeição em relação aos heterozigotos -14pb/+14pb.

Já Piancatelli et al., em 2009, em um estudo com pacientes transplantados renais, apesar de encontrarem um aumento na frequência do genótipo +14pb/+14pb no grupo com rejeição aguda em relação ao controle, não

encontraram diferença estatisticamente relevante. Por outro lado, os autores encontraram associação da diminuição do -14pb/-14pb em pacientes com complicações metabólicas em relação aos pacientes transplantados renais que não tinham disfunções metabólicas. Esse achado pode indicar uma associação do genótipo -14pb/-14pb na inflamação e dislipidemia, provavelmente devido à reduzida expressão de HLA-G.

Assim como Piancatelli et al., em 2009, não encontramos associação estatisticamente significativa entre os diferentes grupos de pacientes e controles estudados, com o polimorfismo 14pb. Não existem outros trabalhos com os outros polimorfismos estudados para discutirmos nossos resultados

O próximo passo foi investigar a associação entre os polimorfismos da região 3' NT do gene de HLA-G (14pb D/I, +3003 T/C, +3010 C/G, +3027 C/A, +3035 C/T, +3142 C/G + 3187 A/G) e a expressão de HLA-G no aloenxerto renal, mas apesar de encontrarmos diferenças nas frequências da expressão de HLA-G no aloenxerto renal entre os grupos, essas diferenças não foram estatisticamente significantes.

Portanto, sugerimos que mais estudos devam ser realizados com esses mesmos polimorfismos em maior número de pacientes, englobando outros polimorfismos do gene HLA-G que possam interferir na expressão protéica dessa molécula e, conseqüentemente, na evolução pós-transplante.

5.3. Tipificação dos Genes HLA -A, -B, -DR e -Cw

Os pacientes transplantados têm diminuição gradual nas estimativas de sobrevivência de aproximadamente 10% para cada incompatibilidade adicional do doador nos locos HLA-A, B, C, ou -DR. (revisado por ANASETTI, 2008). Mas devido ao número reduzido de pacientes estudados em nossas amostras, não foi encontrada relação quanto à compatibilidade de HLA-A, -B e -DR entre os diferentes grupos de pacientes pós transplante renal.

O fato de que certos antígenos possam ser apresentados por determinados alelos de HLA-Cw, pode ser um fator genético determinante para a tolerância, superando ou evitando a tolerância, como suposto por Elder et al., em 2009, em seu estudo com HLA-Cw e psoríase.

O grupo 2 do HLA-C (Cw2, Cw4, Cw5 e Cw6) tem aumento da afinidade por seus ligantes KIR, em comparação as interações Grupo 1 do HLA-C (Cw1, Cw3,

Cw7 e Cw8) por seus ligantes KIR. Dados sugerem que alguns peptídeos no sulco das moléculas grupo 1 do HLA-C oferecem impedimento conformacional à ligação adequada com KIR2DL2/3 (MANDELBOIM et al., 1997). No entanto, há trabalhos como o de WINTER et al., em 1998, que encontraram interação inibidora relativamente fraca entre HLA-C1 e KIR2DL3, sendo facilmente superada por sinais ativadores das células NK, facilitando a eliminação da infecção pelo HCV (WINTER et al., 1998). Por outro lado, Carrington et al., 1999, encontraram que Bw4/C1 estava associado com rápida progressão da AIDS em relação ao Bw4/C2. Essa dicotomia, na opinião de Gaudieri et al., (2005) poderia estar relacionada ao fato de que o Bw4/C1 teria forte inibição e Bw6/C2 fraca inibição dos KIR nos pacientes com HIV (GAUDIERI et al., 2005).

Quanto aos nossos resultados em relação aos alelos de HLA-Cw, para nossos indivíduos transplantados renais, observamos que o alelo Cw2 está associado com fator de risco para rejeição aguda e os alelos Cw3 e Cw15 com fatores de risco para rejeição crônica. Por outro lado, os alelos Cw7 e Cw12 foram associados com proteção contra rejeição crônica.

Observamos também que o grupo 2 do HLA-C foi estatisticamente mais frequente na rejeição aguda em relação ao grupo sem rejeição e podemos notar então que a presença de pelo menos um alelo grupo 2 do HLA-C, em nossas amostras, foi prejudicial à tolerância ao aloenxerto renal, devido à alta frequência do alelo HLA-Cw2, também já citado como fator de risco, no grupo com rejeição aguda.

Em adição, Cw3 em nossos pacientes foi considerado como fator de risco e Cw7 fator de proteção para rejeição crônica. Uma vez que ambos os alelos são do grupo 1 do HLA-C, pode haver diluição do grupo 1 do HLA-C em relação com rejeição crônica e, conseqüentemente, com a rejeição total.

Em nosso estudo, pesquisamos se os alelos de HLA-Cw do receptor poderiam estar relacionados com rejeição do aloenxerto e, nesse aspecto, são poucos os estudos com transplante, mas há trabalhos com esse enfoque em transplante de fígado.

Moya-quiles et al., em 2003, em estudo com 100 pacientes submetidos ao transplante de fígado, mostraram que os pacientes que não apresentaram rejeição aguda tiveram menor frequência do alelo HLA-Cw6 comparado com aqueles que apresentaram rejeição aguda e grupo controle. Encontraram também que a frequência de episódios de rejeição aguda decresceu gradualmente de 46.3% em

incompatíveis HLA-C com duas incompatibilidades, para 33.3% e 16.6% para transplantes com uma ou nenhuma incompatibilidade, respectivamente. Entretanto essa diferença não foi estatisticamente significativa (MOYA-QUILES et al., 2003a).

Moya-quiles et al., em 2007 mostraram que, pacientes submetidos ao transplante de fígado com rejeição aguda tiveram diminuição significativa da frequência do alelo HLA-Cw*07 em relação aqueles sem rejeição aguda.

Moya-quiles et al., em 2007, encontraram o HLA-Cw*07 relacionado à proteção para rejeição aguda enquanto que nós encontramos esse alelo relacionado à proteção para rejeição crônica.

Somente um grupo pesquisou a influência dos grupos 1 e 2 do HLA-C em receptores quanto à situação pos transplante (MOYA-QUILES et al., 2003b). Outros grupos, no entanto analisaram os grupos 1 e 2 do HLA-C em doadores de fígado transplantado (HANVESAKUL et al., 2008; TRAN et al., 2008).

Concordando com os nossos resultados, Moya-quiles et al., em 2003, também encontraram que em indivíduos com rejeição aguda, os aloantígenos NK2 (alelos HLA-C do grupo 2) eram estatisticamente mais frequentes que os aloantígenos NK1 (alelos HLA-C do grupo 1), (MOYA-QUILES et al., 2003b).

Já HANVESAKUL et al., em 2008, estudando 459 pacientes, encontraram que em aloenxertos hepáticos de contendo pelo menos 1 alelo do grupo 2 do HLA-C foram associados à menor evidencia histológica de rejeição crônica e cirrose do enxerto, redução da perda do enxerto e aumento da sobrevida do paciente em 10 anos. Em aloenxertos hepático, a presença de homozigose para o grupo 2 do HLA-C nos doadores proporcionou redução de 26,5% da perda do enxerto em 10 anos quando comparados com a presença de homozigotos grupo 1 do HLA-C. De forma, segundo o grupo citado, os alelos HLA-C do grupo 2 têm interação mais inibitórias para a ativação da NK do que os alelos HLA-C do grupo 1 (HANVESAKUL et al., 2008). De modo semelhante, em biópsia de aloenxerto renal, kurnert et al., em 2007, observaram que enxerto de doadores homozigotos para o grupo 2 de HLA-C apresentaram melhor aceitação do enxerto.

Por outro lado, Tran et al., em 2008, estudando 913 pacientes, encontraram a homozigose para o grupo 2 do HLA-C em doadores não teve impacto no enxerto ou na sobrevida dos pacientes em pelo menos em 10 anos pós transplante, contradizendo os achados de Hanvesakul et al., conforme citado no parágrafo anterior (TRAN et al., 2008; revisado por MENDEL et al., 2009).

Quanto à expressão de HLA-G no aloenxerto renal, no grupo com rejeição os alelos Cw4 e Cw14 foram relacionados com ausência da expressão de HLA-G, enquanto que o Cw6 foi relacionado com maior expressão da molécula. No grupo sem rejeição, o alelo Cw4 foi associado com aumento da expressão de HLA-G. Mas não havendo outros trabalhos para comparação e discussão em relação a estes resultados.

Esses achados mostram a importância deste tipo de estudo não só da compatibilidade de HLA-Cw, mas também na interação diferencial que esses alelos e grupos de alelos de HLA-Cw possam ter na apresentação do aloantígeno e na interação com seus ligantes inibitórios KIR na aceitação do aloenxerto pelo receptor. Como também no desequilíbrio de ligação que possa existir entre os alelos de HLA-G e HLA-C, e a influência desses alelos de HLA-Cw na expressão de HLA-G.

5.4. Polimorfismo da região promotora da IL-18

Nessa parte do trabalho analisamos se o polimorfismo da região promotora da IL-18, SNPs -137 A/C e -607 C/G, poderia estar influenciando na rejeição ou na expressão de HLA-G do aloenxerto renal.

PARIKH et al., em 2004 mostraram que a IL -18 urinária está aumentada na necrose tubular aguda e na disfunção do enxerto quando comparada com outras doenças renais, podendo, portanto, ser marcador de lesão tubular proximal e necrose tubular aguda. Da mesma forma, Simon et al., em 2004, demonstraram que a expressão gênica da IL-18 em células do sangue periférico também pode ser ferramenta para detectar rejeição do aloenxerto renal em estágios iniciais.

Striz et al., em 2005 mostraram que biópsias de aloenxertos renais de pacientes com rejeição aguda, com indução de imunorreatividade, expressam fortemente IL-18 no epitélio dos túbulos distais, túbulos proximais, no infiltrado de leucócitos e no endotélio. E que os níveis de IL-18 no soro de pacientes com rejeição aguda foram estatisticamente elevados em relação aos pacientes sem complicações ou com nefropatia tubular aguda. Ainda, mostraram que células epiteliais renais expressam constitutivamente mRNA para IL-18, induzidas por TNF e IFN- γ , secretando IL-18.

Giedraitis et al., em 2001, estudando polimorfismos da IL-18 encontraram 2 polimorfismos na região promotora e mostraram que a homozigose -607 CC e -137

GG da IL-18, resultava em maior expressão de mRNA da IL-18 em relação aos outros genótipos.

Nos nossos resultados não encontramos diferenças do polimorfismo da posição -607 da IL-18 em relação à rejeição do aloenxerto. Mas no polimorfismo da posição -137 encontramos que o alelo -137 C da IL-18 foi mais frequente e o alelo -137 G menos frequente principalmente na rejeição aguda, mas também na rejeição crônica e, conseqüentemente, na rejeição total em relação ao grupo controle.

O genótipo -137 CC foi mais frequente na rejeição crônica em relação ao grupo controle. O genótipo -137 CG foi mais frequente na rejeição aguda em relação à rejeição crônica e ao grupo controle, enquanto que, o genótipo -137 GG foi menos frequente na rejeição aguda em relação ao grupo controle.

Kolesar, et al., em 2007, encontraram que em pacientes transplantados renais com disfunção do enxerto tardia, a frequência do alelo C da posição -607 foi estatisticamente aumentada em relação aos pacientes com disfunção do enxerto imediata, da mesma forma, o genótipo -607 CC e o haplótipo -607C e -137G foram mais frequentes no grupo com disfunção do enxerto tardia que imediata. No entanto, não encontraram relação desses polimorfismos com a rejeição do enxerto (KOLEGAR, et al., 2007), assim como também não encontramos relação do polimorfismo -607 A/C com a rejeição total.

Kim, et al., em 2008, em um estudo com 37 pacientes transplantados renais com rejeição aguda e 189 sem rejeição aguda, encontraram que a frequência do genótipo -137GG da IL-18 foi estatisticamente maior no grupo com rejeição aguda que no grupo sem rejeição aguda. Mostraram ainda que o grupo com rejeição aguda tiveram níveis mais elevados da IL-18 sérica, e ainda, que o genótipo -137 GG, nesse grupo, também foi mais frequente (esse estudo também revelou níveis séricos mais elevados de IFN- γ no grupo com rejeição aguda) (KIM, et al., 2008).

Dessa forma, nossos resultados não estão de acordo com os resultados de KIM, et al., em 2008, que encontraram frequência estatisticamente maior do genótipo -137 GG no grupo com rejeição aguda que sem rejeição aguda, enquanto nós encontramos que o genótipo -137 GG foi menos frequente na rejeição aguda em relação ao grupo controle e o alelo -137 C mais frequente, principalmente na rejeição aguda, mas também na rejeição crônica e, conseqüentemente, na rejeição total em relação ao grupo controle.

