



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**SILVIA MARÇAL BOTELHO**

---

---

**AVALIAÇÃO DAS MOLÉCULAS HLA-G E PD-L1 EM PACIENTES  
SUBMETIDOS A TRANSPLANTE RENAL EM GOIÂNIA - GO**

---

---

Goiânia - GO

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
FACULDADE DE MEDICINA

## TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

### E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

#### 1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação     Tese

#### 2. Nome completo do autor

SILVIA MARÇAL BOTELHO

#### 3. Título do trabalho

AVALIAÇÃO DAS MOLÉCULAS HLA-G E PD-L 1 EM PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE RENAL EM GOIÂNIA-GO

#### 4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento  SIM     NÃO<sup>1</sup>

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

**a)** consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

**b)** novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

**Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.**



Documento assinado eletronicamente por **Nilzio Antonio da Silva, Usuário Externo**, em 09/10/2020, às 16:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **SÍLVIA MARÇAL BOTELHO, Discente**, em 09/10/2020, às 22:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1608308** e o código CRC **A94C8751**.

SILVIA MARÇAL BOTELHO

---

---

**AVALIAÇÃO DAS MOLÉCULAS HLA-G E PD-L1 EM PACIENTES  
SUBMETIDOS A TRANSPLANTE RENAL EM GOIÂNIA - GO**

---

---

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Nílzio Antonio da Silva

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Isabela Jubé Wastowski

Goiânia – GO

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Marçal Botelho, Sílvia  
AVALIAÇÃO DAS MOLÉCULAS HLA-G E PD-L1 EM PACIENTES  
SUBMETIDOS A TRANSPLANTE RENAL EM GOIÂNIA - GO  
[manuscrito] / Sílvia Marçal Botelho. - 2020.  
CXXXVIII, 138 f.: il.

Orientador: Prof. Nílzio Antonio da Silva; co-orientador Isabela Jubé Wastowski.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Medicina (FM), Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Goiânia, 2020.

Bibliografia. Anexos. Apêndice.  
Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Transplante Renal. 2. HLA-G. 3. PD-L1. 4. Rejeição. I. Antonio da Silva, Nílzio, orient. II. Título.

CDU 61

# Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás

## ATA DA DEFESA

SEI/UFG - 1542079 - Ata de Defesa de Tese

[https://sei.ufg.br/sei/controlador.php?acao=documento\\_imprimir\\_web&...](https://sei.ufg.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&...)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

FACULDADE DE MEDICINA

ATA DE DEFESA DE TESE

Ata nº **23/2020** da sessão de Defesa de Tese de **Silvia Marçal Botelho**, que confere o título de Doutora em **Ciências da Saúde**, na área de concentração em **Dinâmica do Processo Saúde-Doença**.

Aos **onze dias do mês de setembro de dois mil e vinte**, a partir das **08:00h**, por meio de **videoconferência**, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada “**AVALIAÇÃO DAS MOLÉCULAS HLA-G E PD-L 1 EM PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE RENAL EM GOIÂNIA-GO**”. Os trabalhos foram instalados pela Co-Orientadora, Professora Doutora **Isabela Jubé Wastowski (UEG)** com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor Doutor **Mauri Félix de Sousa (FM/UFG)**, membro titular externo; Professora Doutora **Vitalina de Souza Barbosa (FM/UFG)**, membro titular externo, Professora Doutora **Ângela Adamski da Silva (ICB/UFG)**, membro titular interno; Professora Doutora **Maria Alves Barbosa (FEN/UFG)**, membro titular interno. Durante a arguição os membros da banca **não fizeram** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese, tendo sido a candidata **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pela Professora Doutora **Isabela Jubé Wastowski**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos **onze dias do mês de setembro de dois mil e vinte**.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Maria Alves Barbosa, Usuário Externo**, em 11/09/2020, às 14:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mauri Felix De Sousa, Professora do Magistério Superior**, em 12/09/2020, às 11:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Isabela Jube Wastowski, Usuário Externo**, em 14/09/2020, às 19:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **SÍLVIA MARÇAL BOTELHO, Discente**, em 14/09/2020, às 20:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vitalina De Souza Barbosa, Chefe**, em 16/09/2020, às 23:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Angela Adamski Da Silva Reis, Professora do Magistério Superior**, em 22/09/2020, às 13:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1542079** e o código CRC **051BEF6F**.

---

**Referência:** Processo nº 23070.039890/2020-73

SEI nº 1542079

*Dedico este trabalho a todas as médicas e médicos transplantadores do Brasil, profissionais que, apesar das adversidades e carências da saúde no país, continuam firmemente acreditando na Medicina e na ciência. E persistem na luta para manter os transplantes de órgãos como uma terapia salvadora de vidas.*

## **AGRADECIMENTOS**

Obrigado a Deus por ter me permitido conhecer, estudar e exercer a Medicina, para mim uma das mais belas profissões que existem.

Obrigado aos meus pacientes que tornaram este projeto possível, graças aos seus consentimentos e boa vontade em participar da minha pesquisa.

Obrigado a minha mãe, Maria Teófila, meu esposo, Dalcio e minhas irmãs, Cláudia e Sheila, por sempre me apoiarem em todas as escolhas que venho fazendo ao longo da minha vida.

Obrigado ao meu Orientador, Dr. Nílzio Antonio, por me dar a oportunidade de desenvolver este projeto sob sua coordenação.

Obrigado a minha Coorientadora, Dra. Isabela, que me ensinou, amparou e me inspirou durante todo este percurso.

Obrigado a Dra. Maria Alves, uma pessoa muito especial, que me deu apoio e palavras firmes, num momento difícil desta jornada.

Obrigado a Dra. Iociene da Silva Barbosa, por cuidar tão bem do material biológico avaliado nesta pesquisa.

Obrigado a Dra. Maria Auxiliadora de Paula Carneiro Cysneiros, por toda a disponibilidade e ajuda na análise das biópsias renais.

Obrigado ao Dr. Ibrahim Abiodoun Sadissou, pela realização dos testes laboratoriais deste estudo.

Obrigado a secretária Letícia por coordenar tão bem os pacientes durante a fase de avaliação e coleta do material da pesquisa.

Obrigado a todos os membros da minha banca de qualificação: Dr(as). Vitalina de Souza Barbosa, Mauri Félix de Sousa, Ângela Adamski da Silva e Edna Regina Silva Pereira.

Obrigado ao Laboratório HLA-GYN, na pessoa do Dr. Fernando Vinhal pelo apoio na guarda e conservação das amostras desta pesquisa.

Obrigado a todos os membros da minha banca de defesa: Dr(as). Maria Alves Barbosa, Vitalina de Souza Barbosa, Mauri Félix de Sousa, Ângela Adamski da Silva, Renata Toscano Simões e Lilian Carla Carneiro.

E obrigado a todas as pessoas que contribuíram direta e indiretamente para a construção desse trabalho e do meu crescimento pessoal e profissional, tudo se tornou experiência.

## SUMÁRIO

	<b>Pág.</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	23
2.1 Transplantes de Órgãos .....	23
2.2 Transplante Renal .....	24
2.3 Imunologia do Transplante .....	26
2.4 Complexo Principal de Histocompatibilidade ( <i>MHC – Major Histocompatibility Complex</i> ) .....	28
2.5 HLA-G.....	30
2.5.1 Estrutura do HLA-G.....	31
2.5.2 Funções do HLA-G.....	33
2.5.2.1 HLA-G e funções citolíticas das células NK e LTC.....	35
2.5.2.2 HLA-G e Células T CD4 + .....	36
2.5.2.3 HLA-G e Linfócitos T .....	37
2.5.2.4 HLA-G e a regulação inibitória .....	38
2.5.3 HLA-G e Transplante Renal .....	40
2.6 Ligante de PD-1 (PD-L1) .....	45
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	51
3.1 Objetivo Geral .....	51
3.2 Objetivos específicos .....	51
<b>4 METOLOGIA</b> .....	52
4.1 Delineamento do Experimental .....	52
4.2 Desenho do estudo .....	52
4.3 Seleção de pacientes .....	54
4.4 Critérios de inclusão .....	54
4.5 Critérios de exclusão .....	54
4.6 Imuno-histoquímica.....	54
4.7 ELISA .....	55
4.8 Análise Estatística .....	56
<b>5 RESULTADOS</b> .....	58

5.1 Grupo de Pacientes Antigos – Resultados.....	58
5.2 Grupo de Pacientes Novos – Resultados .....	62
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>71</b>
<b>7 RELEVÂNCIA DO ESTUDO .....</b>	<b>83</b>
<b>8 CONCLUSÕES.....</b>	<b>84</b>
<b>9 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>85</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>86</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>99</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>130</b>

<b>TABELAS</b>	<b>Pág.</b>
<b>Tabela 1</b> - Dados clínicos e demográficos do GPA (n=114), Goiânia-GO, 2020.....	100
<b>Tabela 2</b> - Análise descritiva das variáveis numéricas do GPA (n=114), Goiânia-GO, 2020 .....	102
<b>Tabela 3</b> - Análise univariada das variáveis categóricas com a dosagem de HLA-G no GPA (n=114), Goiânia-GO, 2020.....	59
<b>Tabela 4</b> - Correlação entre as variáveis numéricas e a dosagem de HLA-G no GPA (n=114), Goiânia-GO, 2020 .....	61
<b>Tabela 5</b> - Análise multivariada das variáveis em relação à dosagem de HLA-G no GPA (n=114), Goiânia-GO, 2020 .....	62
<b>Tabela 6</b> - Dados clínicos e demográficos do GPN (n=12), Goiânia-GO, 2020 .....	103
<b>Tabela 7</b> - Análise da creatinina, TFG, HLA-G e PD-L1 ao longo do tempo em 10 pacientes de pós-transplante, Goiânia-GO, 2020 .....	104
<b>Tabela 8</b> - Análise univariada dos fatores que influenciaram a dosagem de HLA-G no GPN (n=10), Goiânia-GO, 2020 .....	64
<b>Tabela 9</b> - Tabela 9 – Análise multivariada das variáveis sob a dosagem de HLA-G no GPN (n=10), Goiânia-GO, 2020 .....	65
<b>Tabela 10</b> - Análise univariada das variáveis em relação a dosagem de PD-L1 no GPN (n=10), Goiânia-GO, 2020 .....	67
<b>Tabela 11</b> - Tabela 11 – Análise multivariada das variáveis sob a dosagem de PD-L1 no GPN (n=10), Goiânia-GO, 2020.....	68
<b>Tabela 12</b> - Análise descritiva das variáveis categóricas das Bx do GPN (n=9), Goiânia-GO, 2020.....	70
<b>Tabela 13</b> - Análise descritiva das variáveis numéricas das Bx do GPN (n=9), Goiânia-GO, 2020.....	70

<b>FIGURAS</b>	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1</b> - Posição do MHC no cromossomo 6 e a disposição dos genes dentro dos <i>loci</i> .....	29
<b>Figura 2</b> - Desenho esquemático da forma de transcrição completa do mRNA de HLA-G .....	33
<b>Figura 3</b> - O <i>locus</i> HLA-G e as isoformas proteicas expressas.....	33
<b>Figura 4</b> - Propriedades imunológicas do HLA-G: implicações em doenças humanas .....	39
<b>Figura 5</b> - Inibição da ativação dos linfócitos T via PD-1.....	46
<b>Figura 6</b> - Evolução dos níveis de HLA-G em relação variável Tempo – GPN (n=10) .....	66
<b>Figura 7</b> - Imuno-histoquímica da marcação de PD-L1 (marcação negativa - painel A) e para HLA-G (painel B) nas biópsias dos pacientes do GPN (n=9) .....	69

## SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

AZA	Azatioprina
APC	<i>Antigen-presenting cell</i> ---- célula apresentadora de antígeno
AP	Antiproliferativo
CE	Corticoide
CsA	Ciclosporina A
CD	Célula Dendrítica
sCD30	CD30 solúvel
CTM	Célula Tronco-Mesenquimal
CET	Célula Epitelial Tubular
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
CT	Célula T (=linfócito T)
CB	Célula B (=linfócito B)
CTeff	Célula T efetora
CTreg	Célula T reguladora
CCR	Carcinoma de células renais
DRCT	Doença Renal Crônica Terminal
DRPAD	Doença Renal Policística Autossômica Dominante
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Diálise peritoneal
DF	Doador Falecido
DV	Doador Vivo
DVR	Doador Vivo Relacionado
DVNR	Doador Vivo Não Relacionado
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FRE	Função Retardada do Enxerto
GvHD	<i>Graft versus Host Disease</i> ---- Doença enxerto versus hospedeiro
GPA	Grupo de Paciente Antigos
GPN	Grupo de Pacientes Novos
GN	Glomerulonefrite

HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
H2	<i>Histocompatibility 2</i>
HD	Hemodiálise
HLA	<i>Human leucocyte antigen</i>
HLA-G	<i>Human leucocyte antigen-G</i> --- antígeno leucocitário humano G
sHLA-G	HLA-G solúvel
mHLA-G	HLA-G membrana
iHLA-G	HLA-G intracelular
ICN	Inibidor da Calcineurina
INDET	Indeterminada
INF- $\beta$	<i>Interferon-beta</i>
INF- $\gamma$	<i>Interferon-gama</i>
ILT2	<i>Immunoglobulin-like transcript 2</i>
ILT4	<i>Immunoglobulin-like transcript 4</i>
IL-4	<i>Interleucina 4</i>
Ig	Imunoglobulina
ISS	Imunossupressão
IHQ	Imuno-histoquímica
IPD/IGMT/HLA	<i>International Immunogenetics Project/HLA</i>
KIR2DL4	<i>Killer immunoglobulin-like receptor</i>
LB	Linfócito B (= Célula B)
LT	Linfócito T (= Célula T)
LTC	Linfócito T Citotóxico
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MMF	Micofenolato mofetil
MFS	Micofenolato de sódio
M-TOR	Inibidor da M-TOR
NK	<i>Célula Natural Killer</i>
OPTN	<i>Organ Procurement and Transplant Network</i>
PD-1	<i>Programmed Cell Death 1</i>
PD-L1	<i>Programmed Death 1 Ligand</i>
PD-L2	<i>Programmed Death 2 Ligand</i>
PNC	Pielonefrite Crônica

pb	Pares de bases
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro
RA	Rejeição Aguda
RAC	Rejeição Aguda Celular
RMA	Rejeição Mediada por Anticorpos
RC	Rejeição Crônica
SCMG	Santa Casa de Misericórdia de Goiânia
STZ	Estreptozotocina
TC	Transplante Cardíaco
THR	Transplante Hepático-Renal
TR	Transplante Renal
TRP	Transplante Rim-Pâncreas
TO	Transplante de Órgãos
TOS	Transplante de Órgãos Sólidos
TAC	Tacrolimo
TSR	Terapia de Substituição Renal
TIF	Tempo de isquemia fria
TNF	<i>Tumoral Necrosis Factor</i> --- (Fator de Necrose Tumoral)
TCR	<i>T Cell Receptor</i>
TRP	Transplante Rim-Pâncreas
UGA	Códon de parada (Uracil-Guanina-Adenina)
3' UTR	<i>3' Untranslated region</i> ---Região 3' não traduzida
6-MP	6-Mercaptopurina
WT	Camundongo tipo selvagem

## RESUMO

O transplante renal (TR) é o tratamento de escolha para pacientes com doença renal crônica terminal. No TR, as moléculas HLA-G e PD-L1, por sua ação tolerogênica, são de interesse clínico e terapêutico. O objetivo deste estudo foi avaliar as moléculas HLA-G e PD-L1 em diferentes momentos do TR. Foram avaliados 124 pacientes. Destes, 114 eram previamente transplantados (Grupo de pacientes antigos-GPA) e, em 10 pacientes, a avaliação iniciou-se no pré-TR (Grupo de pacientes novos-GPN). No GPA, estudo transversal com coleta única de sangue, enquanto, no GPN foi realizado um follow-up de 12 meses, com coleta de sangue seriada. Pacientes que tiveram disfunção do enxerto, foram submetidos a coleta de biópsias renais e realizada imuno-histoquímica para ambas as moléculas (GPN). A fase de execução do estudo ocorreu de março/2016 a dezembro/2017. No GPA, o uso de corticoide+inibidor calcineurina+azatioprina como esquema de imunossupressão inicial ( $p<0,001$ ), presença de um ou dois episódios de rejeição ( $p<0,001$ ) e infecção por CMV( $p=0,006$ ) se correlacionaram com baixa dosagem de HLA-G. Ter realizado de 6-10 sessões de hemodiálise no pós-TR renal associou-se a uma elevada dosagem de HLA-G ( $p=0,02$ ). No GPN, a ocorrência de episódios de rejeição foi associada a baixa expressão de HLA-G ( $p<0,001$ ) e PD-L1 ( $p<0,001$ ). A variável tempo pós-TR ( $p<0,001$ ) esteve associada a menor nível de HLA-G. Pacientes transfundidos apresentaram baixos níveis de PD-L1 ( $p=0,03$ ). Níveis aumentados de HLA-G ( $p=0,001$ ) e PD-L1 ( $p<0,001$ ) foram observados em pacientes do sexo feminino. Os pacientes que receberam rim de doador vivo relacionado expressaram mais HLA-G ( $p<0,001$ ). O estudo concluiu que as variáveis supracitadas, que estiveram associadas positiva e negativamente com os níveis de HLA-G e PD-L1, podem promover a estabilidade ou instabilidade dos enxertos respectivamente, mantendo a função renal ou propiciando talvez processos de rejeição.

Palavras-chave: HLA-G; PD-L1; transplante renal; rejeição

## ABSTRACT

Kidney transplantation (KT) is the treatment of choice for patients with end-stage renal disease. In KT, the HLA-G and PD-L1 molecules due to their tolerogenic action are of clinical and therapeutic interest. The aim of this study was to evaluate the HLA-G and PD-L1 molecules at different moments in the KT. 124 patients were evaluated. Of these, 114 were previously transplanted (Group of old patients-GOP) and, in 10 patients, the evaluation started in the pre-KT (Group of new patients-GNP). In the GOP a cross-sectional study with a single blood collection, while in the GPN a 12-month follow-up was carried out with serial blood collection. Patients who had graft dysfunction were submitted to renal biopsy samples and immunohistochemistry was performed for both molecules (GNP). The study execution phase took place from March/2016 to December/2017. In GOP the use of corticosteroids+calcineurin inhibitor +azathioprine as an initial immunosuppression regimen ( $p < 0,001$ ), the presence of one or two episodes of rejection ( $p < 0,001$ ), and CMV infection ( $p = ,006$ ) were correlated with a low dosage of HLA-G. Having performed 6-10 hemodialysis sessions in post-KT was associated with a high dose of HLA-G ( $p = 0,02$ ). In GNP the occurrence of rejection episodes was associated with low expression of HLA-G ( $p < 0,001$ ) and PD-L1 ( $p < 0,001$ ). The variable time after KT ( $p < 0,001$ ) was associated with a lower level of HLA-G. Transfused patients had low levels of PD-L1 ( $p = 0,03$ ). Increased levels of HLA-G ( $p = 0,001$ ) and PD-L1 ( $p < 0,001$ ) were observed in female patients. Patients who received a kidney from a related live donor expressed more HLA-G ( $p < 0,001$ ). The study concluded that the aforementioned variables, which were positively and negatively associated with the levels of HLA-G and PD-L1 can promote the stability or instability of the grafts respectively, maintaining renal function or perhaps providing rejection processes.

Keywords: HLA-G; PD-L1; kidney transplantation; rejection

## 1 INTRODUÇÃO

O transplante renal (TR) é o tratamento de escolha para pacientes com doença renal crônica em estágio terminal (DRCT), pois o mesmo está associado à melhoria significativa na qualidade de vida (HRICIK et al., 2001; TONELLI et al., 2011) e à sobrevivência dos pacientes (TONELLI et al., 2011; WOLFE et al., 1999) sendo o tratamento mais efetivo do ponto de vista médico e também o mais econômico (GOUVEIA et al., 2017; HALLER et al., 2011).

O TR foi introduzido nos Estados Unidos na década de 1950, tendo sido o transplante de órgão sólido (TOS) pioneiro em uma época em que as terapias de substituição renal (TSR) estavam em seus primeiros passos. O primeiro TR de gêmeos idênticos bem sucedido foi realizado pela equipe de Merrill e Murray em dezembro de 1954 (MERRILL et al., 1956). O transplante clínico humano começou e os pesquisadores tentaram entender a resposta imune subjacente e como controlar as poderosas vias de rejeição. Na era da imunossupressão (ISS) convencional baseada no uso de azatioprina (AZA) e corticoide (CE), as taxas de rejeição e falência precoce do enxerto eram altas. Com a introdução do uso clínico da ciclosporina A (CsA) (CALNE et al., 1978) há mais de 30 anos, houve uma melhora nos resultados do transplante, e os programas de TOS se expandiram em todo o mundo desenvolvido (GRINYÓ, 2013).

Desta forma, os transplantes de órgãos (TO) deixaram de ser um experimento clínico para tornar-se uma atividade médica confiável e rotineira, que provou ao longo dos anos sua eficácia clínica, sendo o tratamento de escolha para a falência de órgãos em estágio terminal. Embora um enorme progresso tenha contribuído para o sucesso dessa terapia, vários desafios permanecem para que o TR e de outros órgãos sólidos estejam amplamente disponíveis com riscos mínimos e resultados ideais (SAYEGH; CARPENTER, 2004).

O progresso do TR para uma atividade clínico-cirúrgica de rotina, com expressivos resultados é atribuída aos seguintes fatores: a) grande progresso no conhecimento dos mecanismos imunológicos em relação à resposta aloimune; b) evolução na identificação e caracterização dos antígenos de histocompatibilidade; e c) avanços na ISS, que melhorando o controle dos

episódios de rejeição, são responsáveis por estes resultados na era atual (LIM; KOHLI; BLOOM, 2016).

A descrição do Complexo Principal de Histocompatibilidade (*MHC - Major Histocompatibility Complex*) ocorreu em 1936, sendo resultado de pesquisas em transplantes de tecidos de camundongos. As primeiras moléculas foram caracterizadas como antígenos de caráter polimórfico da superfície celular, codificados por um *locus* denominado H-2 (H= *histocompatibility*). As moléculas desse sistema gênico constituiriam uma barreira imunológica e o êxito dos transplantes dependeria do grau de similaridade H-2 entre receptor e doador, para antígenos então denominados de antígenos de histocompatibilidade. Posteriormente, complexos gênicos homólogos foram descritos em várias espécies de mamíferos, com atuação similar e codificando moléculas envolvidas na resposta imune (CROUAU-ROY et al., 1994; CHRISTIANSEN et al., 1993; DUNHAM et al., 1987).

Em 1958, foi detectado um aloantígeno presente nos leucócitos humanos, que se tornaria o 'primeiro' antígeno leucocitário humano (*Human Leucocyte Antigen - HLA*); o HLA A2 (DAUSSET, 1958), no mesmo ano foram publicados outros artigos versando sobre outros antígenos leucocitários humanos (PAYNE; ROLFS, 1958; VAN ROOD; EERNISSE; VAN LEEUWEN, 1958) desta maneira o campo do HLA, passou da histocompatibilidade para se tornar um dos campos mais centrais da imunologia básica e clínica. A história das moléculas de HLA classe I e II e seu papel nas respostas imunes e o desenvolvimento rápido e extenso do campo HLA é o resultado de contribuições individuais de excelentes pesquisadores, bem como de uma extensa colaboração internacional sobre histocompatibilidade (THORSBY, 2009).

Em 1987, foi descrito o antígeno leucocitário humano G (HLA-G), um antígeno HLA-classe I não clássico que exerce funções imunorreguladoras (GERAGHTY; KOLLER; ORR, 1987), ele também realiza a supressão da resposta imune. Diferentes estudos demonstraram que o gene HLA-G é transcrito em uma variedade de células e tecidos adultos (leucócitos do sangue periférico, placenta, pele, baço, timo, próstata, testículo, ovário, intestino delgado, cólon, coração, cérebro, pulmão, fígado e rim), bem como nos tecidos fetais (coração, pulmão, fígado e rim) (ONNO et al., 1994). Além de seu profundo

efeito para induzir a tolerância fetal, a expressão de HLA-G tem sido associada à aceitação de aloenxertos (CAROSELLA et al., 1999; XIAO et al., 2013).

A expressão de HLA-G solúvel (sHLA-G) no sangue, coração e enxertos hepáticos/renais têm sido associada a uma melhora significativa no prognóstico e menos episódios de rejeição (CRÉPUT et al., 2003a; LILA et al., 2002). Talvez, iguais mecanismos imunológicos sejam importantes para gerar tolerância em ambos, gravidez e TO. Investigação adicional de HLA-G como possível marcador clínico para o prognóstico de certos TO, e mesmo como possibilidades terapêutica imunossupressora ou indutora de tolerância, seriam muito interessantes (HVIID, 2006).

Na busca de novas opções terapêuticas para controle da rejeição e de melhores resultados nos TO, diferentes grupos de cientistas da área de Imunologia, veem trabalhando exaustivamente. Em 1992, um grupo de pesquisadores trabalhando com o tipo clássico de morte celular programada, usando a técnica de hibridização subtrativa, isolaram *programmed cell death 1* (PD-1), um novo membro da superfamília do gene da imunoglobulina (Ig) (ISHIDA et al., 1992). Em estudos posteriores, constatou-se que PD-1 é um receptor imunoinibitório expresso por linfócitos T (LT) ativados, linfócitos B (LB) e células mieloides (AGATA et al., 1996; ISHIDA et al., 1992; NISHIMURA et al., 1998; VIBHAKAR et al., 1997).

O ligante de PD-1 (PD-L1) é um membro da família do gene *B7*, e quando PD-L1 se liga a PD-1, ocorre a inibição da proliferação de linfócitos. A proliferação linfocitária é mediada por receptores de LT e citocinas. A expressão de PD-L1 em tecidos não linfoides e a sua interação potencial com PD-1 pode determinar a extensão das respostas imunitárias em locais de inflamação (FREEMAN et al., 2000).

PD-1 e PD-L1 emitem sinais inibitórios que regulam o equilíbrio entre a ativação, tolerância e imunopatologia dos LT. A indução e manutenção da tolerância dos LT requerem PD-1, e seu ligante PD-L1 em células não hematopoiéticas pode limitar as respostas efetoras dos LT e proteger os tecidos dos danos nos tecidos mediados pelo sistema imunológico (KEIR et al., 2008).

A possibilidade de que células epiteliais tubulares proximais renais (alvo de LT infiltrantes durante a rejeição do aloenxerto renal) poderiam ser protegidas

da lesão por PD-1 e PD-L1, foi investigada no processo de rejeição. E a investigação concluiu que, a via renal epitelial PD-1 / PD-L1 exerce um efeito inibitório sobre as respostas de células T (CT) alorreativas e a que regulação positiva de PD-L1 nas células epiteliais tubulares proximais em pacientes com rejeição aguda de aloenxerto pode reduzir a lesão mediada por LT (STARKE et al., 2010).

No âmbito dos TOS e especificamente do TR, as possibilidades de manuseio destas moléculas para diagnóstico, prognóstico e linhas terapêuticas são imensas. E isto abre caminhos para mais pesquisas dentro não só da Imunologia, mas também da área clínica. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo, avaliar as moléculas HLA-G e PD-L1 em diferentes momentos do TR.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Transplantes de Órgãos

O TO é definido como - a ação de coletar células, tecidos ou órgãos de um indivíduo, transferindo esse material, referido como enxerto, para outro local do mesmo indivíduo - TO autólogo, ou para um indivíduo diferente de mesma espécie - TO alogênico. O TO tem sido um dos grandes avanços da Medicina nos últimos 60 anos, saindo da esfera experimental e progredindo para uma prática de rotina nos serviços médicos do mundo. É um procedimento que, provou ser clinicamente eficaz, salvando vidas de pacientes portadores de falência terminal de diferentes órgãos (SAYEGH; CARPENTER, 2004; STARZL, 2000).

Tem-se que a maior limitação na prática dos transplantes é a resposta imune do receptor contra os tecidos do doador. Limitação esta que foi observada inicialmente em tentativas de restaurar pele lesada ou queimada em pacientes, utilizando doadores não relacionados (sem parentesco). Duas semanas em média após o transplante de pele, esta sofria necrose e se desprendia. Partindo deste fato crucial, modelos animais foram utilizados para tentar compreender o fenômeno. Observou-se então que o motivo da falha na aceitação do enxerto cutâneo era uma reação inflamatória a qual foi chamada rejeição, causada pela resposta imune (GIBSON; MEDAWAR, 1943; MEDAWAR, 1944).

Após as publicações de Medawar, o caminho para mais pesquisas nas diferentes áreas dos TO foi aberto, e progressivas descobertas permitiram que o primeiro TR exitoso fosse realizado em 1954 (MERRILL et al., 1956). Mais de meio século se passou desde o primeiro TO, embora um grande progresso tenha contribuído para o sucesso dessa terapia, vários desafios permanecem para que o transplante esteja amplamente disponível, com riscos mínimos e resultados ideais. (SAYEGH; CARPENTER, 2004).

Além dos aspectos relacionados à imunologia, farmacologia e cirurgia, os TO passam também por outros diferentes contextos, tais como: religiosos, culturais, políticos, jurídicos, morais e éticos. Os avanços mais recentes no universo dos TO trouxeram também progresso nos demais aspectos a ele

associados, oferecendo desta maneira esperança de cura para a população de pacientes portadores de doenças crônicas terminais.

## 2.2 Transplante Renal

A pesquisa na área de anastomoses vasculares do cientista Alexis Carrel, permitiu o desenvolvimento e aprimoramento da cirurgia do TR (CARREL; GUTHRIE, 2001). Nesta evolução do transplante, um marco histórico foi a realização do primeiro TR em ser humano em 1933 por Yu Yu Voronoy, um cirurgião ucraniano, sendo o procedimento utilizado para tratar injúria renal aguda por envenenamento com mercúrio. O rim não funcionou porque houve longo tempo de isquemia quente (foi retirado do doador seis horas após sua parada cardíaca) e o par receptor-doador eram ABO incompatíveis; o receptor morreu 48 horas após a cirurgia (MATEVOSSIAN et al., 2009).

Independente dos insucessos, a ciência progredia e inúmeras pesquisas estavam acontecendo em diferentes partes do mundo no campo dos TO e principalmente TR. Em 1954, em Boston, foi realizado o primeiro TR que obteve êxito clínico (gêmeos monozigóticos), iniciando assim uma nova era para os TR. (MERRILL et al., 1956). Em 1959, a 6-mercaptopurina (6-MP), que já estava em uso clínico para o tratamento da leucemia linfocítica aguda, teve uma de suas variantes, a AZA, avaliada como droga de potencial imunossupressor em TR. Em 1962, iniciou-se o primeiro ensaio clínico utilizando a referida droga, nos pacientes em que a AZA foi combinada com CE, taxas de sobrevivência do aloenxerto em um ano foram entre 40-50% (MURRAY et al., 1963).

A taxa de transplantes bem-sucedidos de rins de doadores falecidos (DF) e doadores vivos (DV) familiares aumentou lentamente durante a década de 1960 e início da década de 1970, após a introdução de AZA e CE. As taxas gerais de mortalidade também caíram à medida que os programas de diálise ao longo prazo melhoraram, o que tornou possível sustentar a vida quando os enxertos falhavam (SAYEGH; CARPENTER, 2004).

Com a introdução da CsA, no início dos anos 80, houve um aumento na taxa de sobrevivência do enxerto em um ano de 51% para mais de 80% (KAHAN et al., 1985). No final de 2002, nos Estados Unidos, havia 150.000 pessoas vivendo

com aloenxertos de órgãos sólidos em funcionamento, contra 62.000 em 1993 (“Organ Procurement and Transplant Network” - OPTN, 2002). Novas drogas surgiram para o controle da rejeição, entre elas o tacrolimo (TAC), um potente inibidor da calcineurina (ICN). O TAC foi descoberto no Japão em 1984 (KINO et al., 1987) e foi introduzido em pacientes humanos em 1989 e 1991 (ARMITAGE et al., 1991; STARZL et al., 1989).

Com o advento de novas drogas imunossupressoras no arsenal terapêutico, o número de TO se elevou ao longo dos anos, e obviamente os TR saíram à frente, tanto que atualmente, de acordo com os dados do *OPTN*, houve uma evolução importante dos TR nos Estados Unidos, onde, em 2018, foram realizados 21.167 procedimentos (HART et al., 2020), e em 2019, 23.401 procedimentos (“Organ Procurement and Transplantation Network”, 2020). A Europa também possuiu um programa de TO bastante estruturado, seus dados mostram que de 2015 a 2019 foram realizados 15.287 TR com DF e 6.465 com DV (“EUROTRANSPLANT”, 2019).

Na América Latina, o primeiro TR foi realizado em 1957, na Argentina, no Instituto de Investigações Médicas de Buenos Aires (CHALLÚ, 1992). No Brasil o primeiro TR ocorreu em 1964 no Hospital dos Servidores do Estado do Rio de Janeiro (VASCONCELOS et al., 1998). O primeiro programa efetivo de TR que obteve sucesso América Latina, foi do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), que realizou seu primeiro TR em janeiro de 1965, sob a coordenação dos professores José Geraldo de Campos Freire e Emil Sabbaga (GARCIA; PESTANA; IANHEZ, 2006).

