

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA**

LORRAINE VIEIRA ALVES

**ASSOCIAÇÃO DE NÍVEIS PLASMÁTICOS E
POLIMORFISMOS EM GENES DE CITOCINAS COM A
FUNÇÃO RENAL DE PACIENTES TRANSPLANTADOS**

Belo Horizonte

2018

LORRAINE VIEIRA ALVES

**ASSOCIAÇÃO DE NÍVEIS PLASMÁTICOS E POLIMORFISMOS EM
GENES DE CITOCINAS COM A FUNÇÃO RENAL DE PACIENTES
TRANSPLANTADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestra em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientadora: Prof^a Ana Paula Lucas Mota –
UFMG

Coorientadora: Prof^a Karina Braga Gomes
Borges – UFMG

Belo Horizonte

2018

A474a Alves, Lorraine Vieira.
Associação de níveis plasmáticos e polimorfismos em genes de citocinas com a função renal de pacientes transplantados / Lorraine Vieira Alves. – 2018.
131 f. : il.

Orientadora: Ana Paula Lucas Mota.
Coorientadora: Karina Braga Gomes Borges.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas.

1. Rins – Transplante – Teses. 2. Citocinas – Teses. 3. Polimorfismo genético – Teses. 4. Rejeição de enxertos – Teses. I. Mota, Ana Paula Lucas. II. Borges, Karina Braga Gomes. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD:617.461



FOLHA DE APROVAÇÃO


ASSOCIAÇÃO DE NÍVEIS PLASMÁTICOS E POLIMORFISMOS EM GENES DE CITOCINAS COM A FUNÇÃO RENAL DE PACIENTES TRANSPLANTADOS

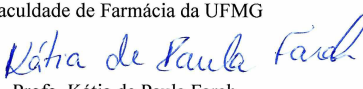
LORRAINE VIEIRA ALVES

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, área de concentração ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS.

Aprovada em 14 de setembro de 2018, pela banca constituída pelos membros:


Profª. Ana Paula Lucas Mota - Orientadora
Faculdade de Farmácia da UFMG


Profª. Karina Braga Gomes Borges
Faculdade de Farmácia da UFMG


Profª. Kátia de Paula Farah
Faculdade de Medicina da UFMG


Profª. Michelle Teodoro Alves
Fundação Hemominas

Belo Horizonte, 14 de setembro de 2018.

Dedico este trabalho ao meu avô, Euler José Vieira, seu amor e sua força espiritual jamais serão esquecidos. Você permanece sendo a luz da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora Aparecida por iluminarem a minha vida e torná-la repleta de amor e de escolhas valiosas.

À professora Ana Paula Lucas Mota, minha orientadora, por sempre ir além pelos seus alunos, pela amizade e carinho ao longo destes anos, por me inspirar com seu exemplo de profissionalismo e competência e por me orientar com tanta sabedoria. A caminhada se tornou mais leve e mais fácil com você ao meu lado.

A minha coorientadora, professora Karina Braga Gomes Borges, por todas as orientações e correções preciosas, por compartilhar seu tempo e nos ceder tanto conhecimento e pela sutileza e graciosidade de sempre.

Aos pacientes do Hospital das Clínicas da UFMG, por nos cederem seu tempo, por compartilharem suas histórias e por se disponibilizarem voluntariamente a participar da pesquisa. Sem vocês nada disso seria possível e por isso sou eternamente grata.

Às colegas do laboratório de Bioquímica e Hematologia Clínica da Faculdade de Farmácia da UFMG, Alessandra Lovato, Aline da Paz, Fernanda Gontijo, Kathryn Fontana, Laura Lara, Lilian Farias, Lorena Caixeta, Pâmela Azevedo, Rita Duarte e Vanêssa Gomes por se tornarem verdadeiras amigas e pelos momentos felizes compartilhados. Em especial, à Carolina Neris e à Suellen Rodrigues, pelas manhãs, tardes e noites que passamos juntas coletando amostras, fazendo experimentos, escrevendo artigos e estudando, sempre com muita alegria, ternura e companheirismo.

Ao médico nefrologista Fernando das Mêrces do Hospital das Clínicas da UFMG, pelo incentivo e apoio na realização deste trabalho e por compartilhar seu tempo e conhecimento clínico.

À Doutora Ana Cristina Simões e Silva, por me receber tão bem em seu laboratório e por todo o apoio para a realização das dosagens de citocinas.

Ao Doutor Leonardo Vasconcellos por ser sempre tão disponível e atencioso e por ser crucial para a realização das coletas sanguíneas.

Aos funcionários do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da UFMG por todo o auxílio nas coletas.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas pela contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais, Silvana e Anóedes, e ao meu irmão, Arthur, pelo amor sempre presente, pelo apoio diário e pelo carinho constante. Obrigada por serem meus companheiros e meus exemplos de vida. Devo a vocês todo o amor que existe em mim.

Ao meu avô, Euler, por ser a pessoa que mais admirei na vida, por seus ensinamentos repletos de espiritualidade e gentileza e por ser meu pai, avô e pra sempre meu amigo. Meu amor por você é eterno e sua falta será pra sempre sentida.

A minha avó, Sylvia, por ser exemplo de empoderamento feminino e por cuidar de mim com tanto amor e carinho.

Ao meu namorado, Thiago Leone, por todos os momentos felizes que passamos juntos, por estar sempre comigo e por todo o amor concedido.

Aos meus amigos queridos, em especial, à Carolina Marques, Daniel Anacleto, Daniela Rozenbaum, Helena Martins, Leonardo Duque, Nadja Mangini e Raphael Padrão, por repartirem suas alegrias e expandirem minha felicidade, por tantos momentos bons que tive o privilégio de compartilhar, por me apoiarem e serem meus “espíritos afins”.

À FAPEMIG, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

“Em matéria de felicidade, convém não esquecer que nos transformamos sempre naquilo que amamos.”

Chico Xavier

Colaboradores

- Dr. Fernando das Mêrces de Lucas Júnior – Médico Nefrologista do Hospital das Clínicas da UFMG
- Dra. Ana Cristina Simões e Silva – Professora Titular do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da UFMG
- Ms. Suellen Rodrigues Martins – Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG

Instituições Participantes

- Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG
- Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia da UFMG
- Laboratório de Nefrologia Pediátrica da Faculdade de Medicina da UFMG
- Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UFMG
- Laboratório Central da Faculdade de Medicina da UFMG

Apoio Financeiro

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

RESUMO

O transplante de rim é a alternativa de reposição renal mais desejável e com o melhor custo-benefício para pacientes com doença renal crônica, especialmente, em estágio terminal. As citocinas são proteínas solúveis mediadoras da resposta imune. Os polimorfismos de citocinas podem influenciar os seus níveis plasmáticos e, dessa forma, afetar o transplante renal. O objetivo deste estudo foi investigar a influência dos níveis de citocinas e de polimorfismos em seus genes sobre a função do enxerto renal e sobre a presença ou não de episódios prévios de rejeição. Avaliou-se também a relação entre estes biomarcadores e o tempo pós-transplante de receptores do transplante renal. Foram avaliados 146 pacientes distribuídos em grupos de acordo com os níveis de creatinina (C1: $\leq 1,4$ e C2: $> 1,4$ mg/dL), ritmo de filtração glomerular estimado (R1: < 60 e R2: ≥ 60 mL/min/1,73m²) e a presença de história prévia de rejeição ao enxerto (REJ: rejeição prévia; nãoREJ: sem episódio de rejeição; INDET: rejeição indeterminada). Para a determinação dos polimorfismos foi utilizado o método de PCR-SSP e para a dosagem de citocinas foi realizada a técnica de ELISA de captura para IL-10 e a técnica de Multiplex para IL-6 e TNF- α . Foi observada uma maior frequência do alelo G e do genótipo GG do polimorfismo -308G>A no gene do TNF- α no grupo R1 em relação ao R2, além de uma maior frequência do carreador A no grupo R2. O alelo G do polimorfismo +25G>C no gene do TGF- β 1 foi mais frequente no grupo REJ em relação ao grupo INDET. Foram encontrados maiores níveis de TNF- α no grupo nãoREJ em relação ao grupo INDET. Além disso, a razão TNF- α /IL-10 foi maior no grupo nãoREJ quando comparada aos demais grupos. A análise dos níveis de citocinas em função do tempo pós transplante mostrou maiores níveis de IL-6 nos subgrupos T1 (tempo 1 a 24 meses pós transplante) e T3 (tempo 61 a 120 meses pós transplante) e o predomínio de IL-10 no subgrupo T2 (tempo 25 a 60 meses pós transplante). O estudo demonstrou uma correlação positiva entre IL-6 e TNF- α e negativa entre IL-6 e IL-10, bem como entre IL-6 e o tempo pós-transplante. TNF- α também se correlacionou negativamente com IL-10. Concluiu-se que o alelo A do polimorfismo -308G>A no gene de TNF- α está associado a uma melhor função do enxerto. Pacientes que não apresentaram episódios prévios de rejeição tiveram maiores níveis de TNF- α e maior razão TNF- α /IL-10. Além disso, o polimorfismo +25G>C no gene de TGF- β 1 foi associado ao histórico de rejeição neste estudo. A influência genética e o balanço entre os níveis de citocinas podem estar associados à função do enxerto e à sobrevida dos pacientes. Estes biomarcadores poderiam ser utilizados como potenciais ferramentas de monitoramento no transplante renal.

Palavras-chave: Transplante de Rim. Citocinas. Polimorfismo Genético. Rejeição de Enxerto.

ABSTRACT

Kidney transplantation is the most desired and cost-effective alternative of renal replacement for end-stage renal disease patients. Cytokines are soluble proteins that influence the immune response. Cytokines polymorphisms can influence their plasma levels and thus affect kidney transplantation. The aim of this study was to investigate the influence of cytokines levels and their polymorphisms on renal graft function and in the presence or not of previous rejection episode. We also evaluated the relationship between these biomarkers and post-transplant time of renal transplant recipients. A total of 146 patients were classified into groups according to creatinine levels (C1: $\leq 1,4$ and C2: $> 1,4$ mg/dL), estimated glomerular filtration rate (R1: < 60 and R2: ≥ 60 mL/ min/1.73m²) and presence of previous graft rejection episode (REJ: prior rejection, noREJ: no rejection episode, INDET: indeterminate rejection). The assessment of polymorphisms was performed by PCR-SSP. IL-10 was measured by sandwich ELISA and IL-6 and TNF- α were determined using Multiplex. A higher frequency of the G allele and the GG genotype of -308G>A polymorphism in the *TNF- α* gene was observed in the R1 group compared to R2. In addition, it was found a higher frequency of the A carrier in the R2 group. The G allele of +25G>C polymorphism in the *TGF- β 1* gene was more frequent in the REJ group compared to INDET group. TNF- α higher levels were found in the noREJ group compared to INDET group. Furthermore, TNF- α /IL-10 ratio was higher in noREJ group when compared to other groups. The analysis of the time after transplantation showed higher levels of IL-6 in the T1 (time 1 to 24 months post transplantation) and T3 (time 61 to 120 months post transplantation) groups and predominance of IL-10 in T2 group (time 25 to 60 months after transplantation). This study demonstrated a positive correlation between IL-6 and TNF- α and negative correlation between IL-6 and IL-10 as well as IL-6 and post-transplant time. TNF- α also correlated negatively with IL-10. As conclusion, A allele of -308G>A polymorphism in the *TNF- α* gene is associated with better graft function. Patients who did not present previous rejection episode had higher levels of TNF- α and higher TNF- α /IL-10 ratio. In addition, the +25G>C polymorphism in the *TGF- β 1* gene was associated with the history of rejection in this study. Genetic influence and balance between cytokine levels may be associated with graft function and patient survival. These biomarkers could be used as potential monitoring tools in renal transplant.

Keywords: Kidney Transplantation. Cytokines. Polymorphism Genetic. Graft Rejection.

LISTA DE FIGURAS

1 Esquema representativo da ativação da resposta imune durante o processo de transplantação	25
2 Delineamento experimental	47
3 Níveis séricos de interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e níveis plasmáticos de interleucina-10 (IL-10) nos diferentes grupos de RTR	71
4 Razão entre os níveis de interleucina-6 (IL-6) e os níveis de interleucina-10 (IL-10) e a razão entre os níveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e os níveis de IL-10 nos diferentes grupos de RTR	72
5 Níveis séricos de interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e níveis plasmáticos de interleucina-10 (IL-10) distribuídos em grupos de acordo com o tempo pós transplante (T1: 1 a 24 meses; T2: 25 a 60 meses; T3: 61 a 120 meses e T4: acima 120 meses pós transplante)	73
6 Avaliação dos níveis séricos de interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e dos níveis plasmáticos de interleucina-10 (IL-10) em função dos seus respectivos polimorfismos genéticos	74

LISTA DE TABELAS

1 Caracterização clínica e demográfica da população estudada	55
2 Frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos de citocinas em receptores do transplante renal de acordo com os níveis séricos de creatinina	58
3 Frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos em genes de citocinas em receptores do transplante renal de acordo com o ritmo de filtração glomerular estimado	60
4 Frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos em genes de citocinas em receptores do transplante renal de acordo com a história prévia de rejeição ao enxerto	62
5 Distribuição genotípica segundo modelos dominante e recessivo em polimorfismos de citocinas em receptores do transplante renal de acordo com os níveis séricos de creatinina	64
6 Distribuição genotípica segundo modelos dominante e recessivo em polimorfismos de citocinas em receptores do transplante renal de acordo com o ritmo de filtração glomerular estimado	66
7 Distribuição genotípica segundo modelos dominante e recessivo em polimorfismos de citocinas em receptores do transplante renal de acordo com a rejeição prévia ao enxerto	68
8 Análise de correlação entre os parâmetros avaliados nos receptores do transplante renal .	75

LISTA DE QUADROS

1 Número de transplantes de órgãos sólidos realizados no Brasil durante o 1º trimestre de 2018	23
2 Números absolutos de transplantes de órgãos sólidos realizados no Brasil de janeiro de 2008 a março de 2018	24
3 Critérios resumidos para a classificação das categorias Banff	35
4 Programação do termociclador para a genotipagem dos polimorfismos em genes das citocinas	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTO	Associação Brasileira de Transplante de Órgãos
Ag	antígeno
APCs	células apresentadoras de antígenos (em inglês, <i>antigen-presenting cells</i>)
ARA	antagonistas dos receptores de angiotensina
CMV	citomegalovírus
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais
CSA	ciclosporina
DM	diabetes mellitus
DNTP's	desoxinucleotídeos trifosfatados (em inglês, <i>Deoxynucleoside triphosphate</i>)
DRC	doença renal crônica
DSA	anticorpos específicos de doadores (em inglês, <i>donor-specific antibodies</i>)
DTH	hipersensibilidade do tipo retardada (em inglês, <i>delayed type hypersensitivity</i>)
ELISA	ensaio imunoenzimático (em inglês, <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EHW	equilíbrio de Hardy-Weinberg
eRFG	ritmo de filtração glomerular estimado
HAS	hipertensão arterial sistêmica
HC/UFMG	Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais
HD	hemodiálise

HLA	antígeno leucocitário humano (em inglês, <i>human leukocyte antigen</i>)
IC	iniciação científica
IECA	inibidores da enzima conversora de angiotensina
IFN- γ	interferon-gama
IL-6	interleucina 6
IL-10	interleucina 10
IMC	índice de massa corporal
I/R	isquemia/reperfusão
IQ	intervalo interquartilico
KDIGO	<i>Kidney Disease: Improving Global Outcomes</i>
MDRD	modificação da dieta na doença renal (em inglês, <i>modification of diet in renal disease</i>)
MHC	complexo principal de histocompatibilidade (em inglês, <i>major histocompatibility complex</i>)
MMF	micofenolato mofetil
NK	células <i>natural killer</i>
PCR	reação em cadeia da polimerase (em inglês, <i>polymerase chain reaction</i>)
PCR	proteína C reativa
PCR-SSP	reação em cadeia da polimerase-iniciador específico (em inglês, <i>single specific primer-polymerase chain reaction</i>)
PDN	prednisona
PRA	painel de reatividade de anticorpos
RA	rejeição aguda
RBT	Registro Brasileiro de Transplantes

RC	rejeição crônica
ROS	espécies reativas de oxigênio (em inglês, <i>reactive oxygen species</i>)
RTR	receptores do transplante renal
SNPs	polimorfismos de nucleotídeo único (em inglês, <i>single nucleotide polymorphism</i>)
TAC	tacrolimus
TCR	receptor de células T (em inglês, <i>T-cell receptor</i>)
TGF- β 1	fator de crescimento transformador do tipo beta (em inglês, <i>transforming growth factor-beta 1</i>)
Th1	t <i>helper</i> 1
Th2	t <i>helper</i> 2
TLRs	receptores <i>toll-like</i> (<i>toll-like receptors</i>)
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa (em inglês, <i>tumor necrosis factor-alpha</i>)
TR	transplante renal
Tregs	células T reguladoras

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1 TRANSPLANTE RENAL	21
2.1.1 Histórico do transplante renal	21
2.1.2 Epidemiologia do transplante renal	23
2.1.3 Resposta imunológica no transplante renal	24
2.1.4 Rejeição ao transplante	28
2.1.4.1 Rejeição hiperaguda	29
2.1.4.2 Rejeição aguda	30
2.1.4.3 Rejeição crônica	32
2.1.4.4 Classificação de Banff	33
2.2 CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS E REGULADORAS NO TRANSPLANTE RENAL	35
2.2.1 Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α)	36
2.2.2 Interferon-gama (Interferon- γ)	37
2.2.3 Interleucina 6 (IL-6)	38
2.2.4 Fator de Crescimento Transformador Beta 1 (TGF- β 1)	39
2.2.3 Interleucina 10 (IL-10)	40
2.3 POLIMORFISMOS EM GENES DE CITOCINAS E SUA INFLUÊNCIA NO PROGNÓSTICO DO TRANSPLANTE RENAL	41
3 JUSTIFICATIVA	45
4 OBJETIVOS	46
4.1 OBJETIVO GERAL	46
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
5 MATERIAIS E MÉTODOS	47
5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ASPECTOS ÉTICOS	47
5.2 CASUÍSTICA	48
5.2.1 Critérios de inclusão	50

5.2.2 Critérios de não inclusão	50
5.3 AMOSTRAS BIOLÓGICAS	50
5.3.1 Preparo das amostras biológicas	51
5.4 MÉTODOS	51
5.4.1 Determinação dos polimorfismos em genes de citocinas	51
5.4.1.1 Extração de DNA e análise molecular de polimorfismos em genes de citocinas pela técnica PCR-SSP	51
5.4.2 Determinação dos níveis de citocinas	53
5.5.2.2 Determinação dos níveis plasmáticos de IL-10 por ELISA	53
5.5.2.2 Quantificação de IL-6 e TNF- α por Multiplex	53
5.4.3 Análises Estatísticas	54
6 RESULTADOS	55
6.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS DOS INTEGRANTES DO ESTUDO	55
6.2 DETERMINAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DOS POLIMORFISMOS EM GENES DE CITOCINAS EM RECEPTORES DO TRANSPLANTE RENAL	58
6.3 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS	70
6.3.1 Avaliação dos níveis de citocinas em função da creatinina sérica, do eRFG e da história prévia de rejeição ao enxerto em RTR	70
6.3.2 Avaliação da razão entre citocinas em função da creatinina sérica, do eRFG e da história prévia de rejeição ao enxerto em pacientes RTR	71
6.3.3 Avaliação dos níveis de citocinas em função do tempo pós transplante	73
6.3.4 Avaliação dos níveis de citocinas em função de seus polimorfismos genéticos	73
6.4 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS AVALIADOS.....	75
7 DISCUSSÃO	76
7.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS DOS INTEGRANTES DO ESTUDO	76
7.2 DETERMINAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DOS POLIMORFISMOS EM GENES DE CITOCINAS EM RECEPTORES DO TRANSPLANTE RENAL	78
7.3 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS	83

7.3.1 Avaliação dos níveis de citocinas em função da creatinina sérica, do eRFG e da história prévia de rejeição ao enxerto em RTR	83
7.3.2 Avaliação da razão entre citocinas em função da creatinina sérica, do eRFG e da história prévia de rejeição ao enxerto em pacientes RTR	85
7.3.3 Avaliação dos níveis de citocinas em função do tempo pós transplante	86
7.3.4 Avaliação dos níveis de citocinas em função de seus polimorfismos genéticos	89
7.4 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS AVALIADOS	91
8 CONCLUSÕES	93
9 PERSPECTIVAS DE ESTUDO	94
REFERÊNCIAS	95
ANEXO A	117
ANEXO B	118
ANEXO C	119
APÊNDICE A	120
APÊNDICE B	124
APÊNDICE C	125
APÊNDICE D	126
APÊNDICE E	127
PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS	128

1 INTRODUÇÃO

O transplante renal, aplicado no portador de doença renal crônica (DRC), passou a ser uma excelente alternativa para o tratamento destes pacientes, já que lhes ofereceu maior sobrevida com melhor qualidade (MOTA *et al.*, 2009).

Entretanto, o transplante induz uma reação inflamatória que desencadeia a produção renal e plasmática de citocinas. Estas citocinas estão diretamente envolvidas na resposta imunológica do receptor em relação ao órgão enxertado e nos mecanismos que desencadeiam a rejeição ao rim transplantado. Inúmeras pesquisas que visam a melhoria dos resultados pós-transplante têm como alvo a resposta imunológica gerada (PONTICELLI, 2012).

As citocinas circulantes participam de mecanismos imunológicos que culminam em expansão clonal de células T efectoras e na produção de anticorpos com atividade citotóxica. Se a reação inflamatória não é controlada por agentes imunossupressores, esta reação causa lesão e destruição do órgão transplantado. O balanço entre citocinas pró-inflamatórias e reguladoras parece ser um mecanismo chave para o desenvolvimento da rejeição ou aceitação do enxerto renal (PONTICELLI, 2012).

Dessa forma, a produção aumentada de algumas citocinas tem sido associada ao desfecho do transplante renal e estas parecem desempenhar papel importante no desenvolvimento de lesões inflamatórias crônicas em pacientes transplantados, o que permitiria a utilização clínica dessas citocinas como biomarcadores de predição à rejeição do enxerto (SEMENTILLI *et al.*, 2008).

Sabe-se que a expressão de citocinas se encontra sob forte controle genético e que os polimorfismos em genes de citocinas podem afetar a expressão gênica e a produção destes mediadores de processos inflamatórios. Apesar dos estudos controversos, estes polimorfismos têm sido associados à complexa rede de processos inflamatórios no transplante e podem ter impacto na função do enxerto, influenciando os resultados do transplante renal a longo prazo (KOCIERZ *et al.*, 2011).

Com a utilização de técnicas de biologia molecular cada vez mais avançadas na monitorização do transplante renal, há a possibilidade de diagnósticos precisos, além da melhor utilização de imunossuppressores no tratamento de pacientes transplantados, favorecendo a qualidade do enxerto (DIAS *et al.*, 2005; TAIT, 2009). A descoberta de um biomarcador ideal de custo reduzido, seguro, de fácil detecção, que reflita a efetividade do tratamento e que seja relativamente estável na população seria extremamente importante para o controle da função do enxerto no pós-transplante. Este achado levaria ao tratamento individualizado com um resultado mais efetivo (MALYSZKO *et al.*, 2015).

A definição de um marcador laboratorial que tenha uma contribuição mais efetiva à clínica, cuja monitoração e prognóstico sejam bem estabelecidos, é a chave para um transplante bem-sucedido. Assim, a realização deste estudo justifica-se pela importância em se identificar o perfil genético e inflamatório de pacientes transplantados renais, que podem gerar um diagnóstico personalizado e um tratamento mais preciso. Além disso, pelos múltiplos fatores que participam do processo de rejeição ao enxerto e pela heterogeneidade dos pacientes transplantados renais, os achados em pesquisas são, ainda, conflitantes, os quais serão confrontados com nossos dados.

Com a detecção precoce e o controle do processo inflamatório, será possível reduzir o dano ao órgão transplantado prevendo, assim, a rejeição antes mesmo da ocorrência de lesão irreversível e permitindo melhores resultados.

Diante disso, o objetivo do estudo foi investigar o papel de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras, bem como a influência de polimorfismos em genes de citocinas, em receptores do transplante renal, correlacionando estes dados com características clínicas e laboratoriais dos pacientes que se associam à resposta do receptor ao enxerto.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 TRANSPLANTE RENAL

2.1.1 Histórico do transplante renal

O transplante de órgãos sólidos é uma das terapêuticas mais importantes com grandes avanços na área da saúde, sendo o transplante renal um dos primeiros procedimentos realizados nesta esfera. Essa técnica foi iniciada como uma experiência prática progredindo para uma modalidade confiável e rotineira, mais eficaz clinicamente e mais rentável se comparada às demais estratégias de tratamento (SAYEGH; CARPENTER, 2004; STARZL, 2000; SUTHANTHIRAN; STROM, 1994).

São descritos registros com aspectos religiosos, mitológicos e arqueológicos que fazem alusão ao conceito de transplante há vários milênios (SHAYAN, 2001). Um texto hindu de 2500-3000 aC, por exemplo, descreve detalhadamente a reconstrução de narizes mutilados por punição aos crimes cometidos, com o uso de enxertos de pele cortados grosseiramente a partir de uma nádega ou queixo do próprio paciente (BERGAN, 1997).

Com o passar dos séculos, houve um progresso significativo na área de transplante quando o cirurgião francês, Alexis Carrel, aperfeiçoou métodos de sutura na anastomose vascular, técnicas de preservação de órgãos e procedimentos de reconstrução de vasos (CARREL, 1902; CARREL; GUTHRIE, 1905).

Em 1906, Jaboulay realizou os primeiros transplantes renais em humanos ao transplantar um rim de cabra para um paciente e um rim de porco para outro. Ambos os indivíduos tinham insuficiência renal e faleceram após a falha dos enxertos renais (MORRIS, 2004).

Anos depois, em 1933, um cirurgião ucraniano chamado Yu Yu Voronoy usou pela primeira vez um rim humano para o transplante em paciente com insuficiência renal aguda secundária à ingestão proposital de mercúrio. Este transplante também falhou e esta falha foi atribuída ao longo período entre a parada cardíaca do doador e o início da reperfusão no

receptor, além da incompatibilidade dos grupos sanguíneos entre doador e receptor (WATSON; DARK, 2012).

Na década de 1950, órgãos de doadores vivos começaram a ser usados, quando houve a percepção da necessidade de se evitar lesões isquêmicas excessivas. Além disso, a técnica cirúrgica antes baseada nos vasos da coxa ou do braço foi refinada em 1951 na França. Este procedimento passou a envolver a colocação do rim extraperitonealmente na fossa ilíaca, onde a bexiga estaria próxima para a anastomose com o ureter do doador, e os vasos ilíacos externos seriam de fácil acesso (WATSON; DARK, 2012).

Apesar de superar questões técnicas da cirurgia como a colocação do rim transplantado e a anastomose vascular, ainda permanecia a questão da resposta imune do receptor em relação ao órgão enxertado. O primeiro transplante bem sucedido neste contexto foi feito pela equipe de Joseph Murray, em 1954, que realizou o transplante de rim entre gêmeos idênticos (MERRILL *et al.*, 1956). Este procedimento foi tanto um sucesso imunológico quanto cirúrgico. O transplante garantiu a função renal estável e a sobrevivência do receptor oito anos após a técnica, sem nenhuma evidência de rejeição antes de seu falecimento por doença cardiovascular (LINDEN, 2009).

No final da década de 1950, a fim de suprimir a resposta imune, foi utilizado o método de radioterapia de irradiação total do corpo em receptores não geneticamente idênticos para submetê-los ao transplante de rim. A maioria dos indivíduos teve como causa de morte os efeitos da radiação (MURRAY *et al.*, 1960).

Neste momento, estava se tornando claro que outra via alternativa de supressão do sistema imunológico deveria ser incorporada como uma opção segura e bem-sucedida. Nesse sentido, a introdução da imunossupressão química trouxe um real avanço para o problema da resposta imune no transplante. Um análogo da purina, a azatioprina, foi o primeiro agente imunossupressor de sucesso (CALNE, 1961). A azatioprina juntamente com a prednisona garantiram a função renal estável durante um ano em cerca de 50% dos rins transplantados de doadores não relacionados (WATSON; DARK, 2012). Outros imunossupressores mais seguros, como a ciclosporina

(CSA) e o tacrolimus (TAC), passaram a ser utilizados posteriormente, garantindo um maior sucesso no pós-transplante renal.

No Brasil, o primeiro transplante renal foi realizado somente em 1965, na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e, felizmente, o número de centros de transplantes renais no país aumentou progressivamente nos anos seguintes (BRASIL, 2010).

2.1.2 Epidemiologia do transplante renal

Atualmente, o Brasil tem o maior sistema público de transplante do mundo (MEIRELLES JUNIOR *et al.*, 2015). No primeiro trimestre de 2018, foram realizados um total de 1.997 transplantes de órgãos sólidos, sendo 1.346 transplantes renais. Este número representa 67% dos transplantes realizados, sendo a maior parte dos órgãos transplantados provenientes de doadores falecidos (**Quadro 1**) (ABTO, 2018).

Quadro 1 – Número de transplantes de órgãos sólidos realizados no Brasil durante o 1º trimestre de 2018

Órgãos	Total	Vivo	Falecido
Rim	1.346	231	1.115
Coração	84	-	84
Fígado	509	41	468
Pâncreas	8	-	8
Pâncreas/Rim	18	-	18
Pulmão	32	0	32
Total	1.997	272	1.725

Fonte: ABTO, 2018 (modificado).

O Registro Brasileiro de Transplantes (RBT) divulgado pela Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO) revela também os dados numéricos referentes aos transplantes de órgãos e tecidos realizados no Brasil. O **Quadro 2** demonstra a evolução dos transplantes de órgãos no

Brasil, em números absolutos, de janeiro de 2008 até março de 2018. O transplante renal é considerado uma modalidade crescente com o número mais expressivo quando comparado a outros tipos de transplante no Brasil.

Quadro 2 – Números absolutos de transplantes de órgãos sólidos realizados no Brasil de janeiro de 2008 a março de 2018

Órgãos	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018*	Jan/08- Mar/18
Rim	3.815	4.287	4.656	4.982	5.431	5.464	5.661	5.589	5.529	5.933	1.346	52.693
Coração	201	201	166	160	228	271	311	353	357	380	84	2.712
Fígado	1.177	1.334	1.413	1.496	1.603	1.727	1.758	1.809	1.882	2.116	509	16.824
Pâncreas	174	160	133	181	153	143	128	120	135	112	26	1.465
Pulmão	53	59	61	49	69	80	67	74	92	112	32	748

Fonte: ABTO, 2018 (modificado).

*Dados referentes ao primeiro trimestre de 2018.

O transplante renal é, atualmente, a melhor opção terapêutica e de reabilitação para pacientes com insuficiência renal crônica em estágio terminal, por doenças congênitas, inflamatórias crônico-degenerativas e/ou infecciosas. É uma alternativa à hemodiálise (HD) com custo e eficácia superiores (MOTA *et al.*, 2009).

2.1.3 Resposta imunológica no transplante renal

Apesar de garantir vantagens para o paciente com doença renal em estágio terminal, o transplante renal causa complicações que podem levar à disfunção e, conseqüentemente, à perda do enxerto (MALYSZKO *et al.*, 2015). Deve ser visto como um processo indutor de intensa reação inflamatória no qual um órgão proveniente do doador, repleto de antígenos imunogênicos, é apresentado ao sistema imune do receptor (PEREIRA *et al.*, 2009).

A **Figura 1** resume os mecanismos imunológicos que ocorrem durante o processo de transplantação renal.