Considerando que a diferença de maior expressão de mRNA de IL-18 na homozigose -607 CC e -137 GG comparada a outros genótipos no estudo de Giedraitis et al., em 2001, não foi estatisticamente significativa e, posto que tanto o nosso trabalho como o trabalho de Kim, et al., foi realizado com número reduzido de pacientes, bem como com grupos de etnias diferentes (KIM et al., estudaram pacientes transplantados renais Coreanos, Kolesar, et al., Europeus, e nós Brasileiros), vê-se a necessidade de mais estudos dos polimorfismos dessa citocina em relação a sua maior expressão e sua influência na rejeição do aloenxerto renal.

Com relação à expressão de HLA-G no aloenxerto renal, tanto na posição -137 quanto a -607 da IL-18 não foi encontrada nenhuma relação entre as frequências alélicas e genóticas entre os grupos de pacientes transplantados renais e a expressão de HLA-G no aloenxerto. Não existindo outros trabalhos desses polimorfismos, nem mesmo com relação à atuação da IL-18 na expressão de HLA-G para comparação, nota-se a necessidade de estudos com esse objetivo.

5.5 Polimorfismo da região promotora do INF- γ

Outra citocina estudada foi o INF- γ . Analisamos se o polimorfismo do SNPs +874 A/T do INF- γ , poderia estar influenciando na rejeição ou na expressão de HLA-G do aloenxerto renal. Pois se sabe que o genótipo +874 TT do INF- γ é associado a altos níveis da citocina e o genótipo +874 AA associado a baixos níveis de INF- γ (PRAVICA *et al.*, 2000). Ainda, INF- γ participa intensamente nos processos de modulação da resposta imune ao alotransplante, podendo diminuir ou aumentar a expressão de outras moléculas envolvidas na aloresposta imune. Por outro lado, pode contribuir para a expressão de moléculas relacionadas com a tolerância imune (COUPEL et al., 2006), inclusive estimulando a produção de HLA-G (BRUGIÈRE et al., 2009).

Encontramos, em nosso estudo, associação entre o polimorfismo de INF- γ e a evolução no transplante renal. O genótipo +874 TT foi mais frequente na rejeição aguda em relação ao grupo sem rejeição e no grupo com rejeição em relação ao grupo sem rejeição. Dessa forma, o genótipo +874 TT é um fator de risco para a rejeição aguda, e se o genótipo +874 TT é alto produtor da citocina, então o INF- γ pode favorecer o processo da rejeição.

Quanto a esse polimorfismo são vários os trabalhos em pacientes transplantados renais, alguns deles estudando rejeição de maneira geral (sem referir rejeição aguda ou crônica) não encontraram nenhuma associação entre o polimorfismo da posição +874 do INF- γ e a rejeição em pacientes transplantados renais (POLI et al., 2001; AZARPIRA et al., 2006; AZARPIRA et al., 2009).

Outros estudos, avaliando rejeição aguda em relação: aos sem rejeição (BRABCOVA et al., 2007) ou aos com função renal estável (ALAKULPPI et al., 2004), também não encontraram relação com o polimorfismo da posição +874 do INF- γ .

Nikolova et al., em 2008 não encontraram nenhuma associação entre os pacientes transplantados renais com função renal normal e rejeição crônica para a posição +874 do INF- γ . Assim como Ligeiro et al., em 2004 e Gendzekhadze et al., em 2006, estudando a relação desse polimorfismo com a rejeição aguda e crônica

Já McDaniel et al., em 2002, estudando pacientes transplantados renais em um grupo de afro americanos, encontraram que o genótipo +874 AT (alto produtor) do INF- γ foi mais frequente e o genótipo +874 AA do INF- γ (baixo produtor), senso menos frequente em pacientes com episódios de rejeição em relação aos pacientes com ou sem disfunção renal. De forma que esse último trabalho está de acordo com os nossos resultados de que o genótipo +874 TT (alto produtor) esteja associado como fator de risco, enquanto que o genótipo +874 AA do INF- γ (baixo produtor), como fator de proteção contra rejeição do aloenxerto renal.

Com relação polimorfismo da posição +874 do INF- γ e a expressão de HLA-G no enxerto renal, apesar de Brugière et al. (2009) mostrarem que o INF- γ induz a síntese do HLA-G em cultura primária de células epiteliais brônquicas, suportando a hipótese de que fatores presentes no microambiente do aloenxerto de pulmão podem promover a expressão de HLA-G, em nosso estudo, não encontramos relação entre nenhum dos grupos de rejeição aguda ou crônica ou sem rejeição e controles com a expressão de HLA-G no enxerto renal.

5.6. Polimorfismo gênico do TNF

TNF também foi analisado quanto à influência dos polimorfismos dos SNPs -308 G/A e -238 G/A, na rejeição e na expressão de HLA-G do aloenxerto renal.

O polimorfismo -308 G/A do TNF está situado na região flanqueada 5' do gene, contendo múltiplos sítios regulatórios (DROUET et al., 1991). O genótipo -308 G está associado com baixo nível de produção do TNF, enquanto os genótipos -308 AG e -308 AA com alta produção do TNF. (HUANG et al., 1999; KROEGER et al., 2000).

De acordo com o resultado das nossas amostras, no SNP -308 A/G do TNF, o alelo -308 A é um fator de risco para RA, o genótipo -308 AG foi de alta frequência na RA, enquanto que o genótipo -308 GG de baixa frequência. Então se o genótipo -308 AG é alto produtor e -308 GG é baixo produtor de TNF, essa citocina favorece a rejeição. E quanto à posição -238 A/G do TNF não houve diferença entre suas frequências alélicas e genotípicas entre os grupos de pacientes transplantados renais e grupo controle.

São muitos os trabalhos com relação ao SNP -308 A/G do TNF em pacientes transplantados renais e também são muitas as divergências entre os resultados encontrados.

Alguns deles estudando rejeição de maneira geral (sem referir rejeição aguda ou crônica) não encontraram nenhuma associação entre o polimorfismo da posição -308 do TNF (CARTWRIGHT et al., 2001; REVIRON et al., 2001; POOLE et al., 2002; MCDANIEL et al., 2002; MELK et al., 2003; AZARPIRA et al., 2009), assim como em nosso grupo de rejeição total.

Já Manchanda e Mittal, em 2008, encontraram maior frequência (4 vezes) do genótipo -308 AA, alto produtor do TNF, no grupo com rejeição em relação ao grupo com função estável do enxerto renal. Thakkinstian et al. (2008), encontraram que o risco de rejeição foi de 20% e 30%, mais alto para -308 GA e -308 AA, respectivamente, comparados com o genótipo -308 GG. E da mesma forma, Sankaran et al., em 1999, encontraram que os polimorfismos alto produtores do -308 do TNF (-308 AG e -308 AA), foram associados com múltiplos episódios de rejeição em pacientes HLA incompatíveis e também com os pacientes resistentes aos corticosteróides.

Em estudos relacionados à rejeição aguda, Dmitrienko et al., em 2005 e Brabcova et al., em 2007 não encontraram diferenças em relação ao polimorfismo -308 do TNF e a rejeição aguda. Mas de forma concordante com nossos resultados, a maioria dos trabalhos mostraram que a rejeição aguda foi relacionada com os fenótipos alto produtores de TNF (-308 AA e -308 AG).

Pelletier et al., em 2000 encontraram que em pacientes com episódios recorrentes de RA, os fenótipos alto produtores de TNF (-308 AA e -308 AG) estavam significativamente aumentados quando comparados com o fenótipo baixo produtor de TNF (-308 GG).

Poli et al., em 2000; Poli et al., em 2001 e Mendoza-carrera et al., em 2008, encontraram que o genótipo alto produtor do -308 do TNF foi relacionado estatisticamente com maior incidência de rejeição aguda e níveis mais elevados de creatinina sérica. Poli et al., em 2000 ainda relacionaram esse genótipo ao dano vascular e Poli et al., em 2001, com episódios mais graves de rejeição. Alakulppi et al., em 2004, encontraram que pacientes com genótipo -308 AA do TNF tinha um risco relativo 5 vezes de rejeição aguda. Grunyo et al., em 2008, encontraram em biópsias renais apresentando rejeição aguda tinham frequência duas vezes de pelo menos um alelo -308 A do TNF.

Em estudos com relação à rejeição crônica, Melk et al., em 2003; Pawlik et al., em 2005; Nikolova et al., em 2008 não encontraram nenhuma associação entre os pacientes transplantados renais com função renal normal e rejeição crônica para a posição 308 A/G do TNF. Já Gendzekhadze et al., em 2006, encontraram associação do -308 A do TNF com a proteção para rejeição crônica e Penka et al., em 2007, encontraram que -308 GA estava associado com rejeição crônica e -308 GG com proteção do enxerto.

Ligeiro et al., em 2004, não encontraram relação da posição -308 do TNF entre os pacientes com função estável, rejeição aguda e rejeição crônica.

Mabel et al., 2004, estudando complicações em pacientes transplantados renais não encontraram relação do genótipo -308 do TNF com hiperuricemia, dislipoproteinemia ou diabetes tipo 2.

São raros os trabalhos com o polimorfismo -238 A/G do TNF em pacientes transplantados renais, todos estudaram ao mesmo tempo o polimorfismo -308 A/G. E assim como em nosso estudo, nenhum deles encontrou relação do -238 A/G com a rejeição (MARSHALL et al., 2000; PARK et al., 2004).

Marshall et al., em 2000, estudando rejeição aguda não encontraram nenhuma relação com os genótipos -238 e -308 do TNF. (MARSHALL et al., 2000)

Altun et al., em 2005, estudando o risco cardiovascular (que é a maior causa de morbidade e mortalidade em pacientes transplantados renais), não encontraram associação dos polimorfismos -238 e -308 do TNF com a espessura do

material da íntima da carótida e índice de massa ventricular esquerda em pacientes transplantados renais.

Park et al., 2004, encontraram que a frequência do alto produtor -308 GG (mas não -308 GA) do TNF foi significativamente maior em pacientes com rejeição recorrente comparado a pacientes sem ou com somente um episódio de rejeição. E a frequência do genótipo -238 GA do TNF, apesar de não ser estatisticamente significante, foi maior em pacientes com rejeição recorrente. Enquanto que em nosso trabalho a frequência do genótipo -238 AA do TNF esteve, não significativamente, mais elevada na rejeição que nos pacientes sem rejeição.

Ranganath et al., em 2009, em um estudo com 258 pacientes em estágio final da doença renal, encontraram que todos os alelos e genótipos dos polimorfismos -238 A/G e -308 A/G do TNF foram diferentes estatisticamente em relação ao controle, com exceção do genótipo -308 AG. No polimorfismo -308 do TNF os indivíduos controles tinham maior frequência de -308 GG e menor de -308 AA e no polimorfismo -238 do TNF os indivíduos controles tinham maior frequência de -238 GG e menor do -238 GA e -238 AA que os pacientes em estágio final da doença renal. Mostrando a importância dos níveis dessa citocina não só no aloenxerto, mas na função renal independente do transplante.

Contudo, os efeitos desses polimorfismos na tolerância ao enxerto ainda permanecem controversos (THAKKINSTIAN et al., 2008).

TNF diminui a expressão de HLA-G1 na superfície celular, mas aumenta o HLA-G citoplasmático (ZIDI et al., 2006), mas assim como para todos os polimorfismos das outras citocinas estudadas, também não foram encontradas associações A/G do TNF entre os grupos de pacientes transplantados renais e a expressão de HLA-G no aloenxerto.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Os objetivos inicialmente propostos foram alcançados e, de acordo com nossos resultados, concluímos que:

A expressão de HLA-G foi mais freqüente em biópsias sem rejeição, no entanto, não observamos diferença significativa em relação às biópsias que apresentaram rejeição. Nos polimorfismos da região 3'NT do HLA-G, os genótipos +3035 CC e +3187 GA foram associados com fatores de risco para rejeição, enquanto que o genótipo +3035 CT foi protetor. Quanto aos alelos HLA-Cw, Cw2, Cw3 e Cw15 foram fatores de risco para rejeição, enquanto os alelos Cw7 e Cw12, fatores de proteção. De acordo com os polimorfismos das citocinas, o genótipo -137 CC da IL-18, +874 TT do INF- γ e -308 AG do TNF foram fatores de risco para rejeição, enquanto que os genótipos -137 GG da IL-18 e -308 GG do TNF, fatores de proteção.