Desde então, o TR no Brasil é uma modalidade de TSR consagrada e realizada em inúmeros centros no país. O Brasil possui um dos maiores centros de TR do mundo, o Hospital do Rim - Fundação Oswaldo Ramos em São Paulo-SP, entidade esta que realiza em média 900 TR por ano (“Hospital do Rim - Fundação Oswaldo Ramos”, 2020). De 2009 a 2019 o Brasil realizou um total de 59.769 TR (GARCIA, 2019).

Em Goiás, o primeiro TR (DV) bem sucedido foi realizado em 4 de junho de 1984, no Hospital Geral de Goiânia. A equipe era composta pelos médicos nefrologistas Dezir Vêncio, João Batista de Souza, Júlio César Ximenes e Sebastião Ludovico Martins, e pelos urologistas Teobaldo Costa, Tácio Vaz,

João Machado de Souza, Rildo Lins Galvão e José Rosa (NETO, 2006). Desde então, as equipes transplantadoras de rim do estado de Goiás vêm trabalhando para dar aos pacientes da região mais oportunidades de acesso ao procedimento. De 2012 a 2019, foram realizados, em Goiás, 200 TR-DV e 671 TR-DF (GARCIA, 2019).

### 2.3 Imunologia do Transplante

A grande limitação aos transplantes é a resposta imune do receptor contra os tecidos do doador. Esta reação gera uma resposta do sistema imunológico ao aloenxerto através de várias etapas, sendo utilizado neste processo o sistema imunológico tanto adaptativo quanto inato (AUCHINCLOSS; SULTAN, 1996).

A resposta imunológica ao enxerto, que possui vários aloantígenos, pode ser mediada por duas vias – a celular ou humoral (anticorpos) (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000). O processo de rejeição tem início quando os LT do receptor reconhecem antígenos do doador expressos no enxerto. Ao reconhecerem esses antígenos como não próprios, os LT são ativados e desencadeiam mecanismos efetores celulares e humorais da rejeição (ROCHA et al., 2003). O alorreconhecimento é o evento central e primário no desencadeamento da resposta imune. Pode ocorrer por duas vias distintas, mas não excludentes: a via direta e a via indireta. Ambas as vias de alorreconhecimento são importantes no processo de rejeição e podem ocorrer simultaneamente (HERNANDEZ-FUENTES; WARRENS; LECHLER, 2003).

Quando a via direta se inicia, os LT do receptor reconhecem o complexo peptídeo-molécula HLA expresso na superfície das APC do doador (SAYEGH; TURKA, 1998). Este complexo do doador é reconhecido pela célula *T Cell Receptor (TCR)* do receptor e se inicia o mecanismo de indução de citotoxicidade. Já na via indireta, os LT do receptor reconhecem os aloantígenos processados e apresentados na forma de peptídeos presentes na superfície celular das *Antigen Presenting Cells (APC)* do receptor, geralmente junto à molécula HLA classe II. Com o passar do tempo, as APC do doador diminuem, o que sugere o favorecimento maior da participação da via indireta, sendo que alguns autores postulam que essa via seja a predominante na

rejeição crônica (RC) (COELHO et al., 1999; SAYEGH; WATSCHINGER; CARPENTER, 1994; SPADAFORA-FERREIRA et al., 2001).

Toda esta sequência de eventos tem como ponto crucial a lesão tecidual do enxerto, levando aos quadros de rejeição hiperaguda, aguda (celular ou humoral) e crônica, quadros clínicos variados acompanham os episódios de rejeição. O uso de drogas imunossupressoras tem como objetivos bloquear esse processo de rejeição (SÁ; LEAL; ROSA, 2017).

O processo de rejeição independente de sua classificação histológica (Anexo A) está interligado com outros fatores que tem relação direta com o prognóstico do enxerto ao longo prazo. Dentre eles, é importante citar o grau de compatibilidade. Quando no caso de TR com doador vivo relacionado (DVR), o nível de compatibilidade (*match*) baseia-se no número de haplótipos (grupo de genes ou alelos presentes em determinado número de *loci* contíguos) compartilhados pelo receptor e possíveis doadores. Desta forma, os possíveis doadores são categorizados como HLA-idêntico, HLA-haploidêntico e HLA-distinto. Já quando se trabalha com doador vivo não relacionado (DVNR) ou DF, o grau de compatibilidade entre receptor e doador é referido em número de incompatibilidades (*mismatches*) HLA, que seria a presença de um antígeno no doador ausente no receptor. Em TR HLA-idêntico, por compartilharem iguais alelos de classes I e II, assim como todos os demais genes do complexo HLA, os mesmos apresentam prognóstico mais elevado do que os TR com rim de DF sem nenhuma incompatibilidade HLA-A, -B, -DR em relação ao receptor (LIMA, 2014).

Outros fatores importantes relacionados com a resposta imunológica do receptor ao enxerto renal e ao desempenho clínico do transplante, são o tempo de isquemia fria (TIF), definido como o período correspondente à perfusão do enxerto no doador até o desclameamento da anastomose no receptor. E a função retardada do enxerto (FRE), definida como a necessidade de suporte dialítico na primeira semana do transplante. Durante o armazenamento refrigerado do rim, os estoques de energia celular são exauridos, resultando na ativação da morte celular apoptótica e necrótica na reperfusão. Após o transplante, as manifestações desta lesão de reperfusão vão depender da extensão do insulto isquêmico que é um fator de risco para FRE, rejeição aguda

e tem um impacto negativo na sobrevivência do enxerto, incluindo a perda crônica do mesmo (GORAYEB-POLACCHINI et al., 2020).

No trabalho de Doshi et al. (2011), os pesquisadores encontraram como fatores de risco associados a FRE - sexo masculino, ser afro-americano, obesidade, *Diabetes mellitus*, diálise crônica, longo tempo em lista espera para transplante, longo TIF e maior número de incompatibilidade doador-receptor. Todos os fatores apresentaram um valor de  $p < 0,01$ , o que demonstra o impacto da FRE sobre o TR e as inter-relações com outros fatores clínicos e imunológicos.

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

A primeira descrição do MHC é de 1936 (GORER, 1937), tendo sido identificado em camundongos; suas moléculas foram caracterizadas como antígenos polimórficos da superfície celular, codificados por um *locus* denominado H-2. Subsequentemente, complexos gênicos similares foram descritos em várias espécies de mamíferos, com o mesmo modo de atuação e também envolvidos na resposta imune (CROUAEU-ROY et al., 1994; CHRISTIANSEN et al., 1993; DUNHAM et al., 1987).

O HLA veio a ser descoberto na década de 50 (DAUSSET, 1958; PAYNE; ROLFS, 1958; VAN ROOD; EERNISSE; VAN LEEUWEN, 1958), quando pesquisadores realizavam estudos sorológicos em pacientes politransfundidos e gestantes, onde detectaram anticorpos leucoaglutinantes. Dausset descreveu o primeiro antígeno, o qual denominou MAC (atualmente designado HLA-A2) (DAUSSET, 1958).

O MHC humano recebeu a denominação HLA referindo-se ao conjunto gênico HLA localizado no braço curto do cromossomo 6, na banda 6p21.31. Nessa região cromossômica, estão presentes outros genes, muitos não pertencentes ao sistema HLA. Essa região do genoma humano, de acordo com os produtos moleculares (estrutura e função) que os genes aí situados codificam, foi subdividida em três regiões - classe I, II e III (BELL, 1989; CHRISTIANSEN et al., 1993; LAMM; OLAISEN, 1985). Dadas as suas características imunológicas,

o HLA representa uma barreira antigênica ao transplante, sendo altamente polimórfico entre os indivíduos e segregado em famílias de maneira codominante mendeliana (SUTHANTHIRAN; STROM, 1994).

Os HLA estão agrupados em três regiões de subclasses: as regiões de classe I, II e III (Figura 1). A região da classe I (grupo clássico – classe Ia) contém os genes HLA-A, HLA-B e HLA-C altamente polimórficos. Os genes desta classe codificam as cadeias  $\alpha$  das moléculas HLA de classe I cuja estrutura se completa com uma cadeia leve de  $\beta$ 2- microglobulina, codificada por um gene de mesmo nome localizado no cromossomo 15 (PIRRI, 2006).

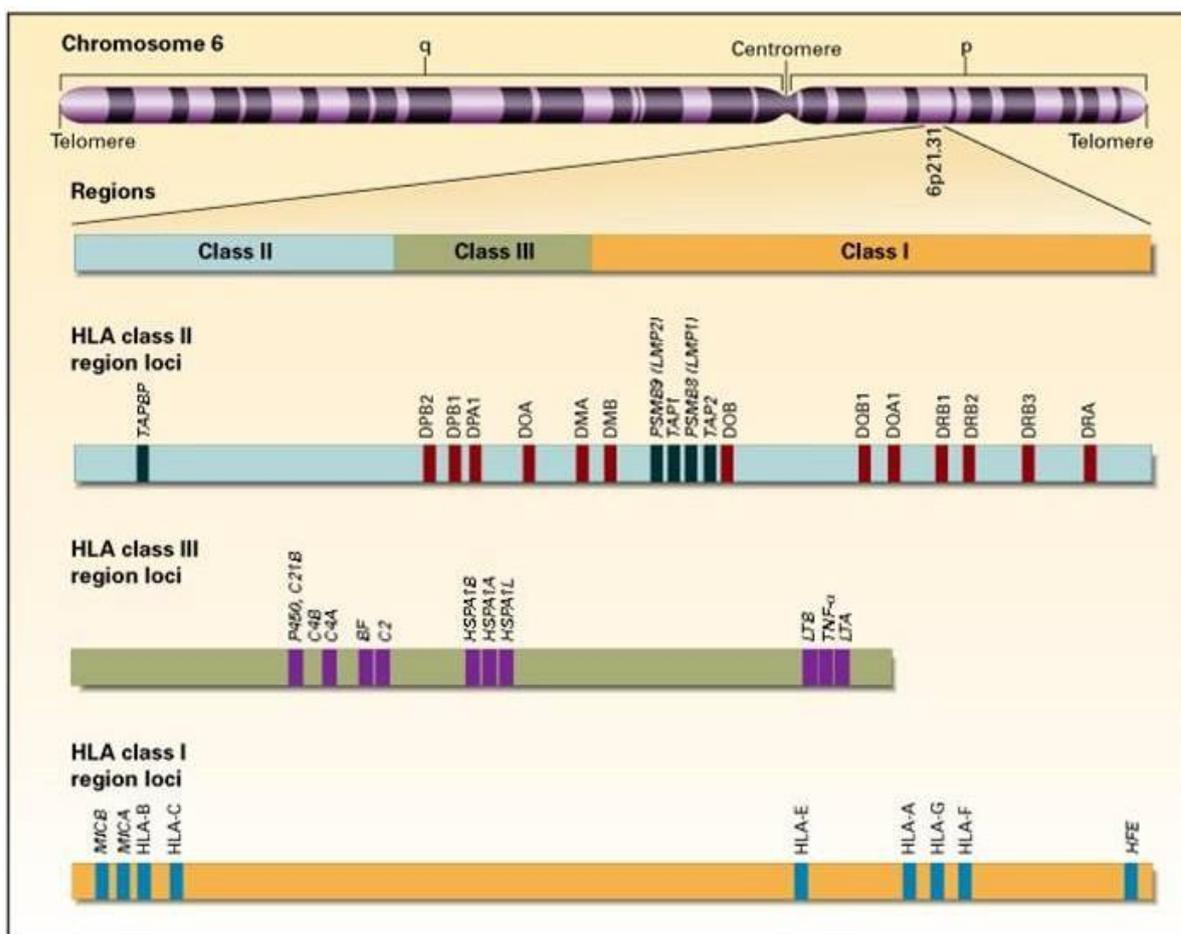


Figura 1 - Ilustração mostrando a posição do MHC no cromossomo 6 e a disposição dos genes dentro dos *loci*. (KLEIN; SATO, 2000)

O grupo não clássico (classe Ib), cujo polimorfismo é limitado, é representado pelos genes HLA-E, HLA-F e HLA-G. A região da classe II, está envolvida no processamento e apresentação de antígenos, consiste em HLA-

DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQA2, HLA-DQB1, HLA-DQB2, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB2, HLA-DRB3, HLA-DRB4 e HLA-DRB5. A região da classe III contém genes implicados em respostas inflamatórias, maturação de leucócitos e cascata do complemento (DENDROU et al., 2018).

Os antígenos HLA classe I, localizados nos *loci* A, B e C, são expressos na superfície de todos os tipos de células nucleadas e de plaquetas. Os antígenos HLA classe II, localizados nos *loci* DR, DQ e DP, são expressos na superfície das APC, que são células que processam peptídeos antigênicos em seu citoplasma e os expõem na fenda da molécula HLA classe II na superfície celular. São representadas pelas células dendríticas (CD), macrófagos, LB, LT ativados, células endoteliais, células epiteliais, células musculares lisas e fibroblastos, sendo que estes três últimos tipos celulares apresentam antígenos após estímulo de citocinas específicas, como o *Tumor Necrosis Factor-TNF $\alpha$*  (Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$ ) e o *Interferon gama (INF $\gamma$ )* (HERNANDEZ-FUENTES; WARRENS; LECHLER, 2003; ROCHA et al., 2003).

## 2.5 HLA-G

O grupo de pesquisadores coordenados por Shirley Ellis, em 1986, descreveu a caracterização de uma nova molécula HLA classe I, que foi isolada das membranas celulares de citotrofoblastos coriônicos e de uma linhagem celular de coriocarcinoma derivado de trofoblastos, vale ressaltar que os antígenos clássicos do HLA classe I não são expressos nessas células. O antígeno foi caracterizado como uma glicoproteína não polimórfica, encontrada em associação com  $\beta$ 2 microglobulina e detectada por anticorpos monoclonais que reconhecem determinantes monomórficos do HLA classe I (ELLIS et al., 1986).

Em 1987, foi descrito, por um grupo de pesquisadores americanos, um ácido desoxirribonucleico (DNA) genômico que codifica um gene não-HLA-A, -B, -C classe I. Este gene, designado HLA-6.0, é tão homólogo do HLA-A e HLA-B, quanto entre si. A proteína HLA classe I codificada por HLA-6.0 é semelhante em organização às proteínas codificadas em HLA-A, -B e -C, exceto que um

códon de terminação em estrutura impede a tradução da maioria da região citoplasmática do HLA-6.0 (GERAGHTY; KOLLER; ORR, 1987).

No entanto, foi somente, em 1990, que o HLA 6.0, recebeu a nomenclatura de HLA-G, uma molécula atípica do HLA classe I, presente em quantidades abundantes na interface materno-fetal (ELLIS; PALMER; MICHAEL, 1990). Estudos posteriores confirmaram que o HLA-G é expresso em praticamente todas as interfaces celulares em que as células maternas e fetais entram em contato, por exemplo, células de citotrofoblasto extravilosas invasivas, células endoteliais endovasculares fetais, células de âmnio e do líquido amniótico (LE BOUTEILLER et al., 1999). Assim o HLA-G foi caracterizado como um gene não clássico do (classe Ib) sistema HLA.

Estudos posteriores demonstraram que o gene HLA-G é transcrito em uma variedade de células e tecidos adultos (leucócitos do sangue periférico, placenta, pele, baço, timo, próstata, testículo, ovário, intestino delgado, cólon, coração, cérebro, pulmão, fígado e rim), bem como nos tecidos fetais (coração, pulmão, fígado e rim) (ONNO et al., 1994), assim como a sua expressão têm sido associada à aceitação de aloenxertos (CAROSELLA et al., 1999; XIAO et al., 2013).

### 2.5.1 Estrutura do HLA-G

O HLA-G apresenta um número de cinquenta e sete alelos, descritos até a data de maio de 2020 ("IPD-IMGT/HLA", 2020), apresentando polimorfismo discreto, quando comparado aos genes HLA de classe Ia. No entanto, alguns desses alelos não são totalmente caracterizados, apresentando apenas alguns éxons sequenciados. Estudos populacionais mundiais sobre toda a sequência do gene HLA-G permitiram *insights* mais precisos sobre a variabilidade do HLA-G (ALTSHULER et al., 2012).

O HLA-G localiza-se no interior da região do HLA de classe I do cromossomo 6 apresentando 4396 pares de bases (pb), com oito éxons, sete íntrons e uma região 3' não traduzida (3'UTR), sendo homólogo àqueles do grupo clássico de classe Ia. Quanto à sua estrutura gênica possui: éxon 1, com 73 pb, codificando o peptídeo sinal; éxon 2, com 270 pb, éxon 3, com 276 pb, e

éxon 4, com 276 pb, os quais codificam os domínios  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$  respectivamente; éxon 5, com 114 pb, codificando a região transmembrana; éxons 6, 7 e 8, com 105 pb, codificando o domínio citoplasmático da molécula HLA-G. Entretanto, devido a um códon de término de leitura (UGA) no éxon 6 a cauda citoplasmática apresenta 6 aminoácidos enquanto a cauda das moléculas de Classe II apresentam aproximadamente 30 (Figura 2) (CAROSELLA; DAUSSET; KIRSZENBAUM, 1996; CAROSELLA; DAUSSET; ROUAS-FREISS, 1999; O'CALLAGHAN; BELL, 1998).

O HLA-G possui sete transcritos alternativos que produzem sete isoformas diferentes de proteínas HLA-G1, -G2, -G3 e -G4 ligadas à membrana e HLA- G5, -G6 e -G7, solúveis (Figura 3) (CAROSELLA et al., 2015; PIRRI, 2006). No entanto, a diversidade do HLA-G não pode ser apenas descrita pelo número de suas isoformas, tais isoformas são as estruturas HLA-G mais simples. Atualmente é sabido que o HLA-G é estruturalmente ainda mais complexo do que isso, estando presente como monômeros, homo e possíveis heteromultímeros, proteínas ubiquitinadas, livres em fluidos biológicos ou como parte de exossomos (CAROSELLA et al., 2015).

Embora o HLA-G tenha sido inicialmente considerado não polimórfico, variações de sua sequência nucleotídica foram descritas em quase todas as partes do gene (VAN DER VEN et al., 1998). O número crescente de locais polimórficos relatados levantou a questão de até que ponto as variações da sequência nucleotídica do HLA-G interferem nas funções postuladas ou comprovadas do HLA-G. Parece haver diferenças quanto à localização, natureza e frequência relativa de polimorfismos entre grupos étnicos, embora certas variações de nucleotídeos sejam compartilhadas por todas as populações étnicas estudadas até o momento (KARHUKORPI et al., 1996; YAMASHITA et al., 1996), por exemplo, as posições nos códons 57, 93, 107 e 110, o que sugere uma origem comum dos alelos HLA-G existentes (PIRRI, 2006; PIRRI et al., 2009; VAN DER VEN; PFEIFFER; SKRABLIN, 2000).

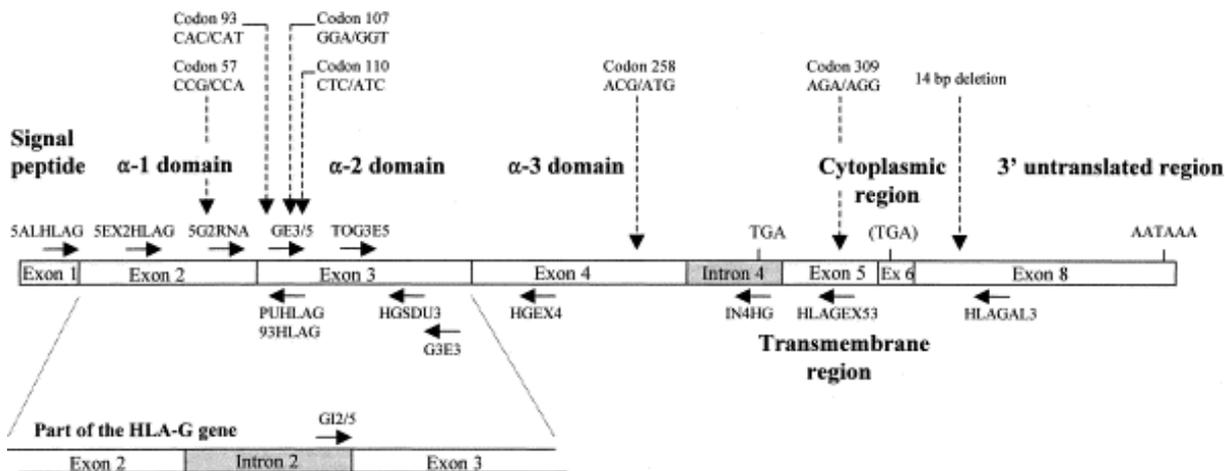


Figura 2 - Desenho esquemático da forma de transcrição completa do mRNA de HLA-G, incluindo o íntron 4. A orientação e a localização dos primers de PCR e sequenciamento são indicadas com setas. Polimorfismos detectados são mostrados (HVIID et al., 1998)

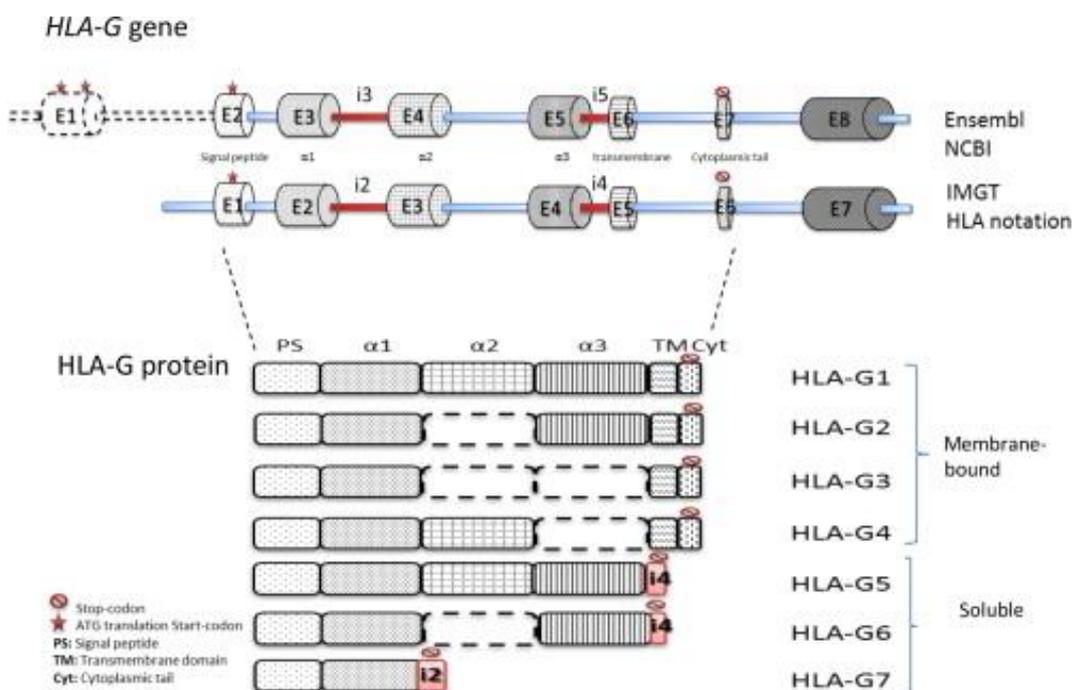


Figura 3 - O locus HLA-G e as isoformas proteicas expressas (CAROSELLA et al., 2015)

### 2.5.2 Funções do HLA-G

Em condições saudáveis, é observado um nível basal de transcrição do gene HLA-G na maioria das células e tecidos. No entanto, a tradução para a proteína HLA-G é restrita aos trofoblastos na interface materno-fetal

(CAROSELLA et al., 2003) e, em adultos, às células-tronco epiteliais, da córnea, das células-tronco mesenquimais (CTM), matriz ungueal, células  $\beta$ -pancreática, células dos precursores eritroides e endoteliais. O HLA-G também pode ser neoexpresso em condições patológicas, incluindo transformação maligna, infecções virais, doenças inflamatórias e autoimunes e transplante alogênico (CAROSELLA, 2011; MORANDI et al., 2016).

Onno et al. (1994) procuraram determinar se os ácidos ribonucleicos mensageiros (mRNA) de HLA-G também são expressos em outros tecidos humanos, desta forma usando sondas específicas para o locus HLA-G, demonstraram que o referido gene é transcrito em uma variedade de células e tecidos adultos obtidos de diferentes indivíduos (leucócitos do sangue periférico, placenta, pele, baço, timo, próstata, testículo, ovário, intestino delgado, cólon, coração, cérebro, pulmão, fígado e rim), bem como nos tecidos fetais (coração, pulmão, fígado e rim).

O locus de HLA-G tem baixo polimorfismo e, devido à sua estrutura, a molécula pode reconhecer e apresentar apenas um repertório de peptídeos restrito em comparação com as moléculas clássicas de HLA Classe Ia (CLEMENTS et al., 2005). Essas peculiaridades tornam o HLA-G exclusivamente orientado para a inibição e tolerância imunológica. No final dos anos noventa um grupo francês demonstrou que os trofoblastos que expressam HLA-G estavam protegidos da citólise mediada por células natural killer (NK) maternas, indicando pela primeira vez o HLA-G como uma molécula chave na tolerância materno-fetal (ROUAS-FREISS et al., 1997).

A partir dessa primeira observação, vários grupos trabalharam para definir o modo de ação do HLA-G e em quais configurações ele está envolvido na promoção da tolerância. Atualmente, é aceito que o HLA-G é uma molécula única com várias propriedades imunomoduladoras: desempenha um papel importante não apenas na tolerância fetal-materna, mas também na modulação das respostas imunes e na promoção e manutenção da tolerância periférica em condições saudáveis e patológicas. O HLA-G pode de fato atuar tanto nos ramos inato quanto adaptativo da imunidade e regular as respostas imunológicas a curto e longo prazo (AMODIO; GREGORI, 2012).

O HLA-G se liga a três receptores inibitórios: *immunoglobulina-like transcript 2* (ILT2) presentes nas células NK, CT e APC, ILT4 (células mieloides) e *killer immunoglobulina-like receptor* (KIR2DL4) (células NK e CT), sendo este último um receptor HLA-G específico. Comparado a outras moléculas de HLA classe I, o HLA-G aprimorou as funções inibitórias diretas e inibe as funções citolíticas das células NK e LT citotóxicos (LTC), aloproliferação de CT CD4+ e maturação das células dendríticas (CAROSELLA et al., 2003).

#### 2.5.2.1 HLA-G e funções citolíticas das células NK e LTC

O HLA-G foi identificado pela primeira vez como uma molécula expressa especificamente pelo citotrofoblasto. As células citotrofoblásticas são células invasoras de decídua que são semialogênicas para a mãe, não expressam HLA-A, HLA-B, níveis muito baixos de HLA-C, mas altos níveis de HLA-G. Como consequência desse padrão de expressão peculiar clássico do HLA classe I, as células trofoblásticas devem ser um alvo para as células LTC e NK da mãe. A citólise pode ser mediada por células NK ou LTC, as células NK eliminam alvos desprovidos de moléculas HLA classe I, como trofoblastos e alguns tumores, enquanto os LTC eliminam alvos que apresentam HLA classe I e complexos de peptídeos, como células alogênicas e células infectadas por vírus (LEMAOULT; ROUAS-FREISS; CAROSELLA, 2005).

As células citotrofoblásticas são ignoradas pelo sistema imunológico da mãe, devido ao fato que o HLA-G inibe diretamente as células NK e, portanto, protege as células fetais semialogênicas e alogênicas da destruição pelas células NK da mãe (LEMAOULT; ROUAS-FREISS; CAROSELLA, 2005). Desta mesma forma foi demonstrado que, o HLA-G poderia proteger tumores alogênicos ou negativos para a classe I do HLA, da imunidade antitumoral mediada por NK (ROUAS-FREISS et al., 2003). O HLA-G inibe a função citolítica do LTC e, portanto, poderia proteger células ou órgãos alogênicos positivos para a classe I do HLA da destruição pelo mesmo mecanismo (LE GAL et al., 1999).

Ao trabalhar com células transfectadas, um grupo de pesquisadores franceses, demonstrou que as isoformas HLA-G2, -G3, -G4 ligadas à membrana inibem a função citolítica de NK e LTC e, desta forma, também podem participar

da proteção de fetos, tumores ou tecidos transplantados da destruição imune (MENIER et al., 2000; RITEAU et al., 2001). Marchal-Bras-Goncalves et al., 2001, concluíram em sua pesquisa que o HLA-G5, o equivalente solúvel do HLA-G1, também possui funções imunossupressoras.

#### 2.5.2.2 HLA-G e Células T CD4+

A expressão de HLA-G foi demonstrada *in vivo* dentro de tecidos, como tumores e transplantes, nos quais o HLA-G é expresso pelos próprios tecidos ou pela infiltração de células mononucleares (CRÉPUT et al., 2003b; LEFEBVRE et al., 2002). Correlações entre a expressão do HLA-G por tumores ou transplantes e a resistência à citólise foram demonstradas *in vitro* e *in vivo*, e se ajustam à função do HLA-G como uma molécula capaz de proteger as células que o expressam contra a destruição por células NK e LT.

Como as APC são as células que mais expressam essa molécula e, como as mesmas estão envolvidas em todas as etapas da resposta imune a montante da citólise, o papel do HLA-G no contexto da aloestimulação das CT e a função do HLA-APC que expressam G foram investigadas. E ficou demonstrado que o HLA-G é capaz de inibir alorrespostas proliferativas de CT CD4+ em três situações diferentes, isto é, sob uma forma solúvel (LE ROND et al., 2004; LILA et al., 2001), sob uma forma de membrana expressa por uma célula inerte de terceiros (RITEAU et al., 1999) e sob uma forma ligada à membrana expressa pela estimulação própria da APC (LEMAOULT et al., 2004; RITEAU et al., 1999). Outros dados de estudos que são relevantes, mostraram que o HLA-G5 inibe a função das CT CD4+ alorreativas, enquanto é produzido pelas próprias CT CD4+ alorreativas ou por outro tipo de célula (LE ROND et al., 2004; LILA et al., 2001).

A função das APC que expressam o HLA-G1 foi investigada, nesses estudos, as APC que expressavam HLA-G1 inibiram quase completamente as respostas das CT CD4+. E os mesmos indicaram que a APC HLA-G positiva que se infiltra em tumores e transplantes possa não estar envolvida na inflamação, mas pode corresponder a uma tentativa de interromper uma reação imune em andamento (LEMAOULT et al., 2004; RITEAU et al., 1999).

As implicações desses dados são inúmeras, entre elas podem ser citadas: (i) estabelecem que as CT CD4+ são sensíveis à inibição pelo HLA-G; (ii) mostram que o HLA-G pode atuar não apenas no nível de inibição de efetores, mas também a montante, no nível de amplificação clonal de CT e maturação de efetores; (iii) indicam que o HLA-G1 e o HLA-G5 agem de maneira semelhante no desencadeamento de respostas imunes e na maturação de efetores. É a presença do HLA-G que parece contar, não o seu modo de entrega; (iv) posicionam a expressão de HLA-G por tumores e transplantes como uma fuga imune relevante ou mecanismo tolerogênico, com um potencial de correlação com o status do paciente e, portanto, um potencial uso para a titulação de HLA-G como ferramenta de diagnóstico ou prognóstico (LEMAOULT; ROUAS-FREISS; CAROSELLA, 2005).

#### 2.5.2.3 HLA-G e Linfócitos T

A inibição da aloproliferação de LT CD4+ pode ser multifatorial. Desta maneira, o HLA-G pode inibir a proliferação de LT CD4+, agindo sobre os próprios LT e bloqueando suas capacidades responsivas / proliferativas, ou atuando sobre as APC e bloqueando suas capacidades estimuladoras ou inibitórias, ou ambas. A inibição da capacidade de resposta dos LT mediada por HLA-G pode ser devida à geração de LT supressores. A inibição mediada por HLA-G da aloproliferação de LT CD4+ pode ser temporária e condicional à presença de HLA-G no microambiente ou permanente via indução de anergia das CT ou geração de LT supressores (LEMAOULT; ROUAS-FREISS; CAROSELLA, 2005).

O HLA-G pode atuar nas APC através da interação com ILT-4 e inibir sua maturação (LIANG; BAIBAKOV; HORUZSKO, 2002; LIANG; HORUZSKO, 2003). Como consequência funcional, a ligação do HLA-G com ILT4 nas CD inibiu significativamente suas capacidades aloestimulantes. Esses dados *in vivo* são a primeira demonstração direta de que o HLA-G tem potencial para uso em terapia imunossupressora.

Os efeitos da inibição mediada por HLA-G1+ APC na capacidade de LT CD4+ serem reestimuladas foram investigados e foi demonstrado que as

populações de LT CD4<sup>+</sup> que foram pré-estimuladas por HLA-G1<sup>+</sup>-APC tiveram uma diminuição significativa (entre 35% e 55%) na capacidade de responder à nova estimulação antigênica. Esses resultados demonstraram que as células HLA-G1<sup>+</sup>-APC<sup>+</sup> não agem apenas como inibidores da ativação dos LT CD4<sup>+</sup>, mas também induziram resposta ao longo prazo das LT CD4<sup>+</sup>, aparentemente semelhante à anergia dos LT. A indução da falta de resposta ao longo prazo dos LT CD4<sup>+</sup> específica do antígeno é uma maneira de desativar algumas especificidades dos LT do repertório antigênico funcional, promovendo assim uma tolerância imune duradoura a alguns antígenos (LEMAOULT; ROUAS-FREISS; CAROSELLA, 2005).