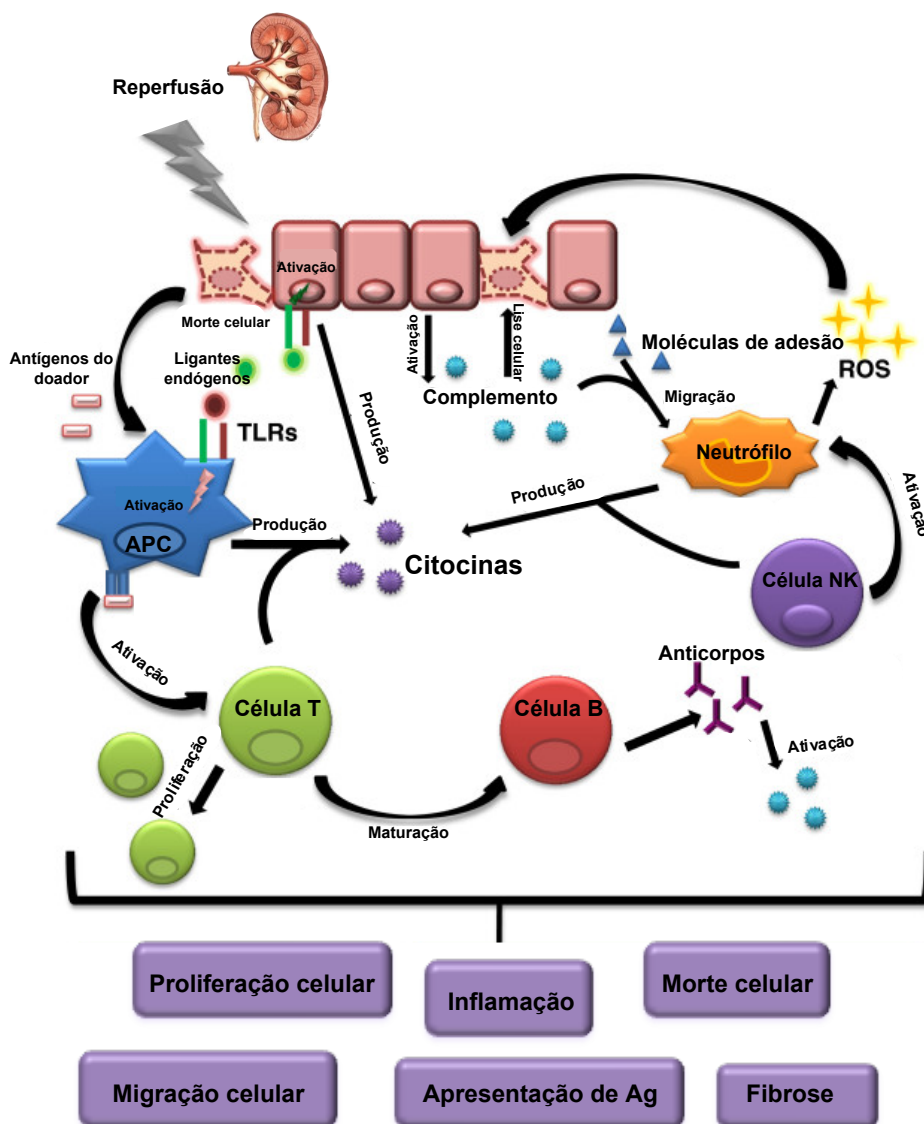


Figura 1 – Esquema representativo da ativação da resposta imune durante o processo de transplantação. Ag: antígeno; APC: célula apresentadora de antígeno; NK: Células *natural killer*; ROS: espécies reativas de oxigênio; TLRs: receptores *toll-like* (*toll-like receptors*). Fonte: AMANO; CAMARA, 2013, p. 4 (modificado).

O início da resposta imune ocorre com a restauração do fluxo sanguíneo após o transplante renal (reperfusão) que causa a morte de células endoteliais. Ligantes endógenos são então liberados e reconhecidos por receptores de células endoteliais e por receptores de células apresentadoras de antígenos (APCs). Essa ativação gera a produção de

citocinas que ativam outras células do sistema imunológico e aumentam a resposta inflamatória (AMANO; CAMARA, 2013).

Na reperfusão, também ocorre uma diminuição na expressão de inibidores do complemento pelas células endoteliais, o que estimula a ativação de proteínas do complemento. A ativação do complemento forma o complexo de ataque à membrana que causa lise das células endoteliais. Além disso, essa ativação é capaz de produzir citocinas e quimionas, aumentar a expressão de moléculas de adesão e auxiliar na migração de neutrófilos para o enxerto. Estes produzem mais citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio (ROS) que contribuem ativamente para a morte celular. Células *natural killer* (NK) também participam desse processo ao produzir citocinas e ativar neutrófilos. Já as células T levam à maturação de células B que, por sua vez, geram imunoglobulinas que também ativam o complemento (AMANO; CAMARA, 2013).

O termo aloenxerto se refere ao órgão transplantado para um indivíduo da mesma espécie geneticamente diferente. Nos transplantes de órgãos, como, por exemplo, no transplante renal, a resposta imunológica do receptor em relação ao aloenxerto é causada por células T do receptor que reconhecem aloantígenos derivados do doador pelo receptor de células T (TCR). Os aloantígenos do enxerto renal são proteínas que variam entre indivíduos da mesma espécie e que são codificadas pelo Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), sendo tais proteínas alvos para a rejeição. O MHC é formado por um conjunto de genes fundamental para a resposta imunológica no transplante. Nos seres humanos, está localizado no braço curto do cromossomo 6 e foi denominado sistema de Antígenos Leucocitários Humanos (HLA) (VOLTARELLI *et al.*, 2009).

O alorreconhecimento de antígenos no transplante culmina em uma série de eventos que envolve a ativação de células T que, por sua vez, se diferenciam em células T efetoras e sofrem expansão clonal, além de produzirem um elevado número de citocinas (DANOVITCH, 2005; HALLORAN, 2004a).

Sinais co-estimulatórios fornecidos pelas APCs são necessários para a ativação de células T. Estes sinais induzem as células T *naives* a se tornarem células T de memória garantindo um reconhecimento direto e rápido de

aloantígenos e subsequente lesão ao enxerto (MCMANIGLE; PAVLISKO; MARTINU, 2013). Em contrapartida, as células T reguladoras (Tregs) são capazes de suprimir outras células T, além de produzir Interleucina 10 (IL-10) e serem implicadas em mecanismos de tolerância ao enxerto (BHARAT, 2006).

O processo de reconhecimento de antígenos não-próprios pode ocorrer por três diferentes vias: a direta, a indireta e a semi-direta (SAFINIA *et al.*, 2010).

Na via direta, os receptores de células T são capazes de reconhecer moléculas de MHC não processadas que são expressas pelas células do doador. Na via indireta, as APCs fagocitam as moléculas de MHC das células do doador, processando e reexpressando os fragmentos de antígenos (peptídeos) em sua superfície celular. Desta maneira, os peptídeos presentes nas APCs e derivados das moléculas de MHC do enxerto são apresentados para as células T nesta via. Já na via semi-direta, as APCs adquirem moléculas de MHC intactas das células presentes no enxerto e as apresentam às células T do receptor (KHAN *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 1996; VELLA *et al.*, 1997).

As células T e seus receptores participam ativamente do processo de rejeição ao enxerto renal. A resposta imune adaptativa mediada por células T CD8+ e por células T CD4+ contra aloantígenos no enxerto constitui uma barreira importante para o sucesso do transplante. As células T CD8+ liberam moléculas que participam da atividade citotóxica, como a Perforina e a Granzima B, acarretando em apoptose de células alvo e lesão ao enxerto (HAGERTY; ALLEN, 1992; KREISEL *et al.*, 2002; SAHD, 2012).

Já as células T CD4+ do subtipo T helper 1 (Th1) produzem IL-2, que promove a proliferação celular de células T CD8+ citotóxicas e interferon gama (IFN- γ) que amplifica as respostas do tipo Th1. Além disso, as células Th1 induzem a hipersensibilidade do tipo retardada (*delayed type hypersensitivity* – DTH) que induz o recrutamento de macrófagos e monócitos e a potenciação da resposta de anticorpos mediada por células B. As células T CD4+ também são capazes de provocar danos diretos ao enxerto pela citotoxicidade mediada pela ligação da proteína Fas e seu ligante FasL (JIANG; HERRERA; LECHLER, 2004). As células T CD4+ do subtipo T

helper 2 (Th2), por sua vez, sintetizam IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 que ativam células B e eosinófilos estando, também, envolvidas no processo de rejeição ao órgão transplantado (GOLDMAN *et al.*, 2001; MARTINEZ *et al.*, 1993).

No transplante renal, deve-se levar em conta o sistema ABO do doador e do receptor para evitar a rápida destruição por anticorpos de glóbulos vermelhos incompatíveis do receptor em relação ao órgão doador. Apesar desta resposta ser facilmente evitada, quando um órgão repleto de células nucleadas é transplantado, as respostas das células T às moléculas MHC altamente polimórficas quase sempre desencadeiam uma resposta imune contra o enxerto levando à rejeição ao transplante (JANEWAY *et al.*, 2001).

Durante a rejeição ao aloenxerto, dois mecanismos imunológicos principais ocorrem: a resposta inata inespecífica predominante na fase inicial da resposta imune e a resposta adaptativa específica resultante do reconhecimento de aloantígenos do doador pelas células T do receptor (MOREAU *et al.*, 2013). A apresentação de antígenos do doador ativa a resposta imune no enxerto, favorece o desenvolvimento de fibrose e altera o perfil de citocinas (AMANO; CAMARA, 2013).

2.1.4 Rejeição ao transplante

O número de néfrons do rim doador é reduzido após o transplante renal como consequência da própria cirurgia, dos métodos de preservação, da rejeição aguda, da isquemia e de outros estressores. Seis meses após o transplante, o número de néfrons, geralmente, fica estável, o que resulta em aloenxerto com função normal. Entretanto, para um número significativo de enxertos, a lesão do rim é contínua com constante perda de néfrons. Como confirmado por biópsia, néfrons danificados não podem ser substituídos e isto leva à uma lesão cumulativa e progressiva (HALLORAN *et al.*, 2004b; NANKIVELL *et al.*, 2003).

As perdas precoces de enxerto incluem a rejeição aguda e trombose vascular. Já as perdas tardias de enxerto são geralmente o resultado de uma combinação de doença pré-existente do doador, resposta imunológica ao

enxerto e recorrência da própria doença do receptor, como a nefropatia por IgA (WATSON; DARK, 2012).

Como já mencionado, o transplante renal é um procedimento capaz de induzir a resposta imune do receptor contra aloantígenos do enxerto do doador. Nesse processo, há a liberação de quimiocinas, aumento da expressão de moléculas de adesão e citocinas pró-inflamatórias, intensificando a resposta imune e aumentando a infiltração celular no enxerto. Como consequência disso, há um aumento no risco de rejeição (KIM *et al.*, 2008).

Em geral, existem três tipos de rejeição ao enxerto: rejeição hiperaguda, rejeição aguda e rejeição crônica (CHONG; ALEGRE, 2012). Estas são categorizadas com base na velocidade com que ocorrem e constituem as principais barreiras do total sucesso de um transplante. A prevenção, o diagnóstico e o tratamento da rejeição aguda assumem importância primordial no acompanhamento do transplantado renal, já que sua resolução incompleta pode predispor à rejeição crônica (MOTA *et al.*, 2009).

2.1.4.1 Rejeição Hiperaguda

A rejeição hiperaguda geralmente ocorre nas primeiras 24 horas após o transplante, caracterizando rejeição imediata do sistema imune do receptor em relação ao rim recém transplantado. Esta rejeição é causada por anticorpos preexistentes no receptor que são dirigidos contra antígenos ABO e/ou HLA do doador. Estes anticorpos podem ser gerados em consequência de transplantes ou transfusões de sangue anteriores, infecções ou gravidez (NANKIVELL; ALEXANDER, 2010; WOOD; SHANKAR; MITTAL, 2013). A ativação do sistema do complemento pelos anticorpos citotóxicos é seguida da ativação e deposição de plaquetas com a diminuição do fluxo sanguíneo e necrose endotelial. Com isso, o enxerto não será vascularizado e deve ser removido imediatamente (COLVIN, 2007).

Mesmo entre os receptores de alto risco imunológico, a rejeição hiperaguda, atualmente, é quase inexistente em consequência da prova de compatibilidade ABO entre o sangue do doador e do receptor e do uso

generalizado de técnicas pré-transplante, como a imunofenotipagem e a prova cruzada entre doador e receptor ou *cross-match* (MONTGOMERY *et al.*, 2009; RIELLA *et al.*, 2014).

2.1.4.2 Rejeição Aguda

A rejeição aguda (RA) é uma resposta imune ao aloenxerto cujo início varia de uma semana a vários meses após o transplante, sendo amplamente atribuída à incompatibilidade HLA. A RA pode ser diagnosticada por biópsia de enxerto por meio da análise histológica e tem como base um sistema de classificação internacional, a classificação de Banff (MENGEL *et al.*, 2012; SOLEZ *et al.*, 2008). A deterioração aguda da função do enxerto associada às alterações histopatológicas caracterizam a RA de enxerto renal (SOLEZ *et al.*, 2008).

As interações complexas entre o dano renal e a ativação subsequente da inflamação e da coagulação podem levar ao desenvolvimento da RA (SINGBARTL; KELLUM, 2012).

A RA consiste em um processo inflamatório complexo e é o resultado de dois mecanismos imunológicos que podem agir sozinhos ou em conjunto: um processo dependente de células T que corresponde à rejeição celular aguda e um processo dependente de células B, que equivale à rejeição humoral aguda (PORT *et al.*, 2004).

Durante o processo de rejeição celular aguda, as células T efetoras migram para o enxerto onde ativam monócitos e granulócitos. As células T e os macrófagos invadem os túbulos e ficam entre as células epiteliais tubulares dentro da membrana basal, processo denominado tubulite e caracterizado por lesão intersticial dos túbulos. A infiltração de células T e monócitos (infiltrado mononuclear intersticial) e a tubulite são as principais características da rejeição aguda. Estas características constituem a rejeição celular tubulointersticial (KATSUMA *et al.*, 2017). A arterite intimal e transmural e a necrose fibrinóide e/ou necrose de músculo liso também são características que definem o grau de RA, segundo a classificação de Banff (HAAS *et al.*, 2018).

Os granulócitos também participam deste processo ao impulsionar e manter a resposta imune adaptativa, além de contribuir para a formação de lesões no enxerto de forma direta ou através da produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias. Adicionalmente, as células NK, células envolvidas na imunidade inata, se tornam ativas no contexto pró-inflamatório e são capazes de eliminar as células alvo (PRATSCHKE; STAUCH; KOTSCH, 2009).

Já na rejeição aguda mediada por anticorpos, há ativação da via clássica do sistema do complemento pelas imunoglobulinas (IgM e IgG) que se ligam ao HLA ou antígenos do sangue, incluindo antígenos não-HLA expressos no endotélio, e atraem neutrófilos que levam à formação do complexo de ataque às membranas. Este processo faz com que haja um recrutamento de outros leucócitos e facilita a citotoxicidade mediada por células NK ou citotoxicidade mediada por monócitos/macrófagos, levando ao dano endotelial, aumento da coagulação e perda da integridade vascular (SEMENTILLI *et al.*, 2008; SIS; HALLORAN, 2010).

O diagnóstico mais atual de RA é baseado em parâmetros da função renal, e as diretrizes KDIGO (*Kidney Disease: Improving Global Outcomes*) de 2012 preconizaram que esta rejeição pode ser definida:

- Pelo aumento da creatinina sérica em pelo menos 1,5 vezes da creatinina basal; *ou*
- Pelo aumento da creatinina sérica em pelo menos 0,3 mg/dL em 48 horas; *ou*
- Volume de urina <0,5 mL/Kg/h durante 6 horas (RODRIGUES *et al.*, 2013).

As manifestações da RA incluem lesões renais clínicas assintomáticas, porém com prognóstico relevante. Estas lesões podem contribuir para graves complicações, como mudanças nos equilíbrios hidroeletrolítico e acidobásico. Além disso, a RA é um fator de risco independente para o desenvolvimento da DRC (COCA; SINGANAMALA; PARIKH, 2012; TSAI *et al.*, 2014).

A incidência da RA foi significativamente reduzida com a introdução de novas terapias imunossupressoras, como inibidores da calcineurina, drogas anti-proliferativas, corticoides e agentes depletos de linfócitos. Com o aumento da sobrevida do enxerto, a rejeição crônica ganhou destaque ao se

tornar o principal desafio para o sucesso do transplante (SELLARES *et al.*, 2012).

2.1.4.3 Rejeição Crônica

A rejeição crônica (RC) é a principal causa de perda tardia do transplante renal e é caracterizada por alterações humorais e celulares com diminuição progressiva da função renal (SOLEZ *et al.*, 2008).

Clinicamente, há aumento progressivo da concentração de creatinina sérica e proteinúria, avançando gradualmente para a DRC. Mudanças estruturais do endotélio e da membrana basal capilar geralmente precedem as manifestações clínicas, como a proteinúria e o aumento da creatinina sérica (BECKER; MORATH; SUESAL, 2016). Geralmente, não se detecta a disfunção renal até que os níveis de creatinina estejam consideravelmente aumentados, o que impossibilita a detecção precoce desta rejeição (JUNG; LEE; KWON, 2012).

A RC pode ocorrer por mecanismos humorais, celulares ou por ambos (CORNELL; SMITH; COLVIN, 2008). Além de fatores imunológicos, os fatores não imunológicos, como infecção por citomegalovírus (CMV), lesão de isquemia-reperfusão e toxicidade por inibidores de calcineurina, também contribuem para o desenvolvimento desta rejeição (WOMER; VELLA; SAYEGH, 2000).

A incompatibilidade de antígenos HLA entre o doador e o receptor é o principal fator imunológico envolvido na RC (HERNANDEZ-FUENTES; LECHLER, 2005). A estimulação das respostas de células B e T de memória por eventos inflamatórios pode levar a formação de novos anticorpos contra antígenos HLA e, menos frequentemente, não-HLA após o transplante renal. Estes anticorpos se ligam às estruturas antigênicas, resultando em rejeição crônica mediada por anticorpos (BECKER; MORATH; SUESAL, 2016; FARKASH; COLVIN, 2012).

A rejeição crônica mediada por anticorpos é a principal forma de RC e causa lesão direta no enxerto pela ação de anticorpos e/ou lesão mediada pela ativação do sistema do complemento e/ou lesão por meio do recrutamento de células inflamatórias. A positividade para C4d é considerada

um dos indicadores da interação entre anticorpos e endotélio. Porém, não é mais um pré-requisito para o diagnóstico deste tipo de rejeição (HAAS *et al.*, 2014).

Atualmente, a rejeição crônica mediada por anticorpos é definida por dano tecidual crônico, como glomerulopatia de transplante e fibrose de íntima arterial, e interação de anticorpos com o endotélio vascular com evidências sorológicas de anticorpos específicos de doadores (DSA para HLA ou outros antígenos). A coloração de C4d ou a detecção por biópsia de transcritos gênicos específicos de rejeição mediada por anticorpos pode substituir a evidência sorológica, apesar do teste sorológico ser altamente recomendado, mesmo se os demais critérios já forem atendidos (HAAS *et al.*, 2018).

A rejeição crônica mediada por células T também assume importância no insucesso do transplante renal. É caracterizada por inflamação intersticial com tubulite grave ou moderada. No grau mais avançado da rejeição crônica mediada por células T, a arteriopatia do aloenxerto crônico, ou seja, a fibrose da íntima arterial com infiltração de células inflamatórias mononucleares e a formação da neoíntima, é diagnosticada (HAAS *et al.*, 2018).

O prognóstico e o diagnóstico da RC são feitos pela análise de biópsia do enxerto juntamente com avaliações órgão-específico da função renal (HALLORAN *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2013). No entanto, é sabido que as técnicas atuais de biópsia, os exames clínicos da função renal e as ferramentas de imagem não são capazes de prever o futuro desenvolvimento da rejeição crônica. Somente a descoberta de novos biomarcadores poderia prever o desenvolvimento da rejeição antes que ela seja estabelecida (BRUNEAU *et al.*, 2016).

No contexto das rejeições ao enxerto, a classificação de Banff se tornou uma ferramenta fundamental quanto à atualização e à padronização diagnóstica no transplante renal.

2.1.4.4 Classificação de Banff

A Classificação de Banff foi criada em 1991 em uma reunião realizada no município de Banff (Canadá). Desde então, a reunião de Banff é realizada

a cada dois anos para atualizar e revisar os critérios de rejeição no transplante (JAIN, 2010).

Esta classificação envolve a padronização e a incorporação de fatores imuno-histoquímicos, histológicos e sorológicos com o intuito de melhorar a sensibilidade diagnóstica da rejeição e fornecer dados sobre a sobrevida dos órgãos transplantados (GARCES *et al.*, 2017).

O grupo antes impulsionado, especialmente, pela área histológica, evoluiu para uma abordagem multidisciplinar e mais abrangente ao incluir as áreas de imunologia, genética e clínica com o objetivo de aperfeiçoar e estabelecer melhor os padrões diagnósticos no transplante. Além disso, tem o objetivo de acelerar o desenvolvimento de novos imunossupressores ao definir parâmetros e abordagens para testes clínicos em colaboração com agências e sociedades internacionais (O'CONNELL *et al.*, 2017; STEGALL *et al.*, 2016).

Com base nas reuniões de Banff, criou-se um padrão internacional para a avaliação de biópsias, o que permitiu a classificação da patologia do aloenxerto renal. Esta classificação distingue o diagnóstico e o tipo de rejeição ao fornecer critérios histológicos e imunológicos específicos para rejeições mediadas por anticorpos e células, além de fornecer orientação quanto à terapia utilizada em pacientes transplantados (JAIN, 2010).

A classificação de Banff causou um impacto universal na prática clínica e na pesquisa, além de beneficiar ensaios de novos fármacos ao estabelecer um padrão para o diagnóstico comprovado por biópsia. No entanto, esta classificação apresenta limitações como a falta de validação independente, ou seja, a ausência de um padrão externo para testar a classificação. Ademais, esta classificação é quase exclusivamente dependente de histopatologia que, por sua vez, tem limitações inerentes à reprodutibilidade intra e interobservador, particularmente, na situação que exige precisão, a qual há interface entre *bordeline* e rejeição (MENGEL; SIS; HALLORAN, 2007).

O **Quadro 3** mostra a classificação quanto às categorias diagnósticas de Banff e suas respectivas descrições de acordo com a XIV Conferência de Banff realizada em 2017 na Espanha.

Quadro 3 – Critérios resumidos para a classificação das categorias Banff

Categoria	Descrição
1. Normal	Biópsia normal ou alterações inespecíficas
2. Alterações mediadas por anticorpos	Evidência histológica de injúria tecidual aguda ou crônica, evidência atual de interação de anticorpos com o endotélio vascular, evidência sorológica de anticorpos específicos do doador (DSA para HLA ou outros antígenos)
3. Alterações <i>Borderline</i>	Focos de tubulite com menor inflamação intersticial ou inflamação intersticial moderada/grave com tubulite leve. A arterite intimal e arterite transmural não estão presentes
4. Rejeição mediada por células T	Para RA: Inflamação intersticial com tubulite moderada ou severa; arterite intimal leve a moderada ou grave com ou sem inflamação intersticial e/ou tubulite; arterite transmural e/ou necrose fibrinóide arterial ou necrose do músculo liso. Para RC: inflamação intersticial com tubulite moderada ou grave. Arteriopatia do aloenxerto crônico no grau mais avançado da RC

RA: rejeição aguda; RC: rejeição crônica;
 Fonte: HAAS *et al.*, 2018 (modificado).

2.2 CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS E REGULADORAS NO TRANSPLANTE RENAL

As citocinas são proteínas ou glicoproteínas solúveis consideradas mediadores chave da resposta imune. Estas proteínas se ligam aos seus receptores específicos e modulam diversos processos biológicos importantes como a diferenciação e a proliferação celular, o reparo tecidual e o processo inflamatório (ELNOKEETY; SHAKER; FAYED, 2017; KAMOUN, 2001; KEEN, 2002). As citocinas desempenham papéis essenciais na manutenção da homeostase tecidual e na defesa do hospedeiro. Entretanto, a produção excessiva ou anormal de determinadas citocinas interrompe estas funções, causando lesão tecidual e inflamação (MCINNES; SCHETT, 2007).

No transplante renal, o trauma cirúrgico e o dano decorrente da isquemia/reperfusão (I/R) induzem a liberação de citocinas e quimiocinas que participam ativamente da resposta imunológica recrutando e direcionando células T do hospedeiro para o enxerto (EL-SAWY; FAHMY; FAIRCHILD, 2002). O desfecho do transplante renal tem ampla participação de citocinas e depende das respostas imunes do tipo Th1 que está associada à rejeição ao

transplante e do tipo Th2, associada à tolerância imunológica e à sobrevida estável do enxerto (AMIRZARGAR *et al.*, 2005).

Dessa forma, a tolerância e a rejeição ao enxerto são consequências do balanço entre os mecanismos efetores e regulatórios controlados por mediadores chave, principalmente citocinas pró-inflamatórias e reguladoras. O equilíbrio entre essas citocinas é, portanto, fundamental para o sucesso ou a falha do transplante renal, principalmente no pós-transplante recente (ASHOOR; NAJAFIAN, 2012; KARCZEWSKI *et al.*, 2009; MANZANO *et al.*, 2005; PEREIRA *et al.*, 2009).

2.2.1 Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α)

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma citocina produzida por células imunes, como monócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos T (AL-LAMKI; MAYADAS, 2015). Esta citocina se liga a dois receptores de superfície, TNFR1 e TNFR2, ativando vias de sinalização relacionadas à indução da inflamação com produção de citocinas pró-inflamatórias, à proliferação e à apoptose celular, participando da modulação da resposta imune (AL-LAMKI; MAYADAS, 2015; PALLADINO *et al.*, 2003).

O TNF- α é considerado um “regulador mestre” da cascata de citocinas por seu papel central na regulação de mediadores pró e anti-inflamatórios. Porém, seu papel pró-inflamatório parece ser mais elucidado, já que participa das respostas inflamatórias com ativação e recrutamento local de leucócitos através da amplificação de quimiocinas e outras citocinas pró-inflamatórias. Além disso, altos níveis de TNF- α contribuem para a disfunção endotelial e a resistência à insulina (FIERS, 1991; STENVINKEL *et al.*, 2005).

O receptor TNFR1 pode ser encontrado no endotélio glomerular normal, diferentemente do TNF- α e do receptor TNFR2 que, geralmente, não estão presentes nos rins de indivíduos saudáveis (BRADLEY; THIRU; POBER, 1995; SPEECKAERT *et al.*, 2012). Durante o processo inflamatório, o TNF- α e seus receptores passam a ser expressos em células glomerulares e tubulares (BAUD; ARDAILLOU, 1995). Em pacientes transplantados renais, o TNF- α promove a ativação de células T e sua alta produção foi associada ao risco elevado de rejeição e à pior função do enxerto (HOFFMANN *et al.*,

2009). Adicionalmente, o TNF- α foi considerado um fator importante envolvido na patogênese da lesão renal após I/R. Evidências comprovaram que o bloqueio desta citocina atenuou a apoptose tubular e a atrofia renal no pós transplante (ADACHI *et al.*, 2014).

2.2.2 Interferon-gama (IFN- γ)

O interferon-gama (IFN- γ) é uma citocina produzida, principalmente, por células NK e linfócitos T ativados. Foi primariamente descrito como um agente antiviral. Posteriormente, foi reconhecido como um dos mais importantes reguladores da inflamação e da imunidade inata e adaptativa. Representa o único membro dos IFNs tipo II, ao contrário dos IFN tipo I que incluem vários tipos, como IFN- α , IFN- β , IFN- ω (EBERL *et al.*, 2015; FRUCHT *et al.*, 2001; SCHRODER *et al.*, 2004).

Desempenha um papel central nas respostas imunes do tipo Th1. Tem atividade comumente associada a efeitos pró-inflamatórios e imunoestimulatórios, como a ativação de macrófagos, embora também possua propriedades anti-inflamatórias, como a supressão da ativação de células T (EVARISTO; ALEGRE, 2013; SHACHAR; KARIN, 2013; VOLTARELLI *et al.*, 2009). Assim, o IFN- γ pode desencadear respostas inflamatórias em certas circunstâncias fisiológicas e controlar as respostas imunes em outras condições (WOOD; SAWITZKI, 2006).

Além disso, o IFN- γ possui papel fundamental na imunidade contra bactérias intracelulares, sendo utilizado terapêuticamente em pacientes com infecções ativas (FLYNN *et al.*, 1993; VOLTARELLI *et al.*, 2009), pode exercer efeitos antitumorais diretamente nas células cancerígenas e participa da modulação da resposta imune no câncer (DUNN; KOEBEL; SCHREIBER, 2006).

No transplante, o controle da produção de IFN- γ pode ser alcançado com a otimização da imunossupressão, sendo a produção não controlada desta citocina ligada à progressão acelerada da disfunção do enxerto renal (SHIU *et al.*, 2017). Em receptores do transplante renal (RTR), o aumento da produção de IFN- γ , a pior função do enxerto no primeiro ano e o alto risco de RA foram relacionados (KIM *et al.*, 2007; NICKEL *et al.*, 2004). No entanto,

atualmente, tem sido demonstrada a associação direta e indireta do IFN- γ na indução da tolerância imunológica *in vitro* e *in vivo* (ROŽMAN; ŠVAJGER, 2018).

2.2.3 Interleucina 6 (IL-6)

Estímulos inflamatórios induzem a expressão de Interleucina-6 (IL-6) que, por sua vez, integra uma rede de citocinas que controla a imunidade inata e adaptativa (JONES, 2005; KISHIMOTO, 2010). A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória sintetizada por células fagocitárias mononucleares (macrófagos e monócitos) e outros tipos celulares, como fibroblastos e células endoteliais (VOLTARELLI *et al.*, 2009).

É capaz de induzir a produção de proteínas de fase aguda, a proliferação e a ativação de células T, a diferenciação de células B e a produção de imunoglobulinas (AKDIS *et al.*, 2011), além de estar envolvida na disfunção endotelial e na fibrogênese (FIELDING *et al.*, 2014; WASSMANN *et al.*, 2004).

A IL-6 exerce ação relevante tanto na inflamação local, onde causa o recrutamento de leucócitos ao estimular a produção de interleucina-8 por células endoteliais, quimiocinas e moléculas de adesão, quanto na inflamação sistêmica, ao promover a ativação da resposta de fase aguda (GABEY, 2006; MCINNES; SCHETT, 2007). Além disso, a IL-6 possui função anti-inflamatória diminuindo a produção das citocinas pró-inflamatórias, IL-1 e TNF- α , ao estimular seus antagonistas específicos (XING *et al.*, 1998).

No que diz respeito ao transplante renal, uma comparação entre receptores estáveis e indivíduos saudáveis revelou níveis séricos de IL-6 semelhantes em ambos os grupos. Por outro lado, foi constatado um aumento significativo de IL-6 circulante em pacientes que apresentavam rejeição ao enxerto (SONKAR *et al.*, 2013). Além disso, foi comprovado que a IL-6 favorece o desenvolvimento de células T CD4⁺ produtoras de IL-17 ao inibir a diferenciação das células T CD4⁺ *naïves* em células reguladoras (Tregs) por Fator de Crescimento Transformador Beta (TGF- β) (FIELDING *et al.*, 2014; WASSMANN *et al.*, 2004). Dessa forma, a IL-6 juntamente com o TGF- β integram o balanço entre as respostas efetoras pró-inflamatórias e a

indução da tolerância ao enxerto participando dos mecanismos envolvidos na rejeição ao transplante (BETTELLI *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2009). Enquanto as Tregs estão diretamente ligadas à tolerância ao enxerto, elevados níveis de IL-17 foram encontrados na rejeição aguda em modelos experimentais e em RTR (HSIEH *et al.*, 2001; LOONG *et al.*, 2002).

2.2.4 Fator de Crescimento Transformador Beta 1 (TGF- β 1)

O TGF- β consiste em um grupo de três isoformas, TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3, produzido pela maioria das células. A ativação de receptores de TGF- β induz sinais intracelulares que participam de processos fisiológicos e patológicos (SCHNAPER *et al.*, 2009). O TGF- β participa de mecanismos opostos ao estimular a proliferação e diferenciação celular, assim como a indução de apoptose e antiproliferação celular, sugerindo um papel chave desta citocina, particularmente do TGF- β 1, na homeostase tecidual (DENNLER; GOUMANS; TEN DIJKE, 2002; SIEGEL; MASSAGUE, 2003).

Durante a lesão renal, o TGF- β 1, a citocina mais abundante em mamíferos, antagoniza a ação de citocinas pró-inflamatórias sendo considerada anti-inflamatória. Porém, também possui propriedades pró-inflamatórias funcionando como um quimioatrativo de leucócitos. Além disso, desempenha um papel importante como agente fibrogênico ao participar da formação de miofibroblastos através da ativação de fibroblastos (KITAMURA; SUTO, 1997; ZAVADIL; BÖTTINGER 2005; ZEISBERG *et al.*, 2008). Assim, apesar de seu papel renoprotetor no controle da inflamação, pode, também, promover a fibrose (LÓPEZ-NOVOA; NIETO, 2009).

O TGF- β estimula as células renais a produzirem proteínas da matriz extracelular o que leva ao espessamento da membrana basal e ao desenvolvimento de glomeruloesclerose. Também pode causar alterações fisiopatológicas em células renais, provocando sua apoptose, hipertrofia e/ou proliferação, além de provocar anormalidades nos podócitos. Isso pode levar à perda de capilares glomerulares e intersticiais e à redução da filtração glomerular com disfunção renal evidente (KITAMURA; SUTO, 1997; LEE, 2012; LÓPEZ-HERNÁNDEZ; LÓPEZ-NOVOA, 2012).