Quanto à influência desses fatores na expressão de HLA-G no enxerto renal, na rejeição, os alelos Cw4 e Cw14 foram relacionados com ausência da expressão de HLA-G, enquanto que o Cw6 foi relacionado com maior expressão da molécula. No grupo sem rejeição, o alelo Cw4 foi associado com aumento da expressão de HLA-G. Assim, os genes que codificam as moléculas HLA, as diversas citocinas e a expressão de moléculas HLA não clássicas avaliadas neste estudo podem contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos imunológicos que medeiam o processo de rejeição em aloenxertos renais.



Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFFLECK, D.G., et al. Interleukin-18 production following murine cardiac transplantation: Correlation with histologic rejection and the induction of INF-gamma. **J Interferon Cytokine Res**, v. 21, p.1, 2001.

AGUILERA, A. Cotranscriptional mRNP assembly: from the DNA to the nuclear pore. **Curr Opin Cell Biol.**, v. 17, p. 242-250, 2005.

ALAKULPPI, N.S., et al. Cytokine gene polymorphisms and risks of acute rejection and delayed graft function after kidney transplantation. **Transplantation**, v.78, n. 10, p.1422-8, 2004.

ALLAN, D.S., et al. Tetrameric complexes of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G bind to peripheral blood myelomonocytic cells. **Journal Exp Med.**, v. 189, p.1149-56, 1999.

ALTUN, B., et al. Impact of cytokine gene polymorphism on cardiovascular risk in renal transplant recipients. **Transpl Int.**, v. 18, n. 6, p. 681-9, 2005.

ALVAREZ, M., et al. (2009) HLA-G 3'-UTR SNP and 14-bp deletion polymorphisms in Portuguese and Guinea-Bissau populations. **Int J Immunogenet**, v. 36, p.361-366.

ANASETTI, C. What are the most important donor and recipient factors affecting the outcome of related and unrelated allogeneic transplantation? **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 21, N. 4, p. 691–697, 2008.

ANDERS, H.J.; VIELHAUER, V.; SCHLONDORFF, D. Chemokines and chemokine receptors are involved in the resolution or progression of renal disease. **Kidney International**, v. 63, p. 401-415, 2003.

APPS, R.; GARDNER, L.; MOFFETT, A. (2008) A critical look at HLA-G. *Trends Immunol* 29, 313-321. Association of polymorphisms in the human interferon-gamma and interleukin-10 gene with acute and chronic kidney transplant outcome: the cytokine effect on transplantation. **Transplantation**, v. 71, n. 5, p. 674-7, 2001.

AWAD, M.R., et al. The effect of cytokine gene polymorphisms on pediatric heart allograft outcome. **J Heart Lung Transplant.**, v. 20, n. 6, p. 625-30, 2001.

AZARPIRA, N., et al. Cytokine gene polymorphisms in renal transplant recipients. **Exp Clin Transplant**, v. 4, n. 2, p. 528-31, 2006.

AZARPIRA, N., et al. Influence of recipient and donor IL-10, TNFA and INFG genotypes on the incidence of acute renal allograft rejection. **Mol Biol Rep**, v. 36, n. 6, p. 1621-6, 2009.

AZUMA, H.; TILNEY, N.L. Chronic graft rejection. **Curr Opin Immunol.**, v.6, p.770-776, 1994.

BAHRI, R., et al. Soluble HLA-G inhibits cell cycle progression in human alloreactive T lymphocytes. **J Immunol.**, v. 176, n. 3, p. 1331-9, 2006.

BAINBRIDGE, D.; ELLIS, S.A.; SARGENT, I.L. HLA-G suppresses proliferation of CD4₊ T-lymphocytes. **J Reprod Immunol.**, v. 48, p. 17–26, 2000.

BARBARA, J.A., et al. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha): the good the bad and potentially very effective. **Immunol. Cell. Biol.**, v. 74, p. 434-443, 1996.

BASTURK, B., et al. Human leukocyte antigen-G, a new parameter in the follow-up of liver transplantation. **Transplantation Proceedings**, v. 38, p.571-574, 2006.

BECKER, B.N; JACOBSON, L.M; HULLETT, D.A. An antigen-independent important hormone: intrarenal angiotensin II (All) as a key to understanding chronic allograft nephropathy. **Graft.**, v. 5, p.199-203, 2002.

BÉRDARD, E.L.R.; KIM, P.; JIANG, J. Chemokine-binding viral protein M-T7 prevents chronic rejection in rat renal allografts. **Transplantation.**, v.15, p.249-52, 2003.

BERMINGHAM, J., et al. Genetic analysis of insulin-like growth factor II and HLA-G in pre-eclampsia. **Biochem Soc Trans.** V. 28, n. 2, p. 215-9, 2000.

BIOMETRIX DIAGNÓSTICA. Catálogo: Nomenclatura HLA - 2009. www.biometrix.com.br, 2009.

BLACK, R.A., et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. **Nature**, v. 385, n. 6618, p. 729-33, 1997.

BODMER, J.G., et al. Nomenclature for factors of the HLA system. **Tissue Antigens.**, v. 46, p. 1-18, 1995.

BRABCOVA, I., et al. Genetic variability of major inflammatory mediators has no impact on the outcome of kidney transplantation. **Transplantation**, v. 84, n. 8, p. 1037-44, 2007.

BRUGIÈRE, O., et al. Immunohistochemical study of HLA-G expression in lung transplant recipients. **Am J Transplant**, v. 9, n. 6, p. 1427-38, 2009.

CAROSELLA, E.C.; DAUSSET, J.; KIRSZENBAUM, M. HLA-G revised. **Immunology Today**, Amsterdam, v. 17 n. 9, p. 407-409, 1996.

CAROSELLA, E.D., et al. HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. **Adv immunol.**, v. 81, p.199-252, 2003.

CARRINGTON, M., et al. HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage. **Science**, v. 283, p. 1748–1752, 1999.

CARRINGTON, M.; NORMAN, P. The KIR Gene Cluster. 2003

CARTWRIGHT, N.H., et al. A study of cytokine gene polymorphisms and protein secretion in renal transplantation. **Transpl Immunol.** v. 8, n. 4, p. 237-44, 2001.

CASTELLI, E.C., et al. The genetic structure of 3'untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes. **Genes Immun,** v. Oct 1, p. 1–8, 2009.

CASTELLI, E.C., et al. In silico analysis of microRNAs targeting the HLA-G 3' untranslated region alleles and haplotypes. **Hum Immunol,** v. 70, n. 12, p. 1020-5, 2009.

CASTELLI, E.C.; MENDES-JUNIOR, C.T.; DONADI, E.A. HLA-G alleles and HLA-G 14pb polymorphisms in a Brazilian population **Tissue Antigens,** v. 70, p. 62-8, 2007(a).

CASTELLI, E.C., et al. A novel HLA-G allele, HLA-G* 010111, in Brazilian population. **Tissue Antigens** v. 70, p. 349-50, 2007(b).

CAUMARTIN, J., et al. Trogocytosis-based generation of suppressive NK cells. **EMBO J.** v. 26, n. 5, p. 1423-33, 2007.

CHAN, W.L., et al. NKT cell subsets in infection and inflammation. **Immunol Lett,** v. 85, p. 159–63, 2003.

CHANG, C.C.; MURPHY, S.P.; FERRONE, S. Differential in vivo and in vitro HLA-G expression in melanoma cells: potential mechanisms. **Hum Immunol.,** v. 64, n. 11, p. 1057-63, 2003.

CHEN, G.; GOEDDEL, D.V. "TNF-R1 signaling: a beautiful pathway". **Science,** v. 296, n. 5573, p. 1634–5, 2002.

CHU, W., et al. A candidate interferon-gamma activated site (GAS element) in the HLA-G promoter does not bind nuclear proteins. **Hum Immunol.,** v. 60, n. 11, p. 1113-8, 1999.

CIROCCO, R.E., et al. Killer cell immunoglobulin-like receptor polymorphisms in HLA-identical kidney transplant recipients: lack of 2DL2 and 2DS2 may be associated with poor graft function. **Tissue Antigens.,** v.69 Suppl p. 1:123-4, 2007.

CIRULLI, V., et al. The class I HLA repertoire of pancreatic islets comprises the nonclassical class Ib antigen HLA-G. **Diabetes,** v. 55, n. 5, p. 1214-22, 2006.

CLEMENTS, C.S., et al. Structural studies on HLA-G: implications for ligand and receptor binding. **Hum Immunol,** v. 68, p. 220-226, 2007.

COLLINS, T., et al. Recombinant human tumor necrosis factor increases mRNA levels and surface expression of HLA-A,B antigens in vascular endothelial cells and dermal fibroblasts in vitro. **Proc Natl Acad Sci USA,** v. 83, n. 2, p. 446, 1986.

COLONNA, M., et al. A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. **J. Exp. Med.** V. 186, p. 1809 –1818, 1997.

COLONNA, M., et al. Human myelomonocytic cells express an inhibitory receptor for classical and nonclassical MHC class I molecules. *J Immunol*, v. 160, p. 3096-100, 1998.

CONTINI, P., et al. Indiveri, S. Ferrone, and F. Puppo. 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. **Eur. J. Immunol.**, v. 33, p. 125–134, 2003.

CRÉPUT, C.; DURRBACH, A.; MENIER, C. Human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression in biliary epithelial cells is associated with allograft acceptance in liver-kidney transplantation. **Journal of Hepatology**, v. 39, p. 587-594, 2003a.

CRÉPUT, C.; LE FRIEC, G.; BAHRI, R. Detection of HLA-G in serum and graft biopsy associated with fewer acute rejections following combined liver-kidney transplantation: possible implications for monitoring patients. **Human Immunology**, v. 64, p. 1033-1038, 2003b.

CRISA, L., et al. Identification of a thymic epithelial cell subset sharing expression of the class Ib HLA-G molecule with fetal trophoblasts. **J Exp Med.**, v. 186, p. 289–298, 1997.

CRISPIM, J.C., et al. Human leukocyte antigen-G expression after kidney transplantation is associated with a reduced incidence of rejection. **Transpl Immunol.**, v. 18, n. 4, p. 361-7, 2008.

CRISPIM, J.C., et al. Frequency of insertion/deletion polymorphism in exon 8 of HLA-G and kidney allograft outcome. **Tissue Antigens.**, v. 71, n. 1, p. 35-41, 2008.

D'ALFONSO, S.; RICHIARDI, P.M. A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNFA promoter region. **Immuno-genetics**, v. 39, p. 150–154, 1994.

DAVIES, J.D., et al. T cell regulation in adult transplantation tolerance. **J Immunol.**; v. 157, p. 529–533, 1996.

DECKER, T.; LOHMANN-MATTHES, M.L.; GIFFORD, G.E. Cell-associated tumor necrosis factor (TNF) as a killing mechanism of activated cytotoxic macrophages. **J Immunol**, v. 138, n. 3, p. 957, 1987.

DERRÉ, L., et al. Expression and release of HLA-E by melanoma cells and melanocytes: Potential impact on the response of cytotoxic effector cells. **The Journal of Immunology**, v. 177, p. 3100-3107, 2006.

DESVAUX, D., et al. Moléculaire diagnosis of renal-allograft rejection: correlation with histopathologic evaluation and antirejection-therapy resistance. **Transplantation**, v. 78, n. 5, p. 647-53, 2004.

DIEHL, M., et al. Nonclassical HLA-G molecules are classical peptide presenters. **Curr Biol**, v. 6, p. 305-314, 1996.

DIETRICH, J.; CELLA, M.; COLONNA, M. Ig-like transcript 2 (ILT2) /leukocyte Ig-like receptor 1 (LIR1) inhibits TCR signaling and actin cytoskeleton reorganization. **J Immunol**, v. 166, p. 2514–21, 2001.

DMITRIENKO, S., et al. Immune response gene polymorphisms in renal transplant recipients. **Transplantation**, v. 80, n. 12, p. 1773-82, 2005.

DONADI, A.D., et al. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. Ainda não publicado, 2010.

DROUET, C.; SHAKHOV, A.N.; JONGENEEL, C.V. Enhancers and transcription factors controlling the inducibility of the tumor necrosis factor-alpha promoter in primary macrophages. **J Immunol**, v. 147, n. 5, p. 1694–1700, 1991.

ELDER, J.T., et al. Molecular dissection of psoriasis: integrating genetics and biology. **J Invest Dermatol.**, v. 130, n. 5, p. 1213-26, 2010.

ELLIS, S.A.; PALMER, M.S.; MCMICHAEL, A.J. Human trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA Class I molecule. **J Immunol.**,v. 144, p. 731-5, 1990.

ELLIS, S.A. et al. Evidence for a novel HLA antigen found on human extravillous trophoblast and a choriocarcinoma cell line. **Immunology.**, v. 59, p. 595-60, 1986.