A indução mediada por HLA-G nos LT supressores, mostra que o HLA-G é uma molécula fortemente envolvida nos mecanismos de escape e tolerância imunológicos. A indução de células supressoras pode ser vista como vigilância e aplicação ativa de “ignorância” do antígeno, porque os LT supressores podem atuar em um ambiente que não contém HLA-G, em células específicas para os mesmos antígenos que elas mesmas, tornando-as incapazes de reagir, espalhando a “ignorância” ao antígeno para todo o sistema imunológico (LEMAOULT; ROUAS-FREISS; CAROSELLA, 2005).

#### 2.5.2.4 HLA-G e a regulação inibitória

O HLA-G possui três receptores conhecidos: ILT2, ILT4 e KIR2DL4, que são receptores inibitórios (COLONNA et al., 1997, 1998; COSMAN et al., 1997; RAJAGOPALAN; LONG, 1999). Quando recrutados por seus ligantes, os receptores inibitórios inibem a função da célula que os carrega, e a superexpressão dos receptores inibitórios diminui e/ou inibe a sua responsividade (CHANG et al., 2002).

A expressão de receptores inibitórios pelas células APC, NK e T após estimulação por HLA-G foi investigada e verificou-se que o HLA-G1 e o HLA-G5 induziram a regulação positiva de seus próprios receptores ILT2 e ILT4 em APC, ILT2 e KIR2DL4 nas células NK e ILT2 e KIR2DL4 nos LT CD4<sup>+</sup>, mas não nas CD8<sup>+</sup>. Estas pesquisas demonstraram: (i) papel imunoinibitório para o HLA-G, (ii) o HLA-G pode atuar como uma molécula de sinalização, pois pode agir por si

só e na ausência de estimulação antigênica concomitante. Esta função enfatiza o papel do HLA-G5 solúvel e sua potencial contribuição para a imunodepressão geral, especialmente quando encontrada em grandes quantidades, ou seja, no microambiente tumoral ou no caso de situações específicas, como transplante combinado fígado-rim (LEMAOULT; ROUAS-FREISS; CAROSELLA, 2005).

Como visto pelas descrições anteriores, as ações do HLA-G são inúmeras e de extrema importância nos contextos fisiológicos e patológicos humanos. Como uma molécula reconhecidamente tolerogênica, que promove o implante uterino do embrião ou a aceitação de aloenxertos sólidos, ela permite também a evasão de tumores ou vírus da resposta imune (Figura 4). Tais mecanismos de ação podem permitir o desenvolvimento de ferramentas médicas que podem trazer benefícios clínicos, tanto em nível diagnóstico quanto terapêutico (CAROSELLA et al., 2008).

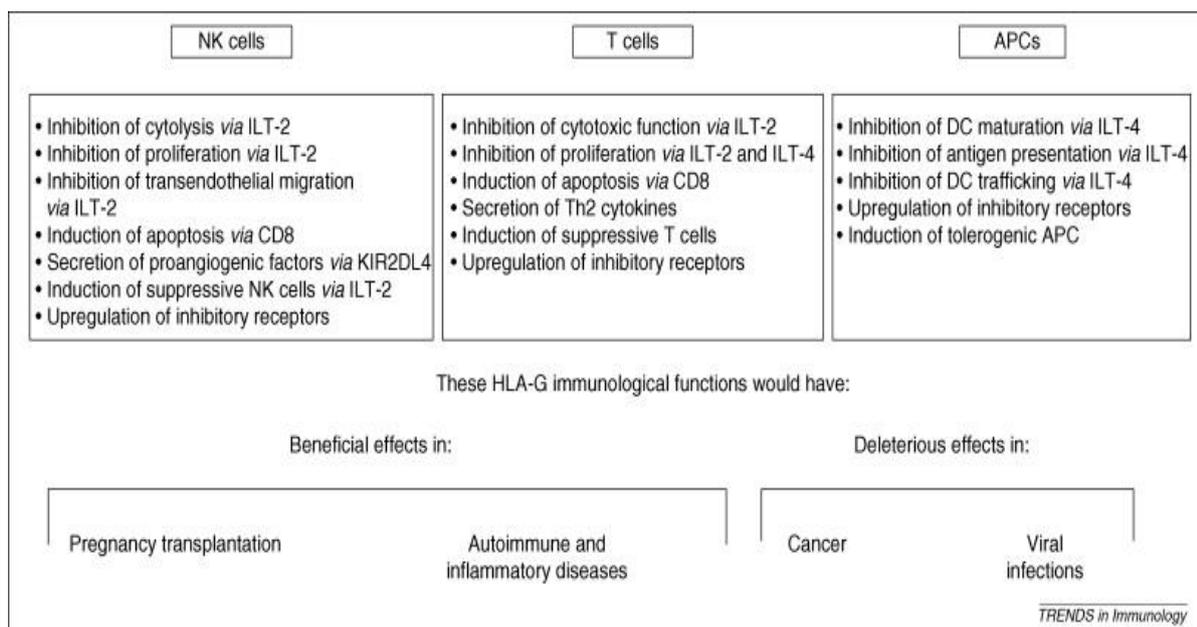


Figura 4 - Propriedades imunológicas do HLA-G: implicações em doenças humanas. O HLA-G como formas solúveis e ligadas à membrana tem propriedades imunossupressoras que ocorrem por meio de interações com receptores expressos diferencialmente em células NK, células T e APCs. Essas funções têm implicações importantes em doenças humanas. De fato, as propriedades tolerogênicas do HLA-G podem ter efeitos benéficos nos distúrbios da gravidez, transplante, auto-imunidade e doenças inflamatórias, limitando as reações imunes, enquanto que podem ser deletérias no câncer e após infecções virais, permitindo a fuga de células infectadas por vírus ou tumor (CAROSELLA et al., 2008)

### 2.5.3 HLA-G e Transplante Renal

A participação do *HLA-G* na imunobiologia dos transplantes iniciou-se com o estudo de transplantes cardíacos (TC) e nos transplantes combinados hepato-renais (THR). Um dos primeiros estudos de HLA-G e TO foi realizado na França, os pesquisadores franceses conhecedores de que o HLA-G exibe funções imunotolerantes (mecanismos de tolerância imunológica materna ao enxerto fetal semialogênico) e que sua expressão pode ser modulada de maneira ascendente, investigaram se o HLA-G poderia ser detectado em pacientes submetidos a TC e estar associado a uma melhor tolerância ao enxerto. O estudo constou de 31 pacientes (25 homens, 6 mulheres, média de idade de 53,4 anos [intervalo 17–79]) receptores de TC, nos quais a expressão de HLA-G foi avaliada em biópsias endomiocárdicas e soro e correlacionada com dados clínicos (LILA et al., 2000).

A expressão do HLA-G nas biópsias endomiocárdicas foi avaliada por imunohistoquímica. A expressão de HLA-G estava presente nas biópsias miocárdicas de cinco (16%) pacientes. Nos pacientes com HLA-G positivo, o número de rejeições agudas foi menor do que nos pacientes com HLA-G negativo. Nenhuma rejeição crônica foi observada em pacientes com HLA-G positivo. Fatores ambientais específicos e liberação local ou sistêmica de citocinas após TC ou tratamentos imunossupressores intensivos, podem estar associados à indução da expressão de HLA-G. Desta forma, a expressão de HLA-G pode contribuir para a aceitação do enxerto por inibição da lise mediada por células NK e LTC, bem como pela supressão da resposta proliferativa alogênica. Este estudo apoiou a hipótese de que o HLA-G pudesse ser ativado durante o processo de transplante, levando à modulação descendente das respostas imunes do hospedeiro e melhor tolerância ao aloenxerto, controlando rejeições agudas e RC (LILA et al., 2000).

Em seu estudo seguinte, Lila et al.(2002) estudando ainda TC, investigaram as possíveis correlações entre a expressão do HLA-G e o número e tipos de rejeição. O número de episódios de rejeição aguda (RA) foi significativamente menor em pacientes com HLA-G-positivo em comparação com pacientes com HLA-G-negativo. Não foi observada RC em pacientes HLA-

G-positivo, enquanto os pacientes HLA-G negativos tiveram RC. Ficou demonstrado com este estudo que, existe uma correlação significativa entre rejeição e expressão de HLA-G no coração após o transplante. A expressão do HLA-G e seu efeito na redução da incidência e gravidade da rejeição parecem ser estáveis ao longo da evolução.

Estas pesquisas incentivaram inúmeros outros estudos sobre o papel do HLA-G em relação aos transplantes. É sabido que a presença do aloenxerto hepático promove melhor aceitação do outro órgão transplantado (CALNE et al., 1969; HOUSSIN et al., 1980). A partir dessa premissa um grupo francês de pesquisadores, mostrou uma associação significativa entre a expressão de HLA-G nas células epiteliais biliares do fígado e a ausência de rejeição do enxerto hepático. Não foi observada RA ou RC do enxerto renal em pacientes nos quais o HLA-G foi expresso no enxerto hepático. Os pesquisadores concluíram que expressão do HLA-G no aloenxerto hepático está associada a uma menor frequência de RA hepática e renal e pode estar envolvida na aceitação de órgãos transplantados simultaneamente (CRÉPUT et al., 2003b).

Créput et al. (2003a) detectaram uma alta concentração de HLA-G no soro de pacientes de THR, mas não em pacientes transplantados de rim. Esse achado foi também corroborado pela expressão ectópica do HLA-G nas biópsias dos enxertos. Outra associação importante foi um baixo número de RA nos enxertos, especialmente em transplantados de fígado-rim. Todos estes aspectos levaram o grupo a propor que o HLA-G pudesse ser utilizado na monitorização de pacientes transplantados, pois a determinação dos níveis solúveis de HLA-G no soro dos pacientes permitiria modular a quantidade de medicamentos imunossupressores administrados aos mesmos.

Na busca de dados entre HLA-G e TR, Kaneku (2006), realizou um estudo pesquisando a correlação entre o HLA-G solúvel (sHLA-G) e a sobrevida efetiva do enxerto renal em pacientes transplantados. Foi demonstrado pelo pesquisador, que dos pacientes que tinham um enxerto funcional ao final do estudo, 73% foram considerados como tendo uma tendência positiva para sHLA-G, comparado com apenas 44% do grupo de pacientes com falha precoce dos enxertos.

Qiu et al. (2006) pesquisaram a presença de sHLA-G em amostras séricas seriadas de TR. Um total de 330 soros de 65 pacientes foram testados para sHLA-G. Após análise em série dos 330 soros dos 65 pacientes, 50% dos 26 pacientes do grupo em funcionamento renal adequado, apresentaram expressão consistente de sHLA-G ou se tornaram positivos, em comparação com 20,5% entre 39 pacientes que rejeitaram seus transplantes, desta maneira, o sHLA-G foi associado a transplantes funcionais. No geral, pacientes positivos para sHLA-G geralmente tiveram melhor aceitação do enxerto.

Em 2007, um grupo de pesquisadores brasileiros realizou estudo para determinar a existência de uma possível correlação entre o polimorfismo de inserção/deleção de 14 pb (14pb ins/del) do HLA-G e o desfecho do aloenxerto renal. A conclusão do estudo foi de que não houve diferença significativa nas frequências alélicas do polimorfismo 14pb ins/del entre controles normais e pacientes transplantados. A análise de outros polimorfismos do HLA-G e estudos funcionais sobre a regulação imune são essenciais para elucidar o papel do HLA-G nos aloenxertos renais (CRISPIM et al., 2007).

Em um estudo transversal, onde foi comparando a expressão de HLA-G em enxertos renais de pacientes pós-transplantados (estratificando-se os mesmos de acordo com a presença ou ausência de rejeição e a relação com os imunossupressores) os resultados sugeriram que a expressão de HLA-G no aloenxerto renal e o uso de TAC estavam associados a uma menor frequência de RA e nefropatia crônica do enxerto (CRISPIM et al., 2008).

Em trabalho de um grupo argentino de 2009, foram avaliadas as isoformas de HLA-G e os níveis de mRNA de MICA (MIC - família de genes relacionada ao MHC de classe I, compreende sete membros, dois dos quais codificam glicoproteínas funcionais [MICA e MICB], enquanto MICC para -G são pseudogenes) em células mononucleares do sangue periférico e em biópsias de receptores de aloenxertos renais com RA, RC e evolução estável do enxerto. Os resultados preliminares sugeriram que a isoforma HLA-G1, mas não os níveis de mRNA de MICA, poderiam fornecer um marcador para medir o estado do aloenxerto renal e servir de base para estudos futuros que pudessem estabelecer a influência dessas moléculas na rejeição ou aceitação de aloenxertos renais (RACCA et al., 2009).

Ao investigar se o sHLA-G é a molécula mais biologicamente relevante entre todos os tipos de moléculas solúveis de HLA classe I para aceitação do enxerto, grupo alemão abordou pacientes de TR e transplantados rim-pâncreas (TRP). Foram analisados os níveis de HLA solúvel total classe I (sHLA-I) em comparação com o sHLA-G em 488 amostras de plasma obtidas antes e em série após o transplante. As amostras de 126 indivíduos saudáveis serviram como controle. A análise multivariada dos dados mostrou que o sHLA-G, mas não o sHLA-I, é um fator de risco independente para rejeição do enxerto. Assim, altos níveis de sHLA-G, mas não de sHLA-I, parecem ter contribuído para uma melhor aceitação do enxerto após o TR ou TRP (REBMANN et al., 2009).

Xiao et al. (2010a) investigaram a expressão da molécula HLA-G, incluindo HLA-G ligado à membrana (mHLA-G), HLA-G intracelular (iHLA-G) e sHLA-G, no sangue periférico de receptores de TR, bem como a relevância entre o HLA-G e a função do órgão transplantado e os episódios de rejeição. Foi realizado um estudo longitudinal em 175 receptores de TR. Três grupos foram envolvidos neste estudo, incluindo grupo de RA (n = 36), grupo estável de função (n = 139) e grupo controle saudável (n = 30). A conclusão do estudo foi de que, as expressões de mHLA-G1 e iHLA-G1 não têm relevância com o início da RA, mas a média dos níveis de sHLA-G5 no grupo de função estável no plasma foi superior à do grupo de RA.

Para investigar a relação entre o sHLA-G e o aparecimento de episódios de RA, foi quantificado o nível de sHLA-G, em 42 casos de TR de um serviço na Tunísia, sendo que os pacientes foram classificados em dois grupos, com e sem RA, e um grupo controle com indivíduos saudáveis (amostras de soro de 18 controles). O estudo sugeriu que níveis séricos mais altos de sHLA-G pareciam contribuir para uma melhor taxa de sobrevivência do aloenxerto renal após 10 anos de seguimento, conforme mostrado pela análise de sobrevivência. Devido ao pequeno número de indivíduos estudados, esses resultados devem ser tratados com cautela (BARDI et al., 2011).

No estudo realizado por Farid et al. (2015), o sHLA-G foi avaliado em 3 grupos: pacientes transplantados renais sem episódios de rejeição (n=43); pacientes transplantados com rejeição comprovada por biópsia (n=27); indivíduos saudáveis, pareados por idade e não transplantados como controles

(n=42). O nível de sHLA-G foi significativamente maior nos pacientes transplantados em comparação com os controles. TAC teve efeitos positivos nos níveis de sHLA-G. Pacientes com RC apresentaram um nível significativamente menor de sHLA-G em comparação com um grupo estável ao enxerto. Os resultados do estudo foram consistentes com estudos anteriores que abordaram o papel do sHLA-G na indução de imunotolerância após o TR, bem como incentivaram mais pesquisas da busca de um tratamento com HLA-G ou derivado, que pudesse se constituir em uma nova terapia eficiente de tratamento antirrejeição.

Ao estudar sHLA-G e CD30 solúvel (sCD30) em receptores de TR em diferentes momentos após o transplante e explorar a relação entre as expressões do sHLA-G, sCD30 sérico e o tempo após o TR, Jin et al. (2017) observaram que o sHLA-G sérico em receptores de TR com enxerto normal aumentou com o tempo após o procedimento, enquanto o nível sérico de sCD30 foi reduzido em um mês após o TR, o que se encontra de acordo com os relatos de estudos prévios.

Os polimorfismos de 14 pb ins/del (rs1704) e + 3142C>G (rs1063320) podem modificar o nível de expressão do HLA-G (ROUSSEAU et al., 2003). Partindo deste conhecimento, um grupo de pesquisadores alemães estudou 175 transplantados renais (41 com RA e 134 sem rejeição) e adicionalmente os doadores correspondentes para ambos os polimorfismos, a fim de avaliar seu impacto nas RA um ano após o transplante. O estudo concluiu que os polimorfismos HLA-G do doador são importantes para a suscetibilidade de resposta RA no TR, assim como os genótipos de 14 pb ins/ins e + 3142GG seriam protetores contra a rejeição de TR (JANSSEN et al., 2019).

Piancatelli et al. (2020a) investigaram as associações do polimorfismo HLA-G14pb ins/del no início de alguns fatores de risco pós-TR, como excesso de peso corporal, anormalidades lipídicas, aumento da glicemia em jejum, bem como os polimorfismos de citocinas com efeitos imunossupressores e metabólicos. O estudo envolveu 173 pacientes TR com avaliação de: índice de massa corporal, colesterol, triglicérides, glicemia de jejum, hipertensão, tabagismo, dados demográficos, e terapêuticos. O estudo dos pacientes transplantados permitiu evidenciar uma relação potencial entre ganho de peso

pós-transplante e polimorfismo HLA-G14pb ins/del, anteriormente envolvido na rejeição por sua atividade imunossupressora/ tolerogênica. Essa nova associação poderia ampliar o conhecimento do papel e das funções das moléculas de HLA-G em doenças e transplantes. Esta descoberta introduz novos aspectos que ainda podem ser explorados em relação a molécula de HLA-G.

## **2.6 Ligante de PD-1 (PD-L1)**

Em 1992, um grupo de pesquisadores trabalhando com o tipo clássico de morte celular programada, usando a técnica de hibridização subtrativa, isolaram PD-1, um novo membro da superfamília do gene da Ig (ISHIDA et al., 1992). Em pesquisas subsequentes, PD1 foi caracterizado como um receptor imunoinibitório expresso por LT ativados, LB e células mieloides (AGATA et al., 1996; ISHIDA et al., 1992; NISHIMURA et al., 1998; VIBHAKAR et al., 1997).

O PD-L1 é expresso por APC (monócitos do sangue periférico humano, CD humanas e murinas ativadas), em tecidos não linfoides, como coração e pulmão. Os níveis relativos de sinais inibitórios PD-L1 e B7-1 / B7-2 coestimulatórios em APC podem determinar a extensão da ativação de LT e, assim, o limiar entre tolerância e autoimunidade. Desta forma os pesquisadores identificaram o ligante de PD-1 e demonstraram que essa interação receptor-ligante leva à inibição da proliferação de linfócitos (FREEMAN et al., 2000).

Os mecanismos de funcionamento de PD-1 e PD-L1 são realizados através da emissão de sinais inibitórios que regulam o equilíbrio entre a ativação, tolerância e imunopatologia dos LT. A indução e manutenção da tolerância dos LT requer PD-1 e PD-L1 em células não hematopoiéticas, isto pode limitar as respostas efetoras dos LT e proteger os tecidos dos danos nos tecidos mediados pelo sistema imunológico (KEIR et al., 2008).

Loke e Allison (2003) estudando PD-L1 e PD-L2, ligantes de PD-1, descobriram que PD-L1 é altamente expresso em macrófagos inflamatórios, em contraste, PD-L2 não é expresso em macrófagos inflamatórios, mas pode ser induzido por ativação alternativa via interleucina 4 (IL-4). Estes resultados sugerem que PD-L1 e PD-L2 podem ter funções diferentes na regulação das respostas tipo 1 e tipo 2. PD-L1 é expresso em macrófagos e células tumorais,

enquanto a PD-L2 é amplamente restrito a CD, assim sendo, a regulação diferencial de PD-L1 e PD-L2 sugere que eles possam ter diferentes funções em diferentes situações inflamatórias Th1 e Th2, embora ambas liguem PD-1 (Figura 5).

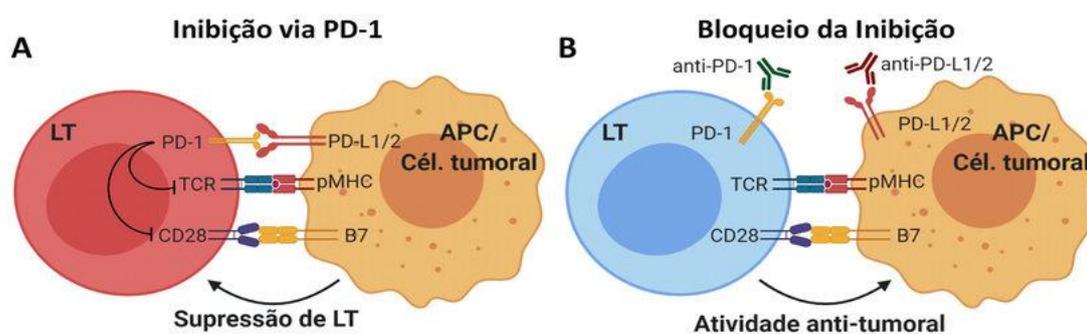


Figura 5 - A inibição da ativação dos linfócitos T via PD-1 pode ser revertida com anticorpos anti-PD-1 e/ou anti-PD-L1/2. A) A ligação do PD-1 com seus ligantes PD-L1/PD-L2 presentes em células apresentadoras de antígeno (APC) ou células tumorais causa supressão da ativação dos linfócitos T via inibição de sinais envolvendo o reconhecimento de antígenos pelo TCR e ligação de moléculas co-estimuladoras (CD28, B7). B) O tratamento com anticorpos anti-PD-1 ou anti-PD-L1/2 bloqueia esse mecanismo de inibição favorecendo a atividade anti-tumoral dos linfócitos T. PD-1 = proteína-1 de morte celular programada. TCR = receptor da célula T ([https://www.researchgate.net/figure/Figura-2-A-inibicao-da-ativacao-dos-linfocitos-T-via-PD-1-pode-ser-revertida-com\\_fig2\\_337613690](https://www.researchgate.net/figure/Figura-2-A-inibicao-da-ativacao-dos-linfocitos-T-via-PD-1-pode-ser-revertida-com_fig2_337613690)/acesso 14/04/2020)

Gao et al. (2003) testaram a hipótese de que os sinais negativos acionados pela estimulação da PD-1, concomitante ao bloqueio dos sinais coestimuladores do CD154, facilitariam a tolerância ao aloenxerto das ilhotas de pâncreas. Os autores usaram uma proteína de fusão dimérica da Ig PD-L1 para estimular o receptor inibidor PD-1 e um anticorpo monoclonal para bloquear o CD154. O PD-L1 inibiu a proliferação de células T CD4+ e CD8+ que foram estimuladas por anti-CD3. Esses resultados sugeriram que o envolvimento do receptor negativo PD-1 exibe efeitos imunorreguladores críticos na resposta do aloenxerto e o bloqueio de moléculas coestimuladoras positivas com a entrega ativa de sinais inibitórios poderiam representar uma nova estratégia terapêutica no transplante.

A interação da molécula PD-1 com seus ligantes PD-L1 e PD-L2 representa um mecanismo conhecido de inibição de CT. PD-1 é homólogo de CD28, enquanto os ligantes de PD-1 compartilham homologia com a família B7 de moléculas coestimuladoras. Desta forma, foi estudada a expressão da

superfície e os níveis de transcrição de PD-L1 e PD-L2 em células epiteliais tubulares renais murinas (CET). O estudo demonstrou que PD-L1, mas não PD-L2, foi fracamente expresso nas CET não estimuladas. Após estimulação com INF- $\gamma$  foi observada uma regulação positiva da expressão da PD-L1 dependente da dose. O bloqueio da via PD-L1/PD-1 com anticorpos monoclonais em ensaios de apresentação de antígenos revelou um papel inibitório desse sistema ligante na ativação das células Th1 e Th2. A coloração para PD-L1 foi forte nos túbulos proximal e distal nos transplantes de rim de camundongo com rejeição, enquanto a coloração de rins normais e transplantes de rim de camundongo singênico não revelou expressão de PD-L1. PD-L2 não foi observado em rins normais ou rejeitados (SCHOOP et al., 2004).

Os dados do estudo demonstraram que o PD-L1 é um antígeno epitelial tubular renal induzível, que regula negativamente as respostas das células T desencadeadas pelas CET estimuladas por INF- $\gamma$ . Os autores do trabalho aventaram a possibilidade de que a via PD-1/PD-L1 pudesse desempenhar um papel importante na proteção do epitélio da lesão túbulointerstitial mediada por imunidade (SCHOOP et al., 2004).

Ainda sobre a exploração da via PD-1/PD-L1 e seu papel na tolerância ao transplante, um grupo de pesquisadores americanos, investigou o papel desta via coestimulatória em modelo de tolerância ao transplante. O bloqueio precoce e tardio do PD-L1, mas não de PD-L2, revogou a tolerância induzida por *Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* (CTLA4)-Ig em um modelo de aloenxerto cardíaco totalmente incompatível ao nível do MHC. Os dados do estudo demonstraram o papel crítico da PD-L1 na indução e manutenção da tolerância ao transplante por sua capacidade de alterar o equilíbrio entre CT patogênicas e reguladoras. A expressão de PD-L1 no tecido do doador foi crítica para prevenção da patologia do enxerto in situ e RC (TANAKA et al., 2007).

Os LT reguladores imunes CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> (Treg) desempenham um papel vital na indução e manutenção da autotolerância. São essenciais para a homeostase dos LT, a prevenção da autoimunidade e a indução de tolerância a enxertos alogênicos de doadores. Baseado neste aspecto, foi investigado o papel das células Treg na resposta ao aloantígeno pela via PD-1/PDL-1. Foram utilizados dois modelos, o primeiro modelo foi o de doença de enxerto contra

hospedeiro (GvHD) e um modelo de transplante de pele, para avaliar os mecanismos da via de PD-1/PD-L1. Observou-se que o bloqueio da via PD-1/PD-L1 usando anticorpos monoclonais anti-PD-L1, inibe a capacidade das células Treg de suprimir e restaurar a proliferação de LT CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> *in vitro*. O bloqueio da via PD-1/PD-L1 anula a imunorregulação mediada por Treg, sugerindo que esta via é necessária para a supressão de Treg das respostas alorreativas das CT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, tal achado tem implicações relevantes para o esclarecimento dos mecanismos de rejeição de aloenxertos e GvHD (KITAZAWA et al., 2007).

Ao trabalhar com a busca do papel funcional das vias PD-1/PD-L1 na rejeição de enxertos renais humanos, Starke et al. (2010) trataram CET primárias humanas com *interferon-beta* (INF- $\beta$ ) e INF- $\gamma$  causando um aumento sinérgico e dependente da dose da expressão de PD-L1 e PD-L2. O bloqueio da superfície PD-L1, mas não PD-L2, nas CET tratadas com *interferon*, resultou em um aumento significativo na proliferação de LT CD4<sup>+</sup> e na produção de citocinas pelos LT CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. A expressão de mRNA e proteína PD-L1, PD-L2 e PD-1 foi aumentada em biópsias de pacientes com rejeição de aloenxerto renal em comparação com os respectivos níveis encontrados nas biópsias pré-transplante. O estudo sugeriu que a via epitelial renal PD-1/PD-L1 exerce um efeito inibitório nas respostas alorreativas dos LT. A regulação positiva da PD-L1 nas células epiteliais tubulares proximais em pacientes com RA do aloenxerto pode reduzir a lesão mediada por CT.

A via coestimulatória PD-L1/PD1 desempenha um papel importante na inibição de respostas aloimunes, bem como na indução e manutenção da tolerância periférica. Foi estudado em um modelo de TC, o significado funcional dessa interação nas respostas aloimunes *in vivo*. O bloqueio de PD-1, diferentemente do bloqueio de PD-L1, não conseguiu acelerar a rejeição de aloenxerto, sugerindo um papel para um parceiro de ligação adicional para PD-L1 que não seja PD-1 na rejeição de transplante. Estes dados indicaram que a interação PD-L1 com B7.1 [foi demonstrado que PD-L1 também pode se ligar a B7.1 para inibir respostas de CT *in vitro* - (BUTTE et al., 2007)] desempenha um papel importante na inibição de respostas aloimunes *in vivo* e sugeriu uma direção dominante para a interação PDL1 e B7.1 (YANG et al., 2011).

Os três ligantes identificados para CD80/86, são moléculas coestimulatórias positivas e negativas que, entre outras funções, controlam a motilidade das CT e a formação de sinapse imune entre as CT e as APC, são eles - CD28, CTLA-4 e PD-L1. Utilizando LT humanos alorreativos e anticorpos bloqueadores, os pesquisadores mostraram que a dinâmica destes ligantes, controla a velocidade, a motilidade e a formação de sinapses imunes entre LT efetores (Teff) contra Treg. O direcionamento individual de CD28, CTLA-4 e PD-L1 pode, portanto, representar uma estratégia terapêutica valiosa para o tratamento de desordens imunológicas, onde as funções efectoras e reguladoras das CT precisam ser direcionadas diferencialmente (DILEK et al., 2013).

As variações genéticas das moléculas coestimuladoras podem afetar a extensão da atividade das CT durante a imunidade mediada por CT, especialmente em pacientes transplantados. Zolfaghari et al. (2015) estudaram a associação dos polimorfismos do gene PD-1/PD-L1 com o desfecho clínico do TR. Avaliando 122 pacientes de TR retrospectivamente, eles classificaram os pacientes em dois grupos: rejeição aguda do enxerto (RAE) comprovada por biópsia e função estável do enxerto (FEE) durante os cinco anos de acompanhamento. Quatro polimorfismos de nucleotídeo único em PD-1 e PD-L1 foram determinados nos grupos de pacientes, bem como em 208 indivíduos controle saudáveis. As frequências dos genótipos e alelos PD-1.3 (+7146 G> A), PD-1.9 (+7625 C> T), PD-L1 (8923 A> C) e PD-L1 (+6777 C> G) não foram significativamente diferentes entre os grupos RAE e FEE. No geral, 27 de 122 receptores de enxerto renal sofreram atraso na função do órgão, e uma maior frequência do genótipo PD-1.9 (+7625 C> T) e alelo T foi observada nesse grupo. Da mesma forma, uma alta frequência significativa desse genótipo foi encontrada no subgrupo RAE de pacientes com função tardia do enxerto, demonstrando que a variação genética funcional no PD-1 pode influenciar o resultado do TR.

Pesquisadores chineses investigaram se a deficiência de PD-L1 nas ilhotas pancreáticas doadoras reduz o tempo de sobrevivência do enxerto. Ilhotas isoladas de camundongos deficientes em PD-L1 ou camundongos do tipo selvagem (WT) (C57BL/6j) foram implantadas sob a cápsula renal de camundongos diabéticos BALB / c induzidos por estreptozotocina (STZ). A

deficiência de PD-L1 nas ilhotas não afeta a função das ilhotas, mas a deficiência de PD-L1 da ilhota aumentou a rejeição do aloenxerto e foi associada a maior infiltração de células inflamatórias e alorreatividade das CT do receptor. Com este estudo os pesquisadores demonstraram que a deficiência de PD-L1 acelerou a rejeição de aloenxertos de ilhotas e respostas aloimunes de receptores (MA et al., 2016), trazendo mais esclarecimentos sobre o papel de PD-L1 no âmbito da regulação imune nos transplantes.

As vias coestimulatórias negativas desempenham um papel fundamental na regulação da rejeição de tecidos alogênicos transplantados e várias linhas de evidência demonstraram que as interações PD-1/PD-L1 controlam o enxerto de órgãos sólidos e GVHD (CLARKSON; SAYEGH, 2005; KEAN et al., 2006; VADIVEL; TRIKUDANATHAN; CHANDRAKER, 2007). PD-L1 e PD-L2 podem desempenhar diferentes papéis na indução de tolerância por CD tolerogênicas. A importância do PD-L1 como ligante, tanto nos tecidos quanto nos próprios linfócitos, pode ser central para a tolerância ao enxerto (KEIR et al., 2006).

Um dos mecanismos pelo qual o bloqueio de PD-L1 pode acelerar a rejeição do enxerto é através da prevenção de apoptose das CT. Os anticorpos bloqueadores PD-L1, mas não PD-1 ou PD-L2, induzem a rejeição acelerada em um modelo de transplante de pele usando CT transgênicas aloespecíficas de receptores de CT (SANDNER et al., 2005).