O TGF- β foi relacionado à progressão da DRC a nível glomerular e tubulointersticial (LÓPEZ-NOVOA *et al.*, 2011; SCHNAPER *et al.*, 2009) ao contribuir para alterações na barreira de filtração glomerular e para a degeneração dos túbulos levando à lesão renal (LOEFFLER; WOLF, 2014). Além disso, o TGF- β foi reconhecido como o principal impulsionador da fibrogênese renal, processo que envolve a infiltração de células inflamatórias, a apoptose e lesão de células tubulares, a deposição de matriz extracelular e a ativação de fibroblastos. Este processo causa comprometimento da função renal e, eventualmente, alterações renais crônicas no transplante. Em concordância, evidências constataram uma expressão aumentada de TGF- β 1 na rejeição crônica do aloenxerto renal (HIGGINS *et al.*, 2018; PARK *et al.*, 2004; PRIBYLOVA-HRIBOVA *et al.*, 2006). Em estudos clínicos, uma possível associação entre a regulação positiva da expressão e sinalização de TGF- β 1 e piores desfechos no transplante renal também foi encontrada (EINECKE *et al.*, 2010; PRIBYLOVA-HRIBOVA *et al.*, 2006).

2.2.5 Interleucina 10 (IL-10)

A interleucina 10 (IL-10) é uma citocina anti-inflamatória que promove a supressão da resposta imune do tipo Th1, inibindo a ativação de APCs, como macrófagos e células dendríticas. Esta citocina é produzida por uma variedade de tipos celulares, como células T reguladoras, macrófagos, células B, células NK e células dendríticas. Nos rins, é secretada principalmente por células endoteliais e mesangiais (SABAT *et al.*, 2010; SINUANI *et al.*, 2013).

Regula negativamente os genes pró-inflamatórios, como os que codificam IL-1, IL-6 e TNF- α , diminuindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias. Atua na resposta do tipo Th2 induzindo a diferenciação e proliferação de células B com consequente produção de anticorpos (BRUNET, 2012). Além disso, possui propriedades imunomoduladoras claras conferindo proteção a vários agentes patogênicos bacterianos, virais, fúngicos e parasitários (COUPER; BLOUNT; RILEY, 2008; SARAIVA; O'GARRA, 2010).

Esta citocina regula negativamente a expressão do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II e as moléculas co-estimuladoras B7-1/B7-2 que participam do processo de ativação de linfócitos T. Participa do processo de diferenciação de células NK, mastócitos, células B, células endoteliais e mesangiais, queratinócitos e células T citotóxicas e auxiliares (DE WAAL MALEFYT *et al.*, 1991; DING *et al.*, 1993; SINUANI *et al.*, 2013).

No transplante, a IL-10 possui impacto contrastante por ter efeito tanto estimulador do sistema imune, aumentando a produção de anticorpos contra o enxerto, como supressor da resposta imune mediada por célula T com inibição de citocinas pró-inflamatórias (HUESO *et al.*, 2010; RONCAROLO *et al.*, 2006; ROUSSET *et al.*, 1992). Nesse contexto, a IL-10 parece ter um efeito protetor mais evidente, já que foi demonstrado que a regulação positiva do gene da IL-10 pode prolongar a sobrevida do aloenxerto e melhorar a função renal (CHEN *et al.*, 2007). Ademais, a resposta imune aguda durante a rejeição do enxerto foi associada ao acúmulo de IL-10 e a superexpressão de citocinas pró-inflamatórias do tipo Th1. Nesse caso, sugeriu-se que o aumento nos níveis de IL-10 serviu para limitar e regular as respostas inflamatórias (EDEMIR *et al.*, 2008). Em receptores do transplante renal, a produção de IL-10 parece ser induzida, em menor extensão, por uma reação imune não controlada completamente e, em maior proporção, por um processo de rejeição ativa (ELNOKEETY; SHAKER; FAYED, 2017).

2.3 POLIMORFISMOS EM GENES DE CITOCINAS E SUA INFLUÊNCIA NO PROGNÓSTICO DO TRANSPLANTE RENAL

As citocinas são frequentemente codificadas por genes com alto grau de variabilidade que modulam o nível de sua produção (BIDWELL *et al.*, 2001; HOPKINS, 2003), podendo influenciar a heterogeneidade das respostas imunes (MARSHALL; WELSH, 2001).

A produção de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras pode, portanto, ser determinada por diferenças genéticas interindividuais e estas podem alterar o microambiente do enxerto e influenciar o resultado do transplante renal ao desencadear diferentes respostas, sejam elas pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias (KOCIERZ *et al.*, 2009). Nesse sentido, a

importância do conhecimento dos polimorfismos em genes de citocinas no transplante de órgãos é notória (KARIMI *et al.*, 2012).

O gene da citocina TNF- α está localizado no cromossomo 6p21.3 (MELK *et al.*, 2003). O polimorfismo de base única (*single nucleotide polymorphism* – SNP) -308G>A da região promotora do TNF- α (rs1800629) resulta em genótipos que modulam a sua expressão (HOFFMANN *et al.*, 2009). A produção elevada de TNF- α e o aumento de sua atividade transcricional estão relacionados à presença do alelo A (WILSON *et al.*, 1992; TURNER *et al.*, 1995; WILSON *et al.*, 1997).

Os achados sobre a associação entre TNF- α e a rejeição ao enxerto ainda são inconsistentes. Alguns estudos encontraram um maior risco de rejeição em RTR carreadores do alelo A (GRINYÓ *et al.*, 2008; MANCHANDA; MITTAL *et al.*, 2008; SÁNCHEZ-FRUCTUOSO *et al.*, 2016), enquanto outros autores não sustentaram tal associação (AZARPIRA *et al.*, 2009; DHAOUADI *et al.*, 2013). Em uma meta-análise, os autores concluíram que o risco aumentado de desenvolver RA do enxerto estava associado aos genótipos alto produtores de TNF- α (HU *et al.*, 2011). No entanto, um acompanhamento de pacientes durante 5 anos indicou que os RTR com baixo perfil de expressão de TNF- α (-308GG) tiveram um declínio mais rápido do ritmo de filtração glomerular estimado (eRFG) em relação àqueles com alto perfil de expressão desta citocina (-308GA e -308AA) (KOCIERZ *et al.*, 2011).

O gene da citocina IFN- γ está localizado no cromossomo 12q24.1 e o SNP +874T>A (rs2430561) está associado aos níveis de produção desta citocina (BARNES *et al.*, 1997; PRAVICA *et al.*, 1999). O alelo T foi associado a uma maior produção de IFN- γ (PRAVICA *et al.*, 2000).

Um estudo mostrou a correlação entre o genótipo alto produtor de IFN- γ e a RA em pacientes transplantados renais (KARIMI *et al.*, 2012). O genótipo de baixa produção do IFN- γ não foi detectado em pacientes com RA e foi considerado preventivo na progressão da doença renal em estágio terminal, sendo apontado como um genótipo renoprotetor (TRIPATHI *et al.*, 2010; ZIBAR *et al.*, 2011). Entretanto, outros estudos não encontraram associação entre esses polimorfismos e o desfecho do transplante renal (AZARPIRA *et al.*, 2009; SINGH *et al.*, 2009).

O gene humano da citocina IL-6 se encontra no cromossomo 7p15.3. O polimorfismo na posição -174G>C (rs1800795) está localizado na região promotora do gene da IL-6 e afeta a transcrição do gene. O alelo C está associado a um menor nível plasmático e uma menor expressão de IL-6 (FISHMAN *et al.*, 1998; JIA *et al.*, 2015).

Os genótipos de maior produção de IL-6 (-174GG e -174GC) foram associados ao maior risco de perda do enxerto e declínio mais acentuado do eRFG em relação ao genótipo de menor produção desta citocina (-174CC) (KOCIERZ *et al.*, 2011). Karimi e colaboradores (2012) constataram que o genótipo GG e o alelo G (polimorfismo -174G>C no gene da IL-6) são considerados fatores de risco de rejeição ao enxerto. Em outras análises, a associação entre este polimorfismo e a ocorrência de RA, DRC ou sobrevida do enxerto em RTR não foi relatada (ALAKULPPI *et al.*, 2004; DHAOUADI *et al.*, 2013; LOUCAIDOU *et al.*, 2005).

O gene da citocina TGF- β 1 está localizado no cromossomo 19q13.2 e a presença de SNPs influencia sua regulação e expressão (SHAH *et al.*, 2006). Dois dentre estes SNPs têm sido foco de extensas pesquisas. São eles: os polimorfismos +10T>C (rs1800470, Leu10Pro ou T29C) e +25G>C (rs1800471, Arg25Pro ou G74C) (GE *et al.*, 2014). Em conjunto, os dois SNPs resultam em nove possíveis haplótipos que são categorizados em três grupos em relação ao nível de produção *in vitro*: baixo produtor (C/C G/C, C/C C/C, T/T C/C e T/C C/C); produtor intermediário (T/C G/C, T/T G/C e C/C G/G); e alto produtor (T/T G/G e T/C G/G) (AWAD *et al.*, 1998; PERREY *et al.*, 1998).

A superexpressão de TGF- β 1 foi correlacionada ao declínio da função renal (CUHACI *et al.*, 1999) e, em alguns estudos, os genótipos alto produtores de TGF- β 1 foram associados à rejeição aguda e/ou crônica no transplante renal (ALAKULPPI *et al.*, 2004; CHOW *et al.*, 2005; NIKOLOVA *et al.*, 2008). Outros estudos, no entanto, não relataram tal associação (LIGEIRO *et al.*, 2004; TAJIK *et al.*, 2006). Uma meta-análise sugeriu que os receptores de transplante de órgãos que possuíam haplótipos considerados alto produtores de TGF- β 1 poderiam ter uma susceptibilidade genética para RA. Além disso, os autores enfatizaram que o monitoramento genético de TGF- β 1 poderia, de alguma forma, controlar a rejeição crônica, já que esta

citocina desencadeia a fibrogênese associada a esta rejeição (GE *et al.*, 2014).

A citocina IL-10 é codificada pelo gene *IL-10* localizado no cromossomo 1q32.1 (KARIMI; EBADI; POURFATHOLLAH, 2013). O promotor deste gene é altamente polimórfico e contém três polimorfismos bialélicos localizados nas posições -1082G>A (rs1800896), -819C>T (rs1800871) e -592C>A (rs1800872). Estes polimorfismos influenciam a capacidade das células em produzir IL-10, alterando seus níveis (LIU *et al.*, 2012; TURNER *et al.*, 1997).

Alguns autores relataram que os polimorfismos no gene da IL-10 poderiam afetar o risco de rejeição do rim transplantado (HUTCHINGS *et al.*, 2002; SANKARAN *et al.*, 1999). No entanto, outros estudos não encontraram associação entre os genótipos relacionados à produção de IL-10, a incidência de rejeição e a sobrevida do enxerto em pacientes transplantados renais (CHEN *et al.*, 2014; RASHAD *et al.*, 2016; XIONG *et al.*, 2015).

Assim, estudos relacionando os polimorfismos em genes de citocinas e a rejeição em RTR ainda são escassos e contraditórios, necessitando de mais estudos em populações diversas para validar os resultados. Cumpre ressaltar que existem poucos estudos investigando a frequência destes SNPs em RTR brasileiros (COELHO *et al.*, 2011; PLOTHOW *et al.*, 2003; RAMPIM, 2003).

3 JUSTIFICATIVA

A rejeição ao enxerto renal ainda constitui o maior desafio para o sucesso do transplante. Os marcadores utilizados rotineiramente na clínica, como a creatinina sérica e a proteinúria, muitas vezes falham em detectar precocemente a rejeição antes da lesão irreversível do órgão. Além disso, apesar da biópsia ser considerada o padrão de referência para o diagnóstico de rejeição, esse método constitui um procedimento invasivo que traz certos riscos ao paciente. Assim, novos biomarcadores de diagnóstico e monitoramento precisam ser explorados no transplante.

As citocinas se encaixam muito bem neste contexto por regular a resposta imune e por, possivelmente, influenciarem de forma direta o curso do transplante renal. Acredita-se que os polimorfismos em genes de citocinas possam esclarecer de alguma forma a heterogeneidade dos eventos pós transplante. Sugere-se que estes polimorfismos possam fornecer informações individuais importantes permitindo um ajuste da imunossupressão e um acompanhamento mais personalizado. Além disso, ainda existem lacunas na literatura acerca da resposta imune, mediada por citocinas e seus polimorfismos, no transplante renal. Dessa forma, a detecção de variações genéticas comuns na população que podem influenciar o equilíbrio entre os níveis de citocinas e que podem, conseqüentemente, afetar o desfecho do transplante renal, representa uma ferramenta em potencial, o que justificaria plenamente seu estudo.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar os níveis plasmáticos de citocinas e seus polimorfismos genéticos correlacionando-os com a função do enxerto, o histórico de rejeição e os dados clínicos de pacientes transplantados renais.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a genotipagem dos seguintes polimorfismos em pacientes transplantados renais: TNF- α -308G>A, TGF- β 1 códon 10 T>C, TGF- β 1 códon 25 G>C, IL-10 -1082G>A, IL-10 -819C>T, IL-10 -592C>A, IL-6 -174G>C e IFN- γ +874T>A;
- Determinar as frequências alélicas e genótípicas destes polimorfismos de acordo com os níveis séricos de creatinina, o ritmo de filtração glomerular estimado e o histórico de rejeição de receptores do transplante renal;
- Quantificar os níveis plasmáticos das citocinas IL-10, TNF- α e IL-6 e relacioná-los aos seus polimorfismos genéticos, aos marcadores da função renal avaliados, ao histórico de rejeição de pacientes transplantados renais e ao tempo pós-transplante.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ASPECTOS ÉTICOS

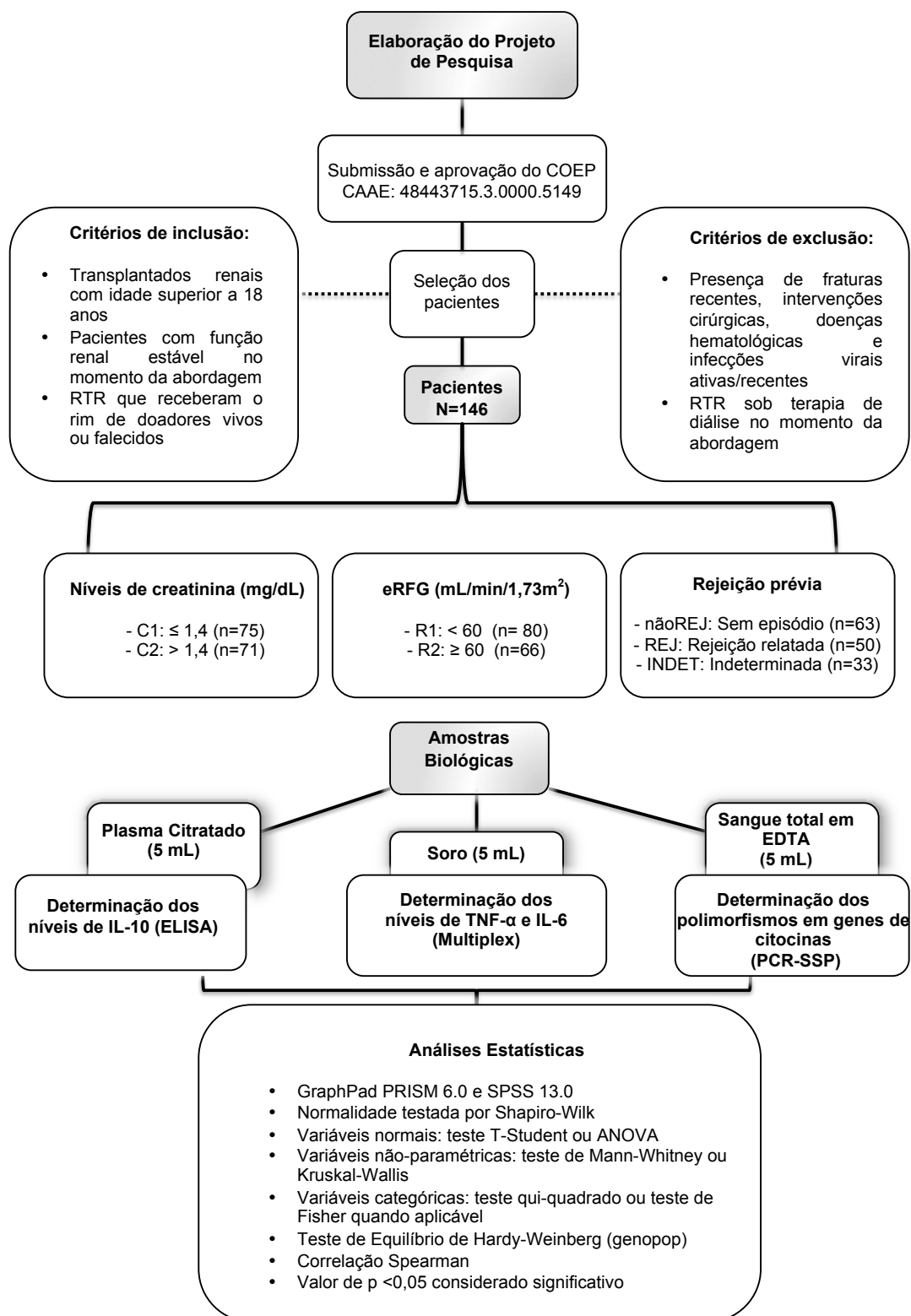


Figura 2 – Delineamento experimental. COEP: Comitê de Ética em Pesquisa. ELISA:

ensaio imunoenzimático. eRFG: ritmo de filtração glomerular estimado. PCR-SSP: reação em cadeia da polimerase-iniciador específico. RTR: receptores do transplante renal.

O presente estudo é uma continuidade do projeto desenvolvido durante a Iniciação Científica (IC) e o artigo "*Creatinine and cytokines plasma levels related to HLA compatibility in kidney transplant patients*" com os resultados parciais obtidos durante a IC foi publicado no mês de outubro de 2015.

O Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais aprovou o corrente projeto, CAAE – 48443715.3.0000.5149, sob o ponto de vista ético e formal com o título original "Avaliação de marcadores genéticos, inflamatórios e hemostáticos em pacientes transplantados renais" (**ANEXO A e B**).

Todos os participantes envolvidos foram esclarecidos quanto aos objetivos proposto nesta pesquisa.

A assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**APÊNDICE A**) foi obtida de todos os voluntários no momento da coleta de sangue. Uma ficha clínica (**APÊNDICE B**) foi elaborada e preenchida para cada participante do estudo.

5.2 CASUÍSTICA

Para este estudo transversal-observacional, foram selecionados 146 pacientes transplantados renais do setor de transplantes da Unidade Bias Fortes do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC/UFMG). As coletas de amostras biológicas de sangue venoso dos pacientes foram realizadas concomitantemente às coletas sanguíneas de rotina que haviam sido solicitadas pelo nefrologista responsável. Não houve necessidade de jejum prévio.

Dados referentes ao transplante renal (tipo de doador, data de realização do transplante, doença de base, etc) e dados clínicos e laboratoriais do dia da coleta sanguínea foram obtidos pela análise de prontuários médicos. Um banco de dados com estas informações foi elaborado e os pacientes foram, posteriormente, divididos em grupos de

acordo com os níveis de creatinina sérica, o eRFG e a presença ou não de rejeição prévia (JUNG; LEE; KWON, 2012; MOTA *et al.*, 2013).

Baseando-se na experiência clínica dos nefrologistas participantes do estudo, em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa e na literatura (ELNOKEETY; SHAKER; FAYED, 2017; FRIED *et al.*, 2003; MOTA *et al.*, 2015; MOTA *et al.*, 2017), foram estabelecidos valores de corte para a estratificação dos pacientes de acordo com a função renal.

Os pacientes foram divididos em dois grupos de acordo com a creatinina sérica:

- C1: Creatinina igual ou inferior a 1,4 mg/dL (n=75);
- C2: Creatinina superior a 1,4 mg/dL (n=71).

Os transplantados também foram distribuídos em grupos de acordo com o eRFG. Os cálculos foram feitos pela fórmula *Modification of Diet in Renal Disease* (MDRD) simplificada. O cálculo foi realizado da seguinte forma: Homens = $175 \times \text{creatinina sérica}^{-1,154} \times \text{idade}^{-0,203}$ e Mulheres = $175 \times \text{creatinina sérica}^{-1,154} \times \text{idade}^{-0,203} \times 0,742$. Para negros, a equação foi multiplicada por 1,212. Os RTR foram distribuídos da seguinte maneira:

- R1: eRFG inferior a 60 mL/min/1,73m² (n=80);
- R2: eRFG: igual ou superior a 60 mL/min/1,73m² (n=66) (MAZANOWSKA *et al.*, 2013; MOTA *et al.*, 2015).

Além disso, os RTR foram distribuídos em grupos de acordo com a presença ou não de rejeição prévia ao enxerto renal. Os dados destes grupos foram coletados a partir de prontuários médicos e foram confirmados pela equipe médica por exames laboratoriais, como proteinúria e creatinina, por pesquisa de painel de reatividade de anticorpos (PRA) e, em alguns casos, por biópsia. Esta informação foi ausente ou não relatada em 33 pacientes. Desta forma, a distribuição ocorreu da seguinte maneira:

- nãoREJ: Sem episódio de rejeição (n=63);
- REJ: Rejeição relatada (n=50);

- INDET: Rejeição indeterminada (n=33).

5.2.1 Critérios de inclusão

- Pacientes transplantados renais com função renal estável no momento da abordagem e coleta de sangue, ou seja, pacientes sem suspeita de rejeição ao enxerto;
- Idade superior a 18 anos;
- Pacientes que receberam o rim de doadores vivos ou falecidos.

5.2.2 Critérios de não inclusão

- Presença de fraturas recentes;
- Pacientes com infecções virais ativas ou em terapia antiviral profilática;
- Presença de intervenções cirúrgicas recentes;
- Sob terapia de diálise (hemodiálise, diálise peritoneal, etc) no momento da abordagem;
- Portadores de distúrbios hematológicos, tais como hemofilias, hemorragias, trombofilia, confirmados por relato médico ou por consulta ao prontuário.

5.3 AMOSTRAS BIOLÓGICAS

A coleta das amostras sanguíneas foi realizada no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da UFMG. Foram coletados 5 mL de sangue venoso em tubos contendo anticoagulante K3 - ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1,8 mg/mL (VACUETTE®), 5 mL de sangue venoso em anticoagulante citrato de sódio 0,109 mol/L (VACUETTE®) e 5 mL de sangue venoso em tubos de soro (VACUETTE®) de cada integrante do estudo por coleta a vácuo para obtenção das amostras de DNA, de plasma e de soro, respectivamente. As amostras foram devidamente acondicionadas e transportadas em caixas térmicas refrigeradas após a coleta. O tempo máximo de 2 horas até a centrifugação não foi ultrapassado.

5.3.1 Preparo das amostras biológicas

Com a finalidade de investigar os polimorfismos em genes de citocinas, foi separada uma alíquota de 600 µL de sangue total das amostras coletadas em EDTA para a posterior extração de DNA. Estas alíquotas foram armazenadas imediatamente em freezer vertical a -20°C (Eletrolux® modelo FE26) e descongeladas apenas para a realização da técnica de extração de DNA genômico. As amostras colhidas em citrato foram centrifugadas a 2.500 RPM, por 20 minutos, em centrífuga refrigerada (Jouan® modelo BR4i) a 4°C, para obtenção das amostras de plasma. As amostras colhidas em soro foram centrifugadas a 3.500 RPM, por 10 minutos, em centrífuga refrigerada (Jouan® modelo BR4i) a 4°C. Alíquotas de 500 µL de plasma citratado e de soro foram preparadas e armazenadas em microtubos de polipropileno atóxico de centrifugação (Axygen®) devidamente identificados e, posteriormente, congelados a -20°C. Cada alíquota de plasma e de soro foi descongelada apenas uma vez para a determinação dos níveis de citocinas pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) e pela técnica de Multiplex.

5.4 MÉTODOS

5.4.1 Determinação de polimorfismos em genes de citocinas

5.4.1.1 Extração de DNA e análise molecular de polimorfismos em genes de citocinas pela técnica de PCR-SSP

O DNA genômico foi extraído a partir de alíquotas de sangue total com o emprego do kit BIOPUR mini spin® seguindo rigorosamente as instruções do fabricante. Os tubos contendo DNA foram incubados por 1 hora a 65°C e armazenados em freezer vertical a -20°C (Eletrolux® modelo FE26). Um maior detalhamento da técnica de extração de DNA está contido no **APÊNDICE C**.

O DNA genômico foi investigado quanto à presença de polimorfismos em genes de citocinas pela técnica PCR-SSP (*Single Specific Primer-Polymerase Chain Reaction*). As condições de reação foram previamente descritas em outro estudo do grupo de pesquisa da UFMG (RODRIGUES,

2013). Para a genotipagem de citocinas, foi utilizado o kit *Cytokine Genotyping Tray* (One Lambda®) contendo placas de 96 poços com pares de iniciadores que amplificavam seletivamente regiões regulatórias polimórficas em genes que codificam TNF- α (-308G>A), TGF- β 1 (+10T>C, +25G>C), IL-10 (-1082G>A, -819C>T, -592C>A), IL-6 (-174G>C) e IFN- γ (+874T>A).

Para as reações, foi preparada uma mistura (Mix) da seguinte maneira: 1 μ L de Platinum® Taq DNA Polymerase foi adicionado à 180 μ L de D-Mix (solução fornecida pelo fabricante contendo desoxinucleotídeos trifosfatados – DNTPs, sacarose, sal sódico de vermelho de fenol, gelatina, MgCl₂.6H₂O, KCl, Tris.HCl). A mistura foi submetida à agitação em vórtex por 5 segundos. Posteriormente, foram adicionados 19 μ L de DNA à mistura D-mix + Platinum® Taq DNA Polymerase. Após a agitação em vórtex por 5 segundos, 10 μ L do Mix com o DNA foram distribuídos a cada poço da placa. Um branco da reação, sem adição de DNA, foi utilizado em todas as placas. Além disso, um par de iniciadores controle estava presente em cada poço da placa para verificar a integridade do DNA. Este par amplificou uma região conservada do gene da β -globulina presente em todas as amostras de DNA humano. A placa de reação foi colocada no termociclador Veriti (Applied Biosystems™) com a programação descrita no **Quadro 4**.

Quadro 4: Programação do termociclador para a genotipagem dos polimorfismos em genes das citocinas

Número de ciclos	Step	Temperatura (°C)	Tempo (seg.)
1	1	96	130
	2	63	60
9	1	96	10
	2	63	60
20	1	96	10
	2	59	50
	3	72	30
Fim	1	4	∞

Os fragmentos de DNA amplificados após a PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 2,5%. Os produtos amplificados corados por

brometo de etídio foram visualizados após a eletroforese utilizando luz ultravioleta e o gel foi fotografado.

A interpretação dos resultados foi baseada na presença ou na ausência de um fragmento de DNA específico amplificado. Os resultados foram interpretados utilizando um esquema de placas de genotipagem de citocinas fornecidos pelo fabricante do kit (**ANEXO C**).

5.4.2 Determinação dos níveis de citocinas

5.4.2.1 Determinação dos níveis plasmáticos de IL-10 por ELISA

O teste de ELISA sanduíche foi a metodologia de escolha para a determinação dos níveis plasmáticos de IL-10. O kit *Human IL-10 Immunoassay* (Quantikine® ELISA, Minneapolis, USA) foi utilizado e as instruções do fabricante foram rigorosamente seguidas. A leitura do ensaio foi realizada utilizando o leitor de microplacas (SpectraMax® Plus 384 Microplate Reader - MOLECULAR DEVICES, USA®) ajustado para 540 nm, na Faculdade de Farmácia da UFMG. As concentrações de IL-10 foram estimadas a partir de uma curva padrão para a qual foi obtido um valor de correlação $r^2 \geq 0,99$. Os resultados foram expressos em pg/mL. Mais detalhes sobre a técnica de ELISA estão presentes no **APÊNDICE D**.

5.4.2.2 Quantificação de TNF- α e IL-6 por Multiplex

As citocinas TNF- α e IL-6 foram quantificadas utilizando o kit Milliplex® MAP (*Human Bone Magnetic Bead Panel* - HBNMAG-51K, EMD Millipore Corporation, Darmstadt, Alemanha). O kit contém microesferas magnéticas fluorescentes recobertas por anticorpos de captura específicos para TNF- α e IL-6. A reação foi lida no sistema de detecção de microesferas (MAGPIX® System, Luminex Corporation, Austin, EUA) identificando o complexo antígeno-anticorpo a ela associado e a magnitude do sinal obtido pela estreptavidina conjugada com a proteína fluorescente R-ficoeritrina (estreptavidina-PE), a qual é diretamente proporcional à quantidade de antígenos de interesse detectados. As concentrações das citocinas foram

estimadas a partir de uma curva padrão para a qual foi obtido um valor de correlação $r^2 \geq 0,99$. Os resultados foram expressos em pg/mL. Um maior detalhamento da técnica de Multiplex está contido no **APÊNDICE E**.

5.4.3 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas nos programas SPSS (versão 13.0) e *GraphPad Prism* (versão 6.0). Foi verificado se as populações se encontravam sob o equilíbrio de Hardy-Weinberg utilizando-se o programa Genepop (http://genepop.curtin.edu.au/genepopo_op1.html). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. As variáveis normais foram avaliadas pelo teste T-Student ou ANOVA para dois ou três grupos, respectivamente, e expressas como média \pm desvio padrão. Já as variáveis não-paramétricas foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis, seguido pela correção de Bonferroni, para dois ou três grupos, respectivamente, e expressas como mediana e intervalo interquartilício (IQ). As variáveis categóricas foram comparadas pelo teste de Qui-quadrado (χ^2) de frequências ou Fisher quando aplicável. A investigação de correlação entre os parâmetros avaliados foi realizada pelo método de Spearman. Foram consideradas significativas diferenças cujo valor de p foi $<0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS DOS INTEGRANTES DO ESTUDO

O presente estudo incluiu 146 pacientes submetidos ao transplante renal. Destes, 91 eram do sexo masculino (62,3%) e 55 do sexo feminino (37,7%). Os principais dados clínicos e demográficos dos participantes do estudo estão apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1: Caracterização clínica e demográfica da população estudada

Parâmetros	Masculino (n=91)	Feminino (n=55)	p	Total (n=146)
Idade (anos)**	48 (59-39)	40 (54-30)	0,012*	46,5 (57,2-35,7)
Causa primária de DRC [n(%)]			0,053	
Glomerulopatias	23 (25,3%)	16 (29,1%)		39 (26,7%)
Nefroesclerose hipertensiva	18 (19,8%)	3 (5,5%)		21 (14,4%)
Doença renal do diabetes	5 (5,5%)	8 (14,5%)		13 (8,9%)
Outras causas	14 (15,4%)	14 (25,4%)		28 (19,2%)
Etiologias desconhecidas	21 (23,1%)	9 (16,4%)		30 (20,5%)
Não informado	10 (10,9%)	5 (9,1%)		15 (10,3%)
Tempo de diálise (meses)**	32,5 (58-16)	30 (51-17,5)	0,981	31 (54-16)
Tempo pós TR (meses)**	104 (165,8-60,7)	95,5 (147,8-55,5)	0,631	101 (157,5-60)
Tipo de doador [n (%)]			0,139	
Falecido	41 (45%)	34 (61,8%)		75 (51,4%)
Vivo	42 (46,2%)	17 (30,9%)		59 (40,4%)
Indeterminado	8 (8,8%)	4 (7,3%)		12 (8,2%)
Comorbidades [n (%)]			0,859	
HAS	49 (53,8%)	27 (49,1%)		76 (52%)
DM	20 (21,9%)	14 (25,4%)		34 (23,3%)
Dislipidemia	18 (19,8%)	8 (14,5%)		26 (17,8%)
Outras	42 (46,2%)	27 (49,1%)		69 (47,3%)
Não tem/não relatado	24 (26,4%)	11 (20%)		35 (23,9%)
Imunossupressão [n (%)]			0,686	
TAC+MMF+PDN	47 (51,6%)	28 (50,9%)		75 (51,4%)
CSA+MMF+PDN	17 (18,7%)	14 (25,4%)		31 (21,2%)
Outras	17 (18,7%)	7 (12,7%)		24 (16,4%)
Indeterminado	10 (11%)	6 (11%)		16 (11%)
Outros Medicamentos [n (%)]			0,243	
Hipotensores				
IECA	23 (25,3%)	11 (20%)		34 (23,3%)
β-bloqueadores	27 (29,7%)	19 (34,5%)		46 (31,5%)
Antagonistas canal Ca ²⁺	29 (31,9%)	16 (29,1%)		45 (30,8%)
ARA	26 (28,6%)	09 (16,4%)		35 (23,9%)
Diuréticos	30 (32,9%)	15 (27,3%)		45 (30,8%)

/continua

Ácido Acetilsalicílico	07 (7,7%)	07 (12,7%)	14 (9,6%)
Estatinas/Fibratos	37 (40,7%)	19 (34,5%)	56 (38,4%)
Suplementos/Polivitamínicos	17 (18,7%)	19 (34,5%)	36 (24,7%)
Ansiolíticos/Antidepressivos	04 (4,4%)	08 (14,5%)	12 (8,2%)
Insulina/Hipoglicemiantes	15 (16,5%)	12 (21,8%)	27 (18,5%)
Outros	60 (65,9%)	41 (74,5%)	101 (69,2%)
Rejeição prévia [n (%)]			0,908
Sim	32 (35,2%)	18 (32,7%)	50 (34,2%)
Não	38 (41,7%)	25 (45,5%)	63 (43,2%)
Indeterminado/Não informado	21 (23,1%)	12 (21,8%)	33 (22,6%)

Dados clínicos e laboratoriais

IMC (Kg/m ²)***	23,8 ± 3,441	24,1 ± 3,705	0,820	23,9 ± 3,499
Creatinina (mg/dL)**	1,5 (1,9-1,2)	1,1 (1,7-0,8)	0,001*	1,3 (1,8-1,1)
eRFG (mL/min/1.73m ²)**	57,1 (69,9-40,2)	58,8 (81,2-33)	0,762	57,7 (71,9-37,1)
Ureia (mg/dL)**	49 (65,0-37,0)	41 (64,7-33,7)	0,218	42 (68,0-34,0)
Ácido Úrico (mg/dL)***	7,1 ± 1,535	5,6 ± 1,738	<0,0001*	6,5 ± 1,749

*p<0,05 foi considerado significativo. **Os dados não-paramétricos estão apresentados como mediana e intervalo interquartil (Mann-Whitney). ***Os dados paramétricos estão apresentados como média e desvio padrão (T-Student). Dados de frequência (%) foram analisados pelo teste χ^2 ou pelo teste de Fisher. DRC: doença renal crônica; TR: transplante renal; HAS: hipertensão arterial sistêmica; DM: diabetes mellitus; TAC: tacrolimus; MMF: micofenolato mofetil; PDN: prednisona; CSA: ciclosporina; IECA: inibidores da enzima conversora de angiotensina; ARA: antagonistas dos receptores de angiotensina; IMC: índice de massa corporal; eRFG: ritmo de filtração glomerular estimado; MDRD: *Modification of Diet in Renal Disease*. Valores de referência: IMC - Eutrófico: 18,5 a 24,9; Creatinina: 0,4 - 1,3 mg/dL; eRFG: ≥ 90 mL/min/1,73m²; Ureia: 16-40 mg/dL; Ácido úrico: 2,5-7,4 mg/dL.