FISCHER, J.C., et al. Relevance of C1 and C2 epitopes for hemopoietic stem cell transplantation: role for sequential acquisition of HLA-C-specific inhibitory killer Ig-like receptor. **J Immunol.**, v. 178, n. 6, p. 3918-23, 2007.

FONS, P., 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.

FOURNEL, S., et al. Cutting edge: soluble HLA-G1 triggers CD95/CD95 ligand-mediated apoptosis in activated CD8+ cells by interacting with CD8. **J. Immunol.**, v. 164, p. 6100 – 6104, 2000.

Frohn, C., et al. The effect of HLA-C matching on acute renal transplant rejection. **Nephrol Dial Transplant**, v. 16, p. 355, 2001.

GAO, G.F., et al. Classical and nonclassical class I major histocompatibility complex molecules exhibit subtle conformational differences that affect binding to CD8 alphaalpha. **J Biol Chem**, v. 275, p. 15232-15238, 2000.

GARDELLA, S., et al. Interleukin-18 synthesis and secretion by dendritic cells are modulated by interaction with antigen-specific T cells. **J Leukoc Biol**, v. 66, p. 237–41, 1999.

GAUDIERI, S., et al. Associations between KIR epitope combinations expressed by HLA-B/-C haplotypes found in an HIV-1 infected study population may influence NK mediated immune responses. **Mol Immunol.** v. 42, n. 4, p. 557-60, 2005.

GENDZEKHADZE, K.; RIVAS-VETENCOURT, P.; MONTANO, R.F. Risk of adverse post-transplant events after kidney allograft transplantation as predicted by CTLA-4 +49 and TNF-alpha -308 single nucleotide polymorphisms: a preliminary study. **Transpl Immunol.**, v. 16, n. 3-4, p. 194-9, 2006.

GERAGHTY, D.E. Structure of the HLA class I region and expression of its resident genes. **Curr.Opin. Immunol.**, v. 5, p.3-7, 1993.

GERAGHTY, D.E.; KOLLER, B.H.; ORR, H.T. A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 84, p. 9145-9, 1987.

GERAGHTY, D.E.; WEI, X.H.; ORR, H.T.; KOLLER, B.H. Human leukocyte antigen F (HLA-F). An expressed HLA gene composed of a class I coding sequence linked to a novel transcribed repetitive element. **J Exp Med.**, v. 171, p. 1-18, 1990.

GERDES, N., et al. Expression of interleukin (IL)-18 and functional IL-18 receptor on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for atherogenesis. **J. Exp. Med.** v. 195, p. 245–257, 2002.

GIBSON, T.; MEDAWAR, P. The fate of skin homografts in man. **J Anat**, v. 77, p. 299-316, 1943.

GIEDRAITIS, V., et al. Cloning and mutation analysis of the human IL-18 promoter: a possible role of polymorphisms in expression regulation. **J Neuroimmunol**, v. 112, p. 146–52, 2001.

GLAS, J., et al. Association of polymorphisms in the interleukin-18 gene in patients with Crohn's disease depending on the CARD15/NOD2 genotype. **Inflamm Bowel Dis**, v. 11, p. 1031–7, 2005.

GOBIN, S.J.; KEIJERS et al. The role of enhancer A in the locus-specific transactivation of classical and nonclassical HLA class I genes by nuclear factor kappa B. **J Immunol**. v. 161, p. 2276-2283, 1998.

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

GÖTHERSTRÖM, C., et al. Difference in gene expression between human fetal liver and adult bone marrow mesenchymal stem cells. **Haematologica**. v. 90, n. 8, p. 1017-26, 2005.

GRACIE, J.A., et al. Disease association of two distinct interleukin-18 promoter polymorphisms in Caucasian rheumatoid arthritis patients. **Genes Immun**, v. 6, p. 211–6, 2005.

HAAS, S.L., et al. 2137 (G/C) IL-18 promoter polymorphism in patients with inflammatory bowel disease. **Scand J Gastroenterol**, v. 40, n. 1438–43, 2005.

HALLORAN, P.F. Rethinking immunosuppression in terms of the redundant and nonredundant steps in the immune response. **Trans Proc.**, v. 28, p. 11-18, 1996.

HANVESAKUL, R., et al. Donor HLA-C genotype has a profound impact on the clinical outcome following liver transplantation. **Am J Transplant.** v. 8, n. 9, p. 1931-41, 2008.

HAREL-BELLAN, A., et al. Natural killer susceptibility of human cells may be regulated by genes in the HLA region on chromosome 6. **Proc Natl Acad Sci U S A.** , v. 83, n. 15, p. 5688-92, 1986.

HARRISON, G.A., et al. A 14 bp deletion polymorphism in the HLA-G gene. **Hum Mol Genet.**, v. 2, p. 2200, 1993.

HAYRY, P. Pathophysiology of chronic rejection. **Transpl Proc.**, v. 28, p. 7-10, 1996.

HAYRY, P.; MENNANDER, A. Will chronic rejection ever respond to treatment? **Transpl Int.**, v. 5, p. 578-9, 1992.

HEIDENREICH, S., et al. Potentiation of lymphokine-induced macrophage activation by tumor necrosis factor-alpha. **J Immunol.** v. 140, n. 5, p. 1511, 1988.

HEINZMANN, A., et al. Association study of polymorphisms within interleukin-18 in juvenile idiopathic arthritis and bronchial asthma. **Allergy**, v. 59, p. 845-9, 2004.

HERRMANN, S.M., et al. Polymorphisms of the tumour necrosis factor-alpha gene, coronary heart disease and obesity. **Eur J Clin Invest** , v. 28, p. 59-66, 1998.

HEUER, J.G.; TUCKER-MCCLUNG, C.; HOCK, R.A. Neuroblastoma cells expressing mature IL-18, but not proIL-18, induce a strong and immediate antitumor immune response. **J Immunother**, v. 22, p. 324-35, 1999.

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, p. 1-13, 1999.

HIGUCHI, T., et al. Polymorphism of the 50-flanking region of the human tumor necrosis factor (TNF)-alpha gene in Japanese. **Tissue Antigens**, v. 51, p.605-612, 1998.

HOFFMAN, M.; WEINBERG, J.B. Tumor necrosis factor-alpha induces increased hydrogen peroxide production and Fc receptor expression, but not increased Ia antigen expression by peritoneal macrophages. **J Leukoc Biol**, v. 42, n. 6, p. 704, 1987.

HOFFMANN, S.C., et al. Association of cytokine polymorphic inheritance and in vitro cytokine production in anti-CD3/CD28-stimulated peripheral blood lymphocytes. **Transplantation**, v. 72, p. 1444-50, 2001.

HSU, K.C., et al. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. **Immunology Rev**, v. 190, p. 40, 2002.

HUANG, D.R., et al. Tumour necrosis factor-alpha polymorphism and secretion in myasthenia gravis. **J Neuroimmunol**, v. 94, n. 1–2, p. 165–71, 1999.

HVIID, T.V., et al. HLA-G polymorphisms in couples with recurrent spontaneous abortions. **Tissue Antigens**., v. 60, p. 122–32, 2002.

HVIID, T.V, et al. HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels. **Immunogenetics**., v. 55, p 63–79, 2003.

HVIID, T.V. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. **Hum Reprod Update**., v.12, p. 209–32, 2006.

HVIID, T.V. HLA-G genotype is associated with fetoplacental growth. **Hum Immunol**.,v. 65, p. 586-93, 2004a.

HVIID, T.V., et al. Association between human leukocyte antigen-G genotype and success of in vitro fertilization and pregnancy outcome. **Tissue Antigens**, v. 64, p. 66–9, 2004b.

HYLENIUS, S., et al. Association between HLA-G genotype and risk of pre-eclampsia: a case-control study using family triads. **Mol Hum Reprod**., v.10, n. 4, p. 237-46, 2004.

HYODO, Y., et al. IL-18 up-regulates perforin-mediated NK activity without increasing perforin messenger RNA expression by binding to constitutively expressed IL-18 receptor. **J. Immunol**., v. 162, p. 1662–1668, 1999.

IBRAHIM, E.C., et al. Heat shock and arsenite induce expression of the nonclassical class I histocompatibility HLA-G gene in tumor cell lines. **Cell Stress Chaperones**. v. 5, n.3, p. 207-18, 2000.

IMBODEN, M., et al. The common G-allele of interleukin-18 single-nucleotide polymorphism is a genetic risk factor for atopic asthma. The SAPALDIA Cohort Study. **Clin Exp Allergy**., v. 36, p. 211–8, 2006.

INMAN, B.; HALLORAN, B.; MELK, A. Microchimerism in sensitized renal patients. **Transplantation**. v.67, n.10, 1998.

ISHITANI, A., et al. Protein expression and peptide binding suggest unique and interacting functional roles for HLA-E, F, and G in maternal-placental immune recognition. **J Immunol**. v. 171, p. 171, 1376-1384, 2003.

ISHITANI, A.; GERAGHTY, D.E. Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens. **Proc Natl Acad Sci USA** ., v. 89, p. 3947-3951, 1992.

ISHITANI, A., et al. Re-examination of HLA-G polymorphism in African Americans. **Immunogenetics**., v. 49, p. 808-811,1999.

JANEWAY, C.JR.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual. Rev. Immunol.**, v. 20, p.197-216, 2002.

JANSSEN, R., et al. No association between interleukin-18 gene polymorphisms and haplotypes in Dutch sarcoidosis patients. **Tissue Antigens**, v. 63, p. 578–83, 2004.

KALINA, U., et al. Genomic organization and regulation of the human interleukin-18 gene. **Scand J Immunol**, v. 52, p.525–30, 2000.

KAMINSKA, D., et al. Intragraft mRNA expression of cytokines and growth factors in human kidney allograft biopsies by in situ RT-PCR analysis. **Transplant Proc**, v. 37, p. 767–769, 2005.

KILBURN, B.A., et al. Extracellular matrix composition and hypoxia regulate the expression of HLA-G and integrins in a human trophoblast cell line. **Biol Reprod. V.** 62, n. 3, p. 739-47, 2000.

KIM, S.H., et al. Structural requirements of six naturally occurring isoforms of the IL-18 binding protein to inhibit IL-18. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 1190 – 1195, 2000.

KIM, C., et al. Association of G–137C IL-18 Promoter Polymorphism With Acute Allograft Rejection in Renal Transplant Recipients, 2008.

KING, A., et al. Recognition of trophoblasts HLA class I molecules by decidual NK cell receptors-a review. **Placenta**, v. 21 suppl A, s. 81-5, 2000.

KOLB, W.P.; GRANGER, G.A. "Lymphocyte in vitro cytotoxicity: characterization of human lymphotoxin". **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 61, n. 4, p. 1250–5, 1968.

KOLESAR, L., et al. Polymorphism of interleukin-18 promoter influences the onset of kidney graft function after transplantation, 2007.

KRETOWSKI, A., et al. Interleukin-18 promoter polymorphisms in type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 51, p. 3347–9, 2002.

KRIEGLER, M., et al. "A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF". **Cell**, v. 53, n. 1. p. 45–53, 1988.

KROEGER, K.M., et al. Effects of stimulus and cell type on the expression of the-308 tumour necrosis factor promoter polymorphism. **Cytokine**, v. 12, n. 2, p. 110–9, 2000.

KRUSE, S., et al. Polymorphisms in the IL 18 gene are associated with specific sensitization to common allergens and allergic rhinitis. **J Allergy Clin Immunol**, v.: 111, p. 117–22, 2003.

KUERSTEN, S.; GOODWIN, E.B. The power of the 3' UTR: translational control and development. **Nat Rev Genet** , v. 4, p. 626-637, 2003.

LAJOIE, J., et al. Characterisation of five novel HLA-G alleles with coding DNA base changes. **Tissue Antigens**, v. 72, p. 502-504, 2008.

LAKKIS, F.G. Role of cytokines in transplantation tolerance: lessons learned from gene-knockout mice. **J Am Soc Nephrol**, v. 9, p. 2361–2367, 1998.

LAPIERRE, L.A.; FIERS, W.; POBER, J.S. Three distinct classes of regulatory cytokines control endothelial cell MHC antigen expression. Interactions with immune gamma interferon differentiate the effects of tumor necrosis factor and lymphotoxin from those of leukocyte alpha and fibroblast beta interferons. **J Exp Med**, v. 167, n. 3, p. 794, 1988.

LAWLOR, D.A., et al. Evolution of class-I MHC genes and proteins: from natural selection to thymic selection. **Annu Rev Immunol**, v. 8, p. 23-63, 1990.

LE BOUTEILLER, P., et al. Placental HLA-G protein expression in vivo: where and what for? **Hum Reprod Update**, v. 5, p. 223-33, 1999.