A indução da tolerância ao aloenxerto depende do equilíbrio das CT reguladoras e efetivas, e PD-1 e PD-L1 têm sido implicadas no controle tanto da indução regulatória de CT quanto da geração aumentada de células Teff em modelos de transplante. A perda de PD-1 e PD-L1 por deleção genética ou bloqueio de anticorpos aumenta a geração de células efetoras e a produção de citocinas (BLAZAR et al., 2003; KITAZAWA et al., 2007; TAO et al., 2005), sugerindo que PD-L1 pode regular a tolerância ao transplante controlando o equilíbrio entre células efetoras reguladoras e patogênicas, limitando a expansão de células efetoras reativas na periferia (KEIR et al., 2008).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

- ✧ Avaliar as moléculas HLA-G e PD-L1 em relação a diferentes momentos do transplante renal.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- ✧ Avaliar a associação de diferentes variáveis clínicas e laboratoriais com as dosagens das moléculas HLA-G solúvel e PD-L1 nas amostras de soros de pacientes submetidos a transplante renal a partir do pré-operatório e durante um seguimento definido de pós-transplante (follow-up de 12 meses);
- ✧ Avaliar a associação de diferentes variáveis clínicas e laboratoriais com a dosagem de HLA-G nas amostras de soros de pacientes previamente submetidos a transplante renal em diferentes períodos do pós-transplante;
- ✧ Avaliar a expressão *in situ* das moléculas HLA-G1 e PD-L1 em amostras de tecido renal de pacientes que apresentaram rejeição do enxerto durante o follow-up de 12 meses.

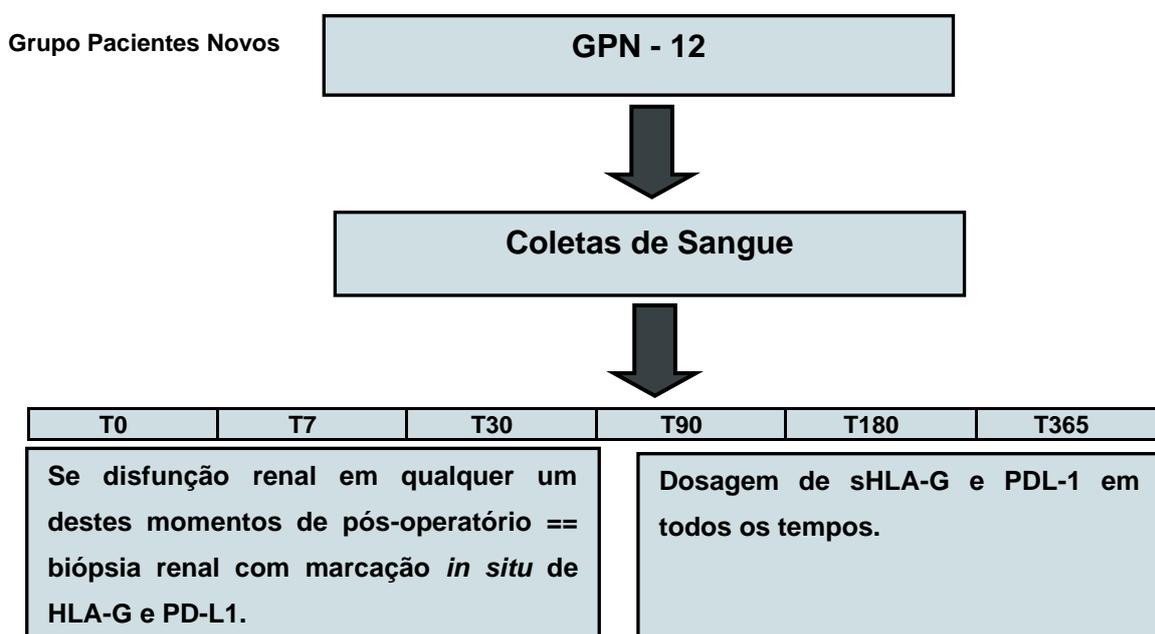
## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Delineamento do Experimental

O estudo foi desenvolvido na Unidade de Transplante Renal da Santa Casa de Misericórdia de Goiânia (SCMG), o mesmo foi autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da SCMG, sob o parecer número 1.123.667 e CAAE 44025015.0.0000.5081 (Anexo B). Todos os pacientes do estudo que aceitaram participar do mesmo, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice E).

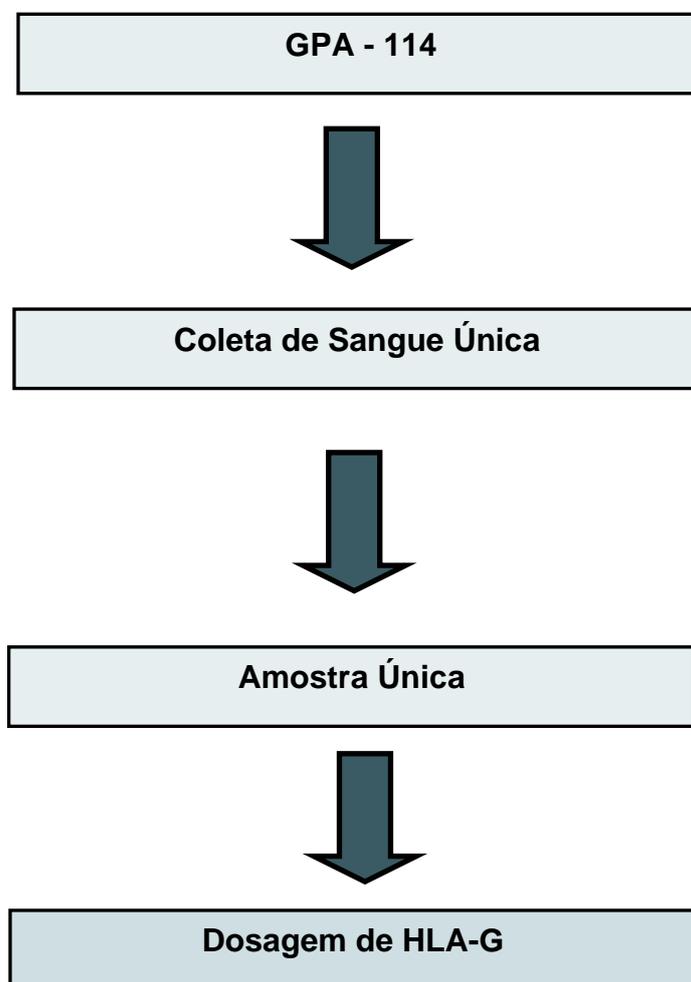
O estudo foi composto por dois grupos distintos de pacientes: **GRUPO PACIENTES NOVOS (GPN)** – estudo prospectivo – os pacientes deste grupo iniciaram o estudo no período pré-transplante renal (coleta de sangue T0), sendo seguidos após o transplante renal por um período de 12 meses, com mais cinco coletas seriadas de sangue (conforme o desenho do estudo). **GRUPO PACIENTES ANTIGOS (GPA)** – estudo transversal – grupo de pacientes já transplantados de longa data que tiveram suas amostras de sangue colhidas em um único momento. Os pacientes do GPN que desenvolveram alteração da função renal e foram submetidos à biópsia renal (Bx), tiveram os espécimes de tecido avaliados para a expressão dos marcadores *in situ*.

### 4.2 Desenho do Estudo



**Legenda:**

- ✧ T0: tempo antes do TR
- ✧ T7: sétimo pós-operatório
- ✧ T30: trinta dias pós-transplante
- ✧ T90: noventa dias pós-transplante
- ✧ T180: cento e oitenta dias pós-transplante
- ✧ T365: trezentos e sessenta e cinco dias pós-transplante

**Grupo Pacientes Antigos**

### 4.3 Seleção dos Pacientes

Foram selecionados pacientes atendidos pela Equipe Nefrovita de Transplante Renal da SCMG, no período de março de 2016 a dezembro de 2017. Os pacientes foram submetidos a coleta de sangue venoso periférico para a avaliação sorológica. Foram submetidos à biópsia renal os pacientes do GPN que apresentaram disfunção do enxerto (rejeição) durante o acompanhamento, e as biópsias foram incluídas na pesquisa.

### 4.4 Critérios de Inclusão

(i) Pacientes submetidos a TR (doador vivo ou doador falecido), acompanhados pela equipe Nefrovita de Transplante Renal – Santa Casa de Goiânia; (ii) estivessem fazendo o primeiro transplante; (iii) mantivessem tempo mínimo de follow-up de 12 meses.

### 4.5 Critérios de Exclusão

(i) Pacientes que não eram acompanhados pela equipe Nefrovita de Transplante Renal; (ii) perderam o follow-up de 12 meses; (iii) estivessem fazendo retransplante e (iv) recusassem a participar do estudo.

### 4.6 Imuno-histoquímica (IHQ)

Foi realizada IHQ nas biópsias de pacientes submetidos ao TR que desenvolveram disfunção do enxerto (rejeição). A avaliação da expressão da molécula HLA-G (todas as isoformas) em biópsias de pacientes transplantados foi realizada por técnica de IHQ utilizando-se o sistema de detecção universal MACH4 Universal HRP Polymer + DAB kit (Biocare, Concord, CA, EUA), segundo protocolo do fabricante, utilizando-se os anticorpos anti-HLA-G (anticorpo monoclonal MEM-G2, Exbio, Praga, República Tcheca) e anti-PD-L1 (MyBioSource, San Diego, Califórnia, EUA). Em cada reação de IHQ, foi incluída uma lâmina de controle positivo (trofoblasto) para os anticorpos HLA-G e PD-L1 e um controle negativo de uma amostra sem a adição do anticorpo primário. A

interpretação foi feita de acordo com a ausência ou presença de coloração e sua intensidade.

A expressão das moléculas HLA-G foi analisada por dois médicos patologistas experientes (duplo cego). Avaliou-se a expressão das moléculas em células pró-inflamatórias de acordo com a presença ou ausência de coloração e sua intensidade. Considerando a seguinte escala: a ausência de coloração foi considerada negativa, (0 para intensidade); presença de imunomarcacão suave foi considerada 1/2++, presença de imunomarcacão moderada/forte foi considerada 3/4++. Cada lâmina foi avaliada em sua totalidade, utilizando-se um microscópio com a objetiva no aumento de 200x e 400x (GONÇALVES et al., 2016).

#### 4.7 ELISA

(I) Os níveis plasmáticos da moléculas sHLA-G foram determinados por meio do teste imunoenzimático ELISA (do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*) realizado no Laboratório multiusuário de biologia molecular da FMRP/USP-RP, coordenado pelo professor Dr. Eduardo Antônio Donadi, utilizando um protocolo validado (REBMANN et al., 2005).

Placas de poliestireno de 96 cavidades (Corning, Nova Iorque, USA) foram incubadas overnight com o anticorpo primário de captura MEM-G/9 (EXBIO, Vestec, Czechia), na diluição 1:100. Esse anticorpo reconhece as isoformas mais abundantes da molécula no plasma: sHLA-G1, isoforma originalmente de membrana, liberada por degradação proteolítica e sHLA-G5, isoforma solúvel. Após a etapa de bloqueio com diluente DAKO por duas horas, 50 µL de plasma de pacientes (pré e pós-tireoidectomia) e indivíduos controles foram transferidas e incubadas por duas horas.

Os complexos sHLA-G/anticorpo anti-HLA-G imobilizados na placa foram detectados por meio do anticorpo secundário de coelho anti-humano β2-microglobulina (DAKO) na diluição 1:10.000. Após uma hora de incubação sob agitação, adicionou-se um anticorpo anti-coelho conjugado com peroxidase (DAKO ENVISION System HRP rabbit) por uma hora. Todas as etapas de incubação foram realizadas em temperatura ambiente. Cada passo foi seguido

de quatro etapas de lavagem com um tampão específico contendo água, PBS 1X e 0,1% de Tween 20 (SIGMA, Saint Louis, Missouri, EUA).

Finalmente, os poços foram incubados com o substrato tetrametilbenzidina (*3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine Liquid Substrate, Supersensitive*, for ELISA – SIGMA - Saint Louis, Missouri, EUA) em sala escura por cerca de 20 minutos e a reação foi interrompida com adição de solução ácida. A absorbância resultante da formação de um produto amarelo foi mensurada por espectrofotometria a 450 nm. As concentrações da molécula HLA-G no plasma foram determinadas utilizando-se uma curva de calibração padrão de cinco pontos (6.25-100 ng/mL) com quantidades conhecidas de HLA-G5. O HLA-G5, utilizado para a construção da curva de calibração, foi obtido de cultura celular de linhagem de melanoma (M8) transfectada com pcDNA contendo o gene HLA-G, de forma que a molécula HLA-G5 é liberada no sobrenadante. Os testes foram realizados em duplicata e os resultados expressos em ng/ml. Como controle negativo, utilizou-se sobrenadante de células M8 transfectadas apenas com o vetor de pcDNA. Quando abaixo do limite detectável, o resultado foi considerado 0 ng/mL.

(II) PD-L1: para detecção da molécula PD-L1 utilizamos o kit da empresa MyBioSource (MyBioSource, San Diego, California, EUA) com faixa de detecção de 2,25-36 ng/L (valor mínimo de detecção 0,1ng/L). Todas as amostras foram analisadas em duplicata.

#### **4.8 Análise Estatística**

O estudo foi composto por dois bancos de dados, designados de “GPA” e “GPN”. Ambos os bancos eram compostos por informações de pacientes que fizeram TR, sendo que o primeiro tinha 33 variáveis que foram correlacionadas com a dosagem de HLA-G, e o segundo banco com 36 variáveis, correlacionadas com a dosagem de HLA-G e dosagem de PD-L1.

Na análise descritiva das variáveis categóricas foram utilizadas as frequências relativas e absolutas, ao passo que na descrição das variáveis numéricas foram utilizadas medidas de posição, tendência central e dispersão, como por exemplo médias, desvios padrão e quartis, além do mínimo e máximo.

Para identificar as variáveis associadas a dosagem de HLA-G do banco do GPA foi realizada a análise univariada, sendo que para variáveis categóricas com mais de duas subcategorias foi utilizado o teste de *Kruskal-Wallis* (HOLLANDER; WOLFE, 1999), para as variáveis categóricas com duas subcategorias foi utilizado o teste de *Mann-Whitney* (HOLLANDER; WOLFE, 1999), e para as variáveis numéricas foi utilizada a correlação de *Spearman* (HOLLANDER; WOLFE, 1999) para avaliar a correlação entre as variáveis de interesse. A correlação de *Spearman* é uma medida limitada entre -1 e 1, sendo que quanto mais próximo o coeficiente estiver de -1 maior a correlação negativa e quanto mais próximo o coeficiente estiver de 1 maior a correlação positiva. Nessa análise foi considerado um nível de significância menor ou igual a 25% para a análise multivariada.

Para verificar os fatores associados a dosagem de HLA-G foi ajustado um modelo de Regressão Log-Linear Gama (MCCULLAGH; NELDER, 1989), uma vez que essa variável era contínua, estritamente positiva e de acordo com os histogramas, observou-se uma tendência decrescente na variável.

No banco de dados "GPN", o método GEE (*Generalized Equations Estimating*) (LIANG; ZEGER, 1986), foi utilizado para identificar as variáveis associadas as dosagens de HLA-G e PD-L1, que é um caminho para contabilizar a correlação existente entre as medidas repetidas dos mesmos indivíduos, visto que as preditoras HLA-G e PDL-1 foram medidas mais de uma vez em tempos diferentes. O método GEE é conhecido como Modelos Marginais e pode ser considerado uma extensão de Modelos Lineares Generalizados (MCCULLAGH; NELDER, 1989) que diretamente incorporam a correlação entre as medidas da mesma unidade amostral. O *software* utilizado nas análises foi o R (*R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2020. Versão 3.5.0*). O valor de  $p$  utilizado foi de  $\leq 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Grupo de Paciente Antigos – Resultados

O GPA foi composto de 114 pacientes transplantados renais, que se encontravam em diferentes tempos do TR, a Tabela 1 (Apêndice A) apresenta os dados gerais destes pacientes.

Os pacientes do sexo masculino representaram 59,65% da amostra; 30,70% dos pacientes na data da coleta já tinham entre 72 e 120 meses de pós-TR; 32,74% dos pacientes tiveram como diagnóstico da doença renal de base causa indeterminada. A hemodiálise (HD) representou 94,74% do tipo de TSR. O tempo prévio de TSR foi de 1-4 anos em 47,62% dos pacientes. O DF constituiu 57,02% dos transplantes renais do GPA.

O tempo de isquemia fria entre 15-24 horas esteve presente em 46,43% dos transplantes; os esquemas de ISS inicial e final com CE+ICN+AP representaram 71,93% e 61,40% dos casos, respectivamente. A taxa de rejeição comprovada por Bx foi de 20,17% no GPA, sendo a rejeição aguda celular (RAC) a com maior número de casos (69,57%). Receberam 1-5 transfusões de sangue antes do TR 55,14% dos pacientes.

A tabela 2 (Apêndice B) apresenta a análise descritiva das variáveis numéricas do GPA. Ressalta-se que, a idade média dos pacientes foi de  $51,12 \pm 11,02$  anos, sendo que o paciente mais novo tinha 20 anos e o mais velho 78 anos; a média da creatinina (CR) na data da coleta foi de 1,34mg/dL. A média da dosagem de HLA-G foi de 12,99ng/mL, sendo que a dosagem máxima encontrada foi de 109,14ng/mL.

Para avaliar os fatores associados a dosagem de HLA-G no GPA foi feita a análise univariada (Tabela 3), sendo selecionados aqueles que apresentaram o valor-*p* menor ou igual a 0,250 para a análise multivariada.

Foi observado que as variáveis sexo, tempo de TSR, tipo de TR, ISS inicial, número de sessões de HD, infecção por citomegalovírus (CMV) e número de episódios de rejeição comprovada por Bx, a princípio não apresentaram indícios de associar-se a dosagem de HLA-G de acordo com o teste.

Tabela 3 – Análise univariada das variáveis categóricas com a dosagem de HLA-G no GPA (n=114), Goiânia-GO, 2020

Variáveis		N	Média	E.P.	Valor-p <sup>*/**</sup>
Sexo	Masculino	68	11,75	1,96	0,152
	Feminino	46	14,82	2,87	
Doença Renal de Base	DM	8	6,72	3,02	0,953
	DRPAD	7	10,23	3,81	
	GN	24	13,82	3,11	
	HAS	25	12,97	3,50	
	INDET	37	14,24	3,72	
	Outras	4	12,28	6,02	
	PNC	8	14,57	5,49	
Tipo de TSR prévia	DP	2	7,93	2,93	0,849
	HD	108	12,85	1,62	
	TTO Conservador	4	19,34	18,60	
Tempo de TSR prévia (anos)	<1	9	9,72	4,69	0,135
	1-4	50	10,60	2,04	
	>4-10	40	14,83	3,20	
	>10	6	25,17	5,91	
Tipo de Transplante	DF	65	15,49	2,31	0,089
	DVNR	6	12,68	9,48	
	DVR	43	9,25	2,23	
TIF (horas)	≤12	3	4,25	3,88	0,768
	>12-15	2	4,82	4,82	
	>15-24	13	12,18	3,45	
	>24	10	9,19	3,59	
FRE	Não	57	11,97	2,55	0,327
	Sim	57	14,01	2,09	
Tempo FRE (dias)	≤7	20	12,52	3,45	0,023
	8-14	20	8,25	2,31	
	15-30	17	22,56	4,47	
Número sessões HD	1-5	32	10,18	2,36	0,137
	6-10	24	18,53	3,67	
	11-15	2	14,62	9,52	
Indução	Não	87	13,65	1,94	0,587
	Sim	27	10,86	3,05	
ISS inicial	CE+AZA	1	0,00	NA	0,197
	CE+ICN	1	2,24	NA	
	CE+ICN+AP	82	14,42	1,98	
	CE+ICN+AZA	30	9,88	3,03	

Tabela 3 – Análise univariada das variáveis categóricas com a dosagem de HLA-G no GPA (n=114), Goiânia-GO, 2020. Conclusão

Variáveis	N	Média	E.P.	Valor-p */**	
ISS da data da coleta	CE+AP	9	14,46	5,28	0,343
	CE+ICN	8	4,42	2,87	
	CE+ICN+AP	70	13,13	2,17	
	CE+ICN+AZA	12	8,06	2,85	
	CE+MTOR	4	40,59	15,44	
	CE+MTOR+AP	4	12,56	5,03	
	CE+MTOR+ICN	5	11,82	7,69	
	OUTROS	2	14,09	10,78	
Episódios de rejeição-Bx	1	20	14,32	4,51	0,115
	2	3	0,00	0,00	
	Nenhum	91	13,13	1,80	
Tipo de Rejeição	Outros	3	2,39	1,48	0,333
	RAC	16	12,76	3,84	
	RC	2	37,55	37,55	
	RMA	2	0,00	0,00	
Infecção por CMV	Não	104	13,62	1,78	0,216
	Sim	10	6,41	2,49	
Tranfusão pré-TR	Nenhuma	34	11,41	3,02	0,297
	1 a 5	59	14,15	2,36	
	6 a 10	11	9,69	5,31	
	>10	3	9,79	9,79	
Gestação	Nenhuma	17	20,49	6,50	0,557
	1	9	10,54	2,84	
	2	7	7,91	3,47	
	3	6	8,85	5,52	
	≥4	6	17,58	8,52	

GPA-grupo de pacientes antigos; EP-erro padrão ; DM-Diabetes mellitus; DRPAD-doença renal policística autossômica dominante; GN-glomerulonefrite; HAS-hipertensão arterial sistêmica; INDET-indeterminada; PNC-pielonefrite crônica; DP-diálise peritoneal; HD-hemodiálise; TTO-tratamento; DF-doador falecido; DVR-doador vivo relacionado; DVNR-doador vivo não relacionado; ISS-imunossupressão; CE-corticoide; AZA-azatioprina; ICN-inibidor da calcineurina; MTOR-inibidor da M-TOR; AP-antiproliferativo; RAC-rejeição aguda celular; RC-rejeição crônica; RMA-rejeição mediada por anticorpos; TSR-terapia de substituição renal; TIF-tempo de isquemia fria; CMV-citomegalovírus; FRE-função retardada do enxerto ; Bx-biópsia renal; TR-transplante renal. \*Kruskal-Wallis/\*\*Mann-Whitney.

Houve diferença significativa da dosagem de HLA-G entre os tempos de FRE, sendo que no *Post-Hoc* aplicado o teste de *Nemenyi*, a FRE entre 8 e 14 dias apresentou menor dosagem de HLA-G do que a de tempo entre 15 e 30.

A tabela 4 apresenta a Correlação de *Spearman* das variáveis numéricas do estudo que apresentaram o valor de  $p$  menor ou igual a 0,250, e nenhuma se correlacionou com a dosagem do HLA-G.

Tabela 4 - Correlação entre as variáveis numéricas e a dosagem de HLA-G no GPA (n=114), Goiânia-GO, 2020.

Variáveis	HLA-G	
	r *	p
Idade (anos)	0,09	0,337
CR da alta (mg/dL)	0,04	0,654
CR-1ano (mg/dL)	-0,07	0,432
CR-COL (mg/dL)	-0,09	0,343
TFG-1 (mL/min)	-0,02	0,833
TFG-COL (mL/min)	-0,01	0,892

ID-idade; COL-coleta; CR-creatinina; TFG-taxa de filtração glomerular; 1-com um ano de TR. \*Dados avaliados através da correlação de *Spearman*.

A Tabela 5 apresenta o modelo multivariado inicial e final das variáveis que influenciaram de forma significativa a dosagem de HLA-G.

Observou-se que quando comparados a pacientes que fizeram de 1 a 5 sessões de HD, pacientes que fizeram de 6 a 10 sessões apresentaram um aumento de 105,4% na dosagem de HLA-G ( $p=0,02$ ).

Pacientes em uso ISS inicial com CE+ICN+AZA apresentaram uma dosagem de HLA-G 87,9% ( $p<0,001$ ) menor que pacientes em uso do esquema CE+ICN+AP, portanto o esquema CE+ICN+AZA associou-se a uma menor dosagem de HLA-G neste grupo de pacientes. Os pacientes que tiveram 1 ou 2 episódios de rejeição comprovada por Bx, quando comparados a pacientes sem nenhum episódio, apresentaram a dosagem de HLA-G 97,8% e 80,1% menores ( $p<0,001$ ), respectivamente. Pacientes infectados por CMV tiveram uma dosagem de HLA-G 84,1% menor que os pacientes que não foram infectados pelo CMV ( $p=0,006$ ).

Tabela 5 – Análise multivariada das variáveis em relação à dosagem de HLA-G no GPA (n=114), Goiânia-GO, 2020

Variáveis	Modelo Inicial *				Modelo Final *			
	Exp{ $\beta$ }	E.P.( $\beta$ )	I.C. 95%	Valor-p	Exp{ $\beta$ }	E.P.( $\beta$ )	I.C. 95%	Valor-p
Sexo -- Masculino	1,000	-	-	-				
Feminino	1,041	0,24	[0,65; 1,66]	0,869				
Tempo TSR prévio (anos) < 1	1,000	-	-	-				
> 1-4	0,423	0,61	[0,13; 1,40]	0,165				
> 4-10	0,741	0,65	[0,21; 2,65]	0,65				
> 10	0,625	0,83	[0,12; 3,18]	0,572				
Tipo de TR -- DF	1,000	-	-	-				
DVNR	1,051	0,88	[0,19; 5,90]	0,951				
DVR	0,357	0,97	[0,05; 2,39]	0,293				
Tempo FRE (dias) -- <= 7	1,000	-	-	-				
8-14	0,763	0,48	[0,30; 1,96]	0,571				
15-30	1,768	0,65	[0,49; 6,32]	0,389				
Número sessões HD -- 1-5	1,000	-	-	-	1,000	-	-	-
6-10	1,537	0,52	[0,55; 4,26]	0,416	2,054	0,3	[1,14; 3,70]	<b>0,02</b>
11-15	0,375	0,97	[0,06; 2,51]	0,317	0,726	0,81	[0,15; 3,55]	0,693
ISS inicial -- CE+ICN+AP	1,000	-	-	-	1,000	-	-	-
CE+ICN+AZA	0,106	0,62	[0,03; 0,36]	<b>0,001</b>	0,121	0,51	[0,04; 0,33]	<b>&lt;0,001</b>
Episódio rejeição-Bx - Nenhum	1,000	-	-	-	1,000	-	-	-
1	0,061	0,75	[0,01; 0,26]	<b>0,001</b>	0,022	0,54	[0,01; 0,06]	<b>&lt;0,001</b>
2	0,435	0,48	[0,17; 1,12]	0,093	0,199	0,43	[0,09; 0,46]	<b>&lt;0,001</b>
Infecção CMV ----- Não	1,000	-	-	-	1,000	-	-	-
Sim	0,141	0,66	[0,04; 0,51]	<b>0,005</b>	0,159	0,64	[0,05; 0,56]	<b>0,006</b>

GPA-grupo de pacientes antigos; Exp( $\beta$ )-exponencial beta; EP ( $\beta$ )-erro padrão beta; IC-intervalo de confiança; TSR-terapia substituição renal; TR-transplante renal; DF-doador falecido; DVR-doador vivo relacionado; DVNR-doador vivo não relacionado; FRE-função retardada do enxerto; HD-hemodiálise; ISS-imunossupressão; CE-corticoide; ICN-inibidor da calcineurina; AZA-azatioprina; AP-antiproliferativo; CMV-citomegalovírus. \*Regressão Log-Linear Gama.

## 5.2 Grupo de Pacientes Novos – Resultados

O GPN foi composto inicialmente por 12 pacientes que foram seguidos de acordo com protocolo do estudo do período pré-TR (antes de iniciar a imunossupressão) até os 365 dias de pós-TR. Ao longo do estudo houve perda de dois enxertos (uma perda por trombose de artéria renal, ocorrida nas

primeiras horas pós-TR e uma perda por infarto renal, no T30 do estudo). Desta forma, a fase de análise final do estudo contabilizou 10 pacientes sob seguimento de um ano. A Tabela 6 (Apêndice C) apresenta as variáveis categóricas do GPN.

A maioria dos pacientes era do sexo masculino (83,33%); a média de idade foi  $40,83 \pm 11,69$  anos; a GN foi o diagnóstico de doença renal de base mais prevalente, presente em 41,67% dos pacientes. O DF foi o tipo de TR mais realizado (83,33%).

O TIF entre >15-24 horas esteve presente em 60% dos casos; 9 pacientes apresentaram FRE (75%). A taxa de rejeição comprovada por Bx foi de 25% na amostra e a RAC foi constatada em 66,67% dos casos de rejeição. Ocorreram duas perdas de enxerto renal (16,67%) ambas devido a causas vasculares. A porcentagem de pacientes que receberam entre 1-5 transfusões sanguíneas foi de 41,67%.

A Tabela 7 (Apêndice D) apresenta as variáveis numéricas estratificadas pelo tempo de coleta. Observou-se que, a CR apresentou níveis menores com o passar do tempo, sendo que em T0, seu valor médio foi de 8,17mg/dL e em T365 de 1,75mg/dL. A taxa de filtração glomerular (TFG) apresentou aumento ao longo do tempo, sendo que a média foi de 51,15ml/min em T365. A molécula HLA-G apresentou diminuição da dosagem média de T0 até T30, entre T30 e T90 houve um aumento, e já em T365 a dosagem média foi menor que em T0. A média da dosagem de PD-L1 em T365 foi de 5,17ng/L.

A Tabela 8 apresenta a análise univariada dos possíveis fatores relacionados a dosagem de HLA-G. Houve associação significativa do sexo sob a dosagem de HLA-G, sendo que paciente do sexo feminino apresentou a dosagem de HLA-G 42,9% menor quando comparado ao sexo masculino.

O paciente que recebeu rim de DVR, teve a dosagem de HLA-G 146,5% maior do que aquele que recebeu rim de DF. Houve influência significativa do número de episódios de rejeição comprovada por Bx na dosagem de HLA-G, sendo que os pacientes que passaram por 2 episódios de rejeição tiveram uma diminuição de 52,4% na dosagem de HLA-G. Quando comparado a um paciente que apresentou RAC, um paciente que apresentou rejeição mediada por anticorpos (RMA), teve a dosagem de HLA-G 41,2% menor. Pacientes que

tiveram perda do enxerto apresentaram a dosagem de HLA-G 47,9% maior quando comparados àqueles sem a perda rim transplantado.

Quando comparado a um paciente que não fez nenhuma transfusão pré-TR, um paciente que fez entre 6 a 10 transfusões apresentou um aumento na dosagem de HLA-G de 90,9%. Houve associação do tempo em relação a dosagem de HLA-G, observou-se que com o passar do tempo a dosagem diminuiu de forma significativa, quando comparado ao tempo T0.

Tabela 8 – Análise univariada dos fatores que influenciaram a dosagem de HLA-G no GPN (n=10), Goiânia-GO, 2020

Variáveis	Exp{ $\beta$ }	E.P.( $\beta$ )	I.C. 95%	Valor-p
Sexo -- Masculino	1,000	-	-	-
Feminino	0,571	0,21	[0,38: 0,86]	<b>0,009</b>
Tempo de TSR prévia (anos) -- 1 a 4	1,000	-	-	-
>4-10	1,209	0,32	[0,65: 2,26]	0,547
Tipo de transplante -- DF	1,000	-	-	-
DVR	2,465	0,18	[1,73: 3,51]	<b>&lt;0,001</b>
TIF (horas) -- >15-24	1,000	-	-	-
>24	1,120	0,26	[0,67: 1,86]	0,659
Episódios de rejeição-Bx -- Nenhum	1,000	-	-	-
1	0,811	0,26	[0,49: 1,35]	0,411
2	0,476	0,18	[0,33: 0,68]	<b>&lt;0,001</b>
Tipo de Rejeição -- RAC	1,000	-	-	-
RMA	0,588	0,18	[0,41: 0,84]	<b>0,003</b>
Perda do Enxerto -- Não	1,000	-	-	-
Sim	1,479	0,20	[1,00: 2,19]	<b>0,045</b>
Transfusão pré-TR -- Nenhuma	1,000	-	-	-
1-5	1,196	0,32	[0,64: 2,24]	0,572
6-10	1,909	0,11	[1,54: 2,37]	<b>&lt;0,001</b>
Creatinina (mg/dL)	1,064	0,03	[1,00: 1,13]	<b>0,064</b>
Taxa de Filtração Glomerular (mL/min)	0,998	0,00	[1,00: 1,00]	0,62
Tempo -- T0	1,000	-	-	-
T7	0,869	0,34	[0,45: 1,69]	0,682
T30	0,370	0,21	[0,25: 0,56]	<b>&lt;0,001</b>
T90	0,490	0,25	[0,30: 0,80]	<b>0,004</b>
T180	0,313	0,20	[0,21: 0,46]	<b>&lt;0,001</b>
T365	0,331	0,24	[0,21: 0,53]	<b>&lt;0,001</b>

GPN-grupo de pacientes novos; EP-erro padrão; IC-intervalo de confiança; Exp( $\beta$ )-exponencial beta; TSR-terapia substituição renal; DF-doador falecido; DVR-doador vivo relacionado; TIF-tempo de isquemia fria; FRE-função retardada do enxerto; Bx-biópsia renal; RAC-rejeição aguda celular; RMA-rejeição mediada por anticorpos; TR-transplante renal.

Para a análise multivariada dos dados, foi ajustado um Modelo Linear Marginal multivariado, utilizando-se das variáveis selecionadas na análise univariada com  $p$  menor ou igual a 0,250. A Tabela 9 apresenta o modelo multivariado inicial e final, no qual se verificou as variáveis que se associaram de forma significativa a dosagem de HLA-G. Observou-se associação significativa do sexo em relação à dosagem de HLA-G, sendo que pacientes do sexo feminino apresentaram uma dosagem de HLA-G 81,4% ( $p=0,001$ ) maior que pacientes do sexo masculino.