Considerando a comparação entre os sexos, a mediana das idades do sexo masculino (48 anos) foi significativamente maior do que a mediana das idades do sexo feminino (40 anos) (p=0,012). Em relação às doenças primárias que levaram ao desenvolvimento da DRC, as glomerulopatias foram as doenças mais frequentes tanto em homens (25,3%) como em mulheres (29,1%), representando a maior porcentagem da população total (26,7%). A nefroesclerose hipertensiva foi mais frequente em indivíduos do sexo masculino (19,8%) em relação aos indivíduos do sexo feminino (5,5%) e a doença renal do diabetes teve uma frequência maior em mulheres (14,5%) quando comparada a dos homens (5,5%). Não foram encontradas diferenças significativas entre as doenças de base da população do estudo (p=0,053). É importante destacar que grande parte dos RTR não possuíam causas primárias de DRC definidas (20,5%) e 10,3% dos pacientes não

apresentavam esta informação relatada em seus prontuários médicos, como mostra a **Tabela 1**.

Não foi encontrada nenhuma diferença entre os sexos em relação ao tempo de hemodiálise pré-transplante ($p=0,981$). A mediana do tempo pós-transplante, ou seja, o período entre a realização da cirurgia e a data da coleta sanguínea, foi de 101 meses nos RTR (**Tabela 1**).

O doador falecido foi o tipo de doador mais frequente em mulheres (61,8%) e o doador vivo o tipo mais comum em homens (46,2%), apesar da frequência de doadores falecidos ser bem semelhante no sexo masculino (45%). Não foi encontrada nenhuma diferença significativa na análise do tipo de doador ($p=0,139$).

No que diz respeito à presença de comorbidades detectadas após o transplante renal, a hipertensão arterial foi a mais comum (52%) e a dislipidemia foi a menos comum (17,8%). Cerca de 23,9% dos pacientes não apresentavam comorbidades ou não possuíam o dado disponível nos prontuários, como mostra a **Tabela 1**.

A terapia imunossupressora tripla mais utilizada foi a terapia composta por Tacrolimus (TAC) + Prednisona (PDN) + Micofenolato de Mofetil (MMF), representando 51,4% da população estudada. A comparação estatística das terapias imunossupressoras entre os sexos não foi significativa ($p=0,686$). Além da imunossupressão, todos os RTR faziam uso de outros medicamentos. A maioria dos pacientes utilizavam hipotensores, sendo os diuréticos os mais frequentes em homens (32,9%) e os β -bloqueadores, os mais frequentes em mulheres (34,5%). Cerca de 38,4% dos pacientes usavam estatinas/fibratos e 24,7% utilizavam suplementação/polivitamínicos. Não foram encontradas diferenças significativas do uso de medicamentos entre homens e mulheres ($p=0,243$).

A rejeição ao enxerto também foi analisada pela comparação entre os sexos e nenhuma diferença significativa foi encontrada ($p=0,908$). A maioria dos pacientes não apresentou episódio de rejeição prévia (43,2%).

As medianas obtidas para o IMC, de homens (23,8) e de mulheres (24,1), também não mostraram diferença estatística ($p=0,820$) e foi possível constatar que a maioria dos pacientes estava na faixa de peso eutrófico (entre 18,5 e 24,9 Kg/m²).

Os marcadores de filtração renal (creatinina, ureia e ácido úrico) e o eRFG também foram analisados em relação ao sexo. Somente a creatinina e o ácido úrico apresentaram diferenças significativas na comparação entre os sexos, sendo $p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente (**Tabela 1**).

6.2 DETERMINAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DOS POLIMORFISMOS EM GENES DE CITOCINAS EM RECEPTORES DO TRANSPLANTE RENAL

Os polimorfismos em genes de citocinas foram determinados em 146 RTR. As populações estavam sob o Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,025$), exceto as populações distribuídas de acordo com o histórico de rejeição para os polimorfismos -819C>T e -592C>A no gene da IL-10. Para estes polimorfismos, a fim de excluir o erro de genotipagem, os resultados foram revistos e confirmados.

Os pacientes foram distribuídos, inicialmente, de acordo com os níveis de creatinina sérica (grupos C1 e C2) e as análises das frequências alélicas e genotípicas foram realizadas. Não foram encontradas diferenças entre os dois grupos (C1 e C2) conforme mostra a **Tabela 2**.

Tabela 2 – Frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos de citocinas em receptores do transplante renal de acordo com os níveis séricos de creatinina

Genótipo	C1 (n=75)	C2 (n=71)	p
TNF-α -308G>A			
G	130 (50,8%)	126 (49,2%)	0,722
A	20 (55,6%)	16 (44,4%)	
<hr/>			
GG	56 (74,7%)	56 (78,9%)	
GA	18 (24,0%)	14 (19,7%)	0,822
AA	01 (1,3%)	01 (1,4%)	
<hr/>			
TGF-β1 +10T>C			
C	72 (55,4%)	58 (44,6%)	0,239
T	78 (48,2%)	84 (51,8%)	
<hr/>			
CC	16 (21,3%)	10 (14,1%)	
TC	40 (53,3%)	38 (53,5%)	0,425

/continua

TT	19 (25,3%)	23 (32,4%)	
TGF-β1 +25G>C			
G	142 (52,0%)	131 (48,0%)	0,480
C	08 (42,1%)	11 (57,9%)	
GG	67 (89,3%)	60 (84,5%)	
GC	08 (10,7%)	11 (15,5%)	0,386
CC	00 (0,0%)	00 (0,0%)	
IL-10 -1082G>A			
A	92 (51,4%)	87 (48,6%)	1,000
G	58 (51,3%)	55 (48,7%)	
AA	27 (36,0%)	24 (33,8%)	
GA	38 (50,7%)	39 (54,9%)	0,859
GG	10 (13,3%)	08 (11,3%)	
IL-10 -819C>T			
C	105 (51,5%)	99 (48,5%)	1,000
T	45 (51,1%)	43 (48,9%)	
CC	34 (45,3%)	33 (46,5%)	
CT	37 (49,3%)	33 (46,5%)	0,884
TT	04 (5,4%)	05 (7,0%)	
IL-10 -592C>A			
C	105 (51,5%)	99 (48,5%)	1,000
A	45 (51,1%)	43 (48,9%)	
CC	34 (45,3%)	33 (46,5%)	
CA	37 (49,3%)	33 (46,5%)	0,884
AA	04 (5,4%)	05 (7,0%)	
IL-6 -174G>C			
G	119 (51,7%)	111 (48,3%)	0,886
C	31 (50,0%)	31 (50,0%)	
GG	48 (64,0%)	44 (62,0%)	
GC	23 (30,7%)	23 (32,4%)	0,968
CC	04 (5,3%)	04 (5,6%)	
IFN-γ +874T>A			
A	99 (52,4%)	90 (47,6%)	0,713
T	51 (49,5%)	52 (50,5%)	

/continua

AA	32 (42,7%)	28 (39,4%)	
TA	35 (46,7%)	34 (47,9%)	0,891
TT	08 (10,7%)	09 (12,7%)	

Teste Qui-Quadrado de Pearson Assintótico; os dados foram apresentados como valores absolutos (frequência em %); C1: creatinina $\leq 1,4$ mg/dL; C2: creatinina $>1,4$ mg/dL. Valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Os pacientes foram, posteriormente, distribuídos de acordo com o eRFG (grupos R1 e R2). A **Tabela 3** mostra as análises das frequências alélicas e genotípicas nestes grupos. Foi observada uma maior frequência do alelo G e do genótipo GG no polimorfismo -308G>A no gene do TNF- α no grupo R1 em relação ao grupo R2 ($p=0,049$ e $p=0,028$, respectivamente).

Tabela 3 – Frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos em genes de citocinas em receptores do transplante renal de acordo com o ritmo de filtração glomerular estimado

Genótipo	R1 (n=80)	R2 (n=66)	p
TNF-α -308G>A			
G	146 (57,0%)	110 (43,0%)	0,049*
A	14 (38,9%)	22 (61,1%)	
GG			
GA	12 (15,0%)	20 (30,3%)	0,028^{a*}
AA	01 (1,3%)	01 (1,5%)	
TGF-β1 +10T>C			
C	71 (54,6%)	59 (45,4%)	1,000
T	89 (54,9%)	73 (45,1%)	
CC			
TC	41 (51,2%)	37 (56,1%)	0,844
TT	24 (30,0%)	18 (27,3%)	
TGF-β1 +25G>C			
G	149 (54,6%)	124 (45,4%)	0,816
C	11 (57,9%)	08 (42,1%)	

/continua

GG	69 (86,3%)	58 (87,9%)	
GC	11 (13,7%)	08 (12,1%)	0,809
CC	00 (0,0%)	00 (0,0%)	
IL-10 -1082G>A			
A	99 (55,3%)	80 (44,7%)	0,904
G	61 (54,0%)	52 (46,0%)	
AA	28 (35,0%)	23 (34,8%)	
GA	43 (53,7%)	34 (51,5%)	0,904
GG	09 (11,3%)	09 (13,6%)	
IL-10 -819C>T			
C	111 (54,4%)	93 (46,6%)	0,898
T	49 (55,7%)	39 (44,3%)	
CC	36 (45,0%)	31 (47,0%)	
CT	39 (48,7%)	31 (47,0%)	0,972
TT	05 (6,3%)	04 (6,0%)	
IL-10 -592C>A			
C	111 (54,4%)	93 (46,6%)	0,898
A	49 (55,7%)	39 (44,3%)	
CC	36 (45,0%)	31 (47,0%)	
CA	39 (48,7%)	31 (47,0%)	0,972
AA	05 (6,3%)	04 (6,0%)	
IL-6 -174G>C			
G	126 (54,8%)	104 (45,2%)	1,000
C	34 (54,8%)	28 (45,2%)	
GG	50 (62,5%)	42 (63,6%)	
GC	26 (32,5%)	20 (30,3%)	0,933
CC	04 (5,0%)	04 (6,1%)	
IFN-γ +874T>A			
A	102 (54,0%)	87 (46,0%)	0,713
T	58 (56,3%)	45 (43,7%)	
AA	30 (37,5%)	30 (45,5%)	
TA	42 (52,5%)	27 (40,9%)	0,695
TT	08 (10,0%)	09 (13,6%)	

/continua

Teste Qui-Quadrado de Pearson Assintótico; os dados foram apresentados como valores absolutos (frequência em %); R1: eRFG <60 mL/min/1,73m²; R2: eRFG ≥60 mL/min/1,73m².
*Valor de p<0,05 foi considerado significativo. ^a GG x GA.

Os pacientes RTR também foram distribuídos de acordo com a história prévia de rejeição ao enxerto (grupos nãoREJ, REJ e INDET). Foi observada apenas uma maior frequência do alelo G do polimorfismo +25 G>C no gene do TGF-β1 no grupo REJ em relação ao grupo INDET (p=0,036) (**Tabela 4**).

Tabela 4 – Frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos em genes de citocinas em receptores do transplante renal de acordo com a história prévia de rejeição ao enxerto

Genótipo	nãoREJ (n=63)	REJ (n=50)	INDET (n=33)	p
TNF-α -308G>A				
G	113 (44,1%)	84 (32,8%)	59 (23,1%)	0,386
A	13 (36,1%)	16 (44,4%)	07 (19,5%)	
GG	51 (80,9%)	35 (70,0%)	26 (78,8%)	0,644
GA	11 (17,5%)	14 (28,0%)	07 (21,2%)	
AA	01 (1,6%)	01 (2,0%)	00 (0,0%)	
TGF-β1 +10T>C				
C	60 (46,2%)	41 (31,5%)	29 (22,3%)	0,606
T	66 (40,7%)	59 (36,4%)	37 (22,9%)	
CC	13 (20,6%)	08 (16,0%)	05 (15,1%)	0,831
TC	34 (54,0%)	25 (50,0%)	19 (57,6%)	
TT	16 (25,4%)	17 (34,0%)	09 (27,3%)	
TGF-β1 +25G>C				
G	115 (46,9%)	97 (39,6%)	33 (13,5%)	0,097 ^a ; 0,531 ^b ; 0,036^{c*}
C	11 (57,9%)	03 (15,8%)	05 (26,3%)	
GG	52 (82,5%)	47 (94,0%)	28 (84,8%)	0,182
GC	11 (17,5%)	03 (6,0%)	05 (15,2%)	
CC	00 (0,0%)	00 (0,0%)	00 (0,0%)	
IL-10 -1082G>A				

/continua

A	74 (41,1%)	62 (34,6%)	43 (24,0%)	0,675
G	52 (46,0%)	38 (33,6%)	23 (20,4%)	
<hr/>				
AA	20 (31,7%)	17 (34,0%)	14 (42,4%)	
GA	34 (54,0%)	28 (56,0%)	15 (45,5%)	0,810
GG	09 (14,3%)	05 (10,0%)	04 (12,1%)	
<hr/>				
IL-10 -819C>T				
C	91 (44,6%)	68 (33,3%)	45 (22,1%)	0,745
T	35 (39,8%)	32 (36,4%)	21 (23,8%)	
<hr/>				
CC	32 (50,8%)	23 (46,0%)	12 (36,4%)	
CT	27 (42,9%)	22 (44,0%)	21 (63,6%)	0,170
TT	04 (6,3%)	05 (10,0%)	00 (0,0%)	
<hr/>				
IL-10 -592C>A				
C	91 (44,6%)	68 (33,3%)	45 (22,1%)	0,745
A	35 (39,8%)	32 (36,4%)	21 (23,8%)	
<hr/>				
CC	32 (50,8%)	23 (46,0%)	12 (36,4%)	
CA	27 (42,9%)	22 (44,0%)	21 (63,6%)	0,170
AA	04 (6,3%)	05 (10,0%)	00 (0,0%)	
<hr/>				
IL-6 -174G>C				
G	97 (42,2%)	78 (33,9%)	55 (23,9%)	0,577
C	29 (46,8%)	22 (35,5%)	11 (17,7%)	
<hr/>				
GG	37 (58,7%)	32 (64,0%)	23 (69,7%)	
GC	23 (36,5%)	14 (28,0%)	09 (27,3%)	0,679
CC	03 (4,8%)	04 (8,0%)	01 (3,0%)	
<hr/>				
IFN-γ +874T>A				
A	86 (45,5%)	61 (32,3%)	42 (22,2%)	0,514
T	40 (38,8%)	39 (37,9%)	24 (23,3%)	
<hr/>				
AA	27 (42,8%)	21 (42,0%)	12 (36,4%)	
TA	32 (50,8%)	19 (38,0%)	18 (54,5%)	0,172
TT	04 (6,4%)	10 (20,0%)	03 (9,1%)	

Teste Qui-Quadrado de Pearson Assintótico; os dados foram apresentados como valores absolutos (frequência em %); nãoREJ: não rejeição; REJ: rejeição; INDET: indeterminado. ^a grupos não rejeição x rejeição; ^b grupos não rejeição x indeterminado; ^c grupos rejeição x indeterminado. *Valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

A comparação das frequências genotípicas foi novamente realizada entre os grupos utilizando-se, quando possível, os modelos de herança dominante e recessivo, uma vez que o padrão de herança genética destes polimorfismos não é totalmente conhecido (**Tabela 5**). Os RTR foram novamente distribuídos de acordo com os níveis de creatinina sérica (grupos C1 e C2). Não foram encontradas diferenças quanto às distribuições das frequências dos carreadores entre os grupos C1 e C2.

Tabela 5 – Distribuição genotípica segundo modelos dominante e recessivo em polimorfismos de citocinas em receptores do transplante renal de acordo com os níveis séricos de creatinina

Genótipo	C1 (n=75)	C2 (n=71)	p
TNF-α -308G>A			
Carreador G			
GG +GA	74 (98,7%)	70 (98,6%)	0,968
AA	01 (1,3%)	01 (1,4%)	
Carreador A			
AA+GA	19 (25,3%)	15 (21,1%)	0,547
GG	56 (74,7%)	56 (78,9%)	
TGF-β1 +10T>C			
Carreador C			
CC + TC	56 (74,7%)	48 (67,6%)	0,346
TT	19 (25,3%)	23 (32,4%)	
Carreador T			
TT+TC	59 (78,7%)	61 (85,9%)	0,252
CC	16 (21,3%)	10 (14,1%)	
TGF-β1 +25G>C			
Carreador G			
GG + GC	75 (100,0%)	71 (100,0%)	-
CC	00 (0,0%)	00 (0,0%)	
Carreador C			
CC + GC	08 (10,7%)	11 (15,5%)	0,386
GG	67 (89,3%)	60 (84,5%)	

/continua

IL-10 -1082G>A			
Carreador A			
AA +GA	65 (86,7%)	63 (88,7%)	0,704
GG	10 (13,3%)	08 (11,3%)	
Carreador G			
GG+GA	48 (64,0%)	47 (66,2%)	0,780
AA	27 (36,0%)	24 (33,8%)	
IL-10 -819C>T			
Carreador C			
CC + CT	71 (94,7%)	66 (93,0%)	0,667
TT	04 (5,3%)	05 (7,0%)	
Carreador T			
TT+CT	41 (54,7%)	38 (53,5%)	0,889
CC	34 (45,3%)	33 (46,5%)	
IL-10 -592C>A			
Carreador C			
CC + CA	71 (94,7%)	66 (93,0%)	0,667
AA	04 (5,3%)	05 (7,0%)	
Carreador A			
AA + CA	41 (54,7%)	38 (53,5%)	0,889
CC	34 (45,3%)	33 (46,5%)	
IL-6 -174G>C			
Carreador G			
GG +GC	71 (94,7%)	67 (94,4%)	0,936
CC	04 (5,3%)	04 (5,6%)	
Carreador C			
CC+GC	27 (36,0%)	27 (38,0%)	0,799
GG	48 (64,0%)	44 (62,0%)	
IFN-γ +874T>A			
Carreador A			
AA + TA	67 (89,3%)	62 (87,3%)	0,705
TT	08 (10,7%)	09 (12,7%)	
Carreador T			
TT+TA	43 (57,3%)	43 (60,6%)	0,691

/continua

AA	32 (42,7%)	28 (39,4%)
----	------------	------------

Teste Qui-Quadrado de Pearson Assintótico; os dados foram apresentados como valores absolutos (frequência em %); C1: creatinina $\leq 1,4$ mg/dL; C2: creatinina $>1,4$ mg/dL. Valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Os pacientes foram, posteriormente, distribuídos de acordo com o eRFG (grupos R1 e R2). A **Tabela 6** mostra as análises das frequências genóticas referentes aos dois modelos de herança. Foi encontrada uma maior frequência dos carreadores do alelo A no polimorfismo -308G>A no gene do TNF- α no grupo R2 em relação ao grupo R1 ($p=0,031$).

Tabela 6 – Distribuição genotípica segundo modelos dominante e recessivo em polimorfismos de citocinas em receptores do transplante renal de acordo com o ritmo de filtração glomerular estimado

Genótipo	R1 (n=80)	R2 (n=66)	p
TNF-α -308G>A			
Carreador G			
GG +GA	79 (98,7%)	65 (98,5%)	1,000
AA	01 (1,3%)	01 (1,5%)	
Carreador A			
AA+GA	13 (16,3%)	21 (31,8%)	0,031*
GG	67 (82,7%)	45 (68,2%)	
TGF-β1 +10T>C			
Carreador C			
CC + TC	56 (70,0%)	48 (72,7%)	0,854
TT	24 (30,0%)	18 (27,3%)	
Carreador T			
TT+TC	65 (81,2%)	55 (83,3%)	0,829
CC	15 (18,8%)	11 (16,7%)	
TGF-β1 +25G>C			
Carreador G			
GG + GC	80 (100,0%)	66 (100,0%)	-

/continua

CC	00 (0,0%)	00 (0,0%)	
Carreador C			
CC + GC	11 (13,7%)	08 (12,1%)	0,809
GG	69 (86,3%)	58 (87,9%)	
IL-10 -1082G>A			
Carreador A			
AA +GA	71 (88,7%)	57 (86,4%)	0,801
GG	09 (11,3%)	09 (13,6%)	
Carreador G			
GG+GA	52 (65,0%)	43 (65,2%)	1,000
AA	28 (35,0%)	23 (34,8%)	
IL-10 -819C>T			
Carreador C			
CC + CT	75 (93,7%)	62 (93,9%)	1,000
TT	05 (6,3%)	04 (6,1%)	
Carreador T			
TT+CT	44 (55,0%)	35 (53,0%)	0,868
CC	36 (45,0%)	31 (47,0%)	
IL-10 -592C>A			
Carreador C			
CC + CA	75 (93,7%)	62 (93,9%)	1,000
AA	05 (6,3%)	04 (6,1%)	
Carreador A			
AA + CA	44 (55,0%)	35 (53,0%)	0,868
CC	36 (45,0%)	31 (47,0%)	
IL-6 -174G>C			
Carreador G			
GG +GC	76 (95,0%)	62 (93,9%)	1,000
CC	04 (5,0%)	04 (6,1%)	
Carreador C			
CC+GC	30 (37,5%)	24 (36,4%)	1,000
GG	50 (62,5%)	42 (63,6%)	
IFN-γ +874T>A			
Carreador A			

/continua

AA + TA	72 (90,0%)	57 (86,4%)	0,606
TT	08 (10,0%)	09 (13,6%)	
Carreador T			
TT+TA	50 (62,5%)	36 (54,5%)	0,398
AA	30 (37,5%)	30 (45,5%)	

Teste Qui-Quadrado de Pearson Assintótico; os dados foram apresentados como valores absolutos (frequência em %); R1: eRFG <60 mL/min/1,73m²; R2: eRFG ≥60 mL/min/1,73m².

*Valor de p<0,05 foi considerado significativo.

Os pacientes também foram distribuídos de acordo com a história prévia de rejeição ao enxerto (grupos nãoREJ, REJ e INDET) e as mesmas análises foram realizadas (**Tabela 7**). Não foram encontradas diferenças significativas quanto às distribuições das frequências dos carreadores entre os grupos citados.

Tabela 7 – Distribuição genotípica segundo modelos dominante e recessivo em polimorfismos de citocinas em receptores do transplante renal de acordo com a rejeição prévia ao enxerto

Genótipo	nãoREJ (n=63)	REJ (n=50)	INDET (n=33)	p
TNF-α -308G>A				
Carreador G				
GG +GA	62 (98,4%)	49 (98,0%)	33 (100,0%)	0,730
AA	01 (1,6%)	01 (2,0%)	00 (0,0%)	
Carreador A				
AA+GA	12 (19,0%)	15 (30,0%)	07 (21,2%)	0,372
GG	51 (81,0%)	35 (70,0%)	26 (78,8%)	
TGF-β1 +10T>C				
Carreador C				
CC + TC	47 (74,6%)	33 (66,0%)	24 (72,7%)	0,590
TT	16 (25,4%)	17 (34,0%)	09 (27,3%)	
Carreador T				
TT+TC	50 (79,4%)	42 (84,0%)	28 (84,8%)	0,735

/continua

CC	13 (20,6%)	08 (16,0%)	05 (15,2%)	
TGF-β1 +25G>C				
Carreador G				
GG + GC	63 (100,0%)	50 (100,0%)	33 (100,0%)	-
CC	00 (0,0%)	00 (0,0%)	00 (0,0%)	
Carreador C				
CC + GC	11 (17,5%)	03 (6,0%)	05 (15,2%)	0,182
GG	52 (82,5%)	47 (94,0%)	28 (84,8%)	
IL-10 -1082G>A				
Carreador A				
AA +GA	54 (85,7%)	45 (90,0%)	29 (87,9%)	0,788
GG	09 (14,3%)	05 (10,0%)	04 (12,1%)	
Carreador G				
GG+GA	43 (68,2%)	33 (66,0%)	19 (57,6%)	0,572
AA	20 (31,8%)	17 (34,0%)	14 (42,4%)	
IL-10 -819C>T				
Carreador C				
CC + CT	59 (93,6%)	45 (90,0%)	33 (100,0%)	0,178
TT	04 (6,4%)	05 (10,0%)	00 (0,0%)	
Carreador T				
TT+CT	31 (49,2%)	27 (54,0%)	21 (63,6%)	0,403
CC	32 (50,8%)	23 (46,0%)	12 (36,4%)	
IL-10 -592C>A				
Carreador C				
CC + CA	59 (93,6%)	45 (90,0%)	33 (100,0%)	0,178
AA	04 (6,4%)	05 (10,0%)	00 (0,0%)	
Carreador A				
AA + CA	31 (49,2%)	27 (54,0%)	21 (63,6%)	0,403
CC	32 (50,8%)	23 (46,0%)	12 (36,4%)	
IL-6 -174G>C				
Carreador G				
GG +GC	60 (95,2%)	46 (92,0%)	32 (97,0%)	0,589
CC	03 (4,8%)	04 (8,0%)	01 (3,0%)	
Carreador C				

/continua

CC+GC	26 (41,3%)	18 (36,0%)	10 (30,3%)	0,562
GG	37 (58,7%)	32 (64,0%)	23 (69,7%)	
IFN-γ +874T>A				
Carreador A				
AA + TA	59 (93,6%)	40 (80,0%)	30 (90,9%)	0,070
TT	04 (6,4%)	10 (20,0%)	03 (9,1%)	
Carreador T				
TT+TA	36 (57,1%)	29 (58,0%)	21 (63,6%)	0,817
AA	27 (42,9%)	21 (42,0%)	12 (36,4%)	

Teste Qui-Quadrado de Pearson Assintótico; os dados foram apresentados como valores absolutos (frequência em %); nãoREJ: não rejeição; REJ: rejeição; INDET: indeterminado. Valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

6.3 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS

6.3.1 Avaliação dos níveis de citocinas em função da creatinina sérica, do eRFG e da história prévia de rejeição ao enxerto em RTR

A comparação entre os níveis das citocinas IL-6, TNF- α e IL-10 foi feita em função das concentrações de creatinina (C1: creatinina $\leq 1,4$ mg/dL e C2: creatinina $> 1,4$ mg/dL) e está mostrada na **Figura 3A**. Não foram obtidas diferenças comparando-se os dois grupos.

A avaliação dos níveis das citocinas avaliadas em função do eRFG (R1: eRFG < 60 mL/min/1,73m² e eRFG ≥ 60 mL/min/1,73m²) também foi realizada, como mostra a **Figura 3B**. Também não foram encontradas diferenças significativas ao se comparar os grupos de eRFG.

Além disso, foi feita a comparação dos níveis das citocinas em função da história prévia de rejeição ao enxerto (nãoREJ, REJ e INDET), como mostra a **Figura 3C**. Foram encontrados maiores níveis de TNF- α no grupo nãoREJ em relação ao grupo INDET ($p = 0,031$).

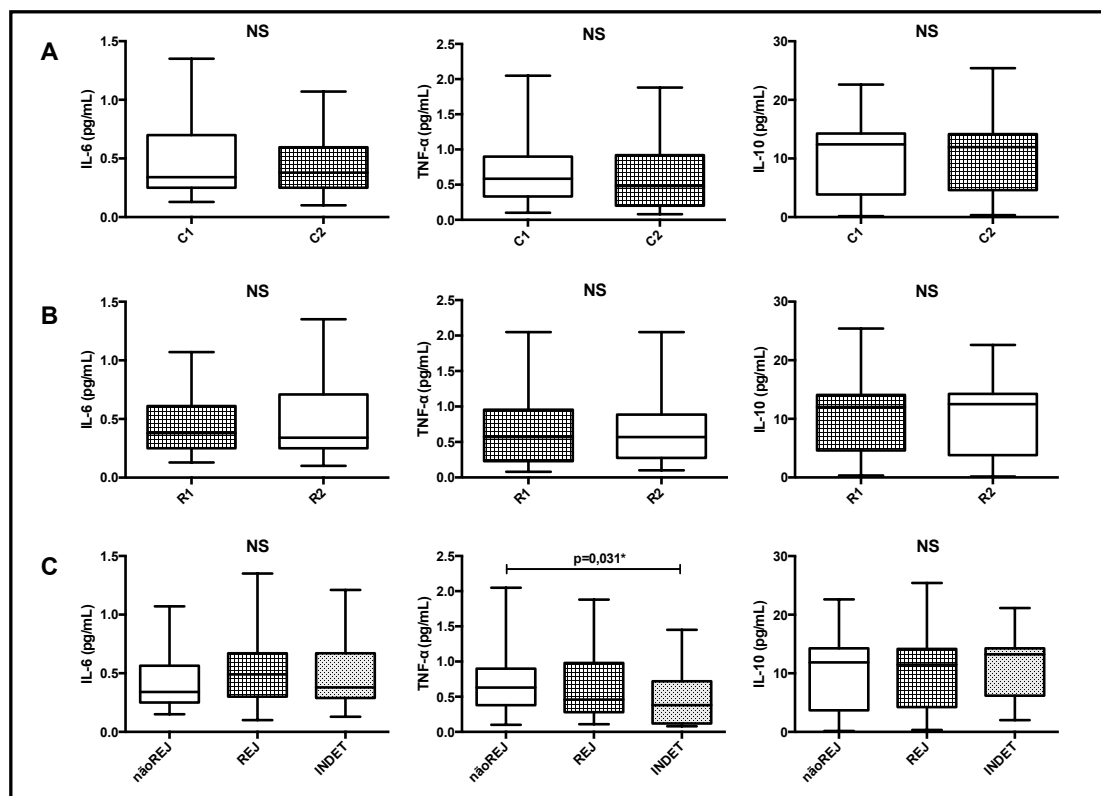


Figura 3 – Níveis séricos de interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e níveis plasmáticos de interleucina-10 (IL-10) nos diferentes grupos de RTR. A: RTR distribuídos de acordo com a creatinina sérica (C1: creatinina $\leq 1,4$ mg/dL e C2: creatinina $> 1,4$ mg/dL); **B:** RTR distribuídos de acordo com o ritmo de filtração glomerular estimado (R1: ritmo de filtração glomerular estimado < 60 mL/min/1.73m² e R2: ritmo de filtração glomerular estimado ≥ 60 mL/min/1.73m²). **C:** RTR distribuídos de acordo com a história prévia de rejeição ao enxerto (nãoREJ: não rejeição; REJ: rejeição; INDET: indeterminado). Teste de Mann-Whitney para dois grupos e Kruskal-Wallis seguido pela correção de Bonferroni para três grupos. *O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

6.3.2 Avaliação da razão entre citocinas em função da creatinina sérica, do eRFG e da história prévia de rejeição ao enxerto em pacientes RTR

Posteriormente, foi realizada a razão entre os níveis das citocinas pró-inflamatórias/anti-inflamatórias IL-6 e IL-10, e a razão entre os níveis de TNF- α e IL-10 em função das concentrações de creatinina (C1: creatinina $\leq 1,4$ mg/dL e C2: creatinina $> 1,4$ mg/dL), como mostra a **Figura 4A**. Não foram observadas diferenças significativas nesta análise.