LE DISCORDE, et al. Expression of HLA-G in human cornea, an immune-privileged tissue. **Hum Immunol**, v. 64, p.1039-44, 2003.

LE FRIEC, G., et al. Soluble HLA-G inhibits human dendritic cell-triggered allogeneic T-cell proliferation without altering dendritic differentiation and maturation processes. **Hum Immunol**. v. 64, n. 8., p. 752-61, 1995.

LEE, N., et al. The membrane-bound and soluble forms of HLA-G bind identical sets of endogenous peptides but differ with respect to TAP association. **Immunity**, v. 3, p. 591-600, 1995.

LEEUWENBERG, J.F., et al. Effects of tumor necrosis factor on the interferon-gamma-induced major histocompatibility complex class II antigen expression by human endothelial cells. **Eur J Immunol**, v. 18, n. 9, p. 1469, 1988.

LEFEBVRE, S., 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**, v. 276, n. 9, p. 6133-9, 2001.

LEMAOULT, J., et al. HLA-G1-expressing antigen-presenting cells induce immunosuppressive CD4+ T cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 18, p. 7064-9, 2004.

LEMAOULT, J., et al. Biology and functions of human leukocyte antigen-G in health and sickness. **Tissue Antigens**, v. 62, p. 273-284, 2003.

LEMAOULT, J., et al. Evidence to support the role of HLA-G5 in allograft acceptance through induction of immunosuppressive/regulatory T cells. **The Journal of Immunology**, v. 176, p. 3266-3276, 2005.

LEROND, S., et al. Alloreactive CD4⁺ and CD8⁺ T cells express the immunotolerant HLA-G molecule in mixed lymphocyte reactions: *in vivo* implications in transplanted patients. **Eur J Immunol.**, v. 34, p. 649-660, 2004.

LEROND, S., et al. Evidence to support the role of HLA-G5 in allograft acceptance through induction of immunosuppressive/regulatory T cells. **The Journal of Immunology.**, v.176, p. 3266-3276, 2006.

LEUNG, B.P., et al. A role for IL-18 in neutrophil activation. **J. Immunol.** v. 167, p. 2879 –2886, 2001.

LIGEIRO, D., et al. Impact of donor and recipient cytokine genotypes on renal allograft outcome. **Transplant Proc.**, v. 36, n. 4, p. 827-9, 2004.

LILA, N., et al. Human leukocyte antigen-G expression after heart transplantation is associated with a reduced incidence of rejection. **Circulation.**, v. 105, p. 1949–54, 2002.

LILA, N., et al. Implication of HLA-G molecule in heart-graft acceptance. **Lancet.**, v. 355, p. 2138, 2000.

LILA, N., et al. Soluble HLA-G protein secreted by allo-specific CD4⁺ T cells suppresses the allo-proliferative response: a CD4⁺ T cell regulatory mechanism. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 98, n. 21, p. 12150-5, 2001.

LOCKSLEY, R.M.; Killeen, N.; Lenardo, M.J. "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology". **Cell**, v. 104, n. 4, p. 487–501, 2001.

LOKE, Y.W.; KING, A. Recent developments in the human maternal-fetal immune interaction. **Curr Opin Immunol.**, v. 3, p. 762-6, 1991.

LOZANO, J.M., et al. Monocytes and T lymphocytes in HIV-1-positive patients Express HLA-G molecule. **Aids.**, v. 16, p. 347-351, 2002.

LU, H.; SHEN, C.; BRUNHAM, R.C. Chlamydia trachomatis infection of epithelial cells induces the activation of caspase-1 and release of mature IL-18. **J Immunol**, v. 165, p. 1463, 2000.

MANCHANDA, P.K., MITTAL, R.D. Analysis of cytokine gene polymorphisms in recipient's matched with living donors on acute rejection after renal transplantation. **Mol Cell Biochem.**, v. 311, n. 1-2, p. 57-65, 2008.

MANDELBOIM, O., et al. The binding site of NK receptors on HLA-C molecules. **Immunity**, v. 6, p. 341–350, 1997.

MARCHAL-BRAS-CONCALVES, R., et al. A soluble HLA-G protein that inhibits natural killer cell-mediated cytotoxicity. **Transplant Proc.**, v. 33, p. 2355–2359, 2001.

MARDER, B.; SCHROÏPEL, B.; MURPHY, B. Genetic variability and transplantation. **Curr Opin Urol**, v. 13, p. 81, 2003.

MARIN, L.A., et al. Evaluation of CD86 gene polymorphism at ^Δ 1057 position in liver transplant recipients. **Transpl Immunol**, v. 15, p. 69, 2005.

MARSHALL, S.E., et al. The impact of recipient cytokine genotype on acute rejection after renal transplantation. **Transplantation**, v. 70, p. 1485±1491, 2000.

MATHEW, J.M., et al. A novel micro-cell-mediated lympholytic assay for the evaluation of regulatory cells in human alloreactive CTL responses. **Journal of Immunological Methods**, v. 272, p. 67-80, 2003.

MATHEW, J.M., et al. Donor bone marrow-derived chimeric cells present in renal transplant recipients infused with donor marrow. I. Potent regulators of recipient antidonor immune responses. **Transplantation**, v. 70, p. 1675-1682, 2000.

MCDANIEL, D.O., et al. Combined analysis of cytokine genotype polymorphism and the level of expression with allograft function in African-American renal transplant patients. **Transpl Immunol**. v. 11, n. 1, p. 107-19, 2003.

MCINNES, I.B., et al. Interleukin 18: A pleiotropic participant in chronic inflammation. **Immunol Today**, v. 21, p. 312, 2000.

MEIER-KRIESCHE, H.U.; SCHOLD, J.D.; KAPLAN, B. Long-term renal allograft survival: have we made significant progress or is it time to rethink our analytic and therapeutic strategies? **Am J Transplant**. , v. 4, n. 8, p. 1289-95, 2004.

MELK, et al. Cytokine single nucleotide polymorphisms and intrarenal gene expression in chronic allograft nephropathy in children. **Kidney Int**. v. 64, n. 1, p. 314-20, 2003.

MENDEL, J.B., et al. HLA-C and liver transplant outcomes: interpreting the facts. **Am J Transplant**. v. 9, n. 7, p. 1491-2, 2009.

MENDES-JUNIOR, C.T., et al. HLA-G 14pb polymorphism at exon 8 in Amerindian populations from Brazilian Amazon. **Tissue Antigens**, v. 69, p. 255-260, 2007.

MENDOZA-CARRERA, F., et al. Influence of cytokine and intercellular adhesion molecule-1 gene polymorphisms on acute rejection in pediatric renal transplantation. **Pediatr Transplantation**, v. 12, p. 755–761, 2008.

MENIER, C., et al. Erythroblasts secrete the nonclassical HLA-G molecule from primitive to definitive hematopoiesis. *Blood*, v. 104, n. 10, p. 3153-60, 2004.

MILLER, S.A., et al., A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res.**, v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.

MINGUELA, A., et al. Implication of Th1, Th2, and Th3 cytokines in liver graft acceptance. **Transplant Proc** 31:519–520, 1999.

MIRENDA, V., et al. Modified dendritic cells coexpressing and allogeneic major histocompatibility complex molecules: An efficient way to induce indirect pathway regulation. **J Am Soc Nephrol**, vol.15, p.987-997, 2004.

MITSDOERFFER, M., et al. Monocyte-derived HLA-G acts as a strong inhibitor of autologous CD4 T cell activation and is upregulated by interferon-beta in vitro and in vivo: rationale for the therapy of multiple sclerosis. **J Neuroimmunol.**, v. 159, n. 1-2, p. 155-64, 2005.

MOREAU, P., et al. Glucocorticoid hormones upregulate levels of HLA-G transcripts in trophoblasts. **Transplant Proc.** v. 33, n. 3, p. 2277-80, 2001.

MOREAU, P., et al. HLA-G gene repression is reversed by demethylation. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 100, n. 3, p. 1191-6, 2003.

MOREAU, P., et al. IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. **Int Immunol.**, v. 11, n. 5, p. 803-11, 1999.

MORETTA, A., et al. A novel surface antigen expressed by a subset of human CD3-CD16+ natural killer cells. Role in cell activation and regulation of cytolytic function. **J Exp Med.**, v. 171, n. 3, p. 695-714, 1990.

MOUILLOT, G., et al. Hypoxia modulates HLA-G gene expression in tumor cells. **Hum Immunol.**, v. 68, n. 4, p. 277-85, 2007.

MOYA-QUILES, M.R., et al. Human leukocyte antigen-C in short and long-term liver graft acceptance. **Liver Transpl**, v. , p. 218, 2003b.

MOYA-QUILES, M.R., et al. Impact of HLA-C on acute rejection in liver transplantation. **Transplant Proc.**, v. 35, n. 5, p. 1892-3a.

MOYA-QUILES, M.R., et al. Impact of Recipient HLA-C in Liver Transplant: A Protective Effect of HLA-Cw*07 on Acute Rejection. **Human Immunology**, v. 68, p. 51–58, 2007.

MURO, M., et al. HLA-DRB1 and -DQB1 polymorphism in liver recipients: relationship between HLA-DQB1*0302 allele frequency and acute rejection. **Hum Immunol**, v. 56, p. 70, 1997.

NAGAMATSU, T., et al. Hypoxia does not reduce HLA-G expression on extravillous cytotrophoblasts. **J Reprod Immunol.**, v. 63, n. 2, p. 85-95, 2004.

NAJI, A., et al. CD3+CD4low and CD3+CD8low are induced by HLA-G: novel human peripheral blood suppressor T-cell subsets involved in transplant acceptance. **Blood**, v. 110, n. 12, p. 3936-48, 2007.

NAKANISHI, K., et al. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. **Annu Rev Immunol**, v. 19, p. 423–74, 2001.

NIKOLIC, B.; SYKES, M. Clonal deletion as a mechanism of transplantation tolerance. **J Heart Lung Transplant.**, v.15, p. 1171–1178, 1996.

NIKOLOVA, P.N., et al. Cytokine gene polymorphism in kidney transplantation Impact of TGF- β 1, TNF- α and IL-6 on graft outcome. **Transplant Immunology**, v. 18, p. 344– 348, 2008.

NOVAK, N., et al. Single nucleotide polymorphisms of the IL18 gene are associated with atopic eczema. **J Allergy Clin Immunol**, v. 115, p. 828–33, 2005.

OBER, C.; ALDRICH, C.L. HLA-G polymorphisms: neutral evolution or novel function? **J Reprod Immunol**. v. 36, p. 1-21, 1997.

OBER, C., et al. Variation in the HLA-G promoter region influences miscarriage rates. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 72, p.1425, 2003.

O'BRIEN, M., et al. Altered HLA-G transcription in pre-eclampsia is associated with allele specific inheritance: possible role of the HLA-G gene in susceptibility to the disease. **Cell Mol Life Sci.**, v. 58, p. 1943-9, 2001.

OKAMURA, H., et al. Interleukin-18: a novel cytokine that augments both innate and acquired immunity. **Adv Immunol**, v. 70, p 281–312, 1998.

OLEE, T., et al. IL-18 is produced by articular chondrocytes and induces proinflammatory and catabolic responses. **J Immunol**, v. 162, p. 1096–100, 1999.

Onno, M., et al. Modulation of HLA-G antigens expression in myelomonocytic cells. **Hum Immunol.**, v. 61, n. 11, p. 1086-94, 2000.

PARHAM, P. Immunology: keeping mother at bay. **Curr Biol.**, v. 6, p. 638-41,1996.

PARHAM P, MCQUEEN KL. Alloreactive killer cells: hindrance and help for haematopoietic transplants. **Nat Rev Immunol.**, v. 3, n. 2, p. 108-22, 2003.

PARIKH, C.R., et al. Urinary Interleukin-18 Is a Marker of Human Acute Tubular Necrosis. **American Journal of Kidney Diseases**, v 43, n. 3, p. 405-414, 2004.

PARK, J.Y., et al. TNF-alpha and TGF-beta1 gene polymorphisms and renal allograft rejection in Koreans. **Tissue Antigens.**, v. 64, n. 6, p. 660-6, 2004.

PAUL, L.D; TOUNGOUZ, M.; GOLDMAN, M. Infusion of donor-derived hematopoietic stem cells in organ transplantation: clinical data. **Transplantation.**, v. 75, p. 465-495, 2003.

PAUL, L.C. Immunobiology of chronic renal transplant rejection. **Blood Purif.**, v. 13, p. 206-218, 1995.

PAWLIK, A., et al. The cytokine gene polymorphisms in patients with chronic kidney graft rejection. **Transpl Immunol.**, v. 14, n. 1, p. 49-52, 2005.