Tabela 9 – Análise multivariada das variáveis sob a dosagem de HLA-G no GPN (n=10), Goiânia-GO, 2020

Variáveis	Modelo Inicial*				Modelo Final*			
	Exp{ $\beta$ }	E.P.( $\beta$ )	I.C. 95%	Valor-p	Exp{ $\beta$ }	E.P.( $\beta$ )	I.C. 95%	Valor-p
Sexo -- Masculino	1,000	-	-	-	1,000	-	-	-
Feminino	2,155	0,21	[1,26; 2,60]	<b>&lt;0,001</b>	1,814	0,18	[1,18; 1,97]	<b>0,001</b>
Tipo de transplante -- DF	1,000	-	-	-	1,000	-	-	-
DVR	3,004	0,00	[3,00; 3,00]	<b>&lt;0,001</b>	2,435	0,14	[1,84; 3,22]	<b>&lt;0,001</b>
Episódios de rejeição-Bx-Nenhum	1,000	-	-	-	1,000	-	-	-
1	0,343	0,14	[0,26; 0,45]	<b>&lt;0,001</b>	0,349	0,09	[0,29; 0,42]	<b>&lt;0,001</b>
2	0,281	0,20	[0,19; 0,42]	<b>&lt;0,001</b>	0,304	0,09	[0,25; 0,36]	<b>&lt;0,001</b>
Perda do Enxerto -- Não	1,000	-	-	-				
Sim	1,086	0,18	[0,77; 1,54]	0,640				
Transfusão pré-TR -- Nenhuma	1,000	-	-	-				
1-5	1,064	0,21	[0,71; 1,59]	0,763				
6-10	2,143	0,19	[1,47; 3,13]	<b>&lt;0,001</b>				
Tempo -- T0	1,000	-	-	-	1,000	-	-	-
T7	0,644	0,26	[0,39; 1,07]	0,087	0,637	0,24	[0,40; 1,03]	0,064
T30	0,330	0,12	[0,26; 0,42]	<b>&lt;0,001</b>	0,326	0,11	[0,26; 0,41]	<b>&lt;0,001</b>
T90	0,468	0,29	[0,27; 0,82]	<b>0,008</b>	0,44	0,27	[0,26; 0,75]	<b>0,002</b>
T180	0,292	0,28	[0,17; 0,50]	<b>&lt;0,001</b>	0,288	0,25	[0,18; 0,47]	<b>&lt;0,001</b>
T365	0,281	0,30	[0,16; 0,51]	<b>&lt;0,001</b>	0,295	0,29	[0,17; 0,52]	<b>&lt;0,001</b>

GPN-grupo de pacientes novos; EP-erro padrão; IC-intervalo de confiança; Exp( $\beta$ )-exponencial beta; DF-doador falecido; DVR-doador vivo relacionado; Bx-biópsia renal; TR-transplante renal. \*Modelo Linear Multivariado

O paciente que recebeu um enxerto de DVR teve um aumento na dosagem de HLA-G de 143,5% ( $p<0,001$ ) em comparação ao paciente que recebeu rim de DF. Houve associação significativa do número de episódios de rejeição comprovados por Bx sob a dosagem de HLA-G, sendo que paciente que passou por um episódio teve diminuição da dosagem de HLA-G em 65,1% ( $p<0,001$ ), e um paciente que passou por 2 episódios de rejeição reduziu a

dosagem de HLA-G em 69,6% ( $p<0,001$ ), quando comparados a um paciente que não teve nenhum episódio

A variável Tempo apresentou associação com a dosagem de HLA-G, com o passar do tempo houve diminuição da dosagem, quando comparado ao tempo T0. Mediante isto, no tempo T30 um paciente apresentou uma diminuição de 67,4% da dosagem de HLA-G (Figura 6).

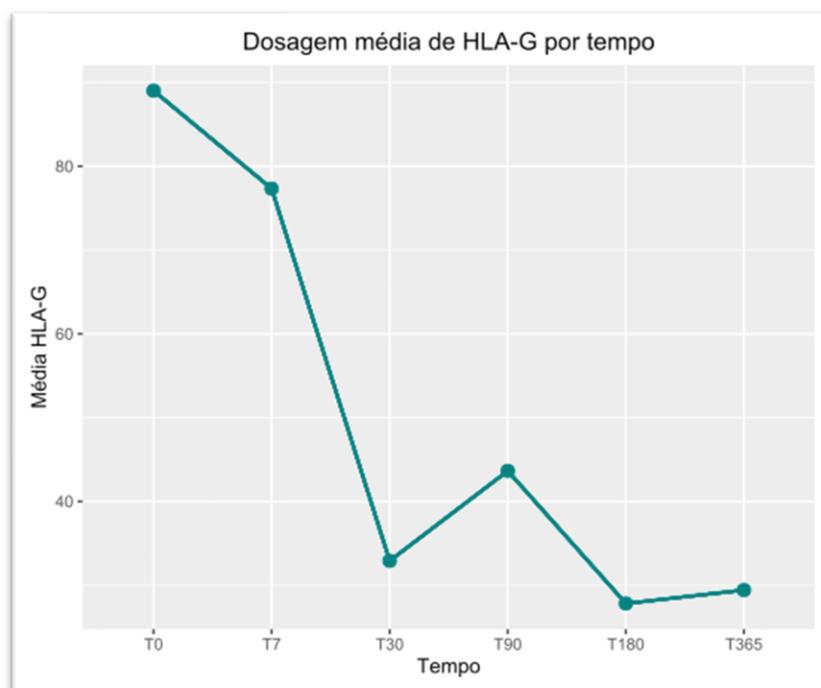


Figura 6 - Evolução da dosagem de HLA-G em relação variável Tempo – GPN (n=10)

A Tabela 10 apresenta a análise univariada das variáveis independentes quanto a variável dosagem de PD-L1. A doença renal de base apresentada pelo paciente associou-se à dosagem de PD-L1, sendo que, quando comparado a um paciente com doença renal de base HAS, pacientes que tinham as patologias: DM, GN e DRPAD evidenciaram, respectivamente, um aumento de 578,8% e uma diminuição de 41,7% e 55,5% na dosagem de PD-L1. O TIF associou-se significativamente a dosagem de PD-L1, paciente que apresentou um TIF superior a 24 horas evidenciou uma diminuição de 72,7% na dosagem da molécula, quando comparados aos pacientes com TIF entre >15-24 horas.

O paciente que apresentou um episódio de rejeição teve um aumento de 302,1% na dosagem de PD-L1 tendo como base aquele que não apresentou nenhum episódio de rejeição. O tipo de rejeição apresentada pelo paciente foi

Tabela 10 - Análise univariada das variáveis em relação a dosagem de PD-L1 no GPN (n=10), Goiânia-GO, 2020

Variáveis	Exp ( $\beta$ )	E.P.( $\beta$ )	I.C. 95%	Valor-P
Sexo -- Masculino	1,000	-	-	-
Feminino	2,916	0,73	[0,70: 12,19]	0,142
Doença Renal de Base -- HAS	1,000	-	-	-
DM	6,788	<0,01	[6,66: 6,92]	<b>&lt;0,001</b>
GN	0,583	0,19	[0,40: 0,85]	<b>0,005</b>
DRPAD	0,445	0,07	[0,39: 0,51]	<b>&lt;0,001</b>
INDET	2,939	0,58	[0,94: 9,16]	0,062
Tempo de TSR prévia (anos) -- 1 a 4	1,000	-	-	-
>4-10	0,997	0,82	[0,20: 4,97]	0,997
TIF (horas) -- >15-24	1,000	-	-	-
>24	0,273	0,49	[0,10: 0,71]	<b>0,008</b>
FRE -- Não	1,000	-	-	-
Sim	2,236	0,54	[0,78: 6,44]	0,138
Episódios de rejeição-Bx -- Nenhum	1,000	-	-	-
1	4,021	0,61	[1,22: 13,29]	<b>0,023</b>
2	0,855	0,55	[0,29: 2,51]	0,777
Tipo de Rejeição -- RAC	1,000	-	-	-
RMA	0,213	0,26	[0,13: 0,35]	<b>&lt;0,001</b>
Perda do enxerto -- Não	1,000	-	-	-
Sim	0,615	0,49	[0,24: 1,61]	0,326
ISS final -- CE+ICN+AP	1,000	-	-	-
CE+MTOR+ICN	9,385	0,16	[6,86: 12,84]	<b>&lt;0,001</b>
CE+MTOR+AP	0,602	0,17	[0,43: 0,84]	<b>0,003</b>
Transfusão pré-TR -- Nenhuma	1,000	-	-	-
1-5	0,170	0,45	[0,07: 0,41]	<b>&lt;0,001</b>
6-10	0,137	0,39	[0,06: 0,29]	<b>&lt;0,001</b>
Gestação -- Nenhuma	1,000	-	-	-
$\geq 4$	5,843	<0,01	[5,73: 5,96]	<b>&lt;0,001</b>
Creatinina (mg/dL)	0,920	0,07	[0,80: 1,06]	0,228
Taxa de Filtração Glomerular (mL/min)	0,986	0,01	[0,97: 1,01]	<b>0,064</b>
Tempo -- T0	1,000	-	-	-
T7	0,713	0,23	[0,45: 1,12]	<b>0,135</b>
T30	4,650	0,8	[0,97: 22,31]	<b>0,054</b>
T90	1,034	0,33	[0,54: 1,97]	<b>0,918</b>
T180	0,644	0,21	[0,43: 0,97]	<b>0,032</b>
T365	6,204	0,84	[1,20: 32,19]	<b>0,029</b>

GPN-grupo pacientes novos; EP-erro padrão; IC-intervalo de confiança; Exp( $\beta$ )-exponencial beta; HAS-hipertensão arterial sistêmica; DM-diabetes mellitus; GN-glomerulonefrite; DRPAD-doença renal policística dominante, INDET-indeterminada; TSR-terapia substituição renal; TIF-tempo de isquemia fria; FRE-função retardada do enxerto; Bx-biópsia renal; RAC-rejeição aguda celular; RMA-rejeição mediada por anticorpos; CE-corticoide; ICN-inibidor de calcineurina; AP-anti-proliferativo; M-TOR-inibidor da M-TOR; TR-transplante renal.

associado a variável desfecho PD-L1, sendo que, quando comparado a um indivíduo com RAC, um paciente com RMA teve uma diminuição de 78,7% na dosagem de PD-L1.

A variável ISS final associou-se significativamente a dosagem de PD-L1, sendo que, quando comparado a um paciente que recebeu ISS final com CE+ICN+AP, indivíduos que receberam ISS final com CE+MTOR+ICN ou a CE+MTOR+AP apresentaram, respectivamente, um aumento de 838,5% e uma diminuição de 39,8% na dosagem de PD-L1. Os pacientes que receberam de 1 a 5 ou de 6 a 10 transfusões no pré-TR evidenciaram, respectivamente, diminuições de 83% e 86,3% na dosagem de PD-L1 quando comparados a não receber transfusão.

Para a análise multivariada dos dados relacionados ao PD-L1 (Tabela 11), foi ajustado um Modelo Linear Marginal multivariado, utilizando-se as variáveis selecionadas na análise univariada.

Tabela 11 – Análise multivariada das variáveis sob a dosagem de PD-L1 no GPN (n=10), Goiânia-GO, 2020

Variáveis	Modelo Inicial				Modelo Final			
	Exp ( $\beta$ )	E.P.	I.C. 95%	Valor-p	Exp ( $\beta$ )	E.P.	I.C. 95%	Valor-p
Sexo -- Masculino	1,000	-	-	-	1,000	-	-	-
Feminino	2,925	0,19	[2,02: 4,24]	<b>&lt;0,001</b>	4,572	0,00	[4,57: 4,57]	<b>&lt;0,001</b>
Episódios de rejeição-Bx -- Nenhum	1,000	-	-	-	1,000	-	-	-
1	1,268	0,18	[0,89: 1,80]	0,178	0,537	0,59	[0,17: 1,71]	0,294
2	0,596	0,30	[0,33: 1,07]	0,080	0,546	0,11	[0,44: 0,68]	<b>&lt;0,001</b>
Transfusão pré-TR ----- Nenhuma	1,000	-	-	-	1,000	-	-	-
1-5	0,365	0,26	[0,22: 0,61]	<b>&lt;0,001</b>	0,169	0,60	[0,05: 0,55]	<b>0,003</b>
6-10	0,543	0,29	[0,31: 0,96]	<b>0,033</b>	0,176	0,59	[0,06: 0,56]	<b>0,003</b>
Tempo -- T0	1,000	-	-	-				
T7	0,909	0,15	[0,68: 1,22]	0,534				
T30	1,589	0,48	[0,62: 4,07]	0,335				
T90	0,859	0,28	[0,50: 1,49]	0,584				
T180	0,757	0,19	[0,52: 1,10]	0,150				
T365	4,519	0,79	[0,96: 21,26]	0,056				

GPN-grupo de pacientes novos; EP-erro padrão; IC-intervalo de confiança; Exp( $\beta$ )-exponencial beta Bx-biópsia renal; TR-transplante renal. \*Modelo Linear Multivariado

Observou-se uma associação significativa da dosagem de PD-L1 em pacientes do sexo feminino (aumento de 357,2% com de  $p < 0,001$ ) quando comparado a pacientes do sexo masculino. Os episódios de rejeição

comprovados por Bx influenciaram significativamente na dosagem de PD-L1, sendo que, quando comparado a um indivíduo que não apresentou nenhum episódio, um indivíduo que teve 2 episódios de rejeição apresentou uma diminuição de 45,4% na dosagem de PD-L1 ( $p < 0,001$ ).

Ao analisar a transfusão de sangue, os indivíduos que receberam de 1-5 ou 6-10 transfusões na fase pré-TR apresentaram, respectivamente, diminuições de 83,1% e 82,4% na dosagem PDL-1 ( $p = 0,003$ ).

A expressão de HLA-G e PD-L1 nas biópsias realizadas para os pacientes do GPN que apresentaram disfunção do enxerto renal durante o seguimento de um ano, estão apresentadas na Figura 7. Foi observada imunomarcção heterogênea granular para HLA-G em todas as lâminas avaliadas, havendo variação no grau de intensidade, entre 1 e 4+. A marcação foi observada principalmente, em citoplasma de túbulos renais. A parede vascular e o interstício não marcaram. Em relação a reação para a detecção de PD-L1, não foi observada marcação em nenhuma das amostras avaliadas.

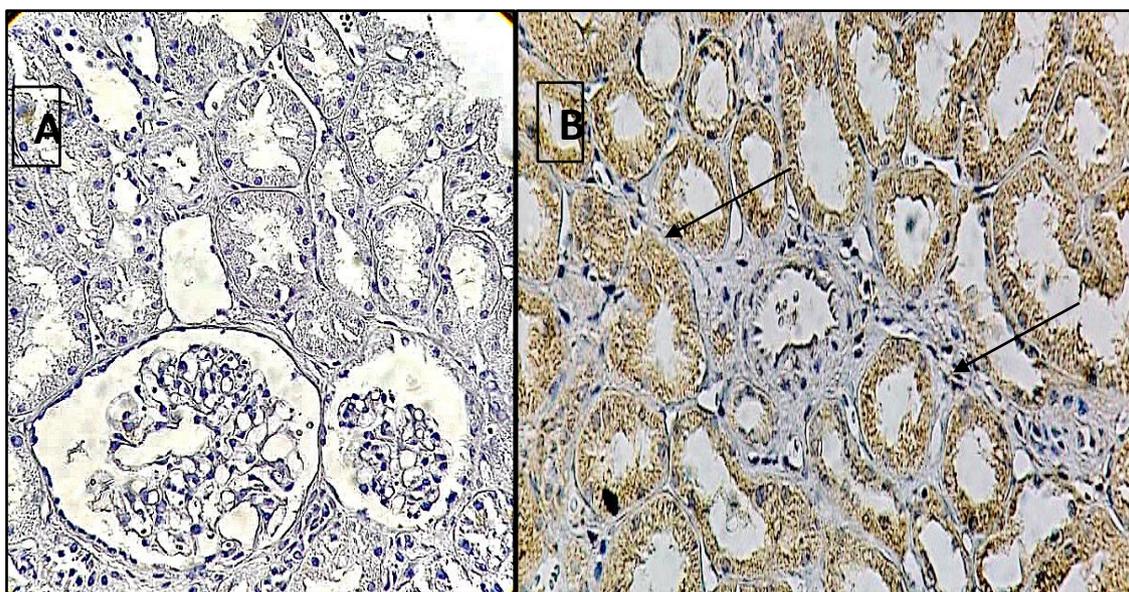


Figura 7 – Imuno-histoquímica da marcação de PD-L1 (marcação negativa - painel A) e para HLA-G (painel B) nas biópsias dos pacientes do GPN (n=9)

As tabelas 12 e 13 apresentam a distribuição da marcação da expressão de HLA-G nas Bx na IHQ. Observou-se uma forte intensidade de HLA-G no tecido renal, sendo que 77,78% das Bx estavam nesta categoria descritiva. A

porcentagem de células marcadas moderadamente foi de 44,44% nas amostras avaliadas. As médias de células e HLA-G no tecido renal para análise foram de 62,78% e 68,72%, respectivamente.

Tabela 12 – Análise descritiva das variáveis categóricas das Bx do GPN (n=9), Goiânia-GO, 2020

Variáveis	Intensidade	N	%
Extensão Cruzes- Quantidade de HLA-G no tecido renal	Forte	7	77,78%
	Moderada	2	22,22%
Porcentagem de células marcadas	Forte	2	22,22%
	Moderada	4	44,44%
	Fraca	3	33,33%

GPN- grupo de pacientes novos; Bx-biópsia renal.

Tabela 13 – Análise descritiva das variáveis numéricas das Bx do GPN (n=9), Goiânia-GO, 2020.

Variáveis	N válidos	Média±DP	Mín.	Máx.
% células	9	62,78±19,54	30	90
HLA-G	9	68,72±14,83	46,43	88,83

GPN- grupo de pacientes novos; Bx-biópsia renal; DP-desvio padrão; Min-mínimo; Máx-máximo.

## 6 DISCUSSÃO

A presente pesquisa é a primeira em Goiás que se propôs a avaliar as moléculas HLA-G e PD-L1 em pacientes transplantados renais. O HLA-G e PD-L1 são moléculas com importante ação tolerogênica, o que no contexto do transplante é um objetivo desejado e relevante, pois os enxertos teriam um tempo funcional mais longo e ausência dos eventos adversos causados pela imunossupressão.

Neste estudo avaliou-se HLA-G e PD-L1 no TR, buscando encontrar fatores associados ao aumento e diminuição destas moléculas no sangue dos pacientes transplantados, o que poderia talvez estar relacionado a um melhor ou pior prognóstico, respectivamente. Desta maneira, trabalhou-se com dois grupos de indivíduos - GPA e GPN, o motivo da abordagem de tais grupos foi verificar como a dosagem de HLA-G comporta-se com a evolução do transplante ao longo dos anos (GPA) e em transplantes recentes (GPN). Já em relação ao PD-L1 foi verificar o comportamento da dosagem da molécula nos pacientes de transplante recente, durante um follow-up de 12 meses, tendo em vista que não houve condições de acompanhar sua dosagem no grupo de pacientes previamente transplantados.

O perfil demográfico dos 114 indivíduos que compuseram o GPA, apresentou pacientes com média de idade  $51,12 \pm 11,02$  anos, sendo a maioria do sexo masculino (59,65%) e as duas principais causas de doença renal de base foram a indeterminada (32,74%) seguida por GN (21,24%). No estudo de Qiu et al. (2006) foi investigada a presença de sHLA-G em amostras séricas de 65 indivíduos de TR, o grupo de pacientes apresentou uma média de idade de  $44,3 \pm 12,2$  anos e 69,23% deles eram do sexo masculino. No presente estudo talvez a média de idade tenha sido um pouco mais elevada, pois muitos dos indivíduos da pesquisa já haviam sido transplantados entre 10-15 anos (29,82%), o que pode ter elevado a média de idade do grupo, quando comparados a faixa dos pacientes do estudo de Qiu. Já em relação ao sexo não houve diferença tão acentuada entre as duas séries.

Em pesquisa de grupo brasileiro sobre a expressão qualitativa de HLA-G em enxertos renais, as causas indeterminada (42,10%) e HAS (26,03%) foram

as doenças de base mais prevalentes, e nesta série o DF representou 71,23% dos TR (CRISPIM et al., 2008). No estudo em questão, a causa indeterminada também foi a mais prevalente, o que mostra a limitação de se fazer diagnóstico da doença renal de base quando os indivíduos chegam para o tratamento nefrológico, pois os pacientes chegam tardiamente aos serviços de saúde, o que impossibilita o adequado diagnóstico. No GPA o transplante renal com DF foi responsável por 57,02% dos casos, talvez a razão para esta característica possa estar relacionada ao início mais tardio do transplante renal com DF em Goiás, cujo primeiro caso ocorreu em 1998 (informação da própria autora).

A terapia de substituição renal mais utilizada pelos pacientes deste grupo foi a HD (94,74%), em 46,43% dos TR o TIF esteve entre >15-24 horas. Em relação a utilização de HD como TSR, Piancatelli et al.(2020a) encontram que 81% dos pacientes de sua série utilizaram esta terapia como tratamento da DRCT e o TIF foi de  $11,45 \pm 3.31$  horas. Uma possível explicação para HD ter sido a terapia dialítica mais utilizada em Goiânia, provavelmente ocorreu pela preferência pessoal dos pacientes, pois a realização da terapia em si, não depende deles e sim das unidades de diálise. Outro fator de possível contribuição seja, a rede de clínicas de hemodiálise da região, que oferecem acessível número de vagas e boas estrutura e assistência. Okushi et al. (2017) observaram um TIF médio de 15 horas em seu estudo, uma possível explicação para a diferença encontrada em relação ao longo TIF no presente estudo, seja a estrutura funcional do sistema de TR no estado de Goiás, que possui etapas protocolares muito demoradas do ponto de vista de execução.

O esquema de imunossupressão com CE+ICN+AP, foi o mais frequente tanto como ISS inicial quanto final (na data da coleta de sangue para o estudo), com 71,93% e 61,40%, respectivamente. Piancatelli et al.(2020a), em estudo realizado na Itália identificaram que 84% dos pacientes utilizaram CE+ICN+AP como esquema de ISS. Na presente pesquisa este foi o esquema mais utilizado, pelo fato de ser um dos mais efetivos para o controle dos episódios de rejeição, de acordo com a experiência do serviço de TR onde o estudo foi realizado.

Quando os episódios de rejeição foram analisados no GPA, foi encontrada uma taxa de rejeição de 20,17%, sendo o tipo de rejeição mais frequente nas biópsias a RAC (69,57%). Em estudo realizado com 69 pacientes de TR na

Eslováquia, os pesquisadores encontraram as seguintes taxas, RMA 28,98%, RAC 15,94 e forma mista 8,69% (DURMANOVA et al., 2019), já na pesquisa de Ajith et al. (2019), a taxa de RCA encontrada em 130 pacientes foi de 30,77%. É importante salientar que no serviço onde o presente estudo foi realizado, em algumas situações a realização da Bx é um problema complexo e difícil, devido ao fato de depender da estrutura funcional do hospital, o que por inúmeras vezes limitou o diagnóstico rápido e correto, o que pode ter superestimado a taxa real de episódios de rejeição.

A média do nível de sHLA-G na pesquisa foi de  $12,99 \pm 17,57$  ng/mL. No estudo de NAJI et al. (2007), os pesquisadores trabalharam com a dosagem de sHLA-G em diferentes tempos de TR, TH e THR, e demonstraram que os pacientes de TR com menos de um ano apresentavam nível médio de sHLA-G de  $1,4 \pm 2,1$  ng/mL, pacientes entre um e cinco anos  $5,5 \pm 7$  ng/mL e os pacientes acima de cinco anos apresentaram  $14,4 \pm 12,8$  ng/mL, concluindo que os níveis de sHLA-G avaliados aumentavam ao longo do tempo. Apesar da diferença metodológica, a média de HLA-G no presente estudo esteve mais próxima do grupo de indivíduos com mais de cinco anos de TR do estudo francês, o que talvez seja explicado pela maior concentração de pacientes da série aqui apresentada, dentro das faixas igual e maior que cinco anos de transplante (>80%).

Durante a análise univariada das variáveis categóricas do estudo, muitas se mostraram promissoras em relação a associar-se a dosagem de HLA-G, mas ao serem avaliadas pelo modelo de regressão linear só permaneceram como significantes: ter realizado entre 6 a 10 sessões de HD no pós-TR ( $p=0,02$ ), o uso do esquema inicial de ISS com CE+ICN+AZA ( $p<0,001$ ), ter apresentado um ou dois episódios de rejeição comprovados por Bx ( $p<0,001$ ) e ter tido infecção pelo CMV ( $p<0,006$ ). As variáveis numéricas não apresentaram associação com a dosagem de HLA-G quando levadas à análise multivariada.

No presente estudo os pacientes que realizaram entre 6 a 10 sessões apresentavam um aumento de 105,4% nos níveis de HLA-G quando comparados aqueles que realizaram 1 a 5 sessões ( $p=0,02$ ). Na literatura científica pesquisada, tal variável não esteve presente nos estudos. Talvez uma hipotética explicação para este dado, possa estar relacionada com a ativação do

sistema complemento pelo contato sangue-materiais do circuito de HD (materiais heterólogos) e as interrelações com outras células do sistema imune (principalmente a linhagem citotóxica- LTC), o que poderia fazer com estas células expressassem uma maior quantidade de HLA-G para proteger o organismo da ação das proteínas dos complemento, ativação esta gerada pela exposição maior aos produtos da HD.

Os pacientes que utilizaram o esquema de ISS com CE+ICN+AZA apresentaram associação com redução nos níveis de HLA-G (87,9%,  $p<0,001$ ) quando comparados ao esquema mais utilizado CE+ICN+AP. Em um estudo americano de 2006, testou-se a relação dos níveis de sHLA-G em pacientes de TR com função renal estável e com rejeição ao enxerto, os esquema de ISS usados continham a combinação de CsA, TAC e outras drogas, e não houve nível de significância entre os níveis de sHLA-G e os regimes imunossupressores utilizados (QIU et al., 2006). No trabalho de Crispim et al.(2008) o tratamento com TAC, mas não com CsA, esteve associado ao aumento da expressão de HLA-G e à ausência de rejeição, apesar de ambas as drogas serem ICN. Ao estudar a relação dos níveis de HLA-G e necrose tubular aguda em TR, um grupo da Tailândia utilizou como protocolo padrão ICN (TAC ou CsA), AP (micofenolato mofetil [MMF] ou AZA) e CE (prednisolona), sendo que tal regime de imunossupressão não apresentou ser significativo para a dosagem de sHLA-G ( $p=0,068$ ) (KRONGVORAKUL et al., 2015). Farid et al.(2015) ao avaliarem os níveis de sHLA-G em diferentes grupos de TR, encontraram que o uso de TAC, e não CsA ou rapamicina, teve um efeito positivo nos níveis de sHLA-G.

Na literatura muitos estudos não separam a AZA do MMF/micofenolato de sódio (MFS) cujo produto final é ácido micofenólico, colocando todos no rol dos AP, o que pode tornar restrita uma análise comparativa. No presente estudo, a separação dos esquemas ocorreu, pois atualmente o centro transplantador utiliza o esquema que tem como base o MMF/MFS (61,40%), dada a superioridade destas drogas quando comparadas a AZA na imunossupressão no TR (WAGNER et al., 2015), o que talvez possa ser uma explicação para o dado encontrado na pesquisa em questão.

Ao ser avaliada a relação dos episódios de rejeição comprovados por Bx, constatou-se que os pacientes que durante sua evolução tiveram um ou dois

episódios de rejeição, apresentaram a dosagem de sHLA-G reduzida em 97,8% e 80,1% ( $p < 0,001$ ), respectivamente, quando comparados aqueles que não apresentaram nenhum episódio. No estudo de Qiu et al. (2006), os autores ao analisarem 330 soros de 65 pacientes TR para determinação da expressão de sHLA-G, demonstraram que destes, 50% dos 26 pacientes do grupo com enxerto estável apresentaram expressão consistente de sHLA-G, em comparação com 20,5% entre 39 pacientes que apresentaram rejeição nos enxertos ( $p = 0,013$ ), desta forma, o sHLA-G foi associado a TR funcionais. Em estudo realizado na China, os pesquisadores avaliaram a utilidade clínica de cinco biomarcadores, entre eles o HLA-G5 no soro de 84 pacientes de TR, para detectar RA. Os dados demonstraram que os indivíduos com RA reduziram o nível de HLA-G5 nos soros em comparação com indivíduos com função estável do enxerto (ZHENG et al., 2012).

Em pesquisa realizada na Eslováquia, os pesquisadores analisaram a expressão de HLA-G em soro e biópsias de enxerto de pacientes de TR, para descobrir alguma relação entre sHLA-G e aceitação de enxerto renal. Os pacientes transplantados foram divididos em dois grupos: com e sem RA, eles demonstraram que os valores séricos de sHLA-G foram significativamente maiores em pacientes sem rejeição do enxerto do que com rejeição ( $p = 0,0058$ ), apoiando a suposição de que o aumento do sHLA-G sérico pode contribuir para a aceitação do aloenxerto (POLÁKOVÁ et al., 2015).

Nos estudos citados, não ocorreu separação pelo número de episódios de rejeição como na presente pesquisa, o que pode comprometer um adequado paralelo comparativo, mas mediante os resultados encontrados, pode-se dizer que o nível reduzido de sHLA-G esteve relacionado com rejeição no aloenxerto renal na presente série, estando os dados aqui relatados de acordo com a literatura médica mundial.

Na análise multivariada do GPA, a infecção pelo CMV esteve associada com a redução de 84,1% dos níveis de HLA-G ( $p = 0,006$ ), quando comparada a ausência da infecção pelo referido vírus. O CMV estimula a indução de expressão do HLA-G provavelmente através de seu homólogo da IL-10. Este homólogo regula positivamente a expressão do HLA-G, podendo portanto, contribuir para a evasão imunológica durante a infecção pelo vírus (SPENCER

et al., 2002). Yan et al.(2009) ao avaliarem indivíduos infectados pelo CMV, quantificaram a expressão de HLA-G nos monócitos e no plasma, e concluíram que o nível de sHLA-G aumentou durante a infecção ativa por CMV em pacientes não transplantados. Xiao et al. (2011) relataram que os níveis de mRNA de HLA-G e sHLA-G no sangue periférico de receptores de TR aumentaram no grupo positivo para CMV quando comparado ao grupo negativo para o vírus.

Outros estudos da literatura médica se contrapõem aos relatados anteriormente, como o estudo de Farid et al. (2015) sobre relação do sHLA-G em TR em renais com e sem RA e a aceitação dos enxertos renais, neste estudo os pesquisadores também avaliaram a relação do sHLA-G com as infecções, dentre elas o CMV, e concluíram que esta infecção não afetou o nível de sHLA-G. Como se pode observar, os dados da presente pesquisa, encontraram uma dosagem de sHLA-G nos pacientes infectados pelo CMV reduzida ( $p=0,006$ ) em relação aos pacientes não infectados, resultado este que não foi encontrado em nenhum dos estudos citados anteriormente.

Possíveis explicações para esta divergência de resultados podem estar relacionadas ao: desenho do estudo, metodologia de diagnóstico CMV, método de dosagem sHLA-G, número de pacientes selecionados, e a própria relação do vírus com a expressão do HLA-G, que pode não estar somente associada com aumento da expressão da molécula, mas que através de mecanismos outros, possa também alternar períodos de redução nos níveis de HLA-G ao longo do processo infeccioso. Deve-se levar em consideração, a possibilidade de que o resultado aqui demonstrado foi relevante e verdadeiro, ao ponto de sugerir a realização de mais estudos para verificar melhor a relação CMV e dosagem de HLA-G.

A segunda parte da discussão da presente pesquisa, diz respeito ao GPN, grupo este que contou inicialmente com 12 pacientes. Durante o período de acompanhamento, houve duas perdas de enxertos, sendo as análises realizadas com 10 pacientes transplantados, que foram seguidos do pré-transplante até 365 pós-procedimento. Neste grupo de pacientes foram avaliadas as dosagens de HLA-G, PD-L1 e feitas as leituras das biópsias que receberam a marcação de ambas as moléculas.

No GPN, o sexo masculino foi maioria (83,33%), a média de idade do grupo foi de  $40,83 \pm 11,69$  anos. No estudo de Bardi et al. (2011) ao avaliarem um grupo de 42 pacientes transplantados renais, os mesmos observaram que o sexo masculino foi mais frequente (71,43%) e a média de idade do grupo foi  $30 \pm 8,7$  anos, pacientes estes mais jovens do que na atual série estudada. No grupo de Bardi, as principais causas de doença renal de base foram GN (42,86%) e indeterminada (33,33%), dados semelhantes ao deste estudo, onde GN respondeu por 41,67% dos pacientes e indeterminada 25%.