A razão das citocinas IL-6 e IL-10 e a razão das citocinas TNF- α e IL-10 também foi realizada em função do eRFG (R1: eRFG <60 mL/min/1.73m² e eRFG \geq 60 mL/min/1.73m²) e está mostrada na **Figura 4B**. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos analisados.

A razão destas citocinas foi feita, por fim, em função da história prévia de rejeição (nãoREJ, REJ e INDET), como mostra a **Figura 4C**. A razão entre os níveis de TNF- α e IL-10 foi maior no grupo nãoREJ quando comparada ao grupo REJ (p=0,022) e ao grupo INDET (p=0,002).

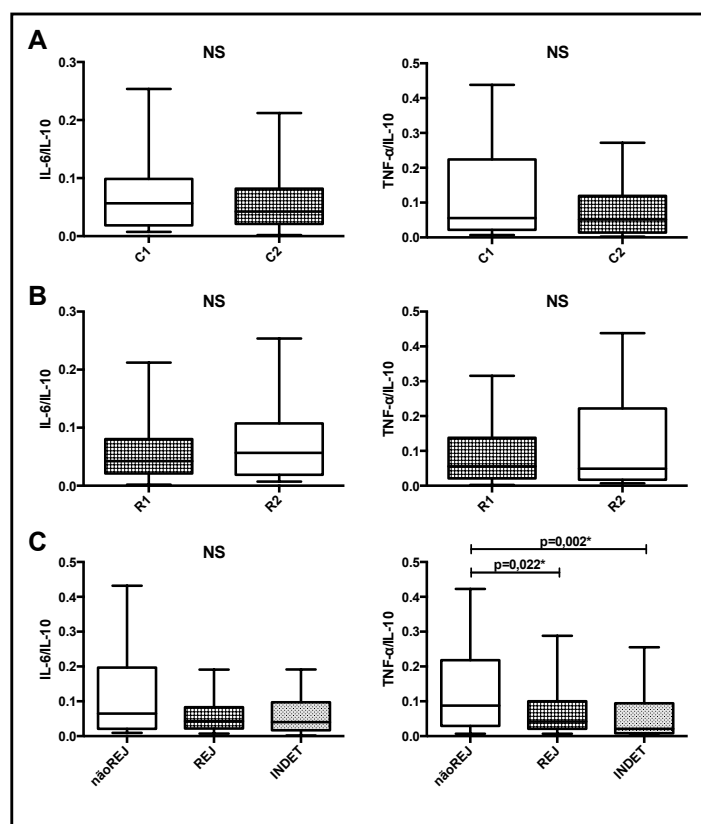


Figura 4 – Razão entre os níveis de interleucina-6 (IL-6) e os níveis de interleucina-10 (IL-10) e a razão entre os níveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e os níveis de IL-10 nos diferentes grupos de RTR. A: RTR distribuídos de acordo com a creatinina sérica (C1: creatinina \leq 1,4 mg/dL e C2: creatinina >1,4 mg/dL); **B:** RTR distribuídos de acordo com o ritmo de filtração glomerular estimado (R1: eRFG <60 mL/min/1.73m² e R2: eRFG \geq 60 mL/min/1.73m²). **C:** RTR distribuídos de acordo com a história prévia de rejeição ao enxerto (nãoREJ: não rejeição; REJ: rejeição; INDET: indeterminado). Teste de Mann-Whitney para dois grupos e Kruskal-Wallis seguido pela correção de Bonferroni para três grupos. *O valor de p<0,05 foi considerado significativo.

6.3.3 Avaliação dos níveis de citocinas em função do tempo pós transplante

Para avaliar a influência do tempo pós-transplante sobre as citocinas, os pacientes foram distribuídos em quatro novos grupos, sendo eles T1: 1 a 24 meses; T2: 25 a 60 meses; T3: 61 a 120 meses e T4: acima de 120 meses pós transplante (**Figura 5**). Foram observados maiores níveis de IL-6 no grupo T1 em relação aos grupos T2 ($p=0,016^*$) e T4 ($p=0,006^*$) e menores níveis de IL-6 no grupo T2 em relação ao grupo T3 ($p=0,036^*$), como mostra a **Figura 5**. Além disso, foram encontrados menores níveis de IL-10 no grupo T1 em relação ao grupo T2 ($p=0,024^*$) e maiores níveis de IL-10 no grupo T2 em relação ao grupo T3 ($p=0,028^*$). As análises referentes ao TNF- α não mostraram diferença significativa.

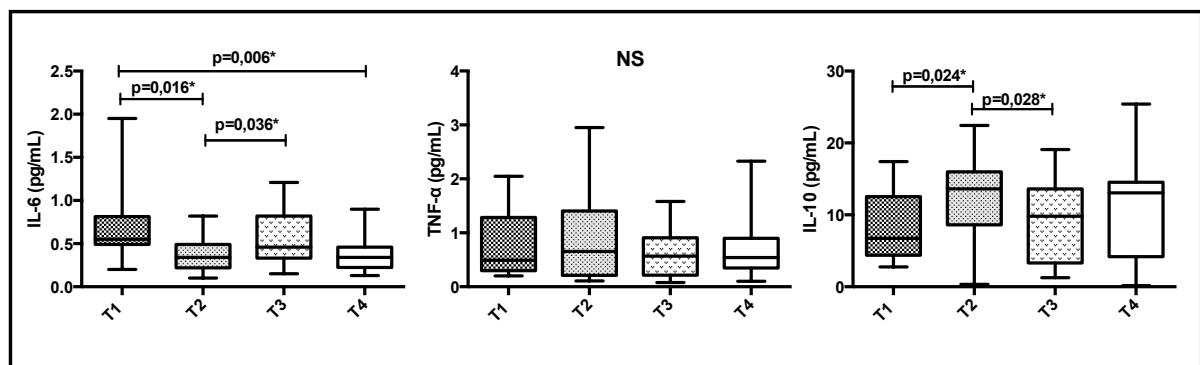


Figura 5 – Níveis séricos de interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e níveis plasmáticos de interleucina-10 (IL-10) distribuídos em grupos de acordo com o tempo pós transplante (T1: 1 a 24 meses; T2: 25 a 60 meses; T3: 61 a 120 meses e T4: acima de 120 meses pós transplante). Teste de Mann-Whitney, teste T-Student (quando aplicável) e teste de Kruskal-Wallis seguido pela correção de Bonferroni. *O valor de $p<0,05$ foi considerado significativo.

6.3.4 Avaliação dos níveis de citocinas em função de seus polimorfismos genéticos

Como forma de avaliar se a produção de citocinas é regulada pelos polimorfismos, foi realizada uma comparação entre as concentrações de IL-6, TNF- α e IL-10 nos pacientes transplantados em função destes polimorfismos

ou de seus haplótipos (**Figura 6**). Os polimorfismos foram distribuídos em grupos relacionados ao nível de produção de citocinas, segundo dados da literatura (TURNER *et al.*, 1995; TURNER *et al.*, 1997; FISHMAN *et al.*, 1998), sendo eles altos produtores: genótipos [GG+GC], genótipos [GA+AA] e haplótipo [GCC/GCC] para IL-6, TNF- α e IL-10, respectivamente; produtores intermediários: haplótipos [GCC/ACC] e [GCC/ATA] para IL-10; e baixos produtores: genótipo [CC] para IL-6, genótipo [GG] para TNF- α e haplótipos [ACC/ACC], [ACC/ATA] e [ATA/ATA] para IL-10. Não foram encontradas diferenças significativas nestas análises (**Figura 6**).

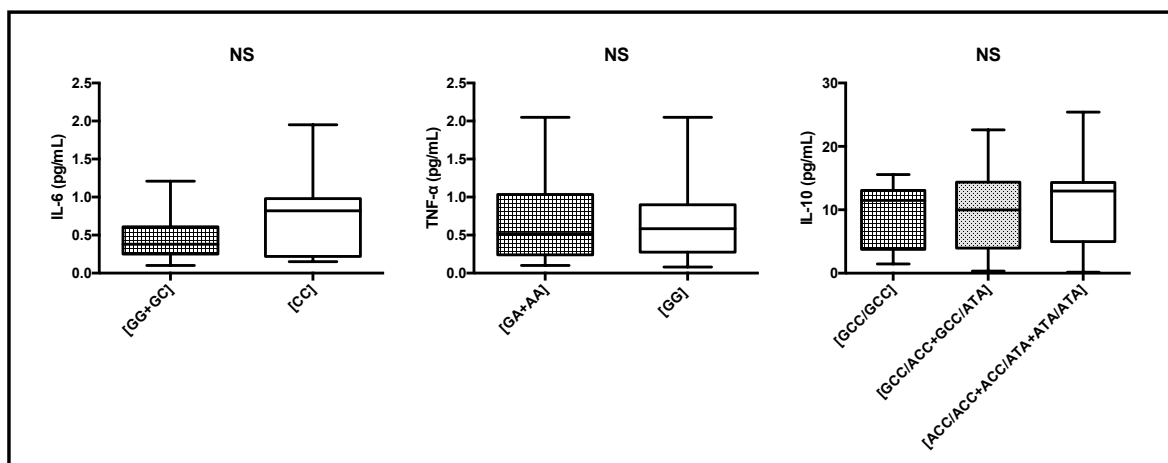


Figura 6 – Avaliação dos níveis séricos de interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e dos níveis plasmáticos de interleucina-10 (IL-10) em função dos seus respectivos polimorfismos genéticos. Polimorfismos genéticos divididos em grupos relacionados à produção de citocinas; Polimorfismo -174G>C no gene da IL-6: genótipos [GG+GC]: altos produtores de IL-6; genótipo [CC]: baixo produtor de IL-6. Polimorfismo -308G>A no gene do TNF- α : genótipos [GA+AA]: altos produtores de TNF- α ; genótipo [GG]: baixo produtor de TNF- α ; Polimorfismos -1082G>A, -819C>T e -592C>A no gene da IL-10: haplótipo [GCC/GCC]: alto produtor de IL-10; haplótipos [GCC/ACC] e [GCC/ATA]: produtores intermediários de IL-10; haplótipos [ACC/ACC], [ACC/ATA] e [ATA/ATA]: baixos produtores de IL-10. Teste de Mann-Whitney para dois grupos e Kruskal-Wallis seguido pela correção de Bonferroni, para três grupos. *O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

6.4 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS AVALIADOS

Foi investigada uma possível correlação entre os parâmetros avaliados, conforme mostra a **Tabela 8**. O tempo pós-transplante se correlacionou negativamente com a IL-6 ($r=-0,195$; $p=0,032$) (**Tabela 8**).

A IL-6 se correlacionou positivamente com o TNF- α ($r=0,379$; $p<0,0001$) e negativamente com a IL-10 ($r=-0,247$; $p<0,004$). O TNF- α também se correlacionou negativamente com a IL-10 ($r=-0,377$; $p<0,0001$), como mostra a **Tabela 8**.

Tabela 8 – Análise de correlação entre os parâmetros avaliados nos receptores do transplante renal

Parâmetros	Receptores do transplante renal	
	r	p
Creatinina vs IL-6	-0,027	0,754
Creatinina vs TNF- α	-0,0004	0,996
Creatinina vs IL-10	0,103	0,239
eRFG vs IL-6	-0,019	0,825
eRFG vs TNF- α	-0,049	0,576
eRFG vs IL-10	-0,087	0,319
Tempo pós transplante vs IL-6	-0,195	0,032*
Tempo pós transplante vs TNF- α	-0,029	0,750
Tempo pós transplante vs IL-10	0,060	0,514
IL-6 vs TNF- α	0,379	<0,0001*
IL-6 vs IL-10	-0,247	0,004*
TNF- α vs IL-10	-0,377	<0,0001*

Análise de correlação de Spearman. *Valor de $p<0,05$ foi considerado significativo.

7 DISCUSSÃO

7.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS DOS INTEGRANTES DO ESTUDO

No presente estudo foram avaliados 146 receptores do transplante renal. Destes pacientes, 91 eram do sexo masculino (62,3%) e 55 do sexo feminino (37,7%) (**Tabela 1**). A maior porcentagem de indivíduos do sexo masculino está de acordo com um estudo sobre o perfil de receptores de transplante de órgãos no Brasil, o qual detectou a maior prevalência do sexo masculino no transplante renal (MARINHO; CARDOSO; ALMEIDA, 2011). Estudos de outros continentes também encontraram dados semelhantes com o predomínio de homens transplantados renais (GUELLA; MOHAMED, 2011; PUOTI *et al.*, 2016).

Os efeitos prejudiciais da testosterona, como suas propriedades pró-apoptóticas e pró-fibróticas, juntamente com um estilo de vida não saudável e uma maior ingestão de conteúdo proteico, predominante em homens, podem ser as causas do maior número de casos de insuficiência renal e, conseqüentemente, do transplante de rim em homens em relação às mulheres. Além disso, os efeitos renoprotetores dos estrogênios na idade reprodutiva podem favorecer o menor número de casos de transplante renal em mulheres (CARRERO *et al.*, 2018; ISEKI, 2008; SILBIGER; NEUGARTEN, 2008).

Apesar da maior necessidade de realizar o transplante renal no sexo masculino, no corrente estudo a mediana das idades nos homens foi significativamente maior (48 anos) em relação à mediana das idades nas mulheres (40 anos). Corroborando com este achado, um estudo demonstrou diferença significativa entre as idades de RTR do sexo masculino e do sexo feminino, sendo a média das idades maior no grupo dos homens (AYAZ *et al.*, 2014). De maneira complementar, o tempo de sobrevivência pós transplante no presente estudo foi maior em homens em relação às mulheres, porém sem diferença significativa.

As condições socioculturais, como um maior cuidado quanto à adesão ao tratamento e à dieta de homens transplantados por mulheres de sua

família, podem estar ligadas ao melhor desfecho do transplante em homens. Por outro lado, condições psicossociais mais comuns em mulheres, como a depressão, podem aumentar o risco de não aderência ao tratamento medicamentoso (DE PASQUALE *et al.*, 2014). Isto pode estar relacionado a uma menor sobrevida de mulheres após o transplante. Além disso, um estudo recente demonstrou que a qualidade de vida em mulheres que são submetidas às terapias de reposição renal é pior quando comparada à dos homens (CARRERO *et al.*, 2018).

Contrariamente a este achado, Chen e colaboradores (2013) relataram uma menor sobrevida em pacientes transplantados renais do sexo masculino em relação ao sexo feminino. O fator hormonal pode ter contribuído para este achado, já que o estradiol pode melhorar a função do enxerto, além de diminuir a infiltração celular, garantindo um melhor prognóstico em pacientes do sexo feminino (MÜLLER *et al.*, 1999).

No presente estudo, foram encontrados maiores níveis de ácido úrico em homens transplantados renais em comparação às mulheres RTR. Em concordância, estudos revelaram que o sexo masculino influenciou, de forma significativa, os níveis de ácido úrico em pacientes transplantados renais (BANDUKWALA; HUANG; PRASAD, 2009; MIN *et al.*, 2009).

Este dado já era esperado, já que os homens possuem níveis mais elevados de ácido úrico em relação às mulheres. Este fato é atribuído à maior disponibilidade endógena deste composto e à dieta com maior conteúdo proteico nos indivíduos do sexo masculino. Além disso, os homens possuem, em geral, maior massa muscular que representa a principal fonte de purina, produto necessário para a formação do ácido úrico (KURAHASHI *et al.*, 2013; MORIWAKI *et al.*, 2014).

O papel do ácido úrico no contexto renal é bem elucidado, sendo constatada uma associação entre os níveis plasmáticos de ácido úrico e a progressão da disfunção renal. Apesar de não ser o biomarcador mais importante, o ácido úrico foi considerado um fator de risco independente para o desenvolvimento da DRC (ISEKI *et al.*, 2004; SONODA *et al.*, 2011).

Além do ácido úrico, no corrente estudo foram encontrados maiores níveis de creatinina em RTR do sexo masculino em comparação aos RTR do sexo feminino. Esse achado também já era esperado, já que a massa

muscular afeta diretamente os níveis de creatinina (LORI *et al.*, 2013). Além da massa muscular, múltiplos fatores, como a ingestão dietética de proteínas, a idade e a etnia, influenciam na acurácia da creatinina como indicador da taxa de filtração glomerular (SANTOS; MARTINS, 2015). Devido a estes fatores, o cálculo do ritmo de filtração glomerular utiliza parâmetros, como o sexo, a idade e a etnia, para fornecer dados mais precisos sobre a função renal (LORI *et al.*, 2013).

Apesar de sofrer inúmeras interferências, a creatinina ainda é muito utilizada na prática clínica para monitorar e detectar a rejeição ao rim transplantado. No entanto, de uma maneira geral, os níveis de creatinina devem aumentar significativamente para que se detecte a disfunção renal. Isto faz com que este teste falhe na prevenção da perda precoce do enxerto (JUNG; LEE; KWON, 2012; MOTA *et al.*, 2017).

7.2 DETERMINAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DOS POLIMORFISMOS EM GENES DE CITOCINAS EM RECEPTORES DO TRANSPLANTE RENAL

As citocinas desempenham um papel importante nas respostas inflamatórias e imunes e estão diretamente relacionadas à complexa patogênese de rejeição ao enxerto renal (KOCIERZ *et al.*, 2009). O controle da expressão de citocinas pode ser modulado por polimorfismos em genes correspondentes (HOPKINS, 2003) e a associação entre estes polimorfismos e o transplante renal permanece sem claras conclusões.

Neste estudo, os polimorfismos que incluem variantes nos genes que codificam o TNF- α (-308G>A), o TGF- β 1 (códon +10T>C e códon +25G>C), a IL-10 (-1082G>A, -819C>T, -592C>A), a IL-6 (-174G>C) e o IFN- γ (+874T>A) foram avaliados quanto ao impacto na função do enxerto e à história prévia de rejeição em pacientes transplantados renais. As populações avaliadas estavam sob o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), com exceção das populações distribuídas de acordo com o histórico de rejeição para os polimorfismos -819C>T e -592C>A no gene da IL-10.

O EHW demonstra que os alelos se distribuem de forma aleatória na população, não alterando suas frequências ao longo das gerações. Desvios no EHW podem ser causados por fatores de interferência, como seleção,

endogamia, migração e deriva genética, e também podem ser consequência da estratificação populacional ou erros de genotipagem (NAMIPASHAKI; RAZAGHI-MOGHADAM; ANSARI-POUR, 2015; SLATKIN *et al.*, 2008). Neste trabalho, o último caso foi excluído pela revisão dos resultados encontrados.

O polimorfismo -308G>A localizado na região promotora do gene do TNF- α regula a produção desta citocina (HOFFMANN *et al.*, 2009). O alelo A foi relacionado ao aumento da atividade transcricional desta citocina e, conseqüentemente, a produção elevada de TNF- α (WILSON *et al.*, 1992; TURNER *et al.*, 1995; WILSON *et al.*, 1997). No presente estudo, foi encontrado uma maior frequência do alelo G e do genótipo GG no grupo R1 (eRFG <60 mL/min/1,73m²) em relação ao grupo R2 (eRFG \geq 60 mL/min/1,73m²) (**Tabela 3**). Além disso, foi encontrada uma maior frequência do carreador do alelo A no grupo R2 em relação ao grupo R1 (**Tabela 6**).

De forma semelhante, Kocierz e colaboradores (2011) observaram uma tendência à deterioração mais rápida da função renal mensurada pelo eRFG em pacientes com o genótipo GG, ou seja, em pacientes cuja expressão de TNF- α era considerada baixa, em relação aos genótipos de alta produção desta citocina.

Adicionalmente, um estudo demonstrou que pacientes RTR geneticamente predeterminados a serem baixos produtores de TNF- α são menos capazes de responder a estímulos infecciosos por possuírem, além da imunossupressão de rotina, uma inibição adicional das respostas imunes por TNF- α (SAHOO; KANG; SUPRAN, 2000). Sabe-se que as infecções são muito comuns no transplante, sendo consideradas fatores que predispõem uma menor sobrevivência do enxerto (SOUSA *et al.*, 2010).

Um possível papel protetivo do alelo A foi relatado em um estudo que encontrou uma associação significativa entre a presença do alelo A e a ausência de rejeição crônica ao enxerto em pacientes transplantados renais que receberam o rim de doadores vivos ou falecidos usuários da terapia tripla MMF, CSA e PDN (GENDZEKHADZE; RIVAS-VETENCOURT; MONTANO, 2006). Apesar do papel pró-inflamatório de TNF- α ser mais relatado na literatura, um estudo demonstrou o papel anti-inflamatório desta citocina na regulação da resposta imune (MASLI; TURPIE, 2009). Isso explicaria, em

parte, o melhor prognóstico encontrado no presente estudo para RTR que carregam o alelo A.

De maneira distinta de nossos achados, outros estudos associaram os genótipos alto produtores de TNF- α (AA e GA) ao pior prognóstico de receptores do transplante renal (NIKOLOVA *et al.*, 2008; SÁNCHEZ-FRUCTUOSO *et al.*, 2016). Nesse sentido, um estudo demonstrou maiores níveis séricos de creatinina, assim como uma maior incidência de episódios de rejeição e um maior dano vascular em RTR com genótipos altos produtores de TNF- α em relação àqueles que possuíam genótipo de menor produção (POLI, 2000).

No presente estudo, não foram encontradas associações entre o polimorfismo -308G>A no gene do TNF- α e a função renal avaliada pela creatinina sérica (**Tabela 2** e **Tabela 5**) e entre o polimorfismo citado e a história prévia de rejeição em RTR (**Tabela 4** e **Tabela 7**). Em concordância, outras análises não conseguiram provar nenhuma associação entre o polimorfismo -308G>A e a incidência de rejeição ou sobrevida do enxerto renal a longo prazo (BRABCOVA *et al.*, 2007; BREULMANN *et al.*, 2007).

Os polimorfismos +10T>C e +25G>C no gene do TGF- β 1 estão associados à variação interindividual dos níveis de produção desta citocina. Os dois SNPs em conjunto resultam em três grupos ligados ao nível de produção *in vitro* de TGF- β 1: alto produtor (T/T G/G e T/C G/G); produtor intermediário (T/C G/C, T/T G/C e C/C G/G); e baixo produtor (C/C G/C, C/C C/C, T/T C/C e T/C C/C) (AWAD *et al.*, 1998; GE *et al.*, 2014; PERREY *et al.*, 1998).

Em nosso estudo, foi observada uma maior frequência do alelo G (polimorfismo +25G>C) no grupo REJ em relação ao grupo INDET (**Tabela 4**). Além disso, não foi encontrada nenhuma associação entre o polimorfismo +10T>C e o histórico de rejeição em pacientes RTR (**Tabela 4**).

Autores demonstraram uma relação entre os polimorfismos de TGF- β 1 e a disfunção crônica do enxerto (NIKOLOVA *et al.*, 2008). Além disso, uma metanálise recente, demonstrou uma associação entre os haplótipos de alta produção de TGF- β 1 (T/T G/G e T/C G/G) e o risco de disfunção crônica do enxerto (LIU *et al.*, 2017). Evidências crescentes demonstram que o TGF- β 1 está fortemente associado à patogênese da fibrose intersticial no rim

(MASOLA *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2016). De certa forma, este fato justifica a maior frequência do alelo G, alelo ligado à alta produção de TGF- β 1, no grupo de pacientes transplantados renais com histórico de rejeição.

Outros estudos, no entanto, não mostraram associação entre os polimorfismos de TGF- β 1 e a rejeição ao enxerto em pacientes RTR (KARIMI *et al.*, 2012; MANCHANDA; MITTAL *et al.*, 2008).

No presente estudo, as frequências dos polimorfismos de TGF- β 1 nos demais grupos avaliados (grupos de acordo com a creatinina e o eRFG) não mostraram nenhuma distinção (**Tabela 2** e **Tabela 5** para creatinina e **Tabela 3** e **Tabela 6** para eRFG).

Um estudo em que a função renal foi baseada no eRFG e/ou proteinúria dos pacientes avaliados também não encontrou diferenças significativas nas frequências dos polimorfismos de TGF- β 1 entre o grupo com função renal estável e o grupo com agravamento da função renal (LA MANNA *et al.*, 2013).

Jiménez-sousa e colaboradores (2012) não demonstraram relação entre o genótipo GG (polimorfismo +25G>C) e a disfunção do enxerto avaliada pela creatinina. No entanto, neste mesmo estudo, foi demonstrado que o genótipo GC (polimorfismo +25G>C), ligado à produção intermediária de TGF- β 1, foi relacionado à disfunção crônica do enxerto com aumento acentuado de creatinina sérica em RTR (JIMÉNEZ-SOUSA *et al.*, 2012).

O promotor do gene *IL-10* contém três polimorfismos nas posições -1082G>A, -819C>T e -592C>A que influenciam a capacidade das células de produzir IL-10 (LIU *et al.*, 2012).

No presente estudo, a mesma frequência alélica foi observada entre os polimorfismos -819C>T e -592C>A, o que sugere estarem ambos em desequilíbrio de ligação. O mesmo desequilíbrio foi encontrado em outro estudo composto por pacientes transplantados renais de origem brasileira (PLOTOW *et al.*, 2003).

Não foram observadas diferenças significativas nas frequências dos polimorfismos do gene *IL-10* entre os grupos avaliados (creatinina, eRFG e histórico de rejeição) no corrente estudo. Estes resultados estão de acordo com outros estudos que não constataram nenhuma associação entre os polimorfismos no gene de IL-10, a função do enxerto e a rejeição ao rim

transplantado (BREULMANN *et al.*, 2007; HU *et al.*, 2016; RASHAD *et al.*, 2016; XIONG *et al.*, 2015).

Khan e colaboradores (2010), no entanto, demonstraram que receptores geneticamente predispostos à baixa expressão de IL-10 são mais suscetíveis à inflamação do enxerto possuindo alto influxo de células inflamatórias no interstício do órgão transplantado e altos índices de fibrose intersticial e atrofia tubular. Além disso, uma metanálise relacionou o haplótipo ACC, haplótipo ligado à baixa expressão de IL-10, a um desfecho desfavorável no transplante renal (THAKKINSTIAN *et al.*, 2009).

O polimorfismo na posição -174G>C no gene da IL-6 também foi avaliado no corrente estudo. O alelo C está associado a uma menor expressão de IL-6 (JIA *et al.*, 2015). Nossas análises não sustentaram nenhuma associação entre o polimorfismo -174G>C no gene da IL-6, a função renal e o histórico de rejeição ao enxerto.

De forma semelhante, um estudo não conseguiu detectar diferença significativa na frequência do polimorfismo -174G>C entre RTR com função renal estável e aqueles que possuíam diminuição da função do enxerto (LA MANNA *et al.*, 2013). Assim como no presente estudo, Gaafar e colaboradores (2014) não encontraram nenhuma associação entre o polimorfismo de IL-6 e a rejeição ao enxerto renal.

Em contraponto, Kocierz e colaboradores (2011) demonstraram que carreadores de genótipos com alto perfil de expressão de IL-6 (GG e GC) foram caracterizados por um declínio mais rápido do eRFG em relação àqueles com baixo perfil de expressão (CC). Além disso, um estudo constatou que o genótipo GG e o alelo G foram associados ao risco de rejeição ao enxerto (KARIMI *et al.*, 2012). Pawlik e colaboradores (2008), entretanto, reconheceram o carreador alélico G como um fator de proteção para a sobrevida a longo prazo do rim transplantado.

O SNP +874T>A está localizado no gene do IFN- γ e o alelo T foi previamente associado à maior produção desta citocina (PRAVICA *et al.*, 2000). No presente estudo, não foram encontradas diferenças significativas quanto às frequências deste polimorfismo nos grupos avaliados.

De forma distinta aos nossos resultados, Karimi e colaboradores (2012) demonstraram uma maior prevalência do alelo T em pacientes que

apresentavam rejeição ao enxerto renal. Além disso, um estudo não associou o genótipo de baixa produção de IFN- γ (AA) com rejeição aguda, sugerindo que este genótipo poderia ser considerado renoprotetor (ZIBAR *et al.*, 2011). Uma possível explicação para estes resultados está relacionada à atividade imunestimulatória de IFN- γ que pode causar a infiltração de linfócitos T CD8⁺ no enxerto provocando sua destruição (DHAOUADI *et al.*, 2013). No entanto, o papel dessa citocina no desfecho do transplante renal permanece inconclusivo.

Assim como no presente estudo, Piancatelli e colaboradores (2016) não encontraram nenhuma relação entre o polimorfismo +874T>A no gene de IFN- γ e a sobrevida do enxerto renal. Ademais, os autores não conseguiram provar nenhuma associação entre este polimorfismo e as complicações metabólicas, infecciosas e cardiovasculares existentes no período pós transplante. Um outro estudo também não encontrou associação entre este polimorfismo e a sobrevida do enxerto, não conseguindo relacionar o SNP +874T>A com a rejeição ao rim transplantado (DHAOUADI *et al.*, 2013).

7.3 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS

7.3.1 Avaliação dos níveis de citocinas em função da creatinina sérica, do eRFG e da história prévia de rejeição ao enxerto em RTR

No presente estudo, não foram encontradas diferenças significativas na comparação dos níveis de IL-6 em função das concentrações de creatinina, do eRFG e da história prévia de rejeição ao enxerto (**Figura 3A**, **3B** e **3C**, respectivamente).

Um estudo prévio do nosso grupo de pesquisa também não encontrou diferenças significativas na comparação dos níveis plasmáticos de IL-6, TNF- α , IL-10 e de outras citocinas com a função renal avaliada pela creatinina em RTR (MOTA *et al.*, 2017).

De maneira distinta, um estudo demonstrou que o aumento dos níveis de IL-6 estava relacionado à elevação da creatinina plasmática, especialmente nas primeiras duas semanas de transplante. Além disso, neste

mesmo estudo, os autores demonstraram que a IL-6 foi associada à rejeição ao enxerto e consideraram esta citocina uma boa ferramenta para a monitorização da função renal (REINHOLD *et al.*, 2012).

Outros autores constataram um aumento significativo de IL-6 circulante em RTR que apresentavam rejeição (JIN *et al.*, 2017; SONKAR *et al.*, 2013). Além disso, Mazanowska e colaboradores (2013) demonstraram uma correlação negativa entre o eRFG e os níveis urinários de IL-6 em RTR.

No presente estudo, foram encontrados maiores níveis de TNF- α no grupo nãoREJ em relação ao grupo INDET (**Figura 3C**). Para os demais grupos avaliados, creatinina e eRFG, não foram constatadas diferenças significativas (**Figura 3A e 3B**, respectivamente).

Apesar da atividade pró-inflamatória de TNF- α estar bem estabelecida, foi demonstrado que a expressão de TNFR2, um receptor de TNF- α , e de TNF- α por APCs tratadas com TGF- β é crítica para a indução da tolerância imunológica por um desvio na resposta imune do tipo Th1 (HECKER; NIIZEKI; STREILEIN, 1999; MASLI; TURPIE, 2009).

De forma contrária aos nossos resultados, altos níveis de TNF- α foram encontrados em RTR com rejeição ao enxerto (BUDAK *et al.*, 2015; SONKAR *et al.*, 2013). Além disso, Budak e colaboradores (2015) encontraram uma correlação negativa entre os níveis de TNF- α e o eRFG no pós transplante renal. Em outro estudo, a expressão elevada de TNFR2 também se correlacionou com a função renal e foi associada à maiores níveis de creatinina em pacientes transplantados (HOFFMANN *et al.*, 2009).

As análises do corrente estudo não demonstraram diferenças significativas na comparação dos níveis de IL-10 com a função renal avaliada por creatinina e pelo eRFG e na comparação entre os níveis de IL-10 e a história prévia de rejeição ao enxerto (**Figura 3A, 3B e 3C**, respectivamente).

De forma semelhante, um estudo não demonstrou nenhuma associação entre os níveis de IL-10 e a rejeição ao enxerto renal (GARCÍA-COVARRUBIAS *et al.*, 2016). Adicionalmente, Mota e colaboradores (2017) também não relacionaram os níveis de IL-10 com a função renal.

Em alguns estudos, a expressão aumentada de IL-10 foi encontrada em receptores do transplante renal com tolerância imunológica ao enxerto (NEWELL *et al.*, 2010; NOVA-LAMPERTI *et al.*, 2016) e os níveis de IL-10

tiveram uma correlação negativa com os níveis séricos de creatinina em RTR considerados estáveis (MA *et al.*, 2015). No entanto, em outros estudos, o aumento dos níveis de IL-10 foi associado à rejeição ao enxerto e à pior função renal avaliada pela creatinina sérica. Nesse caso, o aumento de IL-10 em pacientes com um pior prognóstico seria explicado pela capacidade de IL-10 em limitar e regular o processo inflamatório (EDEMIR *et al.*, 2008; ELNOKEETY; SHAKER; FAYED, 2017).