PAWLIK, A., et al. Interleukin-18 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. **Tissue Antigens**, v. 67, p. 415–8, 2006.

PEI, J., et al. Generation of HLA-C-specific cytotoxic T cells in association with marrow graft rejection: analysis of alloimmunity by T-cell cloning and testing of T-cell-receptor rearrangements. **Biol Blood Marrow Transplant** , v. 7, n. 378, 2001.

PELLETIER, R., et al. Evidence for a genetic predisposition towards acute rejection after kidney and simultaneous kidney-pancreas transplantation. **Transplantation.**, v. 70, n. 4, p. 674±680, 2000.

PENKA, N., et al. Cytokine gene polymorphism in kidney transplantation — Impact of TGF-β1, TNF-α and IL-6 on graft outcome. **Transplant Immunology**, v. 18, p. 344–348, 2008.

PIANCATELLI, D., et al. HLA-G 14-bp insertion/deletion polymorphism in kidney transplant patients with metabolic complications. **Transplant Proc.**, v. 41, n. 4, p. 1187-8, 2009.

POCIOT, F., et al. Analysis of an interferon-gamma gene (IFNG) polymorphism in Danish and Finnish insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) patients and control subjects. Danish Study Group of Diabetes in Childhood. **J Interferon Cytokine Res.**, 1997, v. 17, n. 2, p. 87-93.

PIRRI, A., et al. A study of HLA-G polymorphism and linkage disequilibrium in renal transplant patients and their donors. **Transpl Immunol**, v. 20, p. 143–9, 2009.

POLI, F., et al. Tumour necrosis factor-alpha gene polymorphism: implications in kidney transplantation. **Cytokine.**, v. 12, n. 12, p. 1778-83, 2000.

POLI, F., et al. TNF-α/IFN-γ IL-6, IL-10, and TGF-β1 Gene Polymorphisms in Renal Allografts. **Transplantation Proceedings**, v. 33, p. 348±349, 2001.

POOLE, K.L., et al. Influence of patient and donor cytokine genotypes on renal allograft rejection: evidence from a single centre study. **Transpl Immunol.** , v. 8, n. 4, p. 259-65, 2001.

PRAVICA, V., et al. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. **Hum Immunol**, v. 61, n. 9, p. 863–6, 2000.

PUREN, A.J.; FANTUZZI, G.; DINARELLO, C.A. Gene expression, synthesis, and secretion of interleukin 18 and interleukin 1beta are differentially regulated in human blood mononuclear cells and mouse spleen cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, p. 2256–61, 1999.

PYO, C., et al. HLA-E, HLA-F, and HLA-G polymorphism: genomic sequence defines haplotypes structure and variation spanning the nonclassical class I genes. **Immunogenetics.**, v. 58, p. 241-251, 2006.

Qiu, J., et al. Soluble HLA-G expression and renal graft acceptance. **Am J Transplant.** v. 6, n. 9, p. 2152-6, 2006.

RACUSEN, L.C., et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. **Kidney Int.**, v. 55, p.713-723, 1999.

RANGANATH, P., et al. Role of non-HLA genetic variants in end-stage renal disease. **Tissue Antigens.**, v. 74, n. 2, p. 147-55, 2009.

REBMANN, V., et al. Association of soluble HLA-G plasma levels with HLA-G alleles. **Tissue Antigens**, v. 57, p. 15-21, 2001.

REGELE, H.; BOHMIG, G.A.; HABICHT, A. Capillary deposition of complement split product C4d in renal allografts is associated with basement membrane injury in peritubular and glomerular capillaries: A Contribution of humoral immunity to chronic allograft rejection. **J Am Soc. Nephrol.**, v. 13, p. 2371-2380, 2002.

REVIRON, D., et al. TNF-alpha and IL-6 gene polymorphism and rejection in kidney transplantation recipients. **Transplant Proc.**, v. 33, n. 1-2, p. 350-1, 2001.

RITEAU, B., et al. HLA-G inhibits the allogeneic proliferative response. **J Reprod Immunol.**, v. 43, n. 2, p. 203-11, 1999.

RITEAU, B., et al. 2001. HLA-G2, -G3, and -G4 isoforms expressed as nonmature cell surface gly-coproteins inhibit NK and antigen-specific CTL cytotoxicity. **J. Immunol.** v. 166, p. 5018 –5026, 1999.

RISTICH, V., et al. Tolerization of dendritic cells by HLA-G. **Eur J Immunol.**, v. 35, n. 4, p. 1133-42, 2005.

ROUAS-FREISS, N., et al. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 94, p. 11520, 1997.

ROUAS-FREISS, N., et al. HLA-G in transplantation: A relevant molecule for inhibition of graft rejection? **Am J Transplant.**, v. 3, p. 11-16, 2003.

ROUAS-FREISS, N., et al. HLA-G proteins in cancer: do they provide tumor cells with an escape mechanism? **Cancer Res**, v. 65, p. 10139-44, 2005.

ROUAS-FREISS, N., et al. Switch of HLA-G alternative splicing in a melanoma cell lines causes loss of HLA-G1 expression and sensitivity to NK lysis. **Int. J. Cancer.**, 2005.

ROUSSEAU, P., et al. The 14 pb deletion-insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. **Hum Immunol.**, v. 64, p. 1005-10, 2003.

ROUSSEAU, P.; et al. In vivo, RFX5 binds differently to the human leukocyte antigen-E, -F, and -G promoters and participates in HLA class I protein expression in a cell type-dependent manner. **Immunology, Oxford**, v. 11, n. 1, p. 53-65, 2004.

RUEDA, B., et al. Interleukin-18-promoter polymorphisms are not relevant in rheumatoid arthritis. **Tissue Antigens**, v. 65, p. 544–8, 2005.

SAGUEZ, C.; OLESEN, J.R.; JENSEN, T.H. (2005) Formation of export-competent mRNP: escaping nuclear destruction. **Curr Opin Cell Biol**, v. 17, p. 287-293, 2005.

SAHA, N., et al. Interleukin-1beta-converting enzyme/ caspase-1 in human osteoarthritic tissues: localization and role in the maturation of interleukin-1beta and interleukin-18. **Arthritis Rheum**, v. 42, p. 1577–87, 1999.

SALAMA, A.D., et al. Challenge to achieving clinical transplantation tolerance. **The Journal of Clinical Investigation.**, v.108, n. 7, p. 943-48, 2001.

SANKARA, D.I; ASDERAKIS, A.; ASHRAF, S. Cytokine gene polymorphisms predict acute graft rejection following renal transplantation. **Kidney Int**, v. 56, n. 1, p. 281-8, 1999.

SAYEGH, M.H.; CARPENTER, C.B. Tolerance and chronic rejection. **Kidney Int.**, v. 51 (S58), p. S11-S14, 1997.

SBN. **Sociedade Brasileira de Nefrologia**; www.sbn.org.br. (Acesso 06/2006).

SHELLEKENS, J., et al. Activating KIRs exert a crucial role on relapse and overall survival after HLA-identical sibling transplantation. **Mol Immunol.**, v. 45, n. 8, p. 2255-61, 2008.

SEBELOVA, S., et al. Interleukin-18 and its three gene polymorphisms relating to allergic rhinitis. **J Hum Genet.** v. 52, p. 152–8, 2007.

SELMANI, Z., et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. **Stem Cells.**, v. 26, n. 1, p. 212-22, 2008.

SHIROISHI, M., et al. Structural basis for recognition of the nonclassical MHC molecule HLA-G by the leukocyte Ig-like receptor B2 (LILRB2/LIR2/ILT4/CD85d). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, p. 16412-16417, 2006.

SHIROISHI, M., 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. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, p. 8856-61, 2003.

SIMON, T., et al. Serial peripheral blood interleukin-18 and perforin gene expression measurements for prediction of acute kidney graft rejection. **Transplantation**, v. 77, p. 1589, 2004.

SMITH, M.R., et al. Direct evidence for an intracellular role for tumor necrosis factor-alpha 1. Microinjection of tumor necrosis factor kills target cells. **J Immunol**, v. 144, n. 1, p. 162, 1990.

SOLEZ, K., et al. Banff'05 meeting report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy (CAN). **American journal of transplantation.**, v.7, p.518-526, 2007.

SOLIER, C., et al. HLA-G unique promoter region: functional implications. **Immunogenetics**, v. 53, p. 617-635. 2001

SOMMER, P.; NEHRBASS, U. Quality control of messenger ribonucleoprotein particles in the nucleus and at the pore. **Curr Opin Cell Biol**, v. 17, p. 294-301, 2005.

SOUTO, F.J., et al. Liver HLA-G expression is associated with multiple clinical and histopathological forms of chronic hepatitis B virus infection. **J Viral Hepat.**, 2010.

STARZL, T.S.; DEMETRIS, A.D. Transplantation tolerance, microchimerism, and the two-way paradigm. **Theoretical Medicine and Bioethics.**, v. 19, p. 441-455, 1998.

STASSEN, N.A., et al. IL-18 promoter polymorphisms correlate with the development of post-injury sepsis. **Surgery**, v. 134, p. 351, 2003.

STOLL, S., et al. Production of functional IL-18 by different subtypes of murine and human dendritic cells (DC): DC-derived IL-18 enhances IL-12-dependent Th1 development. **Eur J Immunol**, v. 28, p. 3231–9, 1998.

STOLL, S., et al. Production of IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) messenger RNA and functional protein by murine keratinocytes. **J Immunol**, v. 159, p. 298–302, 1997.

STRIZ, I., et al. Interleukin 18 (IL-18) upregulation in acute rejection of kidney allograft. **Immunol Lett**, v. 99, p. 30–5, 2005.

SUAREZ, M.B., et al. (1997) A new HLA-G allele (HLA-G*0105N) and its distribution in the Spanish population. **Immunogenetics**, v. 45, p. 464-465.

SUGAWARA, S., et al. Neutrophil proteinase 3-mediated induction of bioactive IL-18 secretion by human oral epithelial cells. **J Immunol**, v. 167, p. 6568, 2001.

SULLIVAN, L.C., et al. A structural perspective on MHC class Ib molecules in adaptive immunity. **Trends in Immunology.**, v. 27, n. 9, p. 413-420, 2006.

TAKEUCHI, M., et al. Immunohistochemical and immuno-electron-microscopic detection of interferon-gamma-inducing factor ("interleukin-18") in mouse intestinal epithelial cells. **Cell Tissue Res**, v. 289, p. 499–503, 1997.

TAN, Z., SHON, A.M., OBER, C. Evidence of balancing selection at the HLA-G promoter region. **Hum Mol Genet**, v. 14, p. 3619–28, 2005.

TAN, Z., et al. Allele-Specific Targeting of microRNAs to HLA-G and Risk of Asthma. **The American Journal of Human Genetics.**, v.81, 2007.

TANG, P.; HUNG, M.C.; KLOSTERGAARD, J. "Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer". **Biochemistry**, v. 35, n. 25, p. 8216–25, 1996.

THAKKINSTIAN, A., et al. Association between cytokine gene polymorphisms and outcomes in renal transplantation: a meta-analysis of individual patient data. **Nephrol Dial Transplant.**, v. 23, n. 9, p. 3017-23, 2008.

TOMINAGA, K., et al. IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1b for IFN-g production from human T cells. **Int Immunol**, v. 12, p. 151, 2000.

TORRES, M.I., et al. 14-Base pair polymorphism of human leukocyte antigen-G as genetic determinant in heart transplantation and cyclosporine therapy monitoring. **Hum Immunol.**, v. 70, n. 10, p. 830-5, 2009.

TRAN, T.H., et al. Reassessing the impact of donor HLA-C genotype on long-term liver transplant survival. **Am J Transplant.** v. 9, n. 7, p. 1674-8, 2009.

TURNER, D., et al. Cytokine gene polymorphism and heart transplant rejection. **Transplantation,** v. 64, p. 776, 1997.

UDAGAWA, N., et al. Interleukin-18 (interferon-gamma-inducing factor) is produced by osteoblasts and acts via granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and not via interferon-gamma to inhibit osteoclast formation. **J Exp Med,** v. 185, p. 1005–12, 1997.

UROSEVIC, M., et al. Human leukocyte antigen G up-regulation in lung cancer associates with high-grade histology, human leukocyte antigen class I loss and interleukin-10 production. **Am J Pathol.,** v. 159, n. 3, p. 817-24, 2001.

UROSEVIC, M.; Dummer, R. HLA-G and IL-10 expression in human cancer--different stories with the same message. **Semin Cancer Biol.,** v. 13, n. 5, p. 337-42, 2003.