O tipo de TR mais prevalente foi o DF, que representou 83,33% dos casos. O TIF entre >15-24 horas foi o mais frequente (60%) entre os pacientes, a taxa de FRE foi elevada (75%), dado este que pode ser explicado pela alta taxa de TR-DF e TIF prolongado. A taxa de rejeição foi de 25% sendo a RAC responsável por 66,67% das rejeições. Durmanova et al. (2019), encontraram em seus dados 94,20% de TR-DF, TIF de 17 horas em média, a taxa de rejeição global foi de 53,61% e a de RAC 15,94%. Como observado pela descrição dos dados, existem pontos de concordância entre os estudos, e talvez as diferenças possam estar relacionadas a alguns fatores, tais como: protocolo seriado de Bx, o que eleva o diagnóstico dos episódios de rejeição, estrutura de funcionamento do TR-DF dentro das instituições e do próprio sistema de transplante de cada região.

As transfusões sanguíneas pré-TR ocorreram em 41,7% dos pacientes do GPN. Em estudo realizado na Índia, a taxa de transfusão pré-transplante foi de 40,2%, num grupo de 122 transplantados renais (GUPTA et al., 2019). É importante ressaltar que, tal resultado na presente série possa estar relacionado ao acesso à medicação para tratamento da anemia na DRCT, uso irregular da medicação estimuladora da eritropoiese e a falta de resposta ao tratamento com eritropoetina.

No estudo de Durmanova et al. (2019) a taxa do esquema CE+ICN+AP foi da ordem de 34,78%. Já no estudo de Piancatelli et al. (2020b) ao avaliarem os níveis plasmáticos de sHLA-G em 103 receptores de TR, verificaram que 86% dos mesmos fizeram uso de CE+ICN+AP como esquema de ISS. No estudo atual, o esquema de ISS mais utilizado tanto ao nível inicial quanto ao final do seguimento foi CE+ICN+AP, com 100% e 63,64% respectivamente. Tal

esquema imunossupressor primário vem sendo utilizado no centro há alguns anos, dada sua potência imunossupressora, sendo alterado quando de intercorrências clínicas e/ou imunológicas com os pacientes.

A avaliação das variáveis numéricas do estudo, que foram estratificadas pelo tempo de coleta dos dados, foi relevante a constatação da diminuição da dosagem de sHLA-G ocorrida de T0 para T30, um aumento de T30 para T90, e ao final do seguimento a dosagem era inferior ao T0. Em estudo italiano, 103 pacientes TR tiveram seus níveis de sHLA-G aferidos no pré-TR e um ano após, sendo significativamente mais baixos os níveis detectados após o transplante em comparação com os níveis pré-transplante (pré-transplante:  $216,93 \pm 75,08$  U/mL; após:  $173,01 \pm 69,21$  U/mL;  $p < 0,019$ ) (PIANCATELLI et al., 2020b). Situação também encontrada na presente pesquisa.

A análise multivariada do GPN, demonstrou como preditores da dosagem de HLA-G – sexo feminino ( $p=0,001$ ), TR-DVR ( $p<0,001$ ), 1 e 2 episódios de rejeição comprovados por Bx ( $p<0,001$ ) e os tempos T30 ( $p<0,001$ ), T90 ( $p=0,002$ ), T180 ( $p<0,001$ ) e T365 ( $p<0,001$ ) pós-TR. Nos estudos de Bardi et al. (2011), Durmanova et al (2016) e Okushi et al.(2017) não foi encontrada significância estatística em relação ao sexo e HLA-G. No presente estudo, quando comparado ao sexo masculino, o sexo feminino esteve associado a uma dosagem elevada de sHLA-G ( $p=0,001$ ). Uma possível explicação para tal resultado, poderia ser, a ação de hormônios femininos (progesterona) na dinâmica da expressão de HLA-G (POLÁKOVÁ; BANDŽUCHOVÁ; RUSS, 2011; ŽILINSKÁ et al., 2015).

Os pacientes que receberam TR-DVR apresentaram uma dosagem mais elevada de HLA-G ( $p<0,001$ ), em diferentes séries que avaliaram os níveis de HLA-G e sua relação com diferentes variáveis, o TR-DVR não mostrou significância (CILIÃO ALVES et al., 2012; CRISPIM et al., 2008; KANEKU, 2006). Na investigação de Farid et al. (2015) nenhuma diferença significativa foi encontrada ( $p=0,384$ ) na concentração de sHLA-G de acordo com o tipo de doador, seja DVNR ou DVR, nos receptores de transplante avaliados.

Possíveis explicações para este resultado podem estar relacionadas, ao fato que no TR com DV (seja relacionado ou não) o TIF é mínimo (minutos) o que não impõe ao rim de forma intensa a injúria do processo de isquemia-

reperfusão; e no DVR o nível de compatibilidade entre doador-receptor por estar presente na grande maioria dos transplantes, provavelmente contribua em diminuir a ocorrência de episódios de RA (CLARK; UNSWORTH, 2010; FROHN et al., 2001), obviamente existem outros fatores que estão implicados na gênese da rejeição nos transplantes.

Nos estudos de Crispim et al. (2008) e Jin et al. (2012), pacientes que apresentaram episódios de rejeição tiveram níveis reduzidos de sHLA-G. Na presente pesquisa, os pacientes que apresentaram um ou dois episódios de rejeição confirmada por Bx, tiveram o nível de sHLA-G reduzido em comparação aos indivíduos sem rejeição. Em outro estudo de Xiao et al. (2010b), avaliaram a viabilidade do sHLA-G5 como biomarcador prognóstico pós-transplante em uma coorte de 215 transplantados renais, e concluíram que o nível de sHLA-G5 pode prever RA com alta sensibilidade (63,6%) e especificidade (82,1%).

Como já discutido previamente para o GPA, os episódios de rejeição estiveram associados a uma menor dosagem de sHLA-G nos pacientes TR, o mesmo ocorreu no GPN, reafirmando o resultado de que o nível reduzido de sHLA-G esteve relacionado com rejeição no enxerto renal na presente série, estando os dados aqui relatados, em concordância com a literatura mundial.

Acerca da variável Tempo, a mesma influenciou significativamente a dosagem de HLA-G. Ao longo dos períodos de tempo avaliados – T30 ( $p < 0,001$ ), T90 ( $p = 0,002$ ), T180 ( $p < 0,001$ ) e T365 ( $p < 0,001$ ), os mesmos foram preditores da queda dos níveis de sHLA-G no grupo de pacientes de TR estudados nesta série (Figura 6). Ao estudarem uma coorte de 76 pacientes de TR, Krongvorakul et al. (2015), avaliaram a associação do nível de sHLA-G no período pós-transplante precoce e a rejeição do aloenxerto e NTA nestes pacientes. Os soros obtidos antes do transplante e em série nos dias 3 e 7 após o procedimento foram analisados quanto ao nível de sHLA-G. Os níveis de sHLA-G dos três soros seriais, não diferiram entre pacientes com RA e pacientes sem rejeição. No presente estudo o T7 não apresentou relação com o nível de HLA-G, resultado semelhante ao do estudo de Krongvorakul et al. (2015), apesar do tempo T3 não ter sido avaliado.

No estudo de Poláková et al. (2015), foi analisada a expressão de HLA-G em soro e Bx de enxertos de pacientes transplantados renais para descobrir se

havia alguma relação entre HLA-G e aceitação de enxerto renal. Os soros dos pacientes foram coletados 1 dia antes e no pós-transplante (1-2 semanas, 1 a 12 meses e acima de 12 meses). Ao longo do tempo, descobriram que em todos os pacientes (com e sem rejeição), o nível pré-transplante de sHLA-G diminuiu no período pós-transplante precoce (1-2 semanas) em todos os pacientes (com e sem RA). No período de 1-12 meses pós-transplante, um aumento substancial de sHLA-G foi detectado em pacientes sem rejeição, enquanto nenhuma mudança ou declínio adicional foi observado em receptores com rejeição de enxerto. Nos soros coletados acima de um ano pós-TR, os níveis de sHLA-G aumentaram em ambos os grupos de pacientes (com ou sem rejeição do enxerto). Os dados do atual estudo divergem dos resultados acima, pois houve uma queda expressiva dos níveis de HLA-G a partir do T30, que se mantiveram até T365, com um valor de  $p$  relevante.

Em pesquisa realizada na China, os investigadores avaliaram os níveis de sHLA-G e sCD30, em um grupo de 11 receptores de TR em diferentes momentos do transplante (pré-TR, 1 semana, 1, 3, 6 e 12 meses pós-TR), bem como a relação entre os níveis séricos das referidas moléculas e o tempo após o TR. Os pesquisadores não encontraram diferença significativa entre os valores pré-transplante, 1 semana e 1 mês após o procedimento. O nível sérico de sHLA-G dos receptores de TR aos 3 meses após o transplante foi superior ao 1 mês após o transplante. Não houve alteração significativa no nível sérico de sHLA-G entre 3, 6 e 12 meses após o transplante (JIN et al., 2017). Apesar do presente estudo e a pesquisa chinesa apresentarem um desenho parecido, talvez uma possível explicação para as diferenças encontradas entre ambos, esteja relacionada ao perfil clínico da população estudada e ao limitado número de pacientes do estudo.

A análise univariada de PD-L1 selecionou algumas variáveis sugestivas de influenciar a dosagem de PD-L1, e que foram levadas para avaliação no modelo multivariado. Destas, permaneceram como significativas – sexo feminino ( $p<0,001$ ), 2 episódios de rejeição comprovada por Bx ( $p<0,001$ ) e transfusão pré-TR (1 a 5 e 6 a 10) ( $p=0,003$ ).

Dentro dos estudos publicados sobre PD-L1 em TR, não foram encontrados até a presente data, relatos da relação com sexo. Mas em estudos

sobre PD-L1 e câncer foi possível encontrar referência sobre esta variável. Em trabalho realizado na Alemanha, para avaliar a associação da expressão de PD-L1 no carcinoma de células renais (CCR) com parâmetros clínicos, agressividade tumoral e sobrevivência, as amostras de tumor foram analisadas quanto à expressão de PD-L1 por IHQ, a positividade para PD-L1 foi associada ao sexo feminino ( $p=0,001$ ), metástase linfonodal ( $p=0,004$ ), metástase distante ( $p=0,002$ ) e doença avançada ( $p<0,001$ ) (ABBAS et al., 2016). Talvez, a relação com os hormônios femininos possa explicar tal comportamento em relação ao sexo feminino, havendo para isto a necessidade de pesquisas que envolvam PD-L1 e sua relação com os hormônios femininos, principalmente em pacientes transplantados.

Quando comparado a paciente que não apresentou episódio de rejeição, o indivíduo que teve dois episódios de rejeição comprovados por Bx, teve uma menor dosagem de PD-L1 ( $p<0,001$ ). Ao nível de abordagem clínica como o da presente pesquisa, os estudos sobre PD-L1 e TR são escassos, existem estudos ao nível ciências básicas, o que dificulta a avaliação comparativa entre os mesmos.

Em investigação conduzida por grupo de pesquisadores americanos, que avaliaram o papel e os mecanismos da via PD-1: PD-L1 na tolerância adquirida ao transplante, utilizando um modelo murino de TC, demonstraram o papel crítico de PD-L1 na indução e manutenção da tolerância ao transplante periférico por sua capacidade de alterar o equilíbrio entre CT patogênicas e reguladoras (TANAKA et al., 2007).

Tendo como base o estudo experimental de Tanaka et al. (2007) e tentando extrapolar o raciocínio para seres humanos, o processo de rejeição romperia o equilíbrio entre LT patogênicos e reguladores, gerado por PD-L1, levando a maior expressão dos LT patogênicos e lesão do enxerto (rejeição) e redução no nível desta molécula no sangue. Comprometendo assim, o papel de tolerância gerado por PD-L1, o que geraria mais comprometimento pelos LT.

O presente estudo mostrou que quanto maior o número de transfusão pré-TR (1 a 5 e 6 a 10,  $p=0,003$ ) menor a dosagem de PD-L1. O resultado desta pesquisa até o momento apresenta-se como dado novo em relação ao PD-L1, pois na literatura levantada sobre PD-L1 e TR, não foram obtidos estudos com

avaliação desta relação. Hipoteticamente, talvez quanto maior o número de transfusões sanguíneas, maior a chance de sensibilização - geração de anticorpos de diferentes classes de HLA - que poderia comprometer o equilíbrio entre CT, CD, monócitos etc, levando a diminuição nos níveis de PD-L1, que por sua vez compromete a inibição da proliferação de LT, ampliando a resposta imune e diminuindo ainda mais o nível da molécula no sangue.

Em relação aos dados das biópsias, devido ao número reduzido das mesmas, houve impossibilidade da realização de uma análise multivariada dos resultados, tendo sido possível somente a avaliação descritiva. Observou-se que, a quantidade de HLA-G expressa no tecido renal foi forte em uma proporção maior que 50% das Bx, e a média de HLA-G presente nas Bx também esteve acima de 50%. Sem abordar caráter comparativo, no estudo de Crispim et al. (2008) o HLA-G foi detectado em 54.8% dos espécimes das Bx. Já na série de Okushi et al.(2017) o HLA-G foi detectado pela técnica de imunofluorescência em 34,37% das Bx. Como observado pelos resultados dos estudos descritos acima, a marcação nas biópsias da molécula de HLA-G do presente estudo, mostrou-se relevante. Infelizmente por razões metodológicas a análise comparativa não pôde ser feita. As biópsias avaliadas não apresentaram marcação para PD-L1 (Figura 7).

## 7 RELEVÂNCIA DO ESTUDO

O presente trabalho representa o primeiro estudo realizado no estado de Goiás sobre o papel das moléculas HLA-G e PD-L1 no âmbito do transplante renal, além do fato de que parte da avaliação foi prospectiva (Grupo de pacientes novos), tipo de estudo ainda inédito na região. O mesmo trouxe através de seus resultados, dados até então desconhecidos e relevantes destas moléculas nos pacientes transplantados e suas relações com outros aspectos exclusivos da população de transplantados renais.

A pesquisa gerou discussões sobre a possibilidade futura de se tentar utilizar o biomarcador HLA-G, como mais um dos exames de avaliação imunológica aos quais todo transplantado renal é submetido, buscando desta maneira estabelecer com antecedência (sempre que possível) algum dado prognóstico sobre a evolução do aloenxerto.

O estudo permitiu através do levantamento realizado, traçar um perfil dos pacientes de transplante renal da Equipe Nefrovita da SCMG. O conhecimento detalhado desta população permitirá que medidas de manuseio clínico sejam adotadas de maneira mais individualizada, gerando assim um impacto positivo sobre a evolução dos pacientes e seus enxertos.

Outra característica positiva do estudo foi integrar vários segmentos acadêmicos e científicos – Santa Casa de Goiânia, Universidade Federal de Goiás-Faculdades de Medicina e Odontologia, Universidade Estadual de Goiás, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Esta cooperação em prol de evolução científica traz benefícios e crescimento para todos os envolvidos.

## 8 CONCLUSÕES

✧ Considerando o Grupo de Pacientes Novos, concluiu-se que a ocorrência de episódios de rejeição foi associada a baixa expressão de HLA-G e PD-L1. Sendo que a realização de transfusões também foi associada a baixos níveis de PD-L1 e a variável tempo pós-transplante renal associou-se a baixo nível de HLA-G. Níveis aumentados de ambas moléculas foram observados em pacientes do sexo feminino, e de HLA-G naqueles que receberam rim de doador vivo relacionado.

✧ Considerando o Grupo de Pacientes Antigos, concluiu-se que o uso do esquema corticoide+ inibidor de calcineurina+azatioprina como esquema de imunossupressão inicial, o fato de ter apresentado um ou dois episódios de rejeição comprovada por biópsia e infecção por CMV se correlacionaram com baixa dosagem de HLA-G. Enquanto, ter realizado de 6 a 10 sessões de hemodiálise no pós-transplante renal associou-se a uma elevada dosagem de HLA-G.

✧ Foi observada expressão da molécula HLA-G em amostras de tecido renal de pacientes que apresentaram rejeição do enxerto durante o follow-up de 12 meses. No entanto, o número limitado de amostras não permitiu a avaliação quanto a associações. A molécula PD-L1 não foi detectada nas amostras avaliadas.

## 9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Vários estudos sobre o HLA-G e sua relação com o transplante renal estão disponíveis na literatura científica, mas no estado de Goiás até então não havia dados sobre os mesmos, apresentar estes resultados foi uma atividade importante, relevante e inédita que a pesquisa trouxe para contexto científico do estado.

O presente estudo, encontrou resultados diferentes dos apresentados na literatura científica mundial, assim como trouxe dados novos no contexto das moléculas de HLA-G e PD-L1. Tais resultados incentivam a busca por novas pesquisas e desencadeiam perspectivas para a ampliação das mesmas, dentro dos centros transplantadores do estado de Goiás, centros estes que possuem um grande número de pacientes sob seguimento, o que permitiria intensas investigações e robustez de resultados.

A investigação realizada pelo presente estudo, permitiu que a pesquisadora pudesse traçar um perfil clínico-epidemiológico dos pacientes transplantados acompanhados pela Equipe Nefrovita, e conseqüentemente abriu novos horizontes e ideias para ampliar ainda mais a pesquisa clínica no centro de origem do presente estudo.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. **Cellular and Molecular Immunology**. 4ed. ed. New York: Saunders, 2000.
- ABBAS, M. et al. Intratumoral expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) in patients with clear cell renal cell carcinoma (ccRCC). **Medical Oncology**, v. 33, n. 7, p. 1–7, 2016.
- AGATA, Y. et al. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. **International Immunology**, v. 8, n. 5, p. 765–772, 1996.
- AJITH, A. et al. HLA-G dimer targets Granzyme B pathway to prolong human renal allograft survival. **FASEB journal : Official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 33, n. 4, p. 5220–5236, 2019.
- ALTSHULER, D. M. et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. **Nature**, v. 491, n. 7422, p. 56–65, 2012.
- AMODIO, G.; GREGORI, S. Distinctive Immunological Functions of HLA-G. In: BAHAA KENAWY ABUEL-HUSSIEN ABDEL-SALAM (Ed.). **Histocompatibility**. Croatia: InTech Published, 2012. p. 19–40.
- ARMITAGE, J. M. et al. A clinical trial of FK 506 as primary and rescue immunosuppression in cardiac transplantation. **Transplantation Proceedings**, v. 23, n. 1 II, p. 1149–1152, 1991.
- AUCHINCLOSS, H.; SULTAN, H. Antigen processing and presentation in transplantation. **Current Opinion in Immunology**, v. 8, n. 5, p. 681–687, 1996.
- BARDI, R. et al. Soluble human leukocyte antigen-G (SHLA-G) in Tunisian kidney transplantation. **Archives de l'Institut Pasteur de Tunis**, v. 88, n. 1–4, p. 42–46, 2011.
- BELL, J. Chromosome crawling in the MHC. **Trends in Genetics**, v. 5, n. C, p. 289–290, 1989.
- BLAZAR, B. R. et al. Blockade of Programmed Death-1 Engagement Accelerates Graft-Versus-Host Disease Lethality by an IFN- $\gamma$ -Dependent Mechanism. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 3, p. 1272–1277, 2003.
- BUTTE, M. J. et al. PD-L1 interacts specifically with B7-1 to inhibit T cell proliferation. **Immunity**, v. 27, n. 1, p. 111–122, 2007.
- CALNE, R. Y. et al. Induction of Immunological Tolerance b Porcine Liver Allografts. **Nature**, v. 223, p. 472–476, 1969.

- CALNE, R. Y. et al. Cyclosporin a in Patients Receiving Renal Allografts From Cadaver Donors. **The Lancet**, v. 312, n. 8104, p. 1323–1327, 1978.
- CAROSELLA, E. D. et al. HLA-G: A tolerance molecule from the major histocompatibility complex. **Immunology Today**, v. 20, n. 2, p. 60–62, 1999.
- CAROSELLA, E. D. et al. HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. **Advances in Immunology**, v. 81, p. 199–252, 2003.
- CAROSELLA, E. D. et al. HLA-G: from biology to clinical benefits. **Trends in Immunology**, v. 29, n. 3, p. 125–132, 2008.
- CAROSELLA, E. D. et al. HLA-G. An Immune Checkpoint Molecule. In: ALT, F. (Ed.). **Advances in Immunology**. 1ed. ed. Amsterdã , Holanda: Elsevier Inc., 2015. v. 127p. 33–144.
- CAROSELLA, E. D.; DAUSSET, J.; KIRSZENBAUM, M. HLA-G revisited. **Trends Immunology Today**, v. 17, n. 9, p. 407–409, 1996.
- CAROSELLA, E. D.; DAUSSET, J.; ROUAS-FREISS, N. Immunotolerant functions of HLA-G. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 55, n. 3, p. 327–333, 1999.
- CARREL, A.; GUTHRIE, C. C. Anastomosis of blood vessels by the patching method and transplantation of the kidney. 1906 [classical article]. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 74, n. 4, p. 243–247, 2001.
- CHALLÚ, A. A História da Nefrologia Iberoamericana:Argentina. **Nefrologia**, v. 12, n. s3, p. 11–14, 1992.
- CHANG, C. C. et al. Tolerization of dendritic cells by Ts cells: The crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. **Nature Immunology**, v. 3, n. 3, p. 237–243, 2002.
- CHRISTIANSEN, O. B. et al. Immunology: Prognostic significance of maternal dr histocompatibility types in danish women with recurrent miscarriages. **Human Reproduction**, v. 8, n. 11, p. 1843–1847, 1993.
- CILIÃO ALVES, D. C. et al. Human leukocyte antigen-G 3' untranslated region polymorphisms are associated with better kidney allograft acceptance. **Human Immunology**, v. 73, n. 1, p. 52–59, 2012.
- CLARK, B.; UNSWORTH, D. J. HLA and kidney transplantation. **Journal of Clinical Pathology**, v. 63, n. 1, p. 21–25, 2010.
- CLARKSON, M. R.; SAYEGH, M. H. T-cell costimulatory pathways in allograft rejection and tolerance. **Transplantation**, v. 80, n. 5, p. 555–563, 2005.

COELHO, V. et al. Evidence of indirect allorecognition in long-term human renal transplantation. **Clinical Immunology**, v. 90, n. 2, p. 220–229, 1999.

COLONNA, M. et al. A Common Inhibitory Receptor for Major Histocompatibility Complex Class I Molecules on Human Lymphoid and Myelomonocytic Cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 186, n. 11, p. 1809–18, 1997.

COLONNA, M. et al. Human myelomonocytic cells express an inhibitory receptor for classical and nonclassical MHC class I molecules. **Journal of immunology**, v. 160, n. 7, p. 3096–100, 1998.

COSMAN, D. et al. A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. **Immunity**, v. 7, n. 2, p. 273–282, 1997.

CRÉPUT, C. et al. 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, n. 11, p. 1033–1038, 2003a.

CRÉPUT, C. et al. Human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression in biliary epithelial cells is associated with allograft acceptance in liver-kidney transplantation. **Journal of Hepatology**, v. 39, n. 4, p. 587–594, 2003b.

CROUAEU-ROY et al. Localization of the OTF3 Gene within the Human MHC Class I Region by Physical and Meiotic Mapping. **Genomics**, v. 21, p. 241–243, 1994.

CRISPIM, J. C. O. 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, 2007.

CRISPIM, J. C. O. et al. Human leukocyte antigen-G expression after kidney transplantation is associated with a reduced incidence of rejection. **Transplant Immunology**, v. 18, n. 4, p. 361–367, 2008.

DAUSSET, J. Iso-leucos-anticorps. **Acta Haematologica**, v. 20, p. 156–166, 1958.

DENDROU, C. A. et al. HLA variation and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 5, p. 325–339, 2018.

DILEK, N. et al. Targeting CD28, CTLA-4 and PD-L1 costimulation differentially controls immune synapses and function of human regulatory and conventional t-cells. **Public Library of Science**, v. 8, n. 12, p. 2–15, 2013.

DOSHI, M. D. et al. Recipient risk factors associated with delayed graft function: A paired kidney analysis. **Transplantation**, v. 91, n. 6, p. 666–671, 2011.

DUNHAM, I. et al. Molecular mapping of the human major histocompatibility complex by pulsed-field gel electrophoresis (HLA/gene map/tumor necrosis factor/cosmid cloning). **Immunology**, v. 84, n. October, p. 7237–7241, 1987.

DURMANOVA, V. et al. Impact of HLA-G 14 bp polymorphism and soluble HLA-G level on kidney graft outcome. **Open Life Sciences**, v. 11, n. 1, p. 372–379, 2016.

DURMANOVA, V. et al. Association of HLA-G Polymorphisms in the 3'UTR Region and Soluble HLA-G with Kidney Graft Outcome. **Immunological Investigations**, v. 48, n. 6, p. 644–658, 2019.

ELLIS, S. A. et al. Evidence for a novel HLA antigen found on human extravillous trophoblast and a choriocarcinoma cell line. **Immunology**, v. 59, n. 4, p. 595–601, 1986.

ELLIS, S.; PALMER, M.; MICHAEL, A. Human Trophoblast and the Choriocarcinoma Cell Line BeWo Express a Truncated HLA Class I Molecule. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 144, n. 2, p. 731–735, 1990.

**EUROTRANSPLANT**. Disponível em:

[https://statistics.eurotransplant.org/index.php?search\\_type=transplants&search\\_h\\_organ=kidney&search\\_region=&search\\_period=&search\\_characteristic=&search\\_text=&search\\_collection=](https://statistics.eurotransplant.org/index.php?search_type=transplants&search_h_organ=kidney&search_region=&search_period=&search_characteristic=&search_text=&search_collection=). Acesso em: 3 maio. 2020.

FARID, E. et al. Human leukocyte antigen G and renal allograft transplant. **Experimental and Clinical Transplantation**, v. 13, p. 371–376, 2015.

FREEMAN, G. J. et al. Engagement of the Pd-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 7, p. 1027–1034, 2 out. 2000.

FROHN, C. et al. The effect of HLA-C matching on acute renal transplant rejection. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 16, n. 2, p. 355–360, 2001.

GAO, W. et al. Stimulating PD-1-negative signals concurrent with blocking CD154 co-stimulation induces long-term islet allograft survival. **Transplantation**, v. 76, n. 6, p. 994–999, 2003.

GARCIA, V. **Registro Brasileiro de Transplantes**. São Paulo. Associação Brasileira de Transplante de Órgãos, 2019.

GARCIA, V.; PESTANA, J.; IANHEZ, L. História dos Transplantes no Brasil. In: GARCIA, V. et al. (Eds.). **Transplantes de Órgãos e Tecidos**. 2a edição ed. São Paulo: Segmento Farma Editores Ltda, 2006. p. 28–30.

GERAGHTY, D. E.; KOLLER, B. H.; ORR, H. T. A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 24, p. 9145–9149, 1987.

GIBSON, T.; MEDAWAR, P. B. The fate of skin homografts in man. **Journal of Anatomy**, v. 77, n. Pt 4, p. 299- 310.4, 1943.

GONÇALVES, A. et al. Relevance of HLA-G, HLA-E and IL-10 expression in lip carcinogenesis. **Human Immunology**, v. 77, n. 9, p. 785–790, 2016.

GORAYEB-POLACCHINI, F. S. et al. Impact of Cold Ischemia Time on Kidney Transplant: A Mate Kidney Analysis. **Transplantation Proceedings**, v. 52, n. 5, p. 1269–1271, 2020.

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

GOUVEIA, D. S. E. S. et al. Analysis of economic impact between the modality of renal replacement therapy. **Jornal Brasileiro de Nefrologiara**, v. 39, n. 2, p. 162–171, 2017.

GRINYÓ, J. M. Why is organ transplantation clinically important? **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 6, p. 1–10, 2013.

GUPTA, K. L. et al. Renal transplant and its outcomes: Single-center experience from India. **Experimental and Clinical Transplantation**, v. 17, p. 78–82, 2019.

HALLER, M. et al. Cost-effectiveness analysis of renal replacement therapy in Austria. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 26, n. 9, p. 2988–2995, 2011.

HART, A. et al. OPTN/SRTR 2018 Annual Data Report: Kidney. **American Journal of Transplantation**, v. 20, n. s1, p. 20–130, 2020.

HERNANDEZ-FUENTES, M. P.; WARRENS, A. N.; LECHLER, R. I. Immunologic monitoring. **Immunological Reviews**, v. 196, p. 247–264, 2003.

HOLLANDER, M.; WOLFE, D. A. **Nonparametric Statistical Methods**. 2nd. ed. New York, N.Y.: John Wiley & Sons, 1999.

**Hospital do Rim - Fundação Oswaldo Ramos**. Disponível em: <http://www.hrim.com.br/especialidades/transplantes/>. Acesso em: 3 maio. 2020.

HOUSSIN, D. et al. Specific transplantation tolerance induced by spontaneously tolerated liver allograft in inbred strains of rats. **Transplantation**, v. 29, n. 5, p. 418–419, 1980.

HRICIK, D. E. et al. Life satisfaction in renal transplant recipients: Preliminary results from the Transplant Learning Center. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 38, n. 3, p. 580–587, 2001.

HVIID, T. V. F. et al. Co-dominant expression of the HLA-G gene and various forms of alternatively spliced HLA-G mRNA in human first trimester trophoblast. **Human Immunology**, v. 59, n. 2, p. 87–98, 1998.

HVIID, T. V. F. HLA-G in human reproduction: Aspects of genetics, function and pregnancy complications. **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 3, p. 209–232, 2006.

**IPD-IMGT/HLA**. Disponível em:

<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/docs/release.html>. Acesso em: 14 maio. 2020.

ISHIDA, Y. et al. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. **The EMBO Journal**, v. 11, n. 11, p. 3887–95, 1992.

JANSSEN, M. et al. Donor derived HLA-G polymorphisms have a significant impact on acute rejection in kidney transplantation. **Human Immunology**, v. 80, n. 3, p. 176–183, 2019.

JIN, H. L. et al. Clinical relevance of sHLA-G-mediated with better graft acceptance in early posttransplantation. **Transplantation Proceedings**, v. 44, n. 5, p. 1259–1261, 2012.

JIN, Z. et al. Serum Soluble HLA-G, Soluble CD30 Is Correlated to the Time After Transplantation in Renal Transplant Recipients. **Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi**, v. 33, n. 7, p. 947–952, 2017.

KAHAN, B. D. et al. Impact of Cyclosporine on Renal Transplant Practice at the University of Texas Medical School at Houston. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 5, n. 6, p. 288–295, 1985.

KANEKU, H. Detection of Soluble HLA-G and Its Correlation with Kidney Transplant Outcome. In: TERASAKI, P. I. (Ed.). **Clinical Transplantation**. Los Angeles: Terasaki Foundation Laboratory, 2006. p. 447–454.

KARHUKORPI, J. et al. Hla-g polymorphism and allelic association with hla-a in a finnish population. **European Journal of Immunogenetics**, v. 23, n. 2, p. 153–155, 1996.

KEAN, L. S. et al. Transplant tolerance in non-human primates: Progress, current challenges and unmet needs. **American Journal of Transplantation**, v. 6, n. 5 I, p. 884–893, 2006.

- KEIR, M. E. et al. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 4, p. 883–895, 2006.
- KEIR, M. E. et al. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. **Annual Review of Immunology**, v. 26, n. 1, p. 677–704, 2008.
- KINO, T. et al. Structure of FK506: A Novel Immunosuppressant Isolated from Streptomyces. **The Journal of Antibiotics**, v. 40, n. 9, p. 1249–1255, 1987.
- KITAZAWA, Y. et al. Involvement of the programmed death-1/programmed death-1 ligand pathway in CD4+CD25+ regulatory T-cell activity to suppress alloimmune responses. **Transplantation**, v. 83, n. 6, p. 774–782, 2007.
- KLEIN, J.; SATO, A. The HLA SYSTEM. **The New England Journal of Medicine Review**, v. 343, n. 10, p. 702–709, 2000.
- KRONGVORAKUL, J. et al. Association of soluble human leukocyte antigen-G with acute tubular necrosis in kidney transplant recipients. **Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology**, v. 33, n. 2, p. 117–122, 2015.
- LAMM, L.; OLAISEN, B. Report of the committee on the genetic constitution of chromosomes 5 and 6. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 40, n. 1–4, p. 128–155, 1985.
- LE BOUTEILLER, P. et al. The major histocompatibility complex in pregnancy: Part II. Placental HLA-G protein expression in vivo: Where and what for? **Human Reproduction Update**, v. 5, n. 3, p. 223–233, 1999.
- LE GAL, F. A. et al. HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. **International Immunology**, v. 11, n. 8, p. 1351–1356, 1999.
- LE ROND, 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. **European Journal of Immunology**, v. 34, n. 3, p. 649–660, 2004.
- LEFEBVRE, S. et al. Specific activation of the non-classical class I histocompatibility HLA-G antigen and expression of the ILT2 inhibitory receptor in human breast cancer. **Journal of Pathology**, v. 196, p. 266–274, 2002.
- LEMAOULT, J. et al. HLA-G1-expressing antigen-presenting cells induce immunosuppressive CD4+ T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 18, p. 7064–7069, 2004.
- LEMAOULT, J.; ROUAS-FREISS, N.; CAROSELLA, E. D. Immuno-tolerogenic functions of HLA-G: Relevance in transplantation and oncology. **Autoimmunity Reviews**, v. 4, n. 8, p. 503–509, 2005.