7.3.2 Avaliação da razão entre citocinas em função da creatinina sérica, do eRFG e da história prévia de rejeição ao enxerto em pacientes RTR

No transplante, a resposta imune e o dano renal estão estreitamente relacionadas à inflamação regulada por mediadores pró-inflamatórios. A inflamação é, por sua vez, suprimida por um controle regulatório comumente associado à ação de citocinas anti-inflamatórias (ZHANG *et al.*, 2015). Dessa forma, a utilização da razão entre os níveis de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias no transplante é plausível e pode ser considerada um potencial biomarcador a ser investigado. Ainda assim, poucos são os estudos que relacionam a razão de citocinas ao transplante renal.

No presente estudo, não foram observadas diferenças significativas da razão entre os níveis de IL-6 e IL-10 em função das concentrações de creatinina, do eRFG e da história prévia de rejeição ao enxerto (**Figura 4A, 4B e 4C**, respectivamente).

Kaneda e colaboradores (2006) demonstraram que a razão entre os níveis de IL-6 e IL-10 detectados no pulmão do doador no período pré-transplante pode prever significativamente a mortalidade do receptor após o transplante pulmonar. A razão IL-6/IL-10 foi considerada pelos autores o melhor marcador para prever o desfecho do transplante. Kaneda e colaboradores (2006) ainda ressaltaram que a análise do balanço de citocinas é mais informativa do que a análise de uma única citocina isolada.

No corrente estudo, não foram observadas diferenças significativas da razão entre os níveis de TNF- α e IL-10 em função das concentrações de creatinina e do eRFG (**Figura 4A e 4B**, respectivamente). A análise da razão TNF- α /IL-10 em função da história prévia de rejeição, por sua vez, mostrou

diferenças entre os grupos. Esta razão foi significativamente maior no grupo nãoREJ quando comparada aos demais grupos (REJ e INDET) (**Figura 4C**). Este resultado, juntamente com outros resultados do presente estudo citados anteriormente, nos indicam que TNF- α pode estar apresentando um papel anti-inflamatório nos RTR avaliados. No entanto, mais estudos são necessários para comprovar seu mecanismo de ação no transplante.

De forma oposta aos nossos resultados, uma diminuição da razão IL-10/TNF- α foi associada a piores desfechos do transplante após três anos de seguimento em um estudo que acompanhou pacientes transplantados renais com rejeição e RTR com função estável do enxerto. Os autores encontraram níveis de IL-10 similares entre pacientes com função renal estável e rejeição ao enxerto. No entanto, foi detectado maiores níveis de TNF- α em pacientes com rejeição, o que contribuiu para a diminuição da razão entre IL-10 e TNF- α (CHERUKURI *et al.*, 2014).

Além disso, em um estudo sobre a infecção por citomegalovírus (CMV) em RTR, infecção esta que pode diminuir significativamente a sobrevida do enxerto (BROWNE *et al.*, 2010), Nordøy e colaboradores (2000) demonstraram que os pacientes com infecção assintomática tinham um aumento significativo na razão IL-10/TNF- α . Em contraste, foram detectados altos níveis de TNF- α e moderados níveis de IL-10 em pacientes com infecção por CMV sintomática, demonstrando que o balanço entre essas citocinas pode contribuir para a infecção e suas manifestações clínicas, sugerindo seu uso como um biomarcador no transplante (NORDØY *et al.*, 2000).

7.3.3 Avaliação dos níveis de citocinas em função do tempo pós transplante

A análise dos níveis de citocinas em função do tempo pós transplante (T1: 1 a 24 meses; T2: 25 a 60 meses; T3: 61 a 120 meses e T4: acima de 120 meses) destacou o aumento de IL-6 nos subgrupos T1 e T3 e a elevação de IL-10 no subgrupo T2 (**Figura 5**).

É importante ressaltar que pacientes que possuem elevação de citocinas pró-inflamatórias antes do transplante têm enxertos mais

vulneráveis ao ataque de mecanismos imunes inatos e adaptativos como consequência da alta atividade inflamatória (FITZGERALD; JOHNSON; PEREZ, 2004). Estudos constataram que pacientes que fizeram HD antes da realização do transplante possuem elevados níveis séricos de IL-6 e TNF- α no período pós transplante (LIMA *et al.*, 2011; RYSZ *et al.*, 2006). No presente estudo, apesar de não termos dosado os níveis de citocinas no tempo pré-transplante, cerca de 70% dos pacientes fizeram HD antes da transplantação. Além disso, essa porcentagem provavelmente deve ser maior, já que 28% dos pacientes avaliados não tinham essa informação relatada no prontuário médico.

Lima e colaboradores (2011) foram, em parte, concordantes ao nosso estudo ao demonstrarem que os níveis de IL-6 e TNF- α que estavam elevados no período pré-transplante permaneceram altos no pós-transplante imediato, reduzindo em 30 dias e aumentando novamente em 180 dias após o transplante. Os autores ressaltam que as concentrações de marcadores inflamatórios, tais como IL-6, TNF- α e IL-2, representam uma opção de monitorização a longo prazo no transplante renal.

Um estudo observou que no período de pré-transplante imediato, marcadores pró-inflamatórios como IL-6, TNF- α e proteína C reativa (PCR), assim como marcadores do estresse oxidativo, estavam significativamente elevados quando comparados aos do grupo controle. De forma contrária aos nossos resultados, segundo os autores, nos primeiros meses pós-transplante houve um declínio rápido e significativo em todos os biomarcadores inflamatórios avaliados indicando restauração da função renal por redução do estresse oxidativo e diminuição do processo inflamatório (SIMMONS *et al.*, 2005).

Cueto-Manzano e colaboradores (2005), por sua vez, notaram que após uma redução inicial nos níveis séricos de TNF- α e IL-6 aos 6 meses após o transplante renal, os níveis dessas citocinas aumentaram no décimo segundo e no décimo oitavo mês. Este dado mostra uma concordância parcial no que se refere aos maiores níveis de IL-6 encontrados no presente estudo durante os primeiros dois anos pós-transplante.

Uma associação entre a elevação na concentração de IL-6 no período pós-transplante de pulmão e a rejeição e a diminuição do tempo de sobrevida

do órgão transplantado foi encontrada (HALL *et al.*, 2012). Além disso, um estudo demonstrou que o processo inflamatório contínuo durante o período de cinco anos após o transplante renal requer um esforço adicional para prolongar a sobrevida do enxerto (OZDEMIR *et al.*, 2007). Diante disso, é interessante pontuar que a investigação a longo prazo de marcadores inflamatórios como ferramentas potenciais no diagnóstico e monitoramento de lesão renal e o consequente controle da inflamação parecem ser fundamentais para garantir um melhor desfecho do transplante.

De forma distinta da IL-6, a IL-10 tem como principais funções o controle da inflamação e a imunomodulação, limitando a resposta imune adaptativa. A ideia de que a IL-10 se eleva *in vivo* vem sendo sustentada pelo seu mecanismo contra-regulatório sendo, portanto, uma resposta compensatória no contexto de uma intensa inflamação sistêmica (FITZGERALD; JOHNSON; PEREZ, 2004). De fato, no presente estudo, os níveis significativamente aumentados de IL-10 foram observados após dois anos de transplante, o que coincide com a redução dos níveis de IL-6, sugerindo um controle do processo inflamatório.

Em um experimento com modelo animal, níveis aumentados de IL-10 resultaram em uma redução significativa na glomeruloesclerose e fibrose intersticial e em um menor grau de proteinúria com consequente redução da lesão do rim (MU *et al.*, 2005). Além disso, foi demonstrado que a inibição da IL-10 piora a função do rim, estando diretamente associada ao comprometimento das características histológicas renais (SUMMERS *et al.*, 2011). Isso demonstra que IL-10 tem papel importante na manutenção da função renal estável. Apesar disso, sua expressão anormal, transitória ou prolongada, parece ser um mecanismo compensatório e parece estar ligada à progressão de distúrbios renais (SINUANI *et al.*, 2013).

Ainda que a regulação positiva de IL-10 esteja associada, em alguns estudos, à rejeição crônica e à pior sobrevida do enxerto (ELNOKEETY; SHAKER; FAYED, 2017; HUESO *et al.*, 2010), em outros estudos, a expressão aumentada de IL-10 foi associada à tolerância imunológica ao enxerto (NEWELL *et al.*, 2010; NOVA-LAMPERTI *et al.*, 2016). Sabe-se que os primeiros dois anos de transplante são os mais críticos e de maior instabilidade imunológica. Com o aumento do tempo pós transplante, começa

a se pensar em tolerância imunológica do órgão transplantado. Essa tolerância é intrinsecamente relacionada ao sucesso do transplante e consiste em um mecanismo de adaptação do sistema imune do receptor ao reconhecer aloantígenos do doador com controle sobre a auto reatividade. Esse mecanismo é regulado não só pela ação de imunossuppressores, como também pelo equilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias e reguladoras (SAKAGUCHI; WING; YAMAGUCHI, 2009).

No presente estudo, o aumento significativo de IL-10 após dois anos de transplante pode estar relacionado ao desenvolvimento da imunotolerância ao enxerto, já que esta citocina possui um papel decisivo neste processo (AKDIS *et al.*, 2011) e já que não foram constatadas elevações significativas de citocinas pró-inflamatórias no período T2. Além disso, nossos dados mostraram um aumento dos níveis de IL-6 no período T3. Este resultado pode ser explicado pelo descuido frequente da terapia farmacológica com a diminuição da preocupação em relação ao transplante ao longo dos anos. Assim, o paciente com função renal estável por um período considerável pode não manter um controle rigoroso de sua saúde e isso pode ativar novamente a resposta inflamatória ocasionando o aumento de níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-6 (MOTA *et al.*, 2013).

7.3.4 Avaliação dos níveis de citocinas em função de seus polimorfismos genéticos

No presente estudo, não foram encontradas associações entre os polimorfismos de IL-6, TNF- α e IL-10 e os respectivos níveis plasmáticos destas citocinas em pacientes transplantados renais, sugerindo que os níveis destas citocinas podem ser regulados por fatores além dos genéticos (**Figura 6**).

Raros são os estudos que associam os polimorfismos em genes de citocinas aos níveis plasmáticos destas citocinas em pacientes transplantados renais (BAMOULID *et al.*, 2006; KRAJEWSKA *et al.*, 2009; MELK *et al.*, 2003).

Um estudo envolvendo RTR demonstrou que indivíduos carreadores do alelo G (polimorfismo -174G>C no gene da IL-6) tinham níveis plasmáticos

mais elevados de IL-6 (BAMOULID *et al.*, 2006), de forma distinta aos resultados encontrados no corrente estudo.

Assim como no presente estudo, Krajewska e colaboradores (2009) não conseguiram demonstrar uma associação entre o polimorfismo -174G>C no gene de IL-6 e as concentrações plasmáticas de IL-6 em 125 RTR avaliados. Além disso, Hameed e colaboradores (2018) também não encontraram uma relação entre o polimorfismo -174G>C no gene de IL-6 e a expressão desta citocina em pacientes com doença renal do diabetes.

Outros estudos encontraram uma relação significativa entre o polimorfismo -308G>A no gene de TNF- α e os níveis desta citocina. Alguns autores, por exemplo, demonstraram que pacientes com o genótipo AA (polimorfismo -308G>A) possuíam um significativo aumento de TNF- α em pacientes com doença renal em estágio terminal e em pacientes com doença renal do diabetes (HAMEED *et al.*, 2018; SINGH *et al.*, 2015).

Em concordância com nossos achados, pesquisadores não observaram a associação entre os níveis de TNF- α e o polimorfismo -308 G>A na doença renal crônica (VÁZQUEZ-HUERTA *et al.*, 2014). No entanto, é importante considerar que existem outras variantes localizadas na região promotora do gene de TNF- α que também podem contribuir para a alteração de sua expressão (SCHULZ *et al.*, 2004; VÁZQUEZ-HUERTA *et al.*, 2014). A mesma hipótese pode ser aplicada para as demais citocinas avaliadas.

É importante ressaltar também que os níveis de citocinas podem ter sido influenciados pela terapia imunossupressora e medicamentosa dos pacientes transplantados renais avaliados. A terapia imunossupressora tem efeito negativo sobre a expressão gênica de algumas citocinas. Os corticoesteroides, por exemplo, inibem importantes fatores imunorreguladores como o fator nuclear kappa B, envolvido na transcrição de diversos genes ligados à resposta inflamatória, como os genes das citocinas IL-2, IL-6, IFN- γ e TNF- α . Assim como os corticoesteroides, os agentes inibidores da calcineurina, como o TAC e a CSA, também inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias, além de prevenirem a ativação de células T pela inibição de calcineurina. O arsenal terapêutico inclui outros medicamentos que suprimem a resposta imune, alterando o perfil de citocinas (COOPER & WISEMAN, 2010; DUNCAN; WILKES, 2005). Além dos medicamentos

imunossupressores, cerca de 38,4% dos pacientes do presente estudo utilizavam estatinas/fibratos que também possuem efeitos anti-inflamatórios conhecidos (ELMASRY *et al.*, 2017; ITO *et al.*, 2002; MCFARLAND *et al.*, 2018).

Faz-se necessário destacar que todos os pacientes faziam uso da terapia imunossupressora, o que pode ter influenciado nos níveis de citocinas encontrados no corrente estudo. No mesmo sentido, outro estudo discutiu os efeitos da imunossupressão sobre a expressão de citocinas, evidenciando a terapia como um fator interferente, o qual não possibilita a quantificação plasmática precisa de citocinas em pacientes transplantados renais (MCDANIEL *et al.*, 2003).

De forma semelhante aos resultados obtidos no presente estudo, um estudo que acompanhou crianças transplantadas renais com disfunção crônica do enxerto e com função renal estável não conseguiu provar a associação entre os polimorfismos -1082G>A, -819C>T e -592C>A no gene da IL-10 e -308G>A no gene do TNF- α e a expressão das respectivas citocinas (MELK *et al.*, 2003). O fato da população avaliada ser composta por crianças constitui uma diferença importante em relação ao presente estudo. A resposta imune é mais reativa nesta população quando comparada à população adulta (ETTENGER, 1992).

De maneira oposta, estudos demonstraram que os genótipos de alta produção de IL-10 estavam relacionados à maiores níveis séricos de IL-10 em pacientes com doenças autoimune (AYDINGÖZ *et al.*, 2015; JAHID *et al.*, 2018). Além disso, Kung e colaboradores (2010) demonstraram que o genótipo AA (polimorfismo -592C>A no gene de IL-10) estava associado a um menor nível plasmático de IL-10 em pacientes com doença renal do diabetes.

7.4 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS AVALIADOS

No corrente estudo, a IL-6 se correlacionou positivamente com o TNF- α e negativamente com o tempo pós transplante e com a IL-10. Além disso, foi encontrada uma correlação negativa entre TNF- α e IL-10 (**Tabela 8**).

Assim como no presente estudo, outros estudos encontraram uma correlação positiva entre IL-6 e TNF- α (DE SERRES *et al.*, 2011; MIHAI *et al.*, 2016; UZUN *et al.*, 2016). Em modelos animais foi demonstrado que a IL-6 e o TNF- α isolados ou em combinação podem promover respostas mediadas por células T, afetando a capacidade supressora de Tregs e ativando as células T efectoras (DOMINITZKI *et al.*, 2007; SHEN; GOLDSTEIN, 2009). No entanto, a ação destas citocinas no transplante renal ainda não é clara.

De forma distinta aos nossos dados, um estudo não constatou diferenças entre os níveis de IL-6 em diferentes tempos pós transplante (MOTA *et al.*, 2013). Outras análises, no entanto, demonstraram um aumento de IL-6 em 6 meses após o transplante (LIMA *et al.*, 2011) ou uma diminuição de IL-6 neste período (CUETO-MANZANO *et al.*, 2005), verificando uma certa relação entre o tempo pós transplante e os níveis de IL-6, ainda que inconclusiva.

No presente estudo, a correlação negativa encontrada entre IL-6 e IL-10 e entre TNF- α e IL-10 pode ser explicada pelo balanço regulatório existente entre estas citocinas. A ativação de mediadores inflamatórios induz a produção de IL-10 que, por sua vez, limita e inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias (GIRNDT *et al.*, 1995; STENVINKEL *et al.*, 2005). Dessa forma, IL-10 regula negativamente a produção das citocinas IL-6 e TNF- α (BRUNET, 2012).

Uma continuidade nos estudos do papel de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras, além do estudo da influência genética sobre seus níveis, poderiam auxiliar no melhor entendimento da resposta imune após o transplante renal e, conseqüentemente, ser utilizada como uma ferramenta chave no monitoramento clínico e no prognóstico de pacientes transplantados renais.

8 CONCLUSÕES

O polimorfismo -308G>A no gene de TNF- α foi associado à função do enxerto caracterizada pelo eRFG.

Maiores níveis de TNF- α e maior razão TNF- α /IL-10 foram encontrados em pacientes que não tinham histórico de rejeição ao enxerto, evidenciando um possível papel anti-inflamatório desta citocina no transplante renal.

A dosagem de TNF- α e a genotipagem de seus polimorfismos, particularmente o polimorfismo -308G>A, poderiam ser utilizadas como potenciais estratégias na previsão da função do enxerto e do desfecho clínico de pacientes transplantados renais.

O polimorfismo +25G>C no gene de TGF- β 1 foi associado aos episódios prévios de rejeição. A análise deste polimorfismo poderia constituir uma ferramenta promissora no monitoramento do transplante renal.

As citocinas IL-6 e IL-10 foram associadas ao tempo pós-transplante e o balanço entre estas citocinas poderia estar relacionado ao aumento ou à diminuição da sobrevida do enxerto.

Estudos futuros são necessários para compreender melhor o impacto destas citocinas e de seus polimorfismos no transplante renal.

9 PERSPECTIVAS DE ESTUDO

Realizar a determinação dos polimorfismos em genes de citocinas do doador (doadores vivos) e verificar se existe alguma influência na função renal e no desenvolvimento da rejeição ao enxerto;

Determinar as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos em genes de citocinas nos RTR de acordo com o tempo pós-transplante, avaliando os efeitos destes polimorfismos na sobrevida do enxerto;

Quantificar os níveis plasmáticos das citocinas TGF- β 1 e IFN- γ e relacioná-los aos seus polimorfismos genéticos, aos marcadores da função renal avaliados, ao histórico de rejeição e ao tempo pós-transplante;

Aumentar o tamanho amostral na tentativa de recrutar e avaliar todos os pacientes transplantados renais atendidos no Ambulatório de Transplantes do Hospital das Clínicas da UFMG;

Avaliar os níveis plasmáticos e urinários das citocinas avaliadas ao longo dos anos por meio de um estudo longitudinal dando continuidade à avaliação clínica e laboratorial dos RTR do presente estudo.

REFERÊNCIAS

ABTO – Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. **Registro Brasileiro de Transplantes**, [S.l.: s.n.], 2018.

ADACHI, T. *et al.* Renal atrophy after ischemia-reperfusion injury depends on massive tubular apoptosis induced by TNF α in the later phase. **Medical Molecular Morphology**, v. 47, n. 4, p. 213-223, 2014.

AKDIS *et al.* Interleukins, from 1 to 37, and interferon-g: Receptors, functions, and roles in diseases. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 127, n. 3, p. 721-812, 2011.

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

AL-LAMKI, R. S.; MAYADAS, T. N. TNF receptors: signaling pathways and contribution to renal dysfunction. **Kidney Int.**, v. 87, p. 281-296, 2015.

AMANO, M. T.; CAMARA, N. O. S. The immunomodulatory role of carbon monoxide during transplantation. **Medical Gas. Research**, v. 3, n. 1, p. 1-15, 2013.

AMIRZARGAR, A. *et al.* Th1/Th2 cytokine analysis in Iranian renal transplant recipients. **Transplant. Proc.**, v. 37, n. 7, p. 2985–2987, 2005.

ASHOOR, I. F.; NAJAFIAN, N. Rejection and regulation: a tight balance. **Current Opinion in Organ Transplantation**, v. 17, n. 1, p. 1-7, 2012.

AWAD, M. R. *et al.* Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene: association with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. **Transplantation**, v. 66, n. 8, p. 1014-1020, 1998.

AYAZ, S. *et al.* Evaluation of the effects of recipient/donor gender on early/late postoperative renal graft functions by renal scintigraphy. **Exp. Clin. Transplant.**, v. 12, n. 6, p. 510-514, 2014.

AYDINGÖZ I. E. *et al.* The combination of tumour necrosis factor- α -308A and interleukin-10 -1082G gene polymorphisms and increased serum levels of related cytokines: susceptibility to vitiligo. **Clin. Exp. Dermatol.**, v. 40, n. 1, p. 71-77, 2015.

AZARPIRA, N. *et al.* Influence of recipient and donor IL-10, TNFA and INFG genotypes on the incidence of acute renal allograft rejection. **Molecular Biology Reports**, v. 36, n. 6, p. 1621-1626, 2009.

BAMOULID, J. *et al.* IL-6 Promoter Polymorphism -174 Is Associated with New-Onset Diabetes after Transplantation. **JASN**, v. 17, n. 8, p. 2333-2340, 2006.

BARNES, P. J.; KARIN, M. Nuclear factor- κ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **N. Engl. J. Med.**, v. 336, n. 15, p. 1066, 1997.

BAUD, L.; ARDAILLOU, R. Tumor necrosis factor in renal injury. **Miner. Electrolyte Metab.**, v. 21, n. 4-5, p. 336-341, 1995.

BECKER, L. E.; MORATH, C.; SUESAL, C. Immune mechanisms of acute and chronic rejection. **Clin. Biochem.**, v. 49, n. 4-5, p. 320-323, 2016.

BERGAN, A. Ancient myth, modern reality. A brief history of transplantation. **J. Biocommun.**, v. 24, n. 4, p. 2-9, 1997.

BETTELLI, E. *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 235-238, 2006.

BHARAT, A. *et al.* CD4+25+ regulatory T cells limit Th1-autoimmunity by inducing IL-10 producing T cells following human lung transplantation. **Am. J. Transplant.**, v. 6, n. 8, p. 1799-1808, 2006.

BIDWELL, J. *et al.* Cytokine gene polymorphisms in human disease: on-line databases, supplement 1. **Genes Immun.**, v. 2, n. 5, p. 61, 2001.

BRABCOVA, I. *et al.* Genetic variability of major inflammatory mediators has no impact on the outcome of kidney transplantation. **Transplantation**, v. 84, n. 8, p. 1037-1044, 2007.

BRADLEY, J. R.; THIRU, S.; POBER, J. S. Disparate localization of 55-kd and 75-kd tumor necrosis factor receptors in human endothelial cells. **Am. J. Pathol.**, v. 146, n. 1, p. 27-32, 1995.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE – Sistema Nacional de Transplantes: Manual do Transplante Renal e Lei nº 9.434/97, 2010. Disponíveis em <<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/cidadao>> e <<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area>>. Acesso em 31/03/2018.

BREULMANN, B. *et al.* Influence of cytokine genes polymorphisms on long-term outcome in renal transplantation. **Clin. Transplant.**, v. 21, n. 5, p. 615-621, 2007.

BROWNE, B. J. *et al.* The impact of cytomegalovirus infection ≥ 1 year after primary renal transplantation. **Clinical transplantation**, v. 24, n. 4, p. 572-577, 2010.

BRUNEAU, S. *et al.* Translational implications of endothelial cell dysfunction in association with chronic allograft rejection. **Pediatr. Nephrol.**, v. 31, n. 1, p. 41-51, 2016.

BRUNET, M. Cytokines as predictive biomarkers of alloreactivity. **Clin. Chim. Acta**, v. 413, n. 17-18, p. 1354-1358, 2012.

BUDAK, D. *et al.* Association between graft function and serum TNF- α , TNFR1 and TNFR2 levels in patients with kidney transplantation. **Ren. Fail.**, v. 37, n. ,p. 871-876, 2015.

CALNE, R. Y. Inhibition of the rejection of renal homografts in dogs by purine analogues, **Transplant. Bull.**, v. 28, n. 4, p. 65-81, 1961.

CARREL, A. The operative technique for vascular anastomoses and transplantation of viscera. **Lyon Med.**, v. 98, p. 859, 1902.

CARRERO, J. J. Sex and gender disparities in the epidemiology and outcomes of chronic kidney disease. **Nat. Rev. Nephrol.**, v. 14, n. 3, p. 151-164, 2018.

CARREL, A.; GUTHRIE, C. C. Functions of a transplanted kidney. **Science**, v. 22, n. 563, p. 473, 1905.

CHEN, B. *et al.* Adeno-associated viral vector-mediated interleukin-10 prolongs allograft survival in a rat kidney transplantation model. **Am. J. Transplant.**, v. 7, n. 5, p. 1112-1120, 2007.

CHEN, X. *et al.* Blockade of interleukin-6 signaling augments regulatory T-cell reconstitution and attenuates the severity of graft-versus-host disease. **Blood**, v. 114, n. 4, p. 891-900, 2009.

CHEN, Z. *et al.* Genetic polymorphisms in IL-2, IL-10, TGF- β 1, and IL- 2RB and acute rejection in renal transplant patients, **Clin. Transplant.**, v. 28, n. 6, p. 649-655, 2014.

CHEN, P. D. *et al.*, Gender differences in renal transplant graft survival. **J. Formos. Med. Assoc.**, v. 112, n. 12, p. 783-788, 2013.

CHERUKURI, A. *et al.* Immunologic Human Renal Allograft Injury Associates with an Altered IL-10/TNF- α Expression Ratio in Regulatory B Cells. **Journal of the American Society of Nephrology: JASN**, v. 25, n. 7, p. 1575-1585, 2014.

CHONG, A. S.; ALEGRE, M. L. The impact of infection and tissue damage in solid-organ transplantation. **Nat. Rev. Immunol.** v. 12, n. 6, p. 459-471, 2012.

CHOW, K. M. *et al.* Transforming growth factor-beta1 gene polymorphism in renal transplant recipients. **Ren. Fail.**, v. 27, n. 6, p. 671, 2005.

COCA, S.; SINGANAMALA, S.; PARIKH, C. Chronic kidney disease after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. **Kidney Int.**, v. 81, n. 5, p. 442-448, 2012.

COELHO, V. P. C. V. *et al.* Papéis contrastantes das variantes polimórficas dos genes TGFB1 e IFNG do doador e do receptor na rejeição crônica de transplantados renais. **Einstein (São Paulo)**, v. 9, n.1, p.46-51, 2011.

COLVIN, R. B. Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v.18, n. 4, p.1046-1056, 2007.

COOPER, J. E.; WISEMAN, A. C. Novel immunosuppressive agents in kidney transplantation. **Clinical Nephrology**, v. 73, n. 5, p. 333-343, 2010.

CORNELL, L. D.; SMITH, R. N.; COLVIN, R. B. Kidney Transplantation: Mechanisms of Rejection and Acceptance. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 3, n. 1, p. 189-220, 2008.

COUPER, K. N.; BLOUNT, D. G.; RILEY, E. M. IL-10: the master regulator of immunity to infection. **J. Immunol.**, v. 180, n. 9, p. 5771-5777, 2008.

CUETO-MANZANO, A. M. *et al.* Markers of inflammation before and after renal transplantation. **Transplantation**, v. 80, n. 1, p. 47-51, 2005.

CUHACI, B. *et al.* Transforming growth factor-beta levels in human allograft chronic fibrosis correlate with rate of decline in renal function. **Transplantation**, v. 68, n. 6, p. 785-790, 1999.

DANOVITCH, G. M. **Handbook of kidney transplantation**. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, p. 23-71, 2005.

DE PASQUALE, C. *et al.* Psychopathological aspects of kidney transplantation: Efficacy of a multidisciplinary team. **World J. Transplant.**, v. 4, n. 4, p. 267-275, 2014.

DE SERRES, S. A. *et al.* Monocyte-secreted inflammatory cytokines are associated with transplant glomerulopathy in renal allograft recipients. **Transplantation**, v. 91, n. 5, p. 552-559, 2011.

DE WAAL MALEFYT, R. *et al.* IL-10 and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II MHC expression. **J. Exp. Med.**, v. 174, n. 4, p. 915-924, 1991.

DENNLER, S.; GOUMANS, M. J.; TEN DIJKE, P. Transforming growth factor beta signal transduction, **J. Leukoc. Biol.**, v. 71, n. 5, p. 731-740, 2002.

DHAOUADI, T. *et al.* Cytokine gene polymorphisms in kidney transplantation. **Transplantation Proceedings**, v. 45, n. 6, p. 2152-2157, 2013.

DIAS, E. C. A. *et al.* Monitorização molecular da rejeição de Transplantes Renais. **J. Bras. Nefrol.**, v. 27, n. 2, p. 76-83, 2005.

DING L. *et al.* IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. **J. Immunol.**, v. 151, n. 3, p. 1224-1234, 1993.

DOMINITZKI, S. *et al.* Cutting edge: Trans-signaling via the soluble IL-6R abrogates the induction of FoxP3 in naive CD4 CD25 T cells. **J. Immunol.**, v. 179, n. 4, p. 2041-2045, 2007.

DUNCAN, M. D.; WILKES, D. S. Transplant-related Immunosuppression: A Review of Immunosuppression and Pulmonary Infections. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 2, n. 5, p. 449-455, 2005.

DUNN, G. P.; KOEBEL, C. M.; SCHREIBER, R. D. Interferons, immunity and cancer immunoediting, **Nat. Rev. Immunol.**, v. 6, n. 11, p. 836-48, 2006.

EBERL, G. *et al.* Innate lymphoid cells. Innate lymphoid cells: a new paradigm in immunology, **Science**, v. 348, n. 6237, p. aaa6566, 2015.

EDEMIR, B. *et al.* Activation of counter-regulatory mechanisms in a rat renal acute rejection model. **BMC Genomics**, v. 9, p. 71, 2008.

EINECKE, G. *et al.* A molecular classifier for predicting future graft loss in late kidney transplant biopsies. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 6, p. 1862-1872, 2010.

ELMASRY, A. *et al.* Simvastatin exerts antifibrotic effect and potentiates the antischistosomal effects of praziquantel in a murine model: Role of IL10. **Biomed Pharmacother**, v. 96, p. 215-221, 2017.

ELNOKEETY, M. M; SHAKER, A. M; FAYED, A. M. Urinary interleukin-10 in renal transplant recipients: Does it predict a state of tolerance or rejection. **Saudi J. Kidney Dis. Transpl.**, v. 28, n. 5, p. 1196-1200, 2017.

EL-SAWY, T.; FAHMY, N. M.; FAIRCHILD, R. L. Chemokines: directing leukocyte infiltration into allografts. **Curr. Opin. Immunol.** v. 14, n. 5, p. 562-568, 2002.

ETTENGER, R. B. Children are different: The challenges of pediatric renal transplantation. **Am. J. Kidney Dis.**, v. 20, n. 6, p. 668-672, 1992.

EVARISTO C, ALEGRE ML. IFN- γ : the Dr. Jekyll and Mr. Hyde of immunology? **Am. J. Transplant.**, v. 13, n. 12, p. 3057-3058, 2013.

FARKASH, E. A.; COLVIN, R. B. Diagnostic challenges in chronic antibody-mediated rejection. **Nat. Rev. Nephrol.**, v. 27, n. 5, p. 255-257, 2012.

FIELDING, C. A. *et al.* Interleukin-6 signaling drives fibrosis in unresolved inflammation. **Immunity**, v. 40, n. 1, p. 40-50, 2014.

FIERS, W. Tumor necrosis factor: Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. **FEBS Lett.**, v. 285, n. 2, p. 199-212, 1991.

FISHMAN, D. *et al.* The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. **J. Clin. Invest.**, v. 102, n. 7, p. 369-376, 1998.

FITZGERALD, J. T.; JOHNSON, J. R.; PEREZ, R. V. Pre-transplant elevations of interleukin-12 and interleukin-10 are associated with acute rejection after renal transplantation. **Clin. Transplant.**, v. 18, n. 4, p. 434-439, 2004.

FLYNN, J. L. *et al.* An essential role for interferon gamma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection, **J Exp Med.**, v. 178, n. 6, p. 2249-2254, 1993.

FRIED, L. F. Renal insufficiency as a predictor of cardiovascular outcomes and mortality in elderly individuals. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 41, n. 8, p.1364-1372, 2003.

FRUCHT, D. M. *et al.* IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge, **Trends Immunol.**, v. 22, n. 10, p. 556-560, 2001.

GAAFAR, A. *et al.* Study of the cytokine polymorphisms in correlation to rejection and graft survival in renal allograft donors and recipients from a homogenous Saudi population. **Transpl. Immunol.**, v. 30, n. 1, p. 34-39, 2014.

GABEY, C. Interleukin-6 and chronic inflammation. **Arthritis Research & Therapy**, v. 8, n. 2, p. S3, 2006.