VEIT, T.D.; CHIES, J.A. Tolerance versus immune response -- microRNAs as important elements in the regulation of the HLA-G gene expression. **Transpl Immunol,** v. 20, p. 229-231, 2009.

WAJANT, H.; PFIZENMAIER, K.; SCHEURICH, P. "Tumor necrosis factor signaling". **Cell Death Differ.** v. 10, n. 1, p. 45–65, 2003.

WALDRON-LYNCH, F., et al. Genetic analysis of the 3' untranslated region of the tumour necrosis factor shows a highly conserved region in rheumatoid arthritis affected and unaffected subjects. **J Med Genet,** v. 36, p. 214–216, 1999.

WANG, J., et al. The study of peripheral blood microchimerism in kidney transplantation. **Transplantation Proceedings.,** v. 33, p. 177-178, 2001.

WARLE, M.C., et al. Cytokine gene polymorphisms and acute liver graft rejection: a meta-analysis. **Liver Transpl,** v. 11, p. 19, 2005.

WEI, X.H.; ORR, H.T. Differential expression of HLA-E, HLA-F, and HLA-G transcripts in human tissue. **Hum Immunol.,** v. 29, p.131-42, 1990.

WIENDL, H., et al. A functional role of HLA-G expression in human gliomas: an alternative strategy of immune escape. **J Immunol.,** v.168, p. 4772, 2002.

WILLIAMS, R.O., et al. Successful therapy of collagen-induced arthritis with TNF receptor-IgG fusion protein and combination with anti-CD4. **Immunology,** v. 84, p. 433– 9, 1995.

WILSON, A.G., et al. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. **Proc Natl Acad Sci USA,** v. 94, p. 3195–3199, 1997.

WINTER, C.C., et al. Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition. **J Immunol,** v. 161, p. 571–577, 1998.

WU, C., et al. IL-18 receptor b-induced changes in the presentation of IL-18 binding sites affect ligand binding and signal transduction. **J Immunol**, v. 170, p. 5571–7, 2003.

YANG, Y., et al. Expression of HLA-G in human mononuclear phagocytes and selective induction by IFN-gamma. **J Immunol**. v. 156, n. 11, p. 4224-31, 1996.

YEUNG, M.C., et al. Na essential role for the interferon-inducible, double-stranded RNA-activated protein Kinase PKR in the tumor necrosis factor-induced apoptosis in U937. **Poc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 93, p. 12451-12455, 1996.

YIE, S.M.; XIAO, R.; LIBRACH, C.L. Progesterone regulates HLA-G gene expression through a novel progesterone response element. **Hum Reprod.**, v. 21, n. 10, p. 2538-44, 2006a.

YIE, S.M., et al. Progesterone enhances HLA-G gene expression in JEG-3 choriocarcinoma cells and human cytotrophoblasts in vitro. **Hum Reprod.**, v. 21, n. 1, p. 46-51, 2006b.

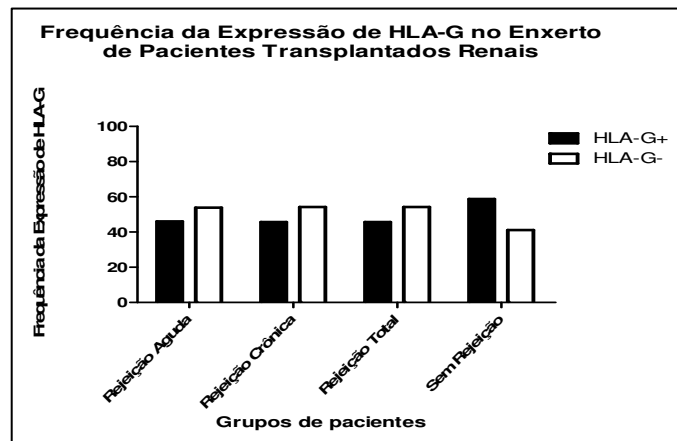
YIE, S.M., et al. A single base-pair mutation in the 3'-untranslated region of HLA-G mRNA is associated with pre-eclampsia. **Mol Hum Reprod**, v. 14, p. 649-653, 2008.

YOSHIMOTO, T., et al. IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-g production. **J Immunol**, v. 161, p. 3400, 1998.

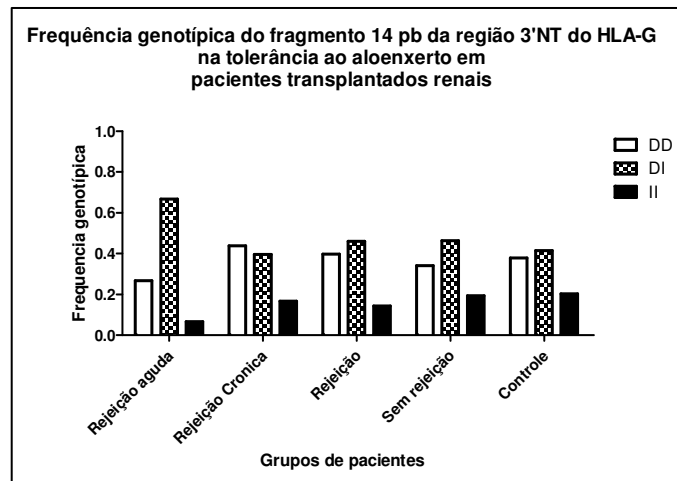
ZHOU ,Y., et al. Roles of functional polymorphisms in the interleukin-18 gene promoter in sarcoidosis. **Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis**, v. 22, p. 105–13, 2005.

ZIDI, I., et al. Increase in HLA-G1 proteolytic shedding by tumor cells: a regulatory pathway controlled by NF-kappaB inducers. **Cell Mol Life Sci**. v. 63, n. 22, p. 2669-81, 2006.

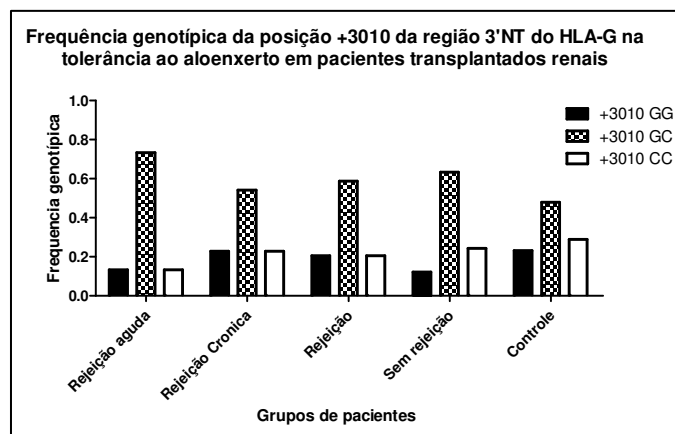
Apêndice



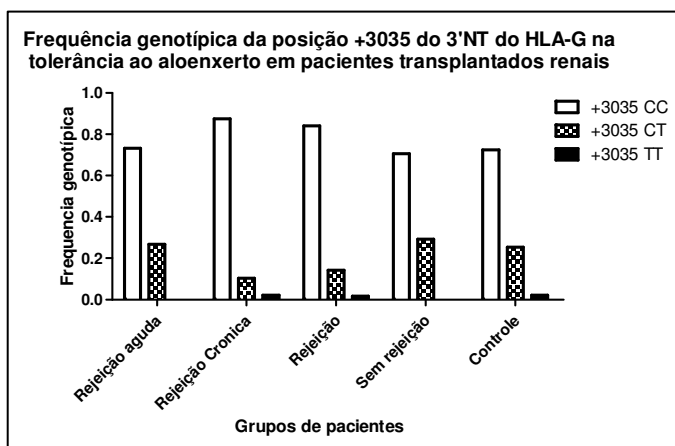
Apêndice A - Frequência da expressão de HLA-G no aloenxerto de pacientes transplantados renais.



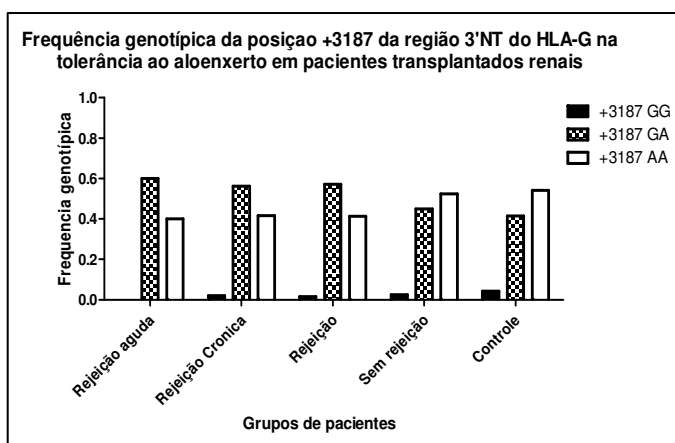
Apêndice B - Frequência genotípica do 14pb da região 3'NT do HLA-G.



Apêndice C - Frequência genotípica do SNP +3010 da região 3'NT do HLA-G.



Apêndice D - Frequência genotípica do SNP +3035 da região 3'NT do HLA-G.



Apêndice E - Frequência genotípica do SNP +3187 da região 3'NT do HLA-G.

Apêndice F - Probabilidade e frequência dos genótipos de haplótipos da região 3'NT do HLA-G em relação à expressão de HLA-G no aloenxerto renal.

Grupos de pacientes	n	Genótipos de Haplotipos da região 3' NT do HLA-G																																
		1 e 1	1 e 2	1 e 3	1 e 4	1 e 5	1 e 6	1 e 7	2 e 2	2 e 3	2 e 4	2 e 5	2 e 6	2 e 7	3 e 3	3 e 4	3 e 4	3 e 6	3 e 7	4 e 4	4 e 5	4 e 6	4 e 7	5 e 5	5 e 6	5 e 7	6 e 6	6 e 7	7 e 7					
Rejeição Aguda																																		
HLA-G -	7	0.0000	0.1429	0.1429	0.0000	0.1429	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1429	0.1429	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1429	0.0000	0.0000	0.0000	0.1429	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
HLA-G +	4	0.0000	0.5000	0.0000	0.2500	0.2500	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	
p valor a		-	0.4909	1.0000	0.3636	1.0000	-	-	-	-	-	1.0000	1.0000	-	-	-	-	1.0000	-	-	-	1.0000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Rejeição Crônica																																		
HLA-G -	18	0.0000	0.2778	0.0556	0.2222	0.0000	0.1111	0.0000	0.0556	0.0556	0.0000	0.0000	0.0556	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0556	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0556	0.0000	0.0556	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	
HLA-G +	14	0.0000	0.0714	0.2857	0.1429	0.0000	0.0714	0.0714	0.0714	0.1429	0.0714	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0714	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	
p valor a		-	0.1959	0.1420	0.6722	-	0.4919	0.4375	1.0000	1.0000	0.1835	0.4375	1.0000	-	-	-	-	1.0000	-	-	-	0.4375	1.0000	-	1.0000	-	-	-	-	-	-	-		
Rejeição Total																																		
HLA-G -	25	0.0000	0.2400	0.0800	0.1600	0.0400	0.0800	0.0000	0.0400	0.0400	0.0000	0.0400	0.0800	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0800	0.0000	0.0000	0.0000	0.0400	0.0400	0.0000	0.0400	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000		
HLA-G +	18	0.0000	0.1667	0.2222	0.1667	0.0556	0.0000	0.0556	0.0556	0.1111	0.0556	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0556	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000		
p valor a		-	0.7117	0.2178	1.0000	1.0000	0.5017	0.4186	1.0000	1.0000	0.5017	1.0000	0.5017	-	-	-	-	0.5017	-	-	-	1.0000	1.0000	-	1.0000	-	-	-	-	-	-			
Sem Rejeição																																		
HLA-G -	13	0.0769	0.1538	0.1538	0.0000	0.0769	0.0000	0.0000	0.0769	0.0769	0.0000	0.0769	0.0000	0.1538	0.0000	0.0769	0.0000	0.0769	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000		
HLA-G +	17	0.1176	0.0000	0.0588	0.1176	0.0000	0.0588	0.0588	0.1765	0.0588	0.0000	0.0000	0.0588	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1176	0.0588	0.0000	0.0000	0.0588	0.0000	0.0000	0.0588	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000		
p valor a		1.0000	0.1793	0.5645	0.4920	0.4333	1.0000	1.0000	0.6129	1.000	-	0.4333	1.0000	0.1793	-	0.4333	-	0.4333	-	-	0.4920	1.0000	-	-	1.0000	-	-	1.0000	-	-	-	-		
Total																																		
HLA-G -	38	0.0263	0.2105	0.1053	0.1053	0.0526	0.0526	0.0000	0.0526	0.0526	0.0000	0.0526	0.0526	0.0526	0.0000	0.0263	0.0000	0.0789	0.0000	0.0000	0.0000	0.0263	0.0263	0.0000	0.0263	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000			
HLA-G +	35	0.0571	0.0857	0.1429	0.1429	0.0286	0.0286	0.0571	0.1143	0.0571	0.0571	0.0286	0.0286	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0571	0.0571	0.0000	0.0000	0.0286	0.0000	0.0000	0.0286	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000		
p valor a		0.6044	0.194	0.7293	0.7293	1.0000	1.0000	0.2264	0.4177	1.0000	0.2264	1.0000	1.0000	0.4939	-	1.0000	-	0.2409	-	-	0.2264	0.6044	1.0000	-	1.0000	-	-	1.0000	-	-	-	-		

^a Teste exato de Fisher (GraphPad InStat, INC 2003).