LIANG, K. Y.; ZEGER, S. L. **Longitudinal data analysis using generalized linear models**. [s.l.] Biometrika, 1986.

LIANG, S.; BAIBAKOV, B.; HORUZSKO, A. HLA-G inhibits the functions of murine dendritic cells via the PIR-B immune inhibitory receptor. **European Journal of Immunology**, v. 32, n. 9, p. 2418–2426, 2002.

LIANG, S.; HORUZSKO, A. Mobilizing Dendritic Cells for Tolerance by Engagement of Immune Inhibitory Receptors for HLA-G. **Human Immunology**, v. 64, n. 11, p. 1025–1032, 2003.

LILA, N. et al. Implication of HLA-G molecule in heart-graft acceptance. **The Lancet**, v. 355, n. 9221, 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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, p. 12150–12155, 2001.

LILA, N. et al. Human leukocyte antigen-G expression after heart transplantation is associated with a reduced incidence of rejection. **Circulation**, v. 105, n. 16, p. 1949–1954, 2002.

LIM, M. A.; KOHLI, J.; BLOOM, R. D. Immunosuppression for kidney transplantation: Where are we now and where are we going? **Transplantation Reviews**, v. 31, n. 1, p. 10–17, 2016.

LIMA, M. G. Avaliação e seleção imunológica: prova cruzada, reatividade contra painel e tipificação HLA. In: MANFRO, R. C.; NORONHA, I. L.; SILVA FILHO, Á. P. (Eds.). **Manual de Transplante Renal**. 2ed. ed. Barueri - São Paulo: Editora Manole Ltda, 2014. p. 29–41.

LOKE, P.; ALLISON, J. P. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 9, p. 5336–5341, 2003.

MA, D. et al. PD-L1 deficiency within islets reduces allograft survival in mice. **Public Library of Science**, v. 11, n. 3, p. 1–12, 2016.

MARCHAL-BRAS-GONCALVES, R. et al. A soluble HLA-G protein that inhibits natural killer cell-mediated cytotoxicity. **Transplantation Proceedings**, v. 33, n. 3, p. 2355–2359, 2001.

MATEVOSSIAN, E. et al. Surgeon Yurii Voronoy (1895-1961) - A pioneer in the history of clinical transplantation: In memoriam at the 75th anniversary of the first human kidney transplantation. **Transplant International**, v. 22, n. 12, p. 1132–1139, 2009.

MCCULLAGH, P.; NELDER, J. A. **Generalized Linear Models**. [s.l.] CRC press, 1989.

MEDAWAR, P. B. The behaviour and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits; a report to the War Wounds Committee of the Medical Research Council. **Journal of Anatomy**, v. 78, p. 176–199, 1944.

MENIER, C. et al. HLA-G truncated Isoforms can substitute for HLA-G1 in fetal survival. **Human Immunology**, v. 61, n. 11, p. 1118–1125, 2000.

MERRILL, J. P. et al. Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins. **Journal of the American Medical Association**, v. 160, n. 4, p. 277–282, 1956.

MURRAY, J. et al. Prolonged survival of human-kidney homografts by immunosuppressive drug therapy. **The New England Journal of Medicine**, v. 268, n. 24, p. 1315–1323, 1963.

NAJI, A. et al. CD3 +CD4 low and CD3 +CD8 low are induced by HLA-G: Novel human peripheral blood suppressor T-cell subsets involved in transplant acceptance. **Blood**, v. 110, n. 12, p. 3936–3948, 2007.

NETO, M. L. D. S. **Fatores de Risco para Infecções em Transplante Renal**. [s.l.] Universidade Católica de Goiás, 2006.

NISHIMURA, H. et al. Immunological studies on PD-1-deficient mice: Implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses. **International Immunology**, v. 10, n. 10, p. 1563–1572, 1998.

O'CALLAGHAN, C. A.; BELL, J. I. Structure and function of the human MHC class Ib molecules HLA-E, HLA-F and HLA-G. **Immunological Reviews**, v. 163, n. 6, p. 129–138, 1998.

OKUSHI, Y. et al. Circulating and renal expression of HLA-G prevented chronic renal allograft dysfunction in Japanese recipients. **Clinical and Experimental Nephrology**, v. 21, n. 5, p. 932–940, 2017.

ONNO, M. et al. The HLA-G gene is expressed at a low mRNA level in different human cells and tissues. **Human Immunology**, v. 41, n. 1, p. 79–86, 1994.

**Organ Procurement and Transplant Network 2002**. Disponível em: <https://www.srtr.org/reports-tools/srtroptn-annual-data-report/>. Acesso em: 3 maio. 2020.

**Organ Procurement and Transplantation Network 2020**. Disponível em: <https://optn.transplant.hrsa.gov/data/view-data-reports/national-data/#>. Acesso em: 15 jul. 2020.

PAYNE, R.; ROLFS, M. R. Fetomaternal leukocyte incompatibility. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 37, n. 12, p. 1756–1763, 1958.

PIANCATELLI, D. et al. HLA-G14bp ins/del polymorphism and post-transplant weight gain in kidney transplantation: Potential implications beyond tolerance. **BMC Nephrology**, v. 21, n. 1, p. 1–11, 2020a.

PIANCATELLI, D. et al. Evaluation of Plasma Levels of Soluble HLA-G and HLA-G Genotypes in Kidney Transplant Recipients. **Transplantation Proceedings**, v. 3, p. 3–5, 2020b.

PIRRI, A. **Polimorfismo de HLA-G e Sua Relação Com Transplante Renal**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2006.

PIRRI, A. et al. A study of HLA-G polymorphism and linkage disequilibrium in renal transplant patients and their donors. **Transplant Immunology**, v. 20, n. 3, p. 143–149, 2009.

POLÁKOVÁ, K. et al. Analysis of HLA-G expression in serum and biopsy samples of kidney transplant recipients. **Immunobiology**, v. 220, n. 4, p. 533–537, 2015.

POLÁKOVÁ, K.; BANDŽUCHOVÁ, E.; RUSS, G. Impact of blood processing on estimation of soluble HLA-G K. **Neoplasma**, v. 58, n. 4, p. 337–342, 2011.

QIU, J. et al. Soluble HLA-G expression and renal graft acceptance. **American Journal of Transplantation**, v. 6, n. 9, p. 2152–2156, 2006.

RACCA, A. L. et al. Expression of HLA-G and MICA mRNA in renal allograft. **Transplant Immunology**, v. 21, n. 1, p. 10–12, 2009.

RAJAGOPALAN, S.; LONG, E. O. A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 189, n. 7, p. 1093–1099, 1999.

REBMANN, V. et al. Report of the wet workshop for quantification of soluble HLA-G in Esse, 2004. **Human Immunology**, v. 66, n. 8, p. 853–863, 2005.

REBMANN, V. et al. Soluble total human leukocyte antigen class I and human leukocyte antigen-G molecules in kidney and kidney/pancreas transplantation. **Human Immunology**, v. 70, n. 12, p. 995–999, 2009.

RITEAU, B. et al. HLA-G inhibits the allogeneic proliferative response. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 43, n. 2, p. 203–211, 1999.

RITEAU, B. et al. HLA-G2, -G3, and -G4 Isoforms Expressed as Nonmature Cell Surface Glycoproteins Inhibit NK and Antigen-Specific CTL Cytolysis. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 8, p. 5018–5026, 2001.

ROCHA, P. N. et al. Effector mechanisms in transplant rejection. **Immunological Reviews**, v. 196, p. 51–64, 2003.

ROUAS-FREISS, N. et al. HLA-G in cancer: a way to turn off the immune system. **Seminars in Cancer Biology**, v. 13, p. 325–336, 2003.

ROUSSEAU, P. et al. The 14 bp Deletion-Insertion Polymorphism in the 3' UT Region of the HLA-G Gene Influences HLA-G mRNA Stability. **Human Immunology**, v. 64, n. 11, p. 1005–1010, 2003.

SÁ, H.; LEAL, R.; ROSA, M. S. Renal transplant immunology in the last 20 years: A revolution towards graft and patient survival improvement. **International Reviews of Immunology**, v. 36, n. 3, p. 182–203, 2017.

SANDNER, S. E. et al. Role of the Programmed Death-1 Pathway in Regulation of Alloimmune Responses In Vivo. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 6, p. 3408–3415, 2005.

SAYEGH, M. H.; CARPENTER, C. B. Transplantation 50 years later - Progress, challenges, and promises. **The New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 26, p. 2761–2766, 2004.

SAYEGH, M. H.; TURKA, L. A. The Role of T-Cell Costimulatory Activation Pathways in Transplant Rejection. **The New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 25, p. 1813–1821, 1998.

SAYEGH, M. H.; WATSCHINGER, B.; CARPENTER, C. B. Mechanisms of T Cell Recognition of Alloantigen. The Role of Peptides. **Transplantation**, v. 9, p. 1295–1302, 1994.

SCHOOP, R. et al. Suppressed T-cell activation by INF- $\gamma$ -induced expression of PD-L1 on renal tubular epithelial cells. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 19, n. 11, p. 2713–2720, 2004.

SPADAFORA-FERREIRA, M. et al. Indirect Alloreactivity and Cytokine Production to HLA-DR Peptides in Human Renal Transplantation. **Transplantation Proceedings**, v. 33, p. 435–436, 2001.

SPENCER, J. V. et al. Potent Immunosuppressive Activities of Cytomegalovirus-Encoded Interleukin-10. **Journal of Virology**, v. 76, n. 7, p. 3585–3585, 2002.

STARKE, A. et al. Renal tubular PD-L1 (CD274) suppresses alloreactive human T-cell responses. **Kidney International**, v. 78, n. 1, p. 38–47, 2010.

STARZL, T. E. et al. Fk 506 for Liver, Kidney, and Pancreas Transplantation. **The Lancet**, v. 334, n. 8670, p. 1000–1004, 1989.

STARZL, T. E. History of clinical transplantation. **World Journal of Surgery**, v. 24, n. 7, p. 759–782, 2000.

SUTHANTHIRAN, M.; STROM, T. Renal Transplantation. **The New England Journal of Medicine**, v. 331, n. 6, p. 365- 376., 1994.

TANAKA, K. et al. PDL1 Is Required for Peripheral Transplantation Tolerance and Protection from Chronic Allograft Rejection. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 8, p. 5204–5210, 2007.

TAO, R. et al. Differential Effects of B and T Lymphocyte Attenuator and Programmed Death-1 on Acceptance of Partially versus Fully MHC-Mismatched Cardiac Allografts. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 9, p. 5774–5782, 2005.

THORSBY, E. A short history of HLA. **Tissue Antigens**, v. 74, n. 2, p. 101–116, 2009.

TONELLI, M. et al. Systematic review: Kidney transplantation compared with dialysis in clinically relevant outcomes. **American Journal of Transplantation**, v. 11, n. 10, p. 2093–2109, 2011.

VADIVEL, N.; TRIKUDANATHAN, S.; CHANDRAKER, A. Transplant Research Center, Division of Nephrology, Brigham and Women's Hospital and Children's hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, p. 2935–2946, 2007.

VAN DER VEN, K. et al. Hla- G Polymorphisms and Allele Frequencies in Caucasians. **Human Immunology**, v. 59, n. 5, p. 302–312, 1998.

VAN DER VEN, K.; PFEIFFER, K.; SKRABLIN, S. HLA-G polymorphisms and molecule function - Questions and more questions - A review. **Placenta**, v. 21, n. SUPPL.1, p. 86–92, 2000.

VAN ROOD, J. J.; EERNISSE, J. G.; VAN LEEUWEN, A. Leucocyte antibodies in sera from pregnant women. **Nature**, v. 181, n. 4625, p. 1735–1736, 1958.

VASCONCELOS, M. et al. O transplante renal no Hospital dos Servidores do Estado - Rio de Janeiro. Revisão de 380 transplantes. **Jornal Brasileiro de Transplantes**, v. 1, p. 71–83, 1998.

VIBHAKAR, R. et al. Activation-induced expression of human programmed death-1 gene in T- lymphocytes. **Experimental Cell Research**, v. 232, n. 1, p. 25–28, 1997.

WAGNER, M. et al. Mycophenolic acid versus azathioprine as primary immunosuppression for kidney transplant recipients ( Review ) SUMMARY OF FINDINGS FOR THE MAIN COMPARISON. **Cochrane Database Systematic Reviews**., n. 12, p. 1–153, 2015.

WOLFE, R. A. et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 23, p. 1725–1730, 1999.

XIAO, L. et al. Expression of Human Leucocyte Antigen G in Peripheral Blood of Kidney Transplantation Recipients. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, v. 90, n. 4, p. 241–4, 2010a.

XIAO, L. et al. Applications of Monitoring Human Leukocyte Antigen G and Its Inhibitory Receptors in Post-Renal Transplantation. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, v. 90, n. 36, p. 2524–7, 2010b.

XIAO, L. et al. Correlation of HLA-G expression with CMV active infection following kidney transplantation. **China Journal of Organ Transplant**, v. 32, n. 1, p. 534–538, 2011.

XIAO L. et al. HLA-G expression in the peripheral blood of live kidney transplant recipients. **Chinese Medical Journal**, v. 126, n. 14, p. 2652–2655, 2013.

YAMASHITA, T. et al. HLA-G Gene Polymorphism in a Japanese Population. **Immunogenetics**, v. 44, n. 3, p. 186–191, 1996.

YAN, W. et al. Induction of Both Membrane-Bound and Soluble HLA-G Expression in Active Human Cytomegalovirus Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 200, n. 5, p. 820–826, 2009.

YANG, J. et al. The Novel Costimulatory Programmed Death Ligand 1/B7.1 Pathway Is Functional in Inhibiting Alloimmune Responses In Vivo. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 3, p. 1113–1119, 2011.

ZHENG, J. et al. Assessment of different biomarkers provides valuable diagnostic standards in the evaluation of the risk of acute rejection. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 44, n. 9, p. 730–736, 2012.

ŽILINSKÁ, Z. et al. Expression of HLA-G transcripts in graft biopsy samples of renal transplant recipients. **Transplant Immunology**, v. 33, n. 3, p. 159–165, 2015.

ZOLFAGHARI, L. et al. Association of programmed cell death 1 and programmed cell death 1 ligand gene polymorphisms with delayed graft function and acute rejection in kidney allograft recipients. **Iranian Journal of Kidney Diseases**, v. 9, n. 3, p. 263–265, 2015.

## APÊNDICES

---

## APÊNDICE A

Tabela 1 - Dados clínicos e demográficos do GPA (n=114), Goiânia-GO, 2020

Variáveis		N	%
Sexo	Masculino	68	59,65%
	Feminino	46	40,35%
Doença Renal de Base	DM	8	7,08%
	DRPAD	7	6,19%
	GN	24	21,24%
	HAS	25	22,12%
	INDET	37	32,74%
	Outras	4	3,54%
	PNC	8	7,08%
Tipo de TSR prévia	DP	2	1,75%
	HD	108	94,74%
	TTO Conservador	4	3,51%
Tempo de TSR prévia (anos)	<1	9	8,57%
	1-4	50	47,62%
	>4-10	40	38,10%
	>10	6	5,71%
Tipo de Transplante	DF	65	57,02%
	DVNR	6	5,26%
	DVR	43	37,72%
TIF (horas)	≤12	3	10,71%
	>12-15	2	7,14%
	>15-24	13	46,43%
	>24	10	35,71%
FRE	Não	57	50,00%
	Sim	57	50,00%
Tempo FRE (dias)	≤7	20	35,09%
	8-14	20	35,09%
	15-30	17	29,82%
Número de sessões HD	1-5	32	55,17%
	6-10	2	3,45%
	11-15	24	41,38%
Indução	Não	87	76,32%
	Sim	27	23,68%

Tabela 1 - Dados clínicos e demográficos do GPA (n=114), Goiânia-GO, 2020. Conclusão

Variáveis		N	%
ISS inicial	CE+AZA	1	0,88%
	CE+ICN	1	0,88%
	CE+ICN+AP	82	71,93%
	CE+ICN+AZA	30	26,32%
ISS da data da Coleta	CE+AP	9	7,89%
	CE+ICN	8	7,02%
	CE+ICN+AP	70	61,40%
	CE+ICN+AZA	12	10,53%
	CE+MTOR	4	3,51%
	CE+MTOR+AP	4	3,51%
	CE+MTOR+ICN	5	4,39%
	OUTROS	2	1,75%
Episódios de rejeição-Bx	1	20	17,54%
	2	3	2,63%
	Nenhum	91	79,82%
Tipo de Rejeição	Outros	3	13,04%
	RAC	16	69,57%
	RC	2	8,70%
	RMA	2	8,70%
Infecção por CMV	Não	104	91,23%
	Sim	10	8,77%
Transfusão pré-TR	>10	3	2,80%
	1-5	59	55,14%
	6-10	11	10,28%
	Nenhuma	34	31,78%
Gestação	1	9	20,00%
	2	7	15,56%
	3	6	13,33%
	≥4	6	13,33%
	Nenhuma	17	37,78%

GPA-grupo pacientes antigos; DM-Diabetes mellitus; DRPAD-doença renal policística autossômica dominante; GN-glomerulonefrite; HAS-hipertensão arterial sistêmica; INDET-indeterminada; PNC-pielonefrite crônica; DP-diálise peritoneal; HD-hemodiálise; TTO-tratamento; DF-doador falecido; DVR-doador vivo relacionado; DVNR-doador vivo não relacionado; ISS-imunossupressão; CE-corticoide; AZA-azatioprina; ICN-inibidor da calcineurina; M-TOR-inibidor da M-TOR; AP-antiproliferativo; RAC-rejeição aguda celular; RC-rejeição crônica; RMA-rejeição mediada por anticorpos; TSR-terapia de substituição renal; TIF-tempo de isquemia fria; CMV-citomegalovírus; FRE-função retardada do enxerto ; Bx-biópsia renal ;TR-transplante renal.

## APÊNDICE B

Tabela 2 - Análise descritiva das variáveis numéricas do GPA (n=114), Goiânia-GO, 2020

Variáveis	Média±DP	Mín – Máx
Idade	51,12±11,02	20-78
CR- Alta (mg/dL)	2,36±1,22	0,7-5,9
CR-1ano (mg/dL)	1,27±0,45	0,6-3,5
CR-COL (mg/dL)	1,34±0,48	0,7-3,55
TFG-1(mL/min)	71,79±24,01	26,5-177
TFG-COL (mL/min)	65,31±21,30	14,9-151,3
HLA-G (ng/mL)	12,99±17,57	0-109,14

GPA-grupo de pacientes antigos; DP-desvio padrão; Mín-mínimo; Máx-máximo; COL-coleta; CR-creatinina; TFG-taxa de filtração glomerular; 1-com um ano de TR

## APÊNDICE C

Tabela 6 – Dados clínicos e demográficos do GPN (n=12), Goiânia-GO, 2020

Variáveis		N	%
Sexo	Masculino	10	83,33%
	Feminino	2	16,67%
Doença Renal de Base	DM	1	8,33%
	DRPAD	2	16,67%
	GN	5	41,67%
	HAS	1	8,33%
	INDET	3	25,00%
Tipo de Transplante	DF	10	83,33%
	DVR	2	16,67%
TIF (horas)	>15-24	6	60,00%
	>24	4	40,00%
FRE	Não	3	25,00%
	Sim	9	75,00%
Indução	Não	9	75,00%
	Sim	3	25,00%
ISS inicial	CE+ICN+AP	12	100,00%
	1	2	16,67%
	2	1	8,33%
Episódios de rejeição-Bx	Nenhum	9	75,00%
	RAC	2	66,67%
Tipo de Rejeição	RMA	1	33,33%
	Perda do Enxerto	Não	10
Sim		2	16,67%
ISS em T365	CE+ICN+AP	7	63,64%
	CE+MTOR+AP	2	18,18%
	CE+MTOR+ICN	2	18,18%
Transfusão pré-TR	1-5	5	41,67%
	6-10	1	8,33%
	Nenhuma	6	50,00%
Gestação	≥4	1	50,00%
	Nenhuma	1	50,00%

GPN-grupo de pacientes novos; DM-Diabetes mellitus; DRPAD-doença renal policística autossômica dominante; GN-glomerulonefrite; HAS-hipertensão arterial sistêmica; INDET-indeterminada; PNC-pielonefrite crônica; DF-doador falecido; DVR-doador vivo relacionado; TIF-tempo de isquemia fria ; FRE-função retardada do enxerto ; ISS-imunossupressão; CE-corticoide; AZA-azatioprina; ICN-inibidor da calcineurina; MTOR-inibidor da M-TOR; AP-antiproliferativo; RAC-rejeição aguda celular; RMA-rejeição mediada por anticorpos; TR-transplante renal.

## APÊNDICE D

Tabela 7 – Análise da creatinina, TFG, HLA-G e PD-L1 ao longo do tempo em 10 pacientes de pós - transplante, Goiânia-GO, 2020

Variáveis	Tempo					
	T0*	T7*	T30*	T90*	T180*	T365*
CR (mg/dL)	8,17(±2,37) 5,9-13,60	6,79(±2,79) 1,4-10,40	3,44(±2,76) 0,90-8,70	2,09(±0,91) 1,0-4,10	1,87(±0,68) 1,0-3,20	1,75(±0,52) 1,2-2,70
TFG (ml/min)	8,35(±2,22) 5,2-12,40	15,64(±17,37) 4,80-62,5	38,7(±29,21) 5,3-103,10	47,43(±29,23) 12,5-104,70	51,36(±28,42) 16,8-93,80	51,15(±21,57) 20,4-84,90
HLA-G (ng/mL)	89,02(±36,46) 46,43-175,89	77,33(±98,37) 11,27-362,38	32,91(±25,95) 11,84-101,03	43,64(±29,86) 4,4-87,24	27,82(17,11) 3,71-55,35	29,42(±26,46) 5,41-87,78
PD- L1(ng/L)	0,75(±0,55) 0,18-1,71	0,51(±0,46) 0,00-1,32	3,85(±10,71) 0,00-34,31	0,78(±1,12) 0,00-2,83	0,45(±0,4) 0,00-1,17	5,17(±13,5) 0,00-43,49

T-tempo de coleta; CR-creatinina; TFG-taxa de filtração glomerular. \*Dados apresentados com média (±DP) e valor mínimo – valor máximo.

## APÊNDICE E

---

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome da pesquisa: Avaliação do potencial prognóstico das moléculas HLA-G e PD-L1 no transplante renal.

Pesquisadora responsável: Silvia Marçal Botelho

Contato pesquisador responsável: (62) 32544042

O(a) Sr.(a) está sendo convidado(a) para participar de estudo que envolverá pacientes que fizeram transplante de rim. É importante que você leia e compreenda totalmente as informações fornecidas. Caso você não entenda alguma parte deste consentimento, pergunte ao seu médico antes de assiná-lo.

Apesar dos avanços da medicina, a necessidade de órgãos para doação ainda é muito grande. Sendo assim, os médicos precisam entender como prolongar a vida útil do rim transplantado. Dessa forma, nosso objetivo, nesse estudo, será avaliar o sangue dos pacientes para descobrir moléculas que ajudem a evitar a rejeição.

Como você sabe, você fez ou fará um transplante renal. Para a realização desta pesquisa, caso concorde em participar, precisamos colher seu sangue (10 mL ou duas colheres de chá). Neste procedimento, os riscos são considerados mínimos, havendo o desconforto da picada da agulha durante a colheita de sangue.

Caso, durante seu tratamento, seu médico indique que existe a necessidade de fazer uma biópsia no rim transplantado, gostaríamos de solicitar a sua autorização para também utilizar um pedaço do material colhido na biópsia.

Os seguintes aspectos lhe são esclarecidos para que você decida sobre sua participação voluntária:

- a) Esta pesquisa não lhe trará quaisquer custos. Visando lhe proporcionar maior conforto e comodidade, a coleta será realizada uma única vez;
- b) Não haverá nenhuma forma de reembolso em dinheiro, uma vez que sua participação na pesquisa não proporcionará nenhum gasto;
- c) Você terá a garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios

e outros relacionados com a pesquisa. Isso poderá ser feito a qualquer momento. Nós temos o compromisso de proporcionar informações atualizadas durante o estudo, ainda que esta possa influenciar a sua vontade de continuar autorizando a sua participação;

d) Você terá a liberdade de retirar o seu consentimento (ou seja, se recusar a participar do estudo) a qualquer momento sem que isso lhe traga prejuízo algum ou qualquer tipo de constrangimento;

e) Você terá garantida a segurança de que não será identificado e que será mantida a sua privacidade e o caráter confidencial das informações concedidas;

f) O sangue será colhido com total responsabilidade e custo dos pesquisadores. Como já dito, a coleta de seu sangue será única e feita com material descartável, sendo necessário apenas um pequeno furo com agulha em veia do seu braço, por ocasião da colheita de seus exames de rotina;

g) O seu sangue doado para esta pesquisa poderá:

Ser utilizado na realização de pesquisas de outra natureza sem sua autorização;

Ser utilizado na realização de pesquisas de outra natureza somente com a sua autorização;

h) Os resultados da pesquisa serão apresentados em reuniões científicas (simpósios e congressos) e serão publicados em revistas científicas especializadas, no entanto, seu nome será rigorosamente mantido em sigilo.

i) Você terá direito a indenização conforme as leis vigentes no país, caso ocorra dano decorrente de participação na pesquisa;

j) Uma via deste documento, devidamente assinada será entregue ao senhor (a). Abaixo também seguem os dados de contato do pesquisador responsável, caso o(a) senhor(a) tenha alguma dúvida posteriormente. Para esclarecimentos de questões éticas, o(a) senhor(a) também pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Sant Casa de Goiânia pelo telefone (62) 3254321.

Dados do pesquisador responsável:

Nome legível: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

Dados do participante (Paciente):

Nome legível: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

Dados do responsável legal pelo participante ou testemunha (*caso aplicável*):

Nome legível: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

## APÊNDICE F

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROGNÓSTICO DAS MOLÉCULAS HLA-G E PD-L1 NO TRANSPLANTE RENAL - FICHA DE COLETA DE DADOS (GPA):

1	CÓDIGO DO PACIENTE	<b>COD PCT</b>
2	DATA DA COLETA	<b>DT COLETA</b>
3	DATA DE NASCIMENTO	<b>DT NASC</b>
4	IDADE NO DIA DA COLETA	<b>ID COLETA</b>
5	SEXO <b>MASCULINO (0)</b> <b>FEMININO (1)</b>	<b>SEXO</b>
6	ESTADO DE NASCIMENTO <b>GOIÁS (0)</b> <b>OUTROS (1)</b>	<b>EST NASC</b>
7	ESTADO CIVIL <b>SOLTEIRO (0)</b> <b>CASADO (1)</b> <b>OUTROS (2)</b>	<b>EST CIVIL</b>
8	DATA DO TRANSPLANTE	<b>DT TX</b>
9	TEMPO DE TRANSPLANTE NO DIA DA COLETA (meses) <b>&gt;12-36= (0)</b> <b>&gt;36-72= (1)</b> <b>&gt;72-120= (2)</b> <b>&gt;120-180= (3)</b> <b>&gt;180 (4)</b>	<b>TP TX</b>
10	DOENÇA RENAL DE BASE <b>HAS (0)</b> <b>DM (1)</b> <b>GN (2)</b> <b>DRPA (3)</b> <b>PNC (4)</b> <b>INDET (5)</b> <b>OUTRAS (6)</b>	<b>DX BASE</b>
11	TIPO DE TRS PRÉVIA <b>HD (0)</b> <b>DP (1)</b> <b>TTO</b> <b>CONSERVADOR(2)</b>	<b>TRS PREV</b>
12	TEMPO DE TRS PRÉVIO <b>&lt;1ano (0)</b> <b>1-4anos completos (1)</b> <b>&gt;4-10 anos completos (2)</b>	<b>TP TRS PREV</b>

	<b>&gt;10anos (3)</b>	
13	TIPO DE TRANSPLANTE <b>DF (0)</b> <b>DVR (1)</b> <b>DVNR (2)</b>	<b>TIP TX</b>
14	GRAU PARENTESCO DOADOR VIVO <b>PAIS (0)</b> <b>IRMÃOS/AS (1)</b> <b>TIOS/AS (2)</b> <b>PRIMOS/AS (3)</b> <b>ESPOSO/A (4)</b> <b>OUTROS (5)</b>	<b>PARENT DV</b>
15	IDADE DO DOADOR (anos) <b>&lt;=18 (0)</b> <b>&gt;18-25 (1)</b> <b>26-40 (2)</b> <b>41-50 (3)</b> <b>51-55 (3)</b> <b>&gt;55 (4)</b>	<b>ID DOA</b>  <b>SEXO DOA:</b>
16	COMPATIBILIDADE <b>6MM(0)</b> <b>5MM(1)</b> <b>4MM(2)</b> <b>3MM(2)</b> <b>2MM(4)</b> <b>1MM(5)</b> <b>0MM(6)</b> <b>IDENTICO(7)</b> <b>HAPLO(8)</b> <b>DISTINTO(9)</b>	<b>COMPAT</b>
16	TEMPO DE ISQUEMIA FRIA (horas) <b>&lt;=12(0)</b> <b>&gt;12-15= (1)</b> <b>&gt;15-24= (2)</b> <b>&gt;24 (3)</b>	<b>TIF</b>
17	TEVE FUNÇÃO RETARDADA DO ENXERTO <b>NÃO (0)</b> <b>SIM (1)</b>	<b>FRE</b>
18	TEMPO DE FUNÇÃO RETARDO DO ENXERTO (dias) <b>&lt;=7 (0)</b> <b>8-14= (1)</b> <b>15-30= (2)</b> <b>&gt;30 (3)</b>	<b>TP FRE</b>
19	QUANTAS SESSÕES HD: <b>1-5 (0)</b> <b>6-10 (1)</b> <b>11-15 (2)</b> <b>&gt;15 (3)</b>	<b>NUM HD</b>
20	INDUÇÃO: <b>NÃO (0)</b> <b>SIM (1)</b>	<b>IND</b>
21	DROGA DA INDUÇÃO <b>TIMOGLOBULINA (0)</b> <b>BASILIXIMAB (1)</b>	<b>DG IND</b>
22	IMUNOSSUPRESSÃO INICIAL	<b>ISS INIC</b>

	<b>CORT+AZA (0)</b> <b>CORT+ICN+AZA (1)</b> <b>CORT+ICN (2) CORT+ICN+AP (3)</b> <b>CORT+AP (4)</b> <b>CORT+MTOR+ICN (5)</b> <b>CORT+MTOR+AP (6) CORT+MTOR (7)</b> <b>OUTROS (8)</b>	
23	<b>IMUNOSSUPRESSÃO DO DIA DA COLETA</b> <b>CORT+AZA (0)</b> <b>CORT+ICN+AZA (1)</b> <b>CORT+ICN (2)</b> <b>CORT+ICN+AP (3)</b> <b>CORT+AP (4)</b> <b>CORT+MTOR+ICN (5)</b> <b>CORT+MTOR+AP (6)</b> <b>CORT+MTOR (7)</b> <b>OUTROS (8)</b>	<b>ISS COL</b>
24	<b>CREATININA DA ALTA (mg/dl)</b>	<b>CR ALTA</b>
25	<b>CREATININA COM 1 ANO (mg/dl)</b>	<b>CR 1</b>
26	<b>CREATININA NA COLETA (mg/dl)</b>	<b>CR COL</b>
27	<b>TFG COM 1 ANO (ml/min)</b>	<b>TFG 1</b>
28	<b>TFG NA DATA DA COLETA (ml/min)</b>	<b>TFG COL</b>
29	<b>EPISÓDIOS DE REJEIÇÃO COMPROVADA POR BX</b> <b>Nenhum (0)</b> <b>1ep (1)</b> <b>2ep (2)</b> <b>3 ou +ep (3)</b>	<b>EP REJ BX</b>
30	<b>TIPO DE REJEIÇÃO</b> <b>RAC (0) RMA (1)</b> <b>RC (2) OUTROS (3)</b>	<b>TIP REJ</b>
31	<b>TRATAMENTO DA REJEIÇÃO</b> <b>MP (0)</b> <b>TIMOGLOBULINA (1)</b> <b>Ig (2) RITUXIMABE (3)</b> <b>OUTROS (4)</b>	<b>TTO REJ</b>
32	<b>INFECCÇÃO POR CMV</b> <b>NÃO (0) SIM (1)</b>	<b>INF CMV</b>

33	TRANSFUSÃO PRÉ TRANSPLANTE RENAL Nenhuma (0) 1-5 (1) 6-10 (2) >10 (3)	<b>TF PRE TX</b>
34	GESTAÇÃO Nenhuma (0) 1 (1) 2 (2) 3 (3) >=4 (4)	<b>GEST</b>



14	IDADE DO DOADOR (anos) <=18 (0) >18-25 (1) 26- 40 (2) 41-50 (3) 51-55 (3) >55 (4)	<b>ID DOA</b> <b>SEXO DOA</b>
15	COMPATIBILIDADE 6MM(0)      5MM(1) 4MM(2)      3MM(2) 2MM(4)      1MM(5) IDENTICO (7)      0MM (6) HAPLO(8)      DISTINTO (9)	<b>COMPAT</b>
16	TEMPO DE ISQUEMIA FRIA (horas) <=12(0) >12-15= (1) >15-24= (2) >24 (3)	<b>TIF</b>
17	TEVE FUNÇÃO RETARDADA DO ENXERTO NÃO (0) SIM (1)	<b>FRE</b>
18	TEMPO DE FUNÇÃO RETARDADA DO ENXERTO (dias) <=7 (0)      8-14= (1) 15-30= (2)      >30 (3)	<b>TP FRE</b>
19	QUANTAS SESSÕES HD: 1-5 (0)      6- 10 (1) 11-15 (2)      >15 (3)	<b>NUM HD</b>
20	INDUÇÃO: NÃO (0) SIM (1)	<b>IND</b>
21	DROGA DA INDUÇÃO TIMOGLOBULINA (0) BASILIXIMAB (1)	<b>DG IND</b>
22	IMUNOSSUPRESSÃO INICIAL CORT+AZA (0) CORT+ICN+AZA (1) CORT+ICN (2) CORT+ICN+AP (3) CORT+AP (4) CORT+MTOR+ICN (5) CORT+MTOR+AP (6) CORT+MTOR (7) OUTROS (8)	<b>ISS INIC</b>
23	EPISÓDIOS DE REJEIÇÃO COMPROVADA POR BX Nenhum (0) 1ep (1)      2 ou +episódios (2)	<b>EP REJ BX</b>
24	TIPO DE REJEIÇÃO RAC (0)      RMA (1) RC (2)      OUTROS (3)	<b>TIP REJ</b>

25	TRATAMENTO DA REJEIÇÃO MP (0) TIMOGLOBULINA (1) IMUNOGLOBULINA (2) RITUXIMABE (3) OUTROS (4)	<b>TTO REJ</b>
26	INFECCÇÃO POR CMV NÃO (0) SIM (1)	<b>INFEC CMV</b>
27	PERDA DO ENXERTO NÃO (0) SIM (1)	<b>PER TX</b>
28	CAUSA DA PERDA: REJEIÇÃO (0) VASCULAR (1) INFECCIOSA (2) OUTRAS (3)	<b>CAUSA PER</b>
29	CREATININA T0 (mg/dl):	<b>CR T0</b>
30	CREATININA - T7 (mg/dl):	<b>CR T7</b>
31	CREATININA - T30 (mg/dl):	<b>CR T30</b>
32	CREATININA T90 (mg/dl):	<b>CR T90</b>
33	CREATININA - T180 (mg/dl):	<b>CR T180</b>
34	CREATININA - T365 (mg/dl):	<b>CR 365</b>
35	TFG T0 (ml/min):	<b>TFG T0</b>
36	TFG – T7 (ml/min):	<b>TFG T 7</b>
37	TFG – T30 (ml/min):	<b>TFG T30</b>
38	TFG – T90 (ml/min):	<b>TFG T90</b>
39	TFG – T180 (ml/min):	<b>TFG T180</b>
40	TFG – T365 (ml/min):	<b>TFG 365</b>
41	IMUNOSSUPRESSÃO EM T365 CORT+AZA (0) CORT+ICN+AZA (1) CORT+ICN (2) CORT+ICN+AP (3) CORT+AP (4) CORT+MTOR+ICN (5) CORT+MTOR+AP (6) CORT+MTOR (7) OUTROS (8)	<b>ISS FINAL</b>
42	COMPLICAÇÕES INFECCIOSAS ITU (0) PNM (1) INFECCÃO PAREDE (2) OUTRAS (3)	<b>COMPL INFEC</b>

43	COMPLICAÇÕES CARDIOVASCULARES <b>ICC (0)</b> <b>ARRITMIA (1)</b> <b>ICO (2)</b> <b>TEP (3)</b> <b>OUTROS (4)</b>	<b>COMPL CV</b>
44	PRA PRÉ TRANSPLANTE Zero (0) 1-49% (1) 50-79% (2) >=80% (3)	<b>PRA PRÉ TX</b>
45	TRANSFUSÃO PRE TRANSPLANTE Nenhuma (0) 1-5 (1) 6-10 (2) >10 (3)	<b>TRANSF PRE TX</b>
46	PRA PÓS TRANSPLANTE Zero (0) 1-49% (1) 50-79% (2) >=80% (3)	<b>PRA PÓS TX</b>
47	GESTAÇÃO Nenhuma (0) 1 (1) 2 (2) 3 (3) >=4 (4)	<b>GEST</b>





**APÊNDICE J**

---

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROGNÓSTICO DAS MOLÉCULAS HLA-G E PD-L1 NO TRANSPLANTE RENAL – FICHA DE BIÓPSIA RENAL**

1	CÓDIGO DO PACIENTE:	
2	DATA DO TXRENAL:	
3	DATA DA COLETA DA BIÓPSIA:	
4	IDADE NO DIA DA COLETA:	
5	INDICAÇÃO DA BIÓPSIA:	
6	LAUDO DO LABORATORIO DE REFERÊNCIA:	
7	LAUDO DO ESTUDO:	
8	OBSERVAÇÃO:	

## APÊNDICE K

---

Artigo submetido a Revista *Kidney International*, como parte das exigências para a defesa da tese de doutorado.