GARCES, J. C. *et al.* Antibody-Mediated Rejection: A Review. **The Ochsner Journal**, v. 17, n. 1, p. 46-55, 2017.

GARCÍA-COVARRUBIAS, L. *et al.* Lack of Association Between Elevated Urinary Levels of Interleukin-10 and Interferon Gamma With the Presence of Inflammation in Kidney Transplant Recipients. **Transplant. Proc.**, v. 48, n. 2, p. 583-587, 2016.

GE, Y.-Z. *et al.* Combined Effects of TGFB1 +869 T/C and +915 G/C Polymorphisms on Acute Rejection Risk in Solid Organ Transplant Recipients: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e93938, 2014.

GENDZEKHADZE, K.; RIVAS-VETENCOURT, P.; MONTANO, R. F. Risk of adverse post-transplant events after kidney allograft transplantation as

predicted by CTLA-4 +49 and TNF-alpha -308 single nucleotide polymorphisms: a preliminary study. **Transpl. Immunol.**, v. 16, n. 3-4, p. 194-199, 2006.

GIRNDT, M. *et al.* Production of interleukin-6, tumour necrosis factor alpha and interleukin- 10 in vitro correlates with the clinical immune defect in chronic hemodialysis patients. **Kidney Int.**, v. 47, n. 2, p. 559-565, 1995.

GOLDMAN, M. *et al.* A role for eosinophils in transplant rejection. **Trends Immunol.**, v. 22, n. 5, p. 247-251, 2001.

GRINYÓ, J. *et al.* Association of four DNA polymorphisms with acute rejection after kidney transplantation. **Transplant International**, v. 21, n. 9, p. 879–891, 2008.

GUELLA, A.; MOHAMED, E. Donor and Recipient Gender Distribution in a Saudi Kidney Transplant Center, **Transplant. Proc.**, v. 43, n. 2, p. 415-417, 2011.

HAAS, M. *et al.* Banff 2013 meeting report: inclusion of C4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. **Am. J. Transplant.**, v. 14, n. 2, p. 272-283, 2014.

HAAS, M. The Banff 2017 Kidney Meeting Report: Revised diagnostic criteria for chronic active T cell-mediated rejection, antibody-mediated rejection, and prospects for integrative endpoints for next-generation clinical trials. **Am. J. Transplant.**, v. 18, n. 2, p. 293-307, 2018.

HAGERTY, D. T.; ALLEN, P. M. Processing and presentation of self and foreign antigens by the renal proximal tubule. **J. Immunol.**, v. 148, n. 8, p. 2324-2330, 1992.

HALL, D. J. *et al.* Immediate postoperative inflammatory response predicts long-term outcome in lung-transplant recipients. **Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery**, v. 15, n. 4, p. 603-607, 2012.

HALLORAN, P. F. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. **N. Engl. J. Med.**, v. 351, n. 26, p. 2715-2729, 2004.a

HALLORAN, P. F. *et al.* Assessing long-term nephron loss: is it time to kick the CAN grading system? **Am. J. Transplant.**, v. 4, n. 11, p. 1729-1730, 2004.b

HALLORAN, P. F. *et al.* Microarray diagnosis of antibody-mediated rejection in kidney transplant biopsies: an international prospective study (INTERCOM). **Am. J. Transplant.**, v. 13, n. 11, p. 2865-2874, 2013.

HAMEED, I. *et al.* Genetic variations in key inflammatory cytokines exacerbates the risk of diabetic nephropathy by influencing the gene expression. **Gene**, v. 30, n. 661, p. 51-59, 2018.

HECKER, K. H.; NIIZEKI, H.; STREILEIN, J. W. Distinct roles for transforming growth factor-beta2 and tumour necrosis factor-alpha in immune deviation elicited by hapten-derivatized antigen-presenting cells. **Immunology**, v. 96, n. 3, p. 372-380, 1999.

HERNANDEZ-FUENTES M. P.; LECHLER, R. I. Chronic graft loss. Immunological and non-immunological factors. **Contrib. Nephrol.**, v. 146, p. 54-64, 2005.

HIGGINS, S. P. *et al.* TGF- β 1/p53 signaling in renal fibrogenesis. **Cell Signal.**, v. 43, p. 1-10, 2018.

HOFFMANN, U. *et al.* Upregulation of TNF receptor type 2 in human and experimental renal allograft rejection. **Am. J. Transplant.**, v. 9, n. 4, p. 675-686, 2009.

HOPKINS, S. J. The pathophysiological role of cytokines. **Leg. Med. (Tokyo)**, v. 5, n. 1, p. S45-57, 2003.

HSIEH, H. G. *et al.* IL-17 expression as a possible predictive parameter for subclinical renal allograft rejection. **Transplant Int.**, v. 14, n. 5, p. 287-298, 2001.

HU, X. *et al.* Donor or recipient TNF-A -308G/A polymorphism and acute rejection of renal allograft: a meta-analysis. **Transplant Immunology**, v. 25, n. 1, p. 61-71, 2011.

HU, Q. *et al.* Interleukin-10-1082 G/a polymorphism and acute renal graft rejection: a meta-analysis. **Ren. Fail.**, v. 38, n. 1, p. 57-64, 2016.

HUESO, M. *et al.* Intragraft expression of the IL-10 gene is up-regulated in renal protocol biopsies with early interstitial fibrosis, tubular atrophy, and subclinical rejection. **Am. J. Pathol.**, v. 176, n. 4, p. 1696-1704, 2010.

HUTCHINGS, A. *et al.* Association of cytokine single nucleotide polymorphisms with B7 costimulatory molecules in kidney allograft recipients, **Pediatr. Transplant.**, v. 6, n. 1, p. 69-77, 2002.

ISEKI, K. *et al.* Significance of hyperuricemia as a risk factor for developing ESRD in a screened cohort. **Am. J. Kidney Dis.**, v. 44, n. 4, p. 642-650, 2004.

ISEKI, K. Gender differences in chronic kidney disease. **Kidney International**, v. 74, n. 4, p. 415-441, 2008.

ITO, T. *et al.* HMG-CoA reductase inhibitors reduce interleukin-6 synthesis in human vascular smooth muscle cells. **Cardiovasc. Drugs Ther.**, v. 16, n. 2, p. 121-126, 2002.

JAHID, M. *et al.* Interleukin10-1082 A/G polymorphism: Allele frequency, correlation with disease markers, messenger RNA and serum levels in North Indian rheumatoid arthritis patients. **Clin. Biochem.**, v. 55, p. 80-85, 2018.

JAIN, M. An overview of Banff classification of renal transplant pathology. **Indian Journal of Transplantation**, v. 4, n. 1, p. 20-25, 2010.

JANEWAY, C. A. *et al.* **Immunobiology: The Immune System in Health and Disease**. 5th edition. New York: Garland Science; 2001.

JIA, W. *et al.* A study on the effect of IL-6 gene polymorphism on the prognosis of non-small-cell lung cancer. **Oncotargets Ther.**, v. 8, p. 2699-2704, 2015.

JIANG, S.; HERRERA, O.; LECHLER, R. I. New spectrum of allorecognition pathways: implications for graft rejection and transplantation tolerance. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 16, n. 5, p. 550-557, 2004.

JIMÉNEZ-SOUSA, M. A. *et al.* Genetic polymorphisms located in TGFB1, AGTR1, and VEGFA genes are associated to chronic renal allograft dysfunction. **Cytokine**, v. 58, p. 321-326, 2012.

JIN, Z. *et al.* [The level of IL-2 and IL-6 in stimulated peripheral lymphocyte supernatants of kidney transplant recipients can predict acute renal allograft rejection]. **Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi**, v. 33, n. 8, p. 1024-1029, 2017.

JONES, S. A. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. **J. Immunol.**, v. 175, n. 6, p. 3463-3468, 2005.

JUNG, Y. J.; LEE, H. R.; KWON, O. J. Comparison of serum cystatin C and creatinine as a marker for early detection of decreasing glomerular filtration rate in renal transplants. **J. Korean Surg. Soc.**, v. 83, n. 2, p. 69-74. 2012.

KAMOUN, M. Cellular and molecular parameters in human renal allograft rejection. **Clin. Biochem.**, v. 34, n. 1, p. 29-34, 2001.

KANEDA, H. *et al.* Pre-implantation multiple cytokine mRNA expression analysis of donor lung grafts predicts survival after lung transplantation in humans. **Am. J. Transplant.**, v. 6, n. 3, p. 544-551, 2006.

KARCZEWSKI, M. *et al.* Cytometric analysis of TH1/TH2 cytokines in the urine of patients undergoing kidney transplantation. **Ann. Transplant.**, v. 14, n. 3, p. 25-28, 2009.

KARIMI, M. H. *et al.* A study of the impact of cytokine gene polymorphism in acute rejection of renal transplant recipients. **Mol. Biol. Rep.**, v. 39, n. 1, p. 509-515, 2012.

KARIMI, M. H.; EBADI, P.; POURFATHOLLAH, A. A. Association of cytokine/costimulatory molecule polymorphism and allograft rejection: a comparative review. **Expert. Rev. Clin. Immunol.**, v. 9, n. 11, p. 1099-1112, 2013.

KATSUMA, A. *et al.* Histopathological findings in transplanted kidneys. **Renal Replacement Therapy**, v. 3, p. 6, 2017.

KEEN L J. The extent and analysis of cytokine and cytokine receptor gene polymorphism. **Transplant Immunology**, v. 10, n. 2-3, p. 143-146, 2002.

KHAN, F. Graft inflammation and histologic indicators of kidney chronic allograft failure: low-expressing interleukin-10 genotypes cannot be ignored. **Transplantation**, v. 90, n. 6, p. 630-638, 2010.

KHAN, I. E. *et al.* **The allo-immunological injury in chronic allograft nephropathy.** In: Gööz M, editors. Chronic kidney disease. Shanghai: InTech, 2012. p. 401-414.

KIM, S. H. *et al.* Pretransplant donor-specific interferon-gamma ELISPOT assay predicts acute rejection episodes in renal transplant recipients. **Transplant. Proc.**, v. 39, n. 10, p. 3057-3060, 2007.

KIM, I. K. *et al.* Impact of innate and adaptive immunity on rejection and tolerance. **Transplantation**, v. 86, n. 7, p. 889-894, 2008.

KISHIMOTO, T. IL-6: from its discovery to clinical applications. **Int. Immunol.**, v. 22, n. 5, p. 347-352, 2010.

KITAMURA, M.; SUTO, T. S. TGF- β and glomerulonephritis: antiinflammatory versus prosclerotic actions. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v. 12, n. 4, p. 669-679, 1997.

KOCIERZ, M. *et al.* The influence of selected cytokine gene polymorphisms on the occurrence of acute and chronic rejection and on kidney graft survival. **Postepy. Hig. Med. Dosw.**, v. 63, n. 835515, p. 613-626, 2009.

KOCIERZ, M. *et al.* -174G/C interleukin-6 gene polymorphism and the risk of transplanted kidney failure or graft loss during a 5-year follow-up period. **Tissue Antigens**, v. 77, n. 4, p. 283-90, 2011.

KRAJEWSKA, M. *et al.* Recipient genetic determinants of inflammatory process and nonstandard atherosclerosis risk factors affect kidney graft function early posttransplantation. **Transplant. Proc.**, v. 41, n. 8, p. 3060-3062, 2009.

KREISEL, D. *et al.* Mouse vascular endothelium activates CD8+ T lymphocytes in a B7-dependent fashion. **J. Immunol.**, v. 169, n. 11, p. 6154-6161, 2002.

KUNG, W. J. *et al.* Association of interleukin-10 polymorphisms with cytokines in type 2 diabetic nephropathy. **Diabetes Technol. Ther.**, v. 12, n. 10, p. 809-813, 2010.

KURAHASHI, H. *et al.* Testosterone replacement elevates the serum uric acid levels in patients with female to male gender identity disorder. **Endocr. J.**, v. 60, n. 12, p. 1321-1327, 2013.

LA MANNA, G. *et al.* The impact of apoptosis and inflammation gene polymorphisms on transplanted kidney function. **Ann. Transplant.**, v. 18, p. 256-264, 2013.

LEE, H. S. Mechanisms and consequences of TGF- β overexpression by podocytes in progressive podocyte disease, **Cell Tissue Res.**, v. 347, n. 1, p. 129-140, 2012.

LI, L. *et al.* Identification of common gene signatures for the diagnosis of renal and cardiac acute allograft rejection. **PLoS One**, v. 8, n. 12, e82153, 2013.

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

LIMA, J. R. *et al.* Cystatin C and inflammatory markers in kidney transplant recipients. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 57, n. 3, p. 347-352, 2011.

LINDEN, P. K. History of solid organ transplantation and organ donation. **Crit. Care Clin.**, v. 25, n. 1, p. 165-184, 2009.

LIU, Z. *et al.* Indirect recognition of donor HLA-DR peptides in organ allograft rejection. **J. Clin. Invest.**, v. 98, n. 5, p. 1150-1157, 1996.

LIU, F. *et al.* Interleukin-10-1082G/A polymorphism and acute liver graft rejection: a meta-analysis. **World J. Gastroenterol.**, v. 18, n. 8, p. 847-854, 2012.

LIU, K. *et al.* Association between TGFB1 genetic polymorphisms and chronic allograft dysfunction: a systematic review and meta-analysis. **Oncotarget**, v. 8, n. 37, p. 62463-62469, 2017.

LOEFFLER, I.; WOLF, G. Transforming growth factor- β and the progression of renal disease. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v. 1, p. i37-i45, 2014.

LOONG, C. C. *et al.* Evidence for the early involvement of interleukin 17 in human and experimental renal allograft rejection. **J. Pathol.**, v. 197, n. 3, p. 322-332, 2002.

LÓPEZ-NOVOA, J. M.; NIETO, M. A. Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression. **EMBO Mol. Med.**, v. 1, n. 6-7, p. 303-314, 2009.

LÓPEZ-NOVOA, J. M. *et al.* Etiopathology of chronic tubular, glomerular and renovascular nephropathies: clinical implications. **J. Transl. Med.**, v. 9, p. 13, 2011.

LÓPEZ-HERNÁNDEZ, F. J.; LÓPEZ-NOVOA, J. M. Role of TGF- β in chronic kidney disease: an integration of tubular, glomerular and vascular effects, **Cell Tissue Res.**, v. 347, n. 1, p. 141-154, 2012.

LORI, L. *et al.* Chronic kidney disease and dialysis access in women. **Journal of Vascular Surgery**, v. 57, n. 4, p. 49S-53S, 2013.

LOUCAIDOU, M. *et al.* Cytokine polymorphisms do not influence acute rejection in renal transplantation under tacrolimus-based immunosuppression. **Transplant. Proc.**, v. 37, n. 4, p. 1760, 2005.

MA, L. *et al.* The imbalance between Tregs, Th17 cells and inflammatory cytokines among renal transplant recipients. **BMC Immunology**, v. 16, p. 56, 2015.

MALYSZKO, J. *et al.* Biomarkers of delayed graft function as a form of acute kidney injury in kidney transplantation. **Scientific Reports**, v. 5, p. 11684, 2015.

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

MANZANO, A. M. C. *et al.* Markers of inflammation before and after renal transplantation. **Transplantation**, v. 80, n. 1, p. 47-51, 2005.

MARINHO, A.; CARDOSO, S. S.; ALMEIDA, V. V. Desigualdade de transplantes de órgãos no Brasil: análise do perfil dos receptores por sexo e raça ou cor. Rio de Janeiro: **Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada**; 2011. (Texto para Discussão, 1629).

MARSHALL, S. E.; WELSH, K. I. The role of cytokine polymorphisms in rejection after solid organ transplantation. **Genes and Immunity**, v. 2, n. 6, p. 297-303, 2001.

MARTINEZ, O. M. *et al.* Evidence for a nonclassical pathway of graft rejection involving interleukin 5 and eosinophils. **Transplantation**, v. 55, n. 4, p. 909-918, 1993.

MASLI, S; TURPIE, B. Anti-inflammatory effects of tumour necrosis factor (TNF)-alpha are mediated via TNF-R2 (p75) in tolerogenic transforming growth factor-beta-treated antigen-presenting cells. **Immunology**, v. 127, n. 1, p. 62-72, 2009.

MASOLA, V. *et al.* Specific heparanase inhibition reverses glucose-induced mesothelial-to-mesenchymal transition. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v. 32, n. 7, p. 1145-1154, 2017.

MAZANOWSKA, *et al.* Increased Plasma Tissue Inhibitors of Metalloproteinase Concentrations as Negative Predictors Associated With Deterioration of Kidney Allograft Function Upon Long-Term Observation. **Transplantation Proceedings**, v. 45, n. 4, p. 1458–1461, 2013.

MCDANIEL, D. O. *et al.* Combined analysis of cytokine genotype polymorphism and the level of expression with allograft function in African-American renal transplant patients. **Transpl. Immunol.**, v. 11, n. 1, p. 107-119, 2003.

MCFARLAND, A. J. *et al.* Differences in statin associated neuroprotection corresponds with either decreased production of IL-1 β or TNF- α in an in vitro model of neuroinflammation-induced neurodegeneration. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 344, p. 56-73, 2018.

MCINNES, I. B.; SCHETT, G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7, n. 6, p. 429-442, 2007.

MCMANIGLE, W.; PAVLISKO, E. N.; MARTINU T. Acute cellular and antibody-mediated allograft rejection. **Semin. Respir. Crit. Care Med.** v. 34, n. 3, p. 320-35, 2013.

MEIRELLES JUNIOR, R. F. *et al.* Transplante de fígado: história, resultados e perspectivas. **Einstein**, v. 13, n. 1, p. 149-152, 2015.

MELK, A. *et al.* Cytokine single nucleotide polymorphisms and intrarenal gene expression in chronic allograft nephropathy in children. **Kidney International**, v. 64, n. 1, p. 314-320, 2003.

MENGEL, M. *et al.* Banff 2011 meeting report: New concepts in antibody-mediated rejection. **Am. J. Transplant.**, v. 12, n. 3, p. 563-570, 2012.

MENGEL, M.; SIS, B.; HALLORAN, P.F. Swot analysis of Banff: strengths, weaknesses, opportunities and threats of the international Banff consensus process and classification system for renal allograft pathology, **Am. J. Transplant.**, v. 7, n. 10, p. 2221-2226, 2007.

MERRILL, J. P. *et al.* Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins, **J. Am. Med. Assoc.**, v. 160, n. 4, p. 277–282, 1956.

MONTGOMERY, R. A. *et al.* ABO incompatible renal transplantation: a paradigm ready for broad implementation. **Transplantation**, v. 87, n. 8, p. 1246–1255, 2009.

MOREAU, A. *et al.* Effector Mechanisms of Rejection. **Cold Spring Harb. Perspect. Med.** v. 3, n. 11, p.a015461, 2013.

MORIWAKI, Y. Effects on Uric Acid Metabolism of the Drugs except the Antihyperuricemics. **Journal of Bioequivalence & Bioavailability**, v. 6, n. 1, p. 010-017, 2014.

MORRIS, P. J. Transplantation - a medical miracle of the 20th century, **N. Engl. J. Med.**, v. 351, n. 26, p. 2678-2680, 2004.

MOTA, P. C. *et al.* Pulmão e transplante renal. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, v. 15, n. 6, p. 1073-1099, 2009.

MOTA, A. P. L. *et al.* Cytokines signatures in short and long-term stable renal transplanted patients. **Cytokine**, v. 62, n. 2, p. 302-309, 2013.

MOTA A. P. L. *et al.* Hemostatic parameters according to renal function and time after transplantation in Brazilian renal transplanted patients. **Dis. Markers**, v. 2015, p. 472750, 2015.

MOTA, A. P. L. *et al.* Regulatory and pro-inflammatory cytokines in brazilian living-related renal transplant recipients according to creatinine plasma levels. **Nephrology (Carlton)**, v. 23, n. 9, p. 867-875, 2017.

MU, W. *et al.* IL-10 suppresses chemokines, inflammation, and fibrosis in a model of chronic renal disease. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 16, n. 12, p. 3651-3660, 2005.

MÜLLER, V. *et al.* Sex hormones and gender-related differences: their influence on chronic renal allograft rejection. **Kidney Int.**, v. 55, n. 5, p. 2011-2020, 1999.

MURRAY, J. E. *et al.* Study of transplantation immunity after total body irradiation. Clinical and experimental investigation. **Surgery**, v. 48, n. 1, p. 272-284, 1960.

NAMIPASHAKI, A.; RAZAGHI-MOGHADAM, Z.; ANSARI-POUR, N. The Essentiality of Reporting Hardy-Weinberg Equilibrium Calculations in Population-Based Genetic Association Studies. **Cell Journal (Yakhteh)**, v. 17, n. 2, p. 187-192, 2015.

NANKIVELL, B. J. *et al.* The natural history of chronic allograft nephropathy. **N. Engl. J. Med.**, v. 349, n. 24, p. 2326-2333, 2003.

NANKIVELL, B. J; ALEXANDER, S. I. Rejection of the Kidney Allograft. **N. Engl. J. Med.**, v. 363, n. 15, p. 1451-1462, 2010.

NEWELL, K. A. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. **J. Clin Invest.**, v. 120, n. 6, p. 1836-1847, 2010.

NICKEL, P. *et al.* Enzyme-linked immunosorbent spot assay for donor-reactive interferon-gamma-producing cells identifies T-cell presensitization and correlates with graft function at 6 and 12 months in renal-transplant recipients. **Transplantation**, v. 78, p. 1640-1646, 2004.

NIKOLOVA, P. N. *et al.* Cytokine gene polymorphism in kidney transplantation — impact of TGF-beta1, TNF-alpha and IL-6 on graft outcome. **Transpl. Immunol.**, v. 18, n. 4, p. 344-348, 2008.

NORDØY, I. *et al.* The Role of the Tumor Necrosis Factor System and Interleukin-10 during Cytomegalovirus Infection in Renal Transplant Recipients. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 1, p. 51-57, 2000.

NOVA-LAMPERTI, E. *et al.* IL-10-produced by human transitional B-cells down-regulates CD86 expression on B-cells leading to inhibition of CD4+T-cell responses. **Scientific Reports**, v. 6, p. 20044, 2016.

O'CONNELL, P. J. *et al.* Clinical Trials for Immunosuppression in Transplantation: The Case for Reform and Change in Direction. **Transplantation**, v. 101, n. 7, p. 1527-34, 2017.

OZDEMIR, N. F. *et al.* Serum C-reactive protein surge in renal transplant recipients: link with allograft survival. **Transplant. Proc.**, v. 39, n. 4, p. 934-937, 2007.

PALLADINO, M. A. *et al.* Anti-TNF-alpha therapies: the next generation. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 2, n. 9, p. 736-746, 2003.

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

PAWLIK, A. *et al.* The association between cytokine gene polymorphisms and kidney allograft survival. **Ann. Transplant.**, v. 13, n. 2, p. 54-58, 2008.

PEREIRA, A. B. *et al.* Citocinas e quimiocinas no transplante renal (cytokines and chemokines in renal transplantation). **J. Bras. Nefrol.**, v. 31, n. 4, p. 286-296, 2009.

PERREY, C. *et al.* Genotyping for polymorphisms in interferon-gamma, interleukin-10, transforming growth factor-beta 1 and tumour necrosis factor-alpha genes: a technical report. **Transpl Immunol.**, v. 6, n. 3, p. 193-197, 1998.

PIANCATELLI, D. *et al.* Kidney Transplantation, Polymorphisms of IL-18, and Other Pro-Inflammatory Genes and Late Post-Transplant Outcome. **Transplant. Proc.**, v. 48, n. 2, p. 323-325, 2016.

PLOTHOW, A. *et al.* Frequencies at three polymorphic sites of interleukin-10 gene promoter in Brazilian renal recipients. **Transplant. Proc.**, v. 35, n. 8, p. 2908-2910, 2003.

POLI, F. Tumour necrosis factor-alpha gene polymorphism: implications in kidney transplantation. **Cytokine**, v. 12, n. 12, p. 1778-1783, 2000.

PONTICELLI, C. The mechanisms of acute transplant rejection revisited. **J. Nephrol.**, v. 25, n. 2, p. 150-158, 2012.

PORT, F. K. *et al.* Organ donation and transplantation trends in the USA, 2003. **Am. J. Transplant.** v. 4, n. 9, p. 7-12, 2004.

PRATSCHKE, J.; STAUCH, D.; KOTSCH, K. Role of NK and NKT cells in solid organ transplantation. **Transpl. Int.** v. 22, n. 9, p. 859-868, 2009.

PRAVICA, V. *et al.* In vitro production of IFN- gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene. **Eur. J. Immunogenet.**, v. 26, n. 1, p. 1-3, 1999.

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

PRIBYLOVA-HRIBOVA, P. *et al.* TGF-beta1 mRNA upregulation influences chronic renal allograft dysfunction. **Kidney International**, v. 69, n. 10, p. 1872-1879, 2006.

PUOTI, F. *et al.* Organ transplantation and gender differences: a paradigmatic example of intertwining between biological and sociocultural determinants. **Biology of Sex Differences**, v. 7, n. 1, p. 35, 2016.

RAMPIM, G. F. **Polimorfismos de genes de citocinas em transplantes cardíaco e renal.** 2003. 74f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2003.

RASHAD, R. H. *et al.* IL-10 Gene polymorphism and graft outcome in live-donor kidney transplantation. **J. Egypt. Soc. Nephrol. Transplant.**, v. 16, n. 3, p. 89-96, 2016.

REINHOLD, S. W. *et al.* Elevated urinary sVCAM-1, IL6, sIL6R and TNFR1 concentrations indicate acute kidney transplant rejection in the first 2 weeks after transplantation. **Cytokine**, v. 57, n. 3, p. 379-388, 2012.

RIELLA, L. V. *et al.* Long-term outcomes of kidney transplantation across a positive complement-dependent cytotoxicity crossmatch. **Transplantation**, v. 97, n. 12, p. 1247-1252, 2014.

RODRIGUES, K. F. **Associação de polimorfismos em genes de citocinas com complicações microvasculares e comorbidades no diabetes mellitus tipo 2.** 2013. 129f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

RODRIGUES, F. *et al.* Incidence and mortality of acute kidney injury after myocardial infarction: a comparison between KDIGO and RIFLE criteria. **PLoS One**, v. 8, n. 7, 2013.

RONCAROLO, M. G. *et al.* Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. **Immunol. Rev.**, v. 212, n. 1, p. 28-50, 2006.

ROUSSET, F. *et al.* Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, n. 5, p. 1890-1893, 1992.

ROŽMAN, P.; ŠVAJGER, U. The tolerogenic role of IFN- γ . **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 41, p. 40-53, 2018.

RYSZ, J. *et al.* Blood serum levels of IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α and IL-1 β in patients on maintenance hemodialysis. **Cell. Mol. Immunol.**, v. 3, n. 2, p. 151-154, 2006.

SABAT, R. *et al.* Biology of interleukin-10. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 21, n. 5, p. 331-344, 2010.

SAFINIA, N. *et al.* T-cell alloimmunity and chronic allograft dysfunction. **Kidney Int.**, v. 78, n. 119, p. S2-S12, 2010.

SAHD, R. **Quantificação Gênica Pré-transplante Renal: Predição da Rejeição Aguda**. 2012, 73f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

SAHOO, S.; KANG, S.; SUPRAN, S. Tumor necrosis factor genetic polymorphisms correlate with infections after renal transplantation. **Transplantation**, v. 69, n. 5, p. 880-884, 2000.

SAKAGUCHI, S.; WING, K.; YAMAGUCHI, T. Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Treg. **Eur. J. Immunol.**, v. 39, n. 9, p. 2331-2336, 2009.

SÁNCHEZ-FRUCTUOSO, A. I. *et al.* The Polymorphism -308G/A of Tumor Necrosis Factor- α Gene Modulates the Effect of Immunosuppressive Treatment in First Kidney Transplant Subjects Who Suffer an Acute Rejection. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, 2016.

SANKARAN, D. *et al.* Cytokine gene polymorphisms predict acute graft rejection following renal transplantation, **Kidney Int.**, v. 56, n. 1, p. 281-288, 1999.

SANTOS, J.; MARTINS, L. S. Estimating glomerular filtration rate in kidney transplantation: Still searching for the best marker. **World Journal of Nephrology**, v. 4, n. 3, p. 345-353, 2015.

SARAIVA, M.; O'GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 10, n. 3, p. 170-181, 2010.

SAYEGH, M. H.; CARPENTER, C. B. Transplantation 50 years later – progress, challenges and promises. **N. Engl. J. Med.**, v. 351, n. 26, p. 2761-2766, 2004.

SCHNAPER, H. W. *et al.* TGF- β signal transduction in chronic kidney disease. **Front. Biosci.**, v. 14, p. 2448-2465, 2009.

SCHRODER, K. *et al.* Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions, **J. Leukoc. Biol.**, v. 75, n. 2, p. 163-89, 2004.

SCHULZ, S. *et al.* Relation between the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene and protein expression, and clinical, biochemical, and genetic markers: age, body mass index and uric acid are independent predictors for an elevated TNF-alpha plasma level in a complex risk model. **Eur. Cytokine Netw.**, v. 15, n. 2, p. 105-11, 2004.

SELLARES, J. *et al.* Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. **Am. J. Transplant.**, v. 12, n. 2, p. 388-99, 2012.

SEMENTILLI, A. *et al.* Patologia do transplante renal: achados morfológicos principais e como laudar as biópsias. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 44, n. 4, p. 293-304, 2008.

SHACHAR, I.; KARIN, N. The dual roles of inflammatory cytokines and chemo- kines in the regulation of autoimmune diseases and their clinical implications. **J. Leukoc. Biol.**, v. 93, n. 1, p. 51-61, 2013.

SHAH, R. *et al.* Allelic diversity in the TGFB1 regulatory region: characterization of novel functional single nucleotide polymorphisms. **Hum. Genet.**, v. 119, n. 1-2, p. 61-74, 2006.

SHAYAN, H. Organ transplantation: from myth to reality. **J. Invest. Surg.**, v. 14, n. 3, p. 135-138, 2001.

SHEN, H.; GOLDSTEIN, D. R. IL-6 and TNF-alpha synergistically inhibit allograft acceptance. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 20, n. 5, p. 1032-1040, 2009.

SHIU, K. Y. *et al.*, Graft dysfunction in chronic antibody-mediated rejection correlates with B-cell-dependent indirect antidonor alloresponses and autocrine regulation of interferon- γ production by Th1 cells, **Kidney Int.**, v. 91, n. 2, p. 477-492, 2017.

SIEGEL, P. M.; MASSAGUE, J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 11, p. 807-821, 2003.

SILBIGER S, NEUGARTEN J: Gender and human chronic renal disease. **Gend. Med.**, v. 5, p. S3-S10, 2008.

SIMMONS, E. M. *et al.* Effect of renal transplantation on biomarkers of inflammation and oxidative stress in end-stage renal disease patients. **Transplantation**, v. 79, n. 8, p. 914-919, 2005.

SINGBARTL, K.; KELLUM, J. A. AKI in the ICU: definition, epidemiology, risk stratification, and outcomes. **Kidney Int.**, v. 81, n. 9, p. 819-25, 2012.

SINGH, R. *et al.* Interleukin 8 -251T>A and Interferon gamma +874A>T polymorphism: potential predictors of allograft outcome in renal transplant recipients from north India. **Transpl. Immunol.**, v. 21, n. 1, p. 13-17, 2009.

SINGH, K. *et al.* Association of tumour necrosis factor- α polymorphism in patients with end stage renal disease. **Nephrology (Carlton)**, v. 20, n. 6, p. 387-391, 2015.

SINUANI, I. *et al.* Role of IL-10 in the progression of kidney disease. **World J. Transplant.**, v. 3, n. 4, p. 91-98, 2013.

SIS, B.; HALLORAN, P. F. Endothelial transcripts uncover a previously unknown phenotype: C4d-negative antibody-mediated rejection. **Curr Opin Organ Transplant.**, v. 15, n. 1, p. 42-8, 2010.

SLATKIN, M. Linkage disequilibrium — understanding the evolutionary past and mapping the medical future. **Nature reviews Genetics**, v. 9, n. 6, p. 477-485, 2008.

SOLEZ, K. *et al.* Banff classification of renal allograft pathology: updates and future directions. **Am. J. Transplant.**, v. 8, n. 4, p. 753-760, 2008.

SONKAR, G. K., *et al.* Evaluation of serum interleukin 6 and tumour necrosis factor alpha levels, and their association with various non-immunological parameters in renal transplant recipients. **Singapore Med. J.**, v. 54, n. 9, p. 511-515, 2013.

SONODA, H. *et al.* Uric acid levels predict future development of chronic kidney disease. **Am. J. Nephrol.**, v. 33, n. 4, p. 352-357, 2011.

SOUSA, S. R. *et al.* Incidência e fatores de risco para complicações infecciosas no primeiro ano após o transplante renal. **J. Bras. Nefrol.**, v. 32, n. 1, p. 77-84, 2010.