Apêndice G - Probabilidade e frequências alélicas e genótípicas do fragmento de inserção/ deleção dos 14 pb da região 3'NT do HLA-G em relação à expressão de HLA-G no aloenxerto renal.

Grupos de pacientes	n	Genótipos			Alelos	
		14-pb Del / Del	14-pb Del / Ins	14-pb Ins / Ins	14-pb Del	14-pb Ins
Rejeição aguda						
HLA-G -	7	0.4286	0.4286	0.1429	0.6429	0.3571
HLA-G +	4	0.0000	0.7500	0.2500	0.3750	0.6250
<i>p valor</i> ^a		0.2364	0.5455	1.0000	0.3777	
Rejeição crônica						
HLA-G -	18	0.4444	0.5000	0.0556	0.6944	0.3056
HLA-G +	14	0.5000	0.3571	0.1429	0.6786	0.3214
<i>p valor</i> ^a		1.0000	1.0000	0.5681	1.0000	
Rejeição Total						
HLA-G -	25	0.4400	0.4800	0.0800	0.6800	0.3200
HLA-G +	18	0.3889	0.4444	0.1667	0.6111	0.3889
<i>p valor</i> ^a		0.7649	1.0000	0.6344	0.6470	
Sem rejeição						
HLA-G -	13	0.3846	0.3077	0.3077	0.5385	0.4615
HLA-G +	17	0.2941	0.5294	0.1765	0.5588	0.4412
<i>p valor</i> ^a		0.7055	0.2828	0.6656	1.0000	
Total						
HLA-G -	38	0.4211	0.4211	0.1579	0.6316	0.3684
HLA-G +	35	0.3429	0.4857	0.1714	0.5857	0.4143
<i>p valor</i> ^a		0.6306	0.6419	1.0000	0.6128	

^a Teste exato de Fisher (GraphPad InStat, INC 2003).

Apêndice H - Probabilidade e frequências alélica e genótípicas do SNP +3003 da região 3'NT do HLA-G em relação à expressão de HLA-G no aloenxerto renal.

Grupos de pacientes	n	Genótipos			Alelos	
		+3003 CC	+3003 CT	+3003 TT	+3003 T	+3003 C
Rejeição aguda						
HLA-G -	7	0.0000	0.1429	0.8571	0.0714	0.9286
HLA-G +	4	0.0000	0.2500	0.7500	0.1250	0.8750
<i>p valor</i> ^a		-	1.0000	1.0000	1.0000	
Rejeição crônica						
HLA-G -	18	0.0000	0.2778	0.7222	0.1389	0.8611
HLA-G +	14	0.0000	0.2857	0.7143	0.1429	0.8571
<i>p valor</i> ^a		-	1.0000	1.0000	1.0000	
Rejeição Total						
HLA-G -	25	0.0000	0.2400	0.7600	0.1200	0.8800
HLA-G +	18	0.0000	0.2778	0.7222	0.1389	0.8611
<i>p valor</i> ^a		-	1.0000	1.0000	1.0000	
Sem rejeição						
HLA-G -	13	0.0000	0.0769	0.9231	0.0385	0.9615
HLA-G +	17	0.0000	0.3529	0.6471	0.1765	0.8235
<i>p valor</i> ^a		-	0.1038	0.1038	0.1264	
Total						
HLA-G -	38	0.0000	0.1842	0.8158	0.0921	0.9079
HLA-G +	35	0.0000	0.3143	0.6857	0.1571	0.8429
<i>p valor</i> ^a		-	0.2780	0.2780	0.3146	

^a Teste exato de Fisher (GraphPad InStat, INC 2003).

Apêndice I - Probabilidade e frequências alélica e genóticas do SNP +3010 da região 3'NT do HLA-G em relação à expressão de HLA-G no aloenxerto renal.

Grupos de pacientes	n	Genótipos			Alelos	
		+3010 GG	+3010 GC	+3010 CC	+3010 C	+3010 G
Rejeição aguda						
HLA-G -	7	0.1429	0.7143	0.1429	0.5000	0.5000
HLA-G +	4	0.2500	0.7500	0.0000	0.6250	0.3750
<i>p valor</i> ^a		1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	
Rejeição crônica						
HLA-G -	18	0.3333	0.5556	0.1111	0.6111	0.3889
HLA-G +	14	0.2143	0.5714	0.2143	0.5000	0.5000
<i>p valor</i> ^a		0.6942	1.0000	0.2950	0.4499	
Rejeição Total						
HLA-G -	25	0.2800	0.6000	0.1200	0.5800	0.4200
HLA-G +	18	0.2222	0.6111	0.1667	0.5278	0.4722
<i>p valor</i> ^a		0.7362	1.0000	0.6825	0.6650	
Sem rejeição						
HLA-G -	13	0.0769	0.5385	0.3846	0.3462	0.6538
HLA-G +	17	0.2353	0.5294	0.2353	0.5000	0.5000
<i>p valor</i> ^a		0.3549	1.0000	0.4434	0.3045	
Total						
HLA-G -	38	0.2105	0.5789	0.2105	0.5000	0.5000
HLA-G +	35	0.2286	0.5714	0.2000	0.5143	0.4857
<i>p valor</i> ^a		1.0000	1.0000	1.0000	0.8701	

^a Teste exato de Fisher (GraphPad Instat, INC 2003).

Apêndice J - Probabilidade e frequências alélica e genóticas do SNP +3027 da região 3'NT do HLA-G em relação à expressão de HLA-G no aloenxerto renal.

Grupos de pacientes	n	Genótipos			Alelos	
		+3027 AA	+3027 AC	+3027 CC	+3027 C	+3027 A
Rejeição aguda						
HLA-G -	7	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000
HLA-G +	4	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000
<i>p valor</i> ^a		-	-	-	-	-
Rejeição crônica						
HLA-G -	18	0.0000	0.0556	0.9444	0.0278	0.9722
HLA-G +	14	0.0000	0.0714	0.9286	0.0357	0.9643
<i>p valor</i> ^a		-	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
Rejeição Total						
HLA-G -	25	0.0000	0.0400	0.9600	0.0200	0.9800
HLA-G +	18	0.0000	0.0556	0.9444	0.0278	0.9722
<i>p valor</i> ^a		-	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
Sem rejeição						
HLA-G -	13	0.0000	0.1538	0.8462	0.0769	0.9231
HLA-G +	17	0.0000	0.0588	0.9412	0.0294	0.9706
<i>p valor</i> ^a		-	0.5645	0.5645	0.5738	0.5738
Total						
HLA-G -	38	0.0000	0.0789	0.9211	0.0395	0.9605
HLA-G +	35	0.0000	0.0571	0.9429	0.0286	0.9714
<i>p valor</i> ^a		-	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000

^a Teste exato de Fisher (GraphPad Instat, INC 2003).

Apêndice L - Probabilidade e frequências alélica e genóticas do SNP +3035 da região 3'NT do HLA-G em relação à expressão de HLA-G no aloenxerto renal.

Grupos de pacientes	n	Genótipos			Alelos	
		+3035 CC	+3035 CT	+3035 TT	+3035 C	+3035 T
Rejeição aguda						
HLA-G -	7	0.7143	0.2857	0.0000	0.8571	0.1429
HLA-G +	4	0.7500	0.2500	0.0000	0.8750	0.1250
<i>p valor</i> ^a		1.0000	1.0000	-	1.0000	
Rejeição crônica						
HLA-G -	18	0.8889	0.1111	0.0000	0.9444	0.0556
HLA-G +	14	0.8571	0.1429	0.0000	0.9286	0.0714
<i>p valor</i> ^a		1.0000	1.0000	-	1.0000	
Rejeição Total						
HLA-G -	25	0.8400	0.1600	0.0000	0.9200	0.0800
HLA-G +	18	0.8333	0.1667	0.0000	0.9167	0.0833
<i>p valor</i> ^a		1.0000	1.0000	-	1.0000	
Sem rejeição						
HLA-G -	13	0.6923	0.3077	0.0000	0.8462	0.1538
HLA-G +	17	0.7647	0.2353	0.0000	0.8824	0.1176
<i>p valor</i> ^a		0.6976	0.6976	-	0.7172	
Total						
HLA-G -	38	0.7895	0.2105	0.0000	0.8947	0.1053
HLA-G +	35	0.8000	0.2000	0.0000	0.9000	0.1000
<i>p valor</i> ^a		0.5540	0.5540	-	1.0000	

^a Teste exato de Fisher (GraphPad Instat, INC 2003).

Apêndice M - Probabilidade e frequências alélica e genótípicas do SNP +3142 da região 3'NT do HLA-G em relação à expressão de HLA-G no aloenxerto renal.

Grupos de pacientes	n	Genótipos			Alelos	
		+3142 GG	+3142 GC	+3142 CC	+3142 G	+3142 C
Rejeição aguda						
HLA-G -	7	0.1429	0.7143	0.1429	0.5000	0.5000
HLA-G +	4	0.0000	0.7500	0.2500	0.3750	0.6250
<i>p valor</i> ^a		1.0000	1.0000	1.0000	0.6749	
Rejeição crônica						
HLA-G -	18	0.1111	0.5556	0.3333	0.3889	0.6111
HLA-G +	14	0.2143	0.5714	0.2143	0.5000	0.5000
<i>p valor</i> ^a		0.6313	1.0000	0.6942	0.4499	
Rejeição Total						
HLA-G -	25	0.1200	0.6000	0.2800	0.4200	0.5800
HLA-G +	18	0.1667	0.6111	0.2222	0.4722	0.5278
<i>p valor</i> ^a		0.6825	1.0000	0.7362	0.6650	
Sem rejeição						
HLA-G -	13	0.3846	0.5385	0.0769	0.6538	0.3462
HLA-G +	17	0.2353	0.5294	0.2353	0.5000	0.5000
<i>p valor</i> ^a		0.4434	1.0000	0.3549	0.2968	
Total						
HLA-G -	38	0.2105	0.5789	0.2105	0.5000	0.5000
HLA-G +	35	0.2000	0.5714	0.2286	0.4857	0.5143
<i>p valor</i> ^a		1.0000	1.0000	1.0000	0.8701	

^a Teste exato de Fisher (GraphPad Instat, INC 2003).

Apêndice N - Probabilidade e frequências alélica e genóticas do SNP +3187 da região 3'NT do HLA-G em relação à expressão de HLA-G no aloenxerto renal.

Grupos de pacientes	n	Genótipos			Alelos	
		3187 GG	+3187 GA	+3187 AA	+3187 A	3187 G
Rejeição aguda						
HLA-G -	7	0.0000	0.4286	0.5714	0.2143	0.7857
HLA-G +	4	0.0000	1.0000	0.0000	0.5000	0.5000
<i>p valor</i> ^a		-	0.1939	0.1939	0.6302	
Rejeição crônica						
HLA-G -	18	0.0000	0.6667	0.3333	0.3333	0.6667
HLA-G +	14	0.0000	0.5714	0.4286	0.2857	0.7143
<i>p valor</i> ^a		-	0.7178	0.7178	0.7885	
Rejeição Total						
HLA-G -	25	0.0000	0.6000	0.4000	0.3000	0.7000
HLA-G +	18	0.0000	0.6667	0.3333	0.3333	0.6667
<i>p valor</i> ^a		-	0.7548	0.7548	0.8156	
Sem rejeição						
HLA-G -	13	0.0769	0.3846	0.5385	0.2692	0.7308
HLA-G +	17	0.0000	0.4118	0.5882	0.2059	0.7941
<i>p valor</i> ^a		0.4333	0.7161	1.0000	0.7590	
Total						
HLA-G -	38	0.0263	0.5263	0.4474	0.2895	0.7105
HLA-G +	35	0.0000	0.5429	0.4571	0.2714	0.7286
<i>p valor</i> ^a		0.4578	1.0000	1.0000	0.8510	

^a Teste exato de Fisher (GraphPad InStat, INC 2003).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)