**Title: HLA-G expression in kidney transplant patients presenting cytomegalovirus**

Silvia M Botelho, MD<sup>1,2</sup>, Isabela J Wastowski, MD; PhD<sup>3</sup>, Nílzio A da Silva, MD;PhD<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Goiás.

<sup>2</sup>Unidade de Transplante Renal - Santa Casa de Misericórdia de Goiânia-Goiás.

<sup>3</sup>Universidade Estadual de Goiás - UEG/UnU-

Unidade Laranjeiras

<sup>4</sup>Serviço de Reumatologia da Universidade Federal de Goiás.

Running title: HLA-G and cytomegalovirus in kidney transplant

Correspondence: Silvia Marçal Botelho, Rua T-29 Número 1306, apt 602, Setor Bueno. Goiânia-Goiás, 74210-050. Brazil. [Tel.: +55 \(62\)992430503](tel:+55(62)992430503),

E-mail: [silviamarcal99@gmail.com](mailto:silviamarcal99@gmail.com)

Acknowledgments: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás.

The HLA-G has an important tolerogenic action in the transplant. Also, cytomegalovirus has been associated with an increase of acute rejection and chronic allograft dysfunction risks. The study aim was to evaluate the HLA-G expression in transplanted kidney patients presenting or not CMV. A group of 114 patients were studied. Plasma levels of HLA-G were determined using ELISA. The study variables were subjected to univariate and multivariate analysis. The HLA-G level was 84.1% lower in patients infected with CMV when compared to non-infected ones. Low levels of HLA-G observed in these patients could be considered a risk factor for rejection.

**KEYWORDS:** expression, cytomegalovirus, tolerance, transplantation

## **Introduction**

The human leukocyte antigen G (HLA-G) is a non-classical major histocompatibility complex (MHC) class Ib molecule, physiologically expressed in cytotrophoblast cells and has been known to be involved in maternal-fetal immune tolerance. Despite being similar to the Classical-I MHC proteins in terms of structure, it presents unique characteristics such as limited polymorphism, restricted tissue expression and it has seven isoforms (HLA-G1 to G7). In addition, it exerts an overall negative immune function inhibiting the activity of immune cells.<sup>1</sup>

Notably, the HLA-G molecule expression can be observed ectopically under non-physiological conditions, like transplants. HLA-G expression in transplants is capable to protect graft tissues from natural killer (NK) cells and cytotoxic T

lymphocytes. Thus, HLA-G expression becomes an important mechanism in transplant tolerance. On the other hand, HLA-G can be expressed in infections that may be associated with an increase of acute rejection and chronic allograft dysfunction risks, such as infections caused by cytomegalovirus (CMV).<sup>2</sup>

CMV is one of most frequent infectious complications after renal transplantation. This infection is associated with allograft rejection but the mechanisms behind are poorly defined yet. After infection, CMV establishes a latent and persistent infection in immature myeloid progenitors and peripheral blood monocytes. The completion of the CMV life cycle is possible after the maturation of monocytes in tissue macrophages and under permissive circumstances, for example, immunosuppression. The cellular and immunological effects of CMV (“indirect effects”) may be as important in transplantation as invasive viral infections.<sup>3</sup> The mechanisms for these effects are complex and it is related to viral evasion strategies to antiviral responses. The bidirectional linkage between CMV infection and graft injury has been observed in multiple clinical trials of cardiac, lung, liver, and kidney transplantation.<sup>4</sup> The induction of HLA-G molecules could be an additional mechanism that helps CMV to subvert host defenses.

In this context, our aim was to evaluate the HLA-G expression in transplanted kidney patients presenting or not CMV infection.

## **Results**

In the group with 114 patients studied, male patients represented 59.65% of the sample and 75.22% individuals were born in the state of Goiás. The number with 30.70% patients, on the day of collection, were between 72 and 120 months after

kidney transplant (KT) and 32.74% patients were diagnosed with underlying kidney disease as an undetermined cause. Hemodialysis represented 94.74% from the renal replacement therapy (RRT). Previous RRT time was 1-4 years in 47.62% patients. The deceased donor (DD) was responsible for 57.02% in KT; at the compatibility level, 3 mismatch were present in 19.59% of the DD and the haploidentical living donor (LD) was 29.90% in KT. The cold ischemia time (TIF) between 15-24 hours was present in 46.43% transplants. The initial and final immunosuppression schemes (ISS) with corticosteroids, calcinerin inhibitor and antiproliferative were present in 71.93%. The rejection rate confirmed by biopsies was 20.17%, with acute cellular rejection (RAC) being the one with the highest number of cases (69.57%). A number of 55.14% patients received 1-5 blood transfusions before KT. Nine percent of patients presented CMV infection.

Table 1 – Multivariate variable related to HLA-G dosage, Goiânia-GO, 2020.

Variable	Initial Model				Final Model			
	Exp{β}	E.P.(β)	I.C. 95%	p value	Exp{β}	E.P.(β)	I.C. 95%	p value
Female	1	-	-	-				
Male	0,942	0,34	[0,48: 1,83]	0,869				
Type of KT -- DD	1	-	-	-				
Type of KT -- NLDR	1,051	0,88	[0,19: 5,90]	0,951				
Type of KT -- LDR	0,357	0,97	[0,05: 2,39]	0,293				
DGF Time -- <= 7 days	1	-	-	-				
DGF Time -- 5-30 days	1,768	0,65	[0,49: 6,32]	0,389				
DGF Time -- 8-14 days	0,763	0,48	[0,30: 1,96]	0,571				
Initial ISS -- CE+ICN+AP	1	-	-	-	1	-	-	-
Initial ISS -- CE+ICN+AZA	0,106	0,62	[0,03: 0,36]	<b>0,001</b>	0,121	0,51	[0,04: 0,33]	<b>&lt;0,00</b>
Bx Ep. rejection --1	1	-	-	-	1	-	-	-
Bx Ep. rejection -- 2	0,05	1,03	[0,01: 0,38]	<b>0,006</b>	0,009	0,82	[0,00: 0,05]	<b>&lt;0,00</b>
Bx Ep. rejection -- none	2,612	0,44	[1,10: 6,19]	<b>0,037</b>	2,075	0,41	[0,93: 4,63]	0,079
CMV infection -- No	1	-	-	-	1	-	-	-
Bx Ep. rejection -- yes	0,141	0,66	[0,04: 0,51]	<b>0,005</b>	0,159	0,64	[0,05: 0,56]	<b>0,006</b>

KT-Kidney transplant; DD- deceased donor; LDR-related living donor; NLDR- non-related living donor; DGF- graft delayed function ; CE-corticosteroid; ICN- calcinerin inhibitor; AZA-azathioprine; AP-antiproliferative; CMV- cytomegalovirus; ISS- immunosuppression schemes; EP=episode: Bx- proven by renal biopsy.

The rejection rate episodes were 20% in both group of patients presenting CMV or non-infected ones. The multivariate analysis showed that CMV infection as a risk factor for the reduction of HLA-G levels when compared to the absence of infection by the virus, with 84.1% reduction HLA-G expression in infected patients ( $p = 0.006$ ).

### **Discussion:**

HLA-G has an important tolerogenic action in the transplant context. It is desired for the grafts to have a longer functional time.<sup>6</sup> Also, this molecule seems to play an important role in CMV infection.<sup>7</sup> In our study, we observed an HLA-G expression level 84.1% lower in patients infected with CMV when compared to non-infected ones.

Some studies have showed the association between HLA-G and CMV infection. Spencer, et al (2002)<sup>8</sup> have suggested that CMV stimulates the induction in HLA-G expression, probably through its IL-10 counterpart, which positively regulates HLA-G, which may contribute to immune evasion during virus infection. Xiao et al. (2011)<sup>9</sup> also reported increasing levels in mRNA HLA-G and sHLA-G in the peripheral blood KT receptors who presented CMV, when compared to the negative group. However, Farid, et al (2015)<sup>10</sup> have not observed relationship between HLA-G levels and CMV infection. Farid's study evaluated the relationship of sHLA-G in KT patients with and without AR and the acceptance in renal grafts. In the same study, the researchers also evaluated the relationship of sHLA-G with infections, including CMV, concluding that CMV infection did not affect the level of sHLA-G.

These discrepant results could be associated with HLA-G gene polymorphism. Jin et al. (2012)<sup>11</sup> have studied the HLA-G 14pb insertion / deletion (-14bp/+14bp) polymorphism in KT patients. They related the polymorphism with acute rejection,

absence of rejection and CMV infection. They found an important correlation between the higher levels of sHLA-G in patients with HLA-G -14 / -14bp and CMV infection. This aspect was also confirmed by the study, which has showed the expression of HLA-G in monocytes and high sHLA-G levels in plasma during active CMV infection in non-transplant patients (YAN et al., 2009).<sup>12</sup> In other study, carried out in Germany, the authors analyzed the influence of a single nucleotide polymorphism (SNP) +3142 C> G HLA-G, located in the 3'UTR region, in occurrence of CMV infection. In this study, 178 recipients in KT and its 178 corresponding donors were evaluated. The sHLA-G levels were quantified before and after transplantation. The presence of the HLA-G +3142 CC genotype in recipients, together with elevated levels of sHLA-G ( $\geq 6.1$  ng / mL), were associated with greater susceptibility to CMV infection after transplantation.<sup>13</sup>

The CMV infection might be associated with life-threatening complications in organ transplant recipients.<sup>14</sup> Interestingly, it is widely acknowledged that, in addition to its direct pathogenic effects, CMV infection in organ transplant recipients is associated with more frequent acute and chronic rejection. Although several possibilities have been proposed for those indirect negative effects, the mechanisms behind are poorly understood so far and direct proofs are missing. In our study, we observed a significant HLA-G expression reduction in patients infected by CMV, when comparing to non-infected patients. The HLA-G protection role in transplant has been well described and HLA-G low levels observed in these patients could be considered a risk factor for rejection<sup>15,16</sup>. More research with a larger number of patients is needed to effectively establish the relationship between HLA-G and CMV infection and the consequences in KT.

To sum up, this study has demonstrated a lower HLA-G expression in KT patients presenting CMV infection. Low levels of HLA-G observed in these patients could be considered a risk factor for rejection. Further investigations would provide deeper insights into the relationship between HLA-G expression and CMV infection in the context of KT.

## **Material and Methods**

A group with 114 patients were studied. Blood collection and data collection took place from March / 2016 to December / 2017. The study was carried out at the Kidney Transplantation Unit of Santa Casa de Misericórdia de Goiânia (SCMG). The study was authorized by the Medical Ethics Committee of SCMG, under the number 1,123,667 and CAE 44025015.0.0000.5081. The CMV diagnosis was obtained by clinical and serological evaluation and by polymerase chain reaction. Plasma levels of soluble HLA-G (sHLA-G) molecules were determined using a validated ELISA protocol.<sup>5</sup> The anti-HLA-G MEM-G9 (Exbio, Prague Czech Republic) was used in ELISA. Plasma concentrations of sHLA-G were determined using a standard five-point calibration curve (6.25–100 ng/mL) with known amounts of HLA-G5. HLAG5 was obtained from the M8-HLA-G5 transfected melanoma cell line (M8), which express the HLA-G5 molecules into the supernatant. The negative control was supernatant from M8-pcDNA cells transfected with the empty vector. The variables study was subjected to univariate and multivariate analysis to determine risk and protection factors associated with HLA-G (GPA / GPN). The statistical analyses were performed using

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2020.

Acknowledgments: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás.

## References

1. Favier B, LeMaout J, Rouas-Freiss N, Moreau P, Menier C, Carosella ED. Research on HLA-G: An update. *Tissue Antigens*. 2007;69(3):207-211. doi:10.1111/j.1399-0039.2006.00757.x.
2. Onno M, Pangault C, Le Friec G, Guilloux V, André P, Fauchet R. Modulation of HLA-G Antigens Expression by Human Cytomegalovirus: Specific Induction in Activated Macrophages Harboring Human Cytomegalovirus Infection. *J Immunol*. 2000;164(12):6426-6434. doi:10.4049/jimmunol.164.12.6426.
3. Kaminski H, Fishman JA. The Cell Biology of Cytomegalovirus: Implications for Transplantation. *Am J Transplant*. 2016;16(8):1-16. doi:10.1111/ajt.13791.
4. Stern M, Hirsch H, Cusini A, et al. Cytomegalovirus serology and replication remain associated with solid organ graft rejection and graft loss in the era of prophylactic treatment. *Transplantation*. 2014;98(9):1013-1018. doi:10.1097/TP.000000000000160.
5. Rebmann V, LeMaout J, Rouas-Freiss N, Carosella E, Grosse-Wilde H. Report of the wet workshop for quantification of soluble HLA-G in Esse, 2004. *Hum Immunol*. 2005;66(8):853-863. doi:https://doi.org/10.1016/j.humimm.2005.05.003.
6. Ajith A, Portik-Dobos V, Nguyen-Lefebvre AT, et al. HLA-G dimer targets

- Granzyme B pathway to prolong human renal allograft survival. *FASEB J.* 2019;33(4):5220-5236. doi:10.1096/fj.201802017R.
7. Albayati Z, Alyami A, Alomar S, et al. The influence of cytomegalovirus on expression of HLA-G and its ligand KIR2DL4 by human peripheral blood leucocyte subsets. *Scand J Immunol.* 2017;85(6):396-407. doi:10.1111/sji.12594.
  8. Spencer J V., Lockridge KM, Barry PA, et al. Potent Immunosuppressive Activities of Cytomegalovirus-Encoded Interleukin-10. *J Virol.* 2002;76(7):3585-3585. doi:10.1128/jvi.76.7.3585-3585.2002.
  9. Xiao L, Shi B, Gao Y, He X, Xu X, Huang H. Correlation of HLA-G expression with CMV active infection following kidney transplantation. *Chin J Organ Transpl.* 2011;32(1):534-538.
  10. Farid E, Al-Wedaie F, Tabbara K, El-Agroudy AE, Al-Ghareeb SM. Human leukocyte antigen G and renal allograft transplant. *Exp Clin Transplant.* 2015;13:371-376. doi:10.6002/ect.mesot2014.P225.
  11. Jin ZK, Xu CX, Tian PX, et al. Impact of HLA-G 14-bp polymorphism on acute rejection and cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients from northwestern China. *Transpl Immunol.* 2012;27(2-3):69-74. doi:10.1016/j.trim.2012.06.008.
  12. Yan W, Lin A, Chen B, Chen S. Induction of Both Membrane-Bound and Soluble HLA-G Expression in Active Human Cytomegalovirus Infection. *J Infect Dis.* 2009;200(5):820-826. doi:10.1086/604733.
  13. Guberina H, Michita RT, Dolff S, et al. Recipient HLA-G +3142 CC genotype and concentrations of soluble HLA-G impact on occurrence of CMV infection

- after living-donor kidney transplantation. *Int J Mol Sci.* 2017;18(11).  
doi:10.3390/ijms18112338.
14. Klenerman P, Oxenius A. T cell responses to cytomegalovirus. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(6):367-377. doi:10.1038/nri.2016.38.
  15. Reinke P, Lippert J, Ewert R, et al. Late-acute renal allograft rejection and symptomless cytomegalovirus infection. *Lancet.* 1994;344(8939-8940):1737-1738. doi:10.1016/S0140-6736(94)92887-8.
  16. Cainelli F, Vento S. Infections and solid organ transplant rejection: A cause-and-effect relationship? *Lancet Infect Dis.* 2002;2(9):539-549.  
doi:10.1016/S1473-3099(02)00370-5.

**APÊNDICE L**

---

E- mail recebido da Revista Kidney International sobre a submissão do artigo.

**Kidney International <onbehalf@manuscriptcentral.com>**

22-Jul-2020

Dear Dr. Botelho:

Your manuscript entitled "HLA-G expression in kidney transplant patients presenting cytomegalovirus" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Kidney International.

Your manuscript ID is KI-07-20-1383.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc.manuscriptcentral.com/ki> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/ki>.

Thank you for submitting your manuscript to Kidney International.

Sincerely,  
Kidney International Editorial Office

**ANEXOS**

---

## ANEXO A

---

### 1) CATEGORIA DE DIAGNÓSTICO DE BANFF A PARTIR DO CORPO DA CLASSIFICAÇÃO DE BANFF DA PATOLOGIA DOS ENXERTOS RENAIIS

(Cortesia do Dr. Stanley de Almeida Araújo, médico patologista, especialista em Nefropatologia, da Universidade Federal de Minas Gerais e Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizontes-MG)

- a. Categoria 1: Biópsia normal ou com alterações não específicas
  - i. Requer exclusão de qualquer diagnóstico das categorias de Banff
  
- b. Categoria 2: Alterações mediadas por anticorpos
  - i. Usar os critérios de diagnósticos para associar aos diagnósticos finais (abaixo)
    1. Diagnóstico
      - a. C4d com coloração positiva sem evidência de rejeição: Escore de lesão de Banff C4d>1 (imunofluorescência em tecido congelado) **OU** C4d >0 (IHQ no tecido na parafina) **E** escore de Lesão de Banff *t0*, *v0*, sem fibrose intimal arterial sem infiltrado inflamatório mononuclear na fibrose e formação de neointima, sem critérios para grupo 1 (rejeição humoral em atividade), sem critérios para o grupo 4 (alterações histológicas de rejeição humoral crônica), sem aumento da expressão genica validados na biópsia de tecido fortemente associada a rejeição humoral.
    2. Grupos de Critérios Diagnósticos:
      - a. Grupo 1 de Critérios para Rejeição Humoral em atividade:
        - Escore de lesão de Banff *g* > 0 na ausência de glomerulonefrite e/ou escore de lesão de Banff *ptc* > 0 na ausência de rejeição celular ou Borderline.
        - Escore de lesão de Banff *v* > 0
        - Microangiopatia Trombótica na ausência de qualquer outra causa
        - Necrose Tubular Aguda na ausência de qualquer outra causa aparente.

1. Diagnóstico:
    - a. Rejeição Humoral Aguda: Sem critérios para rejeição humoral crônica (Grupo de Critérios Diagnósticos 4) **E** pelo menos um critério do Grupo de Critérios 1 (Rejeição humoral em atividade) **E** pelo menos um critério do Grupo de Critérios 2 (Interação de anti-corpos com o tecido) **E** pelo menos um critério do Grupo de Critérios 3 (DSA ou equivalentes)
  2. Grupo de Critérios Diagnósticos:
    - a. Grupo de Critérios 2 interação anticorpos com o tecido:
      - Escore de lesão de Banff C4d>1 (imunofluorescência em tecido congelado) **OU** C4d >0 (IHQ no tecido na parafina)
      - Pelo menos moderada inflamação microvascular (MVI) ( $g + ptc > 1$ ) na ausência de uma glomerulonefrite em recorrência ou *de novo*; Borderline (Categoria de Diagnóstico 3) ou rejeição celular aguda (Critério de Diagnóstico 4). Se Borderline, rejeição celular aguda ou infecção estiverem presentes esse escore não é suficiente, necessitando de um escore  $g > 1$ .
      - Aumento da expressão de genes de transcrição/classificadores validados em biópsia de tecido fortemente associados a rejeição humoral.
1. Diagnóstico:
    - a. Rejeição Humoral Crônica em Atividade: Pelo menos uma característica da rejeição humoral crônica (Grupo de Critério 4) **E** pelo menos um critério de interação de anticorpo com o tecido (Grupo de Critério 2) **E** pelo menos um critério de DSA ou equivalentes (Grupo de Critério 3)
  2. Grupo de Critérios Diagnósticos:
    - a. Grupo de Critérios 3 DSA ou Equivalentes:
      - DSA (anti-HLA ou outros específicos)
      - Escore de Lesão de Banff C4d > 1 (imunofluorescência em tecido congelado) **OU** C4d >0 (IHQ no tecido na parafina)
      - Aumento da expressão de genes de transcrição/classificadores validados em biópsia

de tecido fortemente associados a rejeição humoral.

#### 1. Diagnóstico

a. Rejeição Humoral Crônica: o Banff de 2017 permite usar esse termo para as biópsias que apresentem duplicação de membrana basal glomerular na ausência de algum critério de presente/recorrente interação de anticorpos com o endotélio (Grupo de Critério 2), mas com um diagnóstico prévio e documentado de rejeição humoral crônica ou aguda, ou uma evidência prévia de DSA.

#### 2. Grupo de Critérios de Diagnósticos

a. Grupo de Critérios 4 Alterações histológicas de Rejeição Humoral Crônica:

- Escore de Lesão de Baff  $cg > 0$  (pela microscopia eletrônica, se disponível, ou pela microscopia óptica), excluindo biópsias prévias de microangiopatia trombótica prévias.

- Sete ou mais camadas em um capilar peritubular cortical e cinco ou mais em dois capilares adicionais. Evitando porções de cortes longitudinais pela microscopia eletrônica, sem disponível.

- Novo quadro de fibrose intimal arterial, excluindo outras causas; presença de leucócitos na intima vascular esclerosada favorecendo rejeição humoral crônica, se não houver biópsias prévias que evidenciem rejeição celular, porém não são totalmente necessárias.

c. Categoria 3: Suspeito (Borderline) para rejeição celular aguda

a. Foco de  $t > 0$  **E**  $i$  menor ou igual a 1 **OU** Foco de  $t1$  **E**  $i$  maior ou igual a 2.

d. Categoria 4: Rejeição Celular

a. Rejeição Celular Aguda IA:  $i \geq 2$  **E**  $t2$

b. Rejeição Celular Aguda IB:  $i \geq 2$  **E**  $t3$

c. Rejeição Celular Aguda IIA:  $v1$ , independente do  $i$  ou  $t$

- d. Rejeição Celular Aguda IIB:  $v_2$ , independente do  $i$  ou  $t$
  - e. Rejeição Celular Aguda IIC:  $v_3$ , independente do  $i$  ou  $t$
  - f. Rejeição Celular Crônica em Atividade Grau IA:  $t_i \geq 2$  **E**  $i\text{-IFTA} \geq 2$  (excluindo outras causas, com opielonefrite, poliomavirus, etc) **E**  $t_2$
  - g. Rejeição Celular Crônica em Atividade Grau IB:  $t_i \geq 2$  **E**  $i\text{-IFTA} \geq 2$  (excluindo outras causas) **E**  $t_3$
  - h. Rejeição Celular Crônica em Atividade Grau II: Fibrose intimal arterial com infiltrado celular de mononucleares na área de fibrose e formação de neointima.
- 
- e. Categoria 5: IFTA
    - a. Grau I (Leve):  $ci_1$  **OU**  $ct_1$
    - b. Grau II (Moderado):  $ci_2$  **OU**  $ct_2$
    - c. Grau III (Grave):  $ci_3$  **OU**  $ct_3$
- 
- f. Categoria 6: Outras características não causadas por rejeição aguda ou crônica:
    - a. Nefropatia por BK-Vírus
    - b. Transtorno Linfoproliferativo pós-transplante
    - c. Toxicidade por inibidores de calcineurina
    - d. Necrose Tubular Aguda
    - e. Recorrência de doenças
    - f. Glomerulopatia *de novo*
    - g. Pielonefrites
    - h. Nefrite Intersticial induzida por Drogas

## ANEXO B

## PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

SANTA CASA DE  
MISERICÓRDIA DE GOIÂNIA

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Avaliação do potencial prognóstico das moléculas HLA-G e PD-L1 no transplante renal

**Pesquisador:** SILVIA MARÇAL BOTELHO

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 44025015.0.0000.5081

**Instituição Proponente:** SANTA CASA DE MISERICORDIA DE GOIANIA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.123.667

**Data da Relatoria:** 29/06/2015

**Apresentação do Projeto:**

Apresentou todos os elementos essenciais do projeto de pesquisa.

**Objetivo da Pesquisa:**

Apresentados no projeto.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Apresentados no projeto.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Tamanho da amostra: 80.

Seleção de Pacientes: Serão selecionados pacientes atendidos pela equipe Nefrovita de Transplante renal da Santa Casa de Misericórdia de Goiânia, no período de agosto de 2015 a dezembro de 2016, submetidos a primeiro transplante de rim, que evoluírem com sinais de rejeição e que portanto, já tem por isso necessidade de biópsia renal e avaliação sorológica de rotina, e concordarem com os termos e assinatura do TCLE.

Estes terão confeccionadas lâminas da biópsia obtida para o acompanhamento e para a reação de imunohistoquímica.

A avaliação da expressão da molécula HLA-G e PD-L1 em biópsias de pacientes transplantados será realizada por técnica de imunohistoquímica utilizando-se o

**Endereço:** Rua Campinas N.º 1135

**Bairro:** Setor Americano do Brasil

**CEP:** 74.530-240

**UF:** GO

**Município:** GOIANIA

**Telefone:** (62)3254-4161

**Fax:** (62)3251-7424

**E-mail:** cep@santacasago.org.br

**SANTA CASA DE  
MISERICÓRDIA DE GOIÂNIA**

Continuação do Parecer 1.123.667

sistema de detecção universal MACH4 Universal HRP Polymer + DAB kit (Biocare, Concord, CA, EUA), segundo protocolo do fabricante, utilizando-se os anticorpos anti-HLA-G (anticorpo monoclonal MEMG2, Exbio, Praga, República Tcheca) e anti-PD-L1 ( MyBioSource, San Diego, California, EUA). D. ELISA: (I) HLA-G solúvel: Avaliaremos a expressão de HLA-G nas formas solúveis presentes no soro dos pacientes utilizando o kit de ELISA para detecção de HLA-G da Exbio (Praga, República Tcheca). (II) PD-L1: para detecção da molécula PD-L1 utilizaremos o kit da empresa My BioSource ( My BioSource, San Diego, California, EUA). Todas as amostras serão analisadas em duplicata. E. PCR quantitativo: Avaliaremos a expressão de transcritos do gene HLA-G e PDL-1 utilizando ensaio TaqMan (Life Technology). E. Análise Estatística: Serão realizados testes não-paramétricos, tais como o teste de Mann-Whitney, o teste exato de Fisher em tabelas de contingência 2X2. Todos esses serão feitos utilizando-se o software GraphPad Prism Versão 5.01. Todos os dados obtidos serão correlacionados às variáveis clínicas e histológicas.

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

Foram citados no projeto adequadamente

**Recomendações:**

Nenhuma

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

Nenhuma

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Endereço: Rua Campinas N.º 1135

Bairro: Setor Americano do Brasil

CEP: 74.530-240

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3254-4161

Fax: (62)3251-7424

E-mail: cep@santacasago.org.br

Página 02 de 03

SANTA CASA DE  
MISERICÓRDIA DE GOIÂNIA



Continuação do Parecer: 1.123.667

GOIANIA, 25 de Junho de 2015

Assinado por:

DEBORA RODRIGUES  
(Coordenador)

*Debora Rodrigues*  
Coordenadora Comitê de Ética  
em Pesquisa - SCAG

**Endereço:** Rua Campinas N.º 1135

**Bairro:** Setor Americano do Brasil

**CEP:** 74.530-240

**UF:** GO

**Município:** GOIANIA

**Telefone:** (62)3254-4161

**Fax:** (62)3251-7424

**E-mail:** cep@santacasago.org.br

## ANEXO C

## AUTORIZAÇÃO DO CONSELHO DIRETOR DA FM – UFG



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
FACULDADE DE MEDICINA



CONSELHODIRETOR

CERTIDÃO DE ATA

Certifico que o Conselho Diretor da Faculdade de Medicina da UFG, em Reunião Ordinária realizada no dia **12/09/2018**, aprovou por unanimidade o Parecer do Relator Prof. Dr. Marcelo Fouad Rabahi, para cadastramento junto ao Sistema Integrado de Gestão de Atividades Acadêmicas – SIGAA **e esta Certidão não substitui à aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa**, quanto ao Projeto de Pesquisa intitulado “AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROGNÓSTICO DAS MOLÉCULAS HLA-G E PD-L1 NO TRANSPLANTE RENAL”, executado pela doutoranda Silvia Marçal Botelho, sob a orientação do Prof. Emérito Dr. Nílzio Antônio da Silva.

Coordenação Administrativa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Goiás, em Goiânia, aos doze dias do mês de setembro de dois mil e dezoito.

  
Izildinha Alves da Silva Jorge  
Coordenadora Administrativa da FM/UFG

Visto:   
Prof. Dr. Waldemar Naves do Amaral  
Diretor da Faculdade de Medicina da UFG, em exercício