SPEECKAERT, M. M. *et al.* Tumor necrosis factor receptors: Biology and therapeutic potential in kidney diseases. **Am. J. Nephrol.**, v. 36, n. 3, p. 261-270, 2012.

STARZL, T. E. History of clinical transplantation. **World J. Surg.**, v. 24, n. 7, p. 759-782, 2000.

STEGALL, M. D. *et al.* Developing New Immunosuppression for the Next Generation of Transplant Recipients: The Path Forward. **Am. J. Transplant.**, v. 16, n. 4, p. 1094-101, 2016.

STENVINKEL, P. *et al.* IL-10, IL-6, and TNF-alpha: central factors in the altered cytokine network of uremia--the good, the bad, and the ugly. **Kidney Int.**, v. 67, n. 4, p. 1216-33, 2005.

SUMMERS, S. A. *et al.* Signal transducer and activation of transcription 6 (STAT6) regulates T helper type 1 (Th1) and Th17 nephritogenic immunity in experimental crescentic glomerulonephritis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 166, n. 2, p. 227-234, 2011.

SUTHANTHIRAN, M.; STROM, T. B. Renal transplantation. **N. Engl. J. Med.**, v. 331, n. 6, p. 365-376, 1994.

TAIT, B. D. Solid phase assays for HLA antibody detection in clinical transplantation. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 21, n. 5, p. 573-577, 2009.

TAJIK, N. *et al.* The predictive value of HLA-DR matching and cytokine gene polymorphisms in renal allograft acute rejection: a living unrelated donor (LURD) study. **Iran. J. Immunol.**, v. 3, n. 4, p. 150-156, 2006.

THAKKINSTIAN, A. *et al.* Association between cytokine gene polymorphisms and outcomes in renal transplantation: a meta-analysis of individual patient data. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v. 23, n. 9, p. 3017-3023, 2008.

TRIPATHI, G. *et al.* Association of proinflammatory cytokines with end stage renal disease. **Cytokine**, v. 50, n. 3, p. 278-283, 2010.

TSAI, T. *et al.* Contemporary incidence, predictors, and outcomes of acute kidney injury in patients undergoing percutaneous coronary interventions: insights from the NCDR Cath-PCI registry. **JACC. Cardiovasc. Interv.**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2014.

TURNER, D. M. *et al.* A genetic marker of high TNF-alpha production in heart transplant recipients. **Transplantation**, v. 60, n. 10, p. 1113-1117, 1995.

TURNER, D. M. *et al.* An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. **European Journal of Immunogenetics**, v. 24, n. 1, p. 1-8, 1997.

UZUN, S. *et al.* The role of midkine in the inflammatory process and its correlation with other inflammatory markers in renal transplant recipients. **Int. J. Artif. Organs**, v. 39, n. 6, p. 277-281, 2016.

VÁZQUEZ-HUERTA, D. I. *et al.* Tumor necrosis factor alpha -238 G/A and -308 G/A polymorphisms and soluble TNF- α levels in chronic kidney disease:

correlation with clinical variables. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 7, n. 8, p. 2111-2119, 2014.

VELLA, J. P. *et al.* Indirect allorecognition of major histocompatibility complex allopeptides in human renal transplant recipients with chronic graft dysfunction. **Transplantation**, v. 64, n. 6, p. 795-800, 1997.

VOLTARELLI, J. C. *et al.* **Imunologia Clínica na Prática Médica**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2009. 1099p.

WANG, H. *et al.* Improvement of cytokine response and survival time by bioartificial kidney therapy in acute uremic pigs with multi-organ dysfunction. **Int. J. Artif. Organs**, v. 33, n. 8, p. 526-534, 2010.

WANG, Z. *et al.* Transforming Growth Factor-beta1 Induces Endothelial-to-Mesenchymal Transition via Akt Signaling Pathway in Renal Transplant Recipients with Chronic Allograft Dysfunction. **Annals of transplantation**, v. 21, p. 775-783, 2016.

WASSMANN, S. *et al.* Interleukin-6 induces oxidative stress and endothelial dysfunction by overexpression of the angiotensin II type 1 receptor. **Circ. Res.**, v. 94, n. 4, p. 534-541, 2004.

WATSON, C. J. E.; DARK, J. H. Organ transplantation: historical perspective and current practice, **British Journal of Anaesthesia**, v. 108, n. 1, p. 29-42, 2012.

WILSON, A. G. *et al.* Single base polymorphism in the human Tumour Necrosis Factor alpha (TNF α) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. **Human Molecular Genetics**, v. 1, n. 5, p. 353, 1992.

WILSON, A. G. *et al.* Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor α promoter on transcriptional activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 7, p. 3195-3199, 1997.

WOMER, K. L.; VELLA, J. P.; SAYEGH, M. H. Chronic allograft dysfunction: mechanisms and new approaches to therapy. **Semin. Nephrol.**, v. 20, n. 2, p. 126-147, 2000.

WOOD KJ, SAWITZKI B. Interferon gamma: a crucial role in the function of induced regulatory T cells in vivo. **Trends. Immunol.**, v. 27, n. 4, p. 183-187, 2006.

WOOD, K.; SHANKAR, S.; MITTAL, S. **Concepts and challenges in organ transplantation: rejection, immunosuppressant and tolerance**. Clinical immunology: principles and practice. 4. ed. California: Elsevier, 2013. p. 989-995.

XING, Z. *et al.* IL-6 is an anti-inflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. **J. Clin. Invest.**, v. 101, n. 2, p. 311-320, 1998.

XIONG, J. *et al.* Lack of association between interleukin-10 gene polymorphisms and graft rejection risk in kidney transplantation recipients: A Meta-Analysis, **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0127540, 2015.

ZAVADIL, J.; BÖTTINGER, E. P. TGF- β and epithelial-to-mesenchymal transitions. **Oncogene**, v. 24, n. 37, p. 5764–5774, 2005.

ZEISBERG, E. M. *et al.* Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 19, n. 12, p. 2282-2287, 2008.

ZHANG, W. R. *et al.* Plasma IL-6 and IL-10 Concentrations Predict AKI and Long-Term Mortality in Adults after Cardiac Surgery. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 26, n. 12, p. 3123-3132, 2015.

ZIBAR, L. *et al.* The Relationship Between Interferon- γ Gene Polymorphism and Acute Kidney Allograft Rejection, **Clinical Immunology**, v. 73, n. 4, 2011.

ANEXO A – Carta de aprovação do Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, CAAE (2015)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

Projeto: CAAE – 48473415.0.0000.5149

**Interessado(a): Profa. Ana Paula Lucas Mota
Departamento de Análises Clínicas e
Toxicológicas
Faculdade de Farmácia**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 16 de setembro de 2015, o projeto de pesquisa intitulado **"Avaliação de marcadores genéticos no transplante renal"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto através da Plataforma Brasil.

**Profa. Dra. Telma Campos Medeiros Lorentz
Coordenadora do COEP-UFMG**

ANEXO B – Carta de aprovação do Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, CAAE (Atualizada em 2016).



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 48443715.3.0000.5149

Interessado(a): **Profa. Ana Paula Lucas Mota**
Departamento de Análises Clínicas e
Toxicológicas
Faculdade de Farmácia

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 30 de agosto de 2016, a emenda abaixo relacionada, do projeto de pesquisa intitulado **"Avaliação de marcadores genéticos, inflamatórios e hemostáticos no transplante renal"** .

- Acréscimo de novos biomarcadores de diagnóstico e monitoramento dos pacientes transplantados, sem perdas ou alterações em seus tratamentos.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto através da Plataforma Brasil.

Profa. Dra. Vivian Resende
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO C – Esquema de placas de genotipagem de citocinas fornecido pelo kit Cytokine Genotyping Tray (One Lambda®)

WORKSHEET
Cytokine Genotyping Tray or Primer Pack, Lot 004

Name _____

Tray Exp. Date _____

Tray Lot # _____

Tray Dot # _____

D-mix Lot #/Batch # _____

Cat. # CYTGEN, PCYTGEN

TNF-α Results _____

TGF-β1 Results _____

IL-10 Results _____

IL-6 Results _____

IFN-γ Results _____

Relationship to Patient _____

Race _____ ABC/Rh _____

Birthdate _____

Sample I.D. _____

Disease _____

POSITIONS	1H/3H/ 5H/7H/ 9H/11H	1G/3G/ 5G/7G/ 9G/11G	1F/3F/ 5F/7F/ 9F/11F	1E/3E/ 5E/7E/ 9E/11E	1D/3D/ 5D/7D/ 9D/11D	1C/3C/ 5C/7C/ 9C/11C	1B/3B/ 5B/7B/ 9B/11B	1A/3A/ 5A/7A/ 9A/11A	2H/4H/ 6H/8H/ 10H/12H	2G/4G/ 6G/8G/ 10G/12G	2F/4F/ 6F/8F/ 10F/12F	2E/4E/ 6E/8E/ 10E/12E	2D/4D/ 6D/8D/ 10D/12D	2C/4C/ 6C/8C/ 10C/12C	2B/4B/ 6B/8B/ 10B/12B	2A/4A/ 6A/8A/ 10A/12A
RESULTS (mark positive locations)																
PRODUCT SIZE (bp)	750	125	125	175	175	125	125	300	300	300	250	250	175	175	250	250
SPECIFICITY *	Neg Cht	TNF-α promoter -308A	TNF-α promoter -308G	TGF-β1 codon 10T	TGF-β1 codon 10C	TGF-β1 codon 25C	TGF-β1 codon 25G	IL-10 promoter -1082A,-919T	IL-10 promoter -1082G,-819C	IL-10 promoter -1082A,-819C	IL-10 promoter -819T,-592A	IL-10 promoter -819C,-592C	IL-6 promoter -174C	IL-6 promoter -174G	IFN-γ intron 1 +874T	IFN-γ intron 1 +874A
TNF-α	G/G (low)	G/A (high)	A/A (high)	T/T G/G (high)	T/C G/G (high)	T/C G/G (high)	T/C G/G (high)	T/T G/C (intermediate)	C/C G/G (intermediate)	T/T G/C (intermediate)	C/C G/C (low)	C/C G/C (low)	T/T G/C (low)	T/C G/C (low)	G/C G/C (high)	G/C G/C (high)
TGF-β1	G/C G/C (low)	T/T G/C (intermediate)	C/C G/C (intermediate)	T/T G/C (intermediate)	T/T G/C (low)	T/T G/C (low)	T/T G/C (low)	G/C G/C (high)	G/C G/C (high)	G/C G/C (high)	G/C G/C (high)	G/C G/C (high)	G/C G/C (high)	G/C G/C (high)	G/C G/C (high)	G/C G/C (high)
IL-10	G/C G/C (low)	T/T G/C (intermediate)	C/C G/C (intermediate)	T/T G/C (intermediate)	T/T G/C (low)	T/T G/C (low)	T/T G/C (low)	G/C G/C (high)	G/C G/C (high)	G/C G/C (high)	G/C G/C (high)	G/C G/C (high)	G/C G/C (high)	G/C G/C (high)	G/C G/C (high)	G/C G/C (high)
IL-6	G/C G/C (low)	T/T G/C (intermediate)	C/C G/C (intermediate)	T/T G/C (intermediate)	T/T G/C (low)	T/T G/C (low)	T/T G/C (low)	G/C G/C (high)	G/C G/C (high)	G/C G/C (high)	G/C G/C (high)	G/C G/C (high)	G/C G/C (high)	G/C G/C (high)	G/C G/C (high)	G/C G/C (high)
IFN-γ	T/T (high)	T/A (intermediate)	A/A (low)	T/T (high)	T/T (high)	T/T (high)	T/T (high)	T/T (high)	T/T (high)	T/T (high)	T/T (high)	T/T (high)	T/T (high)	T/T (high)	T/T (high)	T/T (high)

Photo Documentation

Test Performed by _____ Date _____

Read by _____ Date _____

Reviewed by _____ Date _____

* Note: Low, Intermediate and High refer to gene expression levels.

One Lambda, Inc. 21001 Kittridge St., Canoga Park, CA 91303-2801 Tel: (818) 702-0042 Fax: (818) 702-6904 www.onelambda.com

CYTGEN_004_WS_Rev 1 : Page 1 of 1
Template: Temp_CYTGEN_WS_Rev 0

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
(Grupo de Pacientes Transplantados Renais)

Título do Projeto: Associação de níveis e polimorfismos em genes de citocinas com a função renal de pacientes transplantados

**Professora orientadora e pesquisadora responsável:
Dra. Ana Paula Lucas Mota**

Você está sendo convidado a participar como voluntário(a) de uma pesquisa científica intitulada como: “Associação de níveis e polimorfismos em genes de citocinas com a função renal de pacientes transplantados”, que está descrita a seguir:

A perda do enxerto por mecanismos diversos de rejeição e a ocorrência de complicações cardiovasculares ainda são frequentes no pós-transplante renal. A inflamação, a ativação do sistema imunológico, os distúrbios da coagulação e características genéticas desempenham um papel importante em pacientes transplantados renais, principalmente no que diz respeito à mortalidade cardiovascular e ao risco de rejeição. Na década de 1960, os transplantes de órgãos foram iniciados no Brasil, mas não evoluíram naquela época, em razão da baixa sobrevivência dos receptores. Atualmente, com o aprimoramento de técnicas científicas, o Brasil detém o maior programa público de transplantes de órgãos e tecidos do mundo, destacando-se pelo crescente número de transplantes realizados a cada ano.

Esta pesquisa visa esclarecer sobre as alterações laboratoriais em exames de pacientes transplantados renais, que possam contribuir para o melhor tratamento e monitoramento pós-transplante. Você está sendo convidado para participar desta pesquisa de forma **voluntária e gratuita**.

Para decidir se você deve concordar ou não em participar desta pesquisa, leia atentamente todos os itens a seguir que irão informá-lo(a) e esclarecê-lo(a) de todos os procedimentos, riscos e benefícios pelos quais você passará segundo as exigências da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde.

1. Identificação do(a) voluntário(a) da pesquisa:

Nome: _____ Gênero: _____
 Identidade: _____ Órgão Expedidor: _____
 Data de Nascimento: ____/____/____ Médico: _____
 Telefone: _____ Tempo de Tx: _____

2. Objetivo da pesquisa:

Investigar os polimorfismos em genes de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras e os níveis de citocinas em pacientes submetidos ao transplante de rim, sem sinais clínicos de rejeição, distribuídos em subgrupos de acordo com os níveis séricos de creatinina e o ritmo de filtração glomerular estimado.

3. Descrição detalhada e explicação dos procedimentos realizados:

Sua participação é voluntária e se dará por meio de uma punção venosa de amostras sanguíneas, com agulhas estéreis e descartáveis e tubos a vácuo, também estéreis. Os riscos decorrentes de sua participação na pesquisa envolvem possíveis incômodos durante a punção venosa, como dor local, tonteira ou sensação de desmaio e, após a coleta, o possível surgimento de uma mancha roxa (hematoma), devido ao extravasamento de sangue de um vaso sanguíneo. Geralmente não há complicações e essa mancha roxa desaparece em poucos dias.

Descrição dos desconfortos e riscos da pesquisa:

(X) Risco Mínimo () Risco Baixo () Risco Médio () Risco Alto

4. Descrição dos benefícios da pesquisa:

Se você aceitar participar, estará contribuindo para a confirmação ou a exclusão das hipóteses geradas em torno das alterações em exames laboratoriais encontrados em pacientes transplantados renais, bem como irá contribuir para a geração de materiais didáticos, que possuem o objetivo de instruir e esclarecer os participantes sobre o tratamento e a prevenção de diversas complicações associadas ao transplante de rim.

5. Despesas, compensações e indenizações:

Você não terá despesa pessoal nessa pesquisa incluindo transporte, exames e consultas. As coletas serão realizadas sempre que você comparecer às consultas de rotina e/ou ao laboratório para exames. Você não terá compensação financeira relacionada à sua participação nessa pesquisa.

6. Direito de confidencialidade:

Você tem assegurado que todas as suas informações pessoais obtidas durante a pesquisa serão consideradas estritamente confidenciais e os registros estarão disponíveis apenas para os pesquisadores envolvidos no estudo. Os resultados obtidos nessa pesquisa poderão ser publicados com fins científicos, mas sua identidade será mantida em sigilo.

7. Acesso aos resultados da pesquisa:

Você tem direito de acesso atualizado aos resultados da pesquisa. Em caso de resultados que possam afetar seu monitoramento, entraremos em contato com você ou com o seu médico para que as devidas medidas possam ser tomadas.

8. Liberdade de retirada do consentimento:

Você tem direito de retirar seu consentimento, a qualquer momento, deixando de participar da pesquisa, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu cuidado e/ou tratamento na instituição.

9. Acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa:

Você tem garantido o acesso, em qualquer etapa da pesquisa, aos profissionais responsáveis pela mesma, para esclarecimento de eventuais dúvidas acerca de procedimentos, riscos, benefícios, etc., através dos contatos abaixo:

Professora orientadora e responsável pela pesquisa: Ana Paula Lucas Mota
Telefone: (31) 3409 6896
Email: aplmeta@farmacia.ufmg.br

10. Acesso à instituição responsável pela pesquisa:

Você tem garantido o acesso, em qualquer etapa da pesquisa, à instituição responsável pela mesma, para esclarecimento de eventuais dúvidas acerca dos procedimentos éticos, através do contato abaixo:

Comitê de ética do campus da UFMG
Avenida Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II – 2º andar, sala 2005,
Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG. CEP: 31270-901. Telefone (31) 3409
4592.
email coep@prpq.ufmg.br

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Fui informado verbalmente e por escrito sobre os dados dessa pesquisa e minhas dúvidas com relação a minha participação foram satisfatoriamente respondidas.

Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, os desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso aos pesquisadores e à instituição de ensino.

Tive tempo suficiente para decidir sobre minha participação e concordo voluntariamente em participar desta pesquisa e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante a mesma, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

A minha assinatura neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dará autorização aos pesquisadores, ao patrocinador do estudo e ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais de utilizarem os dados obtidos quando se fizer necessário, incluindo a divulgação dos mesmos, sempre preservando minha identidade.

Assino o presente documento em duas vias de igual teor e forma, ficando uma em minha posse.

Belo Horizonte, _____ de _____ de _____

Voluntário

Pesquisador Responsável

APÊNDICE B – Ficha Clínica

Ficha Clínica			
"AVALIAÇÃO DE MARCADORES GENÉTICOS, INFLAMATÓRIOS E HEMOSTÁTICOS EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS"			
Número de ID do participante: _____ Data da coleta: ____________ Prontuário: _____			
1. Identificação:			
Nome: _____ DN: ____________ Sexo: _____			
Naturalidade: _____ Endereço: _____			
Cidade: _____ Estado: _____ CEP: _____ Tel: _____			
Etnia: _____ Médico: _____ Outras Infos: _____			
2. Dados Clínicos:			
a) Peso (Kg): _____ Altura (m) _____ IMC (Kg/m ²) _____ b) Diálise\Tempo: _____			
c) Doença base: _____ d) Comorbidades: _____			
e) Data do Tx renal: ____________ f) Doador (tipolidade\sexo) : _______________			
g) Imunossuppressores: _____			
h) Outros medicamentos: _____			
i) Tabagismo? _____ j) Consumo de bebida álcool? _____			
k) Prática de exercício físico? _____ l) Tipo sanguíneo: _____ m) História familiar de DRC: _____ n) PA: ________ o) Rejeição prévia\data indução: _____			
Dados Laboratoriais - Data: ____________			
Hemograma	Ionograma	Bioquímica	Bioquímica
Hm\Ht\Hb: \ \	Na\k: \	Creat:	BD\ BT: \
GL:	Mg\P\Cl: \ \	Uréia:	Nível Med____:
Seg\Bast: \	Ca\Cai: \	Ác. úrico:	Albumina:
Baso\Eos: \	Urina	HbA1c:	Globina:
Linf\Mono: \	DU\pH: \	Glico JJ:	LDH:
Plaq:	Micro\Prot: \	TGO\AST:	Colest T:
VCM\HCM: \	Prot. 24h:	TGP\ALT:	HDL\LDL: \
PTTA: c: \ p:	Alb\Creat:	FAL\GGT: \	VLDL\ TGL:
RNI\TP: \ c: p:	Sedimentos:	CK T:	Outros:
Outros:	Outros:	Outros:	Outros:
Imuno (Receptor)		Imuno (Doador)	
HLA A:	B:	DR:	HLA A: B: DR:
PRA PRÉ (data):			Prova Cruzada: GS:
PRA PÓS (data):			Outros:
Biópsia:			Infecções pós-Tx:
Outros:			

APÊNDICE C – Detalhamento da extração do DNA pelo kit Biopur Mini Spin

A proteinase K foi previamente preparada com a adição de 1,35mL de Tampão de Proteinase e o Tampão de Eluição S foi pré-aquecido a 56°C. Foi realizada a transferência de 200µL de sangue total de cada paciente para microtubos de centrifugação de 1,5mL. Em cada microtubo contendo sangue total foram adicionados 25µL de Proteinase K seguido da adição de 200µL de tampão de Lise S.

Após a adição dos reagentes, os microtubos foram homogeneizados vigorosamente em vórtex para a obtenção de um alto rendimento e pureza de DNA. Os microtubos foram incubados a 56°C por 15 minutos e, a cada 5 minutos desta etapa, foram novamente homogeneizados em vórtex. Para a precipitação do DNA, foram adicionados 210µL de etanol 99,8% nos microtubos. O conteúdo de cada microtubo foi transferido para o Tubo Spin S e centrifugado por 1 minuto a 11.000 RPM. O tubo de coleta com o filtrado foi descartado e o tubo-filtro foi colocado sob um novo tubo de coleta. Posteriormente, foram adicionados 500µL de Tampão de Lavagem SI e os Tubos Spin S foram centrifugados por 1 minuto a 11.000 RPM. O filtrado foi descartado e o tubo de coleta foi recolocado sob o tubo-filtro. Para remover o etanol residual, foi realizada a centrifugação por 1 minuto a 11.000 RPM. O tubo-filtro foi colocado em um tubo de Eluição S e foram dispensados 200µL de Tampão de Eluição S previamente aquecido diretamente sobre a membrana de sílica do tubo-filtro. Os tubos de Eluição S foram incubados por 1 minuto a temperatura ambiente e centrifugados por 1 minuto a 11.000 RPM.

APÊNDICE D – Detalhamento da determinação dos níveis plasmáticos de IL-10 por ELISA

Foram adicionados 50µL do Diluente de Ensaio RD1W nos poços correspondentes às amostras teste. Nos poços apropriados, foram adicionados 200µL de amostras padrão, controle e de plasma citratado. A placa foi incubada por 2 horas em temperatura ambiente, o conteúdo dos poços foi retirado por inversão e a placa foi lavada manualmente por 4 vezes utilizando 400µL de Tampão de Lavagem por poço.

Posteriormente, foram adicionados 200µL de Anticorpo Anti-IL-10 Humano Conjugado em cada poço e a placa foi novamente incubada por 2 horas em temperatura ambiente. A etapa de lavagem foi repetida e 200µL de Solução de Substrato foram adicionados a cada poço. Em seguida, a placa foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente em local protegido da luz. Após a incubação, foram adicionados 50µL de Solução de Parada em cada poço e foi observada uma mudança da coloração azul para coloração amarela.

APÊNDICE E – Detalhamento da quantificação de TNF- α e IL-6 por Multiplex

Para a realização do teste, foram adicionados 200 μ L de tampão de ensaio em cada poço da placa. A placa foi selada e colocada sob agitação por 10 minutos em temperatura ambiente. O tampão de ensaio foi removido por inversão da placa em papel toalha limpo. Foram adicionados 13 μ L de amostra padrão e amostra controle nos poços apropriados e 13 μ L de tampão de ensaio nos poços correspondentes às amostras teste. Posteriormente, foram adicionados 13 μ L da solução matriz em todos os poços da placa e 13 μ L de cada amostra de soro (diluição 1:2) em seus respectivos poços. Após a adição das *beads* (13 μ L), a placa foi selada e incubada por 2 horas com agitação em temperatura ambiente. Esse passo permitiu que anticorpos específicos localizados na superfície das *beads* “capturassem” seus respectivos antígenos presentes nas amostras de soro garantindo a sua detecção simultânea.

O conteúdo dos poços foi retirado por inversão e a placa foi lavada 3 vezes com 200 μ L de tampão de lavagem. Em cada poço, foram adicionados 25 μ L de anticorpo de detecção. A placa foi selada e incubada por 30 minutos em temperatura ambiente com agitação. Para a ligação aos anticorpos de detecção, foram adicionados 25 μ L de estreptavidina-PE nos poços. A placa foi novamente selada e incubada por 30 minutos em temperatura ambiente com agitação. A etapa de lavagem foi repetida e foram adicionados 120 μ L de solução tampão *sheath fluid* em todos os poços. Por fim, foi feita a ressuspensão das *beads* por 5 minutos em agitador de microplacas.

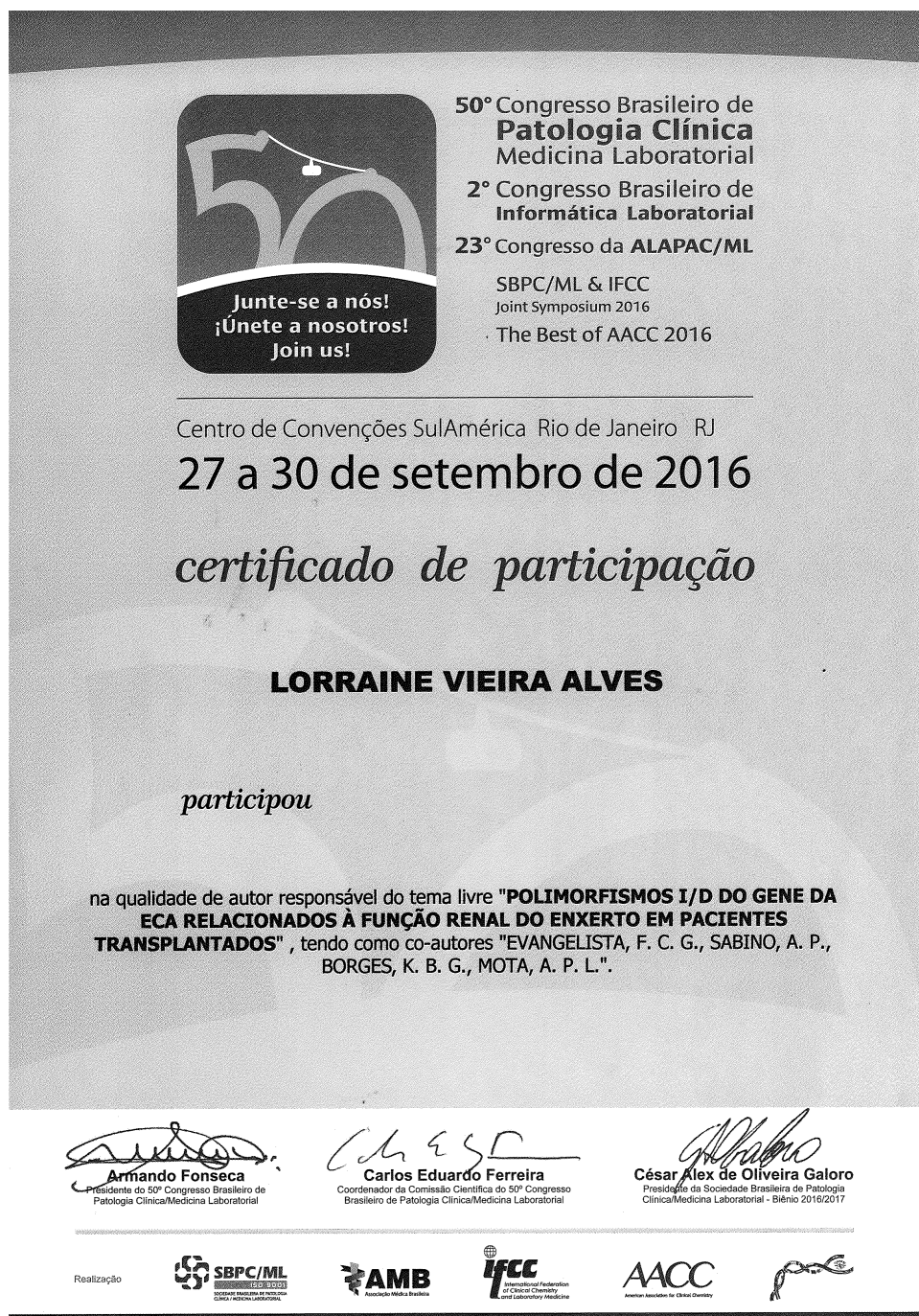
PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS


50° Congresso Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial

Local: Rio de Janeiro (RJ).

Data: 27 a 30 de setembro de 2016.

Apresentação de pôster: "Polimorfismos I/D do gene da ECA relacionados à função renal do enxerto em pacientes transplantados".





50
 Junte-se a nós!
 ¡Únete a nosotros!
 Join us!


50° Congresso Brasileiro de
Patologia Clínica
 Medicina Laboratorial
 2° Congresso Brasileiro de
Informática Laboratorial
 23° Congresso da **ALAPAC/ML**
 SBPC/ML & IFCC
 Joint Symposium 2016
 The Best of AACC 2016


Centro de Convenções SulAmérica Rio de Janeiro RJ
27 a 30 de setembro de 2016
certificado de participação


LORRAINE VIEIRA ALVES

participou






na qualidade de autor responsável do tema livre "**POLIMORFISMOS I/D DO GENE DA ECA RELACIONADOS À FUNÇÃO RENAL DO ENXERTO EM PACIENTES TRANSPLANTADOS**", tendo como co-autores "EVANGELISTA, F. C. G., SABINO, A. P., BORGES, K. B. G., MOTA, A. P. L.".

 **Armando Fonseca**
 Presidente do 50° Congresso Brasileiro de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial

 **Carlos Eduardo Ferreira**
 Coordenador da Comissão Científica do 50° Congresso Brasileiro de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial

 **César Alex de Oliveira Galoro**
 Presidente da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial - Biênio 2016/2017

Realização

51º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial

Local: São Paulo (SP).

Data: 26 a 29 de setembro de 2017.

Apresentação oral: "Polimorfismos I/D no gene da ECA e sua relação com a evolução clínica e o histórico de rejeição em pacientes receptores do transplante renal".



51º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial
3º Congresso Brasileiro de Informática Laboratorial
A Medicina Laboratorial na assistência à saúde
26 a 29 de setembro de 2017
 Palácio das Convenções do Anhembi Parque
 São Paulo • SP

certificado de participação

LORRAINE VIEIRA ALVES

participou

na qualidade de autor responsável do tema livre selecionado para apresentação oral
"POLIMORFISMOS I/D NO GENE DA ECA E SUA RELAÇÃO COM A EVOLUÇÃO CLÍNICA E O HISTÓRICO DE REJEIÇÃO EM PACIENTES RECEPTORES DO TRANSPLANTE RENAL", tendo como co-autores "SABINO, A. P., EVANGELISTA, F. C. G., BORGES, K. B. G., MOTA, A. P. L."

Gustavo Campana
 Presidente do 51º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial

Carlos Eduardo Ferreira
 Coordenador da Comissão Científica do 51º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial

César Alex de Oliveira Galoro
 Presidente da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial - Biênio 2016/2017

Realização

SBPC • ML
 Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial

AMB
 Associação Médica Brasileira

Congresso Mineiro de Biomedicina e Congresso Mineiro de Análises Clínicas

Local: Belo Horizonte (MG)

Data: 12 a 14 de outubro de 2017.

Apresentação de pôster: “Associação entre os polimorfismos I/D no gene da Enzima Conversora de Angiotensina e o prognóstico de receptores do transplante renal”.



XV Congresso Brasileiro de Transplantes

Local: Foz do Iguaçu (PR).

Data: 18 a 21 de outubro de 2017.

Apresentação de pôster: “Polimorfismos I/D do gene da Enzima Conversora de Angiotensina no prognóstico do transplante renal”.



Certificamos que

O trabalho Polimorfismos I/D do gene da Enzima Conversora de Angiotensina no prognóstico do transplante renal

Participou do **XV CONGRESSO BRASILEIRO DE TRANSPLANTES 2017**, realizado em Foz do Iguaçu, PR, de 18 a 21 de outubro de 2017, na qualidade de Tema Livre Pôster.

Autores: Lorraine Vieira Alves, Fernanda Cristina Gontijo Evangelista, Suellen Rodrigues Martins, Carolina Neris Cardoso, Adriano de Paula Sabino, Marcus Faria Lasmar, Luiz Flávio Couto Giordano, Karina Braga Gomes Borges, Ana Paula Lucas Mota

São Paulo, 21 de outubro 2017




ROBERTO C. MANFRO
 Presidente ABTO


JOSÉ MEDINA PESTANA
 Presidente Conselho
 Consultivo ABTO


JÚLIO CESAR WIEDERKEHR
 Presidente do XV Congresso
 Brasileiro de Transplantes 2017

REALIZAÇÃO:

 Associação Brasileira de Transplante de Órgãos