



**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO MICRO-RNA-146a-5p COMO BIOMARCADOR  
DA LESÃO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO NA DISFUNÇÃO INICIAL DO  
TRANSPLANTE RENAL**

**PATRÍCIA MILHORANSA**

**PORTO ALEGRE**

**2017**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO MICRO-RNA-146a-5p COMO BIOMARCADOR  
DE LESÃO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO NA DISFUNÇÃO INICIAL DO  
TRANSPLANTE RENAL**

**PATRÍCIA MILHORANSA**

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ceratti Manfro.

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Medicina: Ciências Médicas, pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

PORTO ALEGRE

2017

*Dedico esta tese a minha família,  
Minha base, minha razão, minha estrutura.  
Principalmente aos meus pais e ao meu irmão, Sandro Milhoransa,  
transplantado renal desde 1999, razão e motivo deste estudo.  
Um exemplo de vida e superação!  
Agradeço a todos pelo apoio, incentivo e compreensão.*

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais pelo apoio, incentivo e força em todos os momentos da minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Roberto Ceratti Manfro, por aceitar me orientar e me auxiliar no processo de consolidação do conhecimento. A ele serei eternamente grata, muito obrigada pela oportunidade!

Aos colegas do Grupo de Pesquisa do Laboratório de Biologia Molecular aplicado a Nefrologia (LABMAN), do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela parceria, apoio e auxílio. Agradeço em especial a Mariane dos Santos, sempre presente nas horas boas e difíceis. A Carolina Caruccio Montanari pelo tempo e dedicação, sempre ao meu lado. Em especial, a colega do laboratório de Cardiologia Molecular Niara Medeiros e Daiane Silvello pela dedicação, paciência nos ensinamentos da parte prática. Obrigada pela amizade sempre!

A equipe da Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial a Marina Siebert e ao Michel Andrades por me convidarem a fazer parte de outro projeto sobre micro RNAs. A Patrícia Keller e ao Hugo Bock pela ajuda e empréstimo de materiais.

A equipe do serviço de Radiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que realizou uma parte considerável das punções do meu trabalho, sendo sempre gentis e pacientes.

A toda equipe de transplante do serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que se mobilizou e participou diretamente na realização deste trabalho ao longo de quatro anos.

A toda equipe do laboratório do Instituto de Cardiologia de Porto Alegre que esteve sempre ao meu lado. Em especial ao meu chefe Ricardo Bruch e as colegas Jerusa Ribeiro e Cyntia Lazarotto por me auxiliarem e serem minhas amigas. A todos da Instituição que contribuíram de alguma forma para a realização desse projeto.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação de Medicina: Ciências Médicas (PPGCM), por oportunizar meu aprimoramento profissional.

## RESUMO

**Introdução:** O transplante renal (TR) é o tratamento de escolha para uma significativa porção de pacientes com perda crônica terminal da função renal. Apesar dos progressos obtidos, a disfunção inicial do enxerto (DIE) permanece como uma importante complicação precoce muitas vezes levando à necessidade da biópsia renal. Essa, apesar de suas limitações, riscos e custos, é considerada padrão ouro para a avaliação das disfunções dos enxertos renais. Assim sendo é imprescindível estudar e buscar biomarcadores não invasivos capazes de diagnosticar as agressões aos transplantes renais, em especial na fase de DIE, quando os parâmetros funcionais não estão disponíveis.

**Objetivo:** Analisar e quantificar a expressão do micro Ácido Ribonucleico (miRNA) miRNA-146a-5p em amostras de sangue periférico e tecido renal de pacientes que desenvolveram disfunção do enxerto associados a lesões de isquemia e reperfusão após transplante renal.

**Métodos:** Trata-se de um estudo transversal. Os pacientes submetidos a transplante renal que necessitem de biópsia devido à presença de DIE foram convidados a participar da pesquisa e a assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. As amostras foram armazenadas no período de março de 2013 a abril de 2017. Posteriormente foi avaliada a expressão do micro RNA (miR-146 a-5p) em tecido renal e em sangue periférico.

**Resultados:** Em amostras de biópsia renal, encontramos um aumento estatisticamente significativo na expressão de miR-146a-5p no grupo de disfunção inicial do enxerto (DIE, n=33) versus grupo de pacientes estáveis (STA, n=13),  $P=0,019$  no grupo de pacientes com rejeição aguda (RA, n=9) versus grupo de DIE não observamos diferença significativa,  $P=0,106$ , assim como o grupo de pacientes estáveis versus RA não observamos diferença significativa,  $P=1,000$ . Diferença na análise global  $P=0,008$ . No entanto, em amostras de sangue periférico encontramos aumento na expressão gênica de miR-146a-5p no grupo de DIE versus pacientes STA, porém, não foi estatisticamente significativo,  $P=0,083$ . Não houve correlação entre a expressão miR-146a-5p nos diferentes grupos de biópsia e sangue periférico,  $P=0,541$ .

**Conclusão:** A expressão do miR 146a-5p apresentou expressão gênica distinta na disfunção inicial do enxerto em amostras de biópsias, podendo vir a ser considerado potencial biomarcador de lesão de isquemia e reperfusão renal.

**Palavras-chave:** Transplante Renal; Isquemia e Reperfusão; Rejeição Aguda; Micro RNAs.

## ABSTRACT

**Introduction:** Kidney transplantation is the treatment of choice for a significant portion of patients with chronic terminal loss of renal function. Despite the progress achieved, delayed graft function DGF remains an important early complication. Graft biopsy, despite its limitations, risks and costs, is considered a gold standard for the diagnosis of graft dysfunction. Therefore, it is imperative to study and search for noninvasive biomarkers capable of diagnosing injuries to kidney transplants, especially in the DGF period when functional parameters are not available.

The objective of the present study was to analyze and quantify the expression of miRNA-146a-5p ribonucleic micro-acids (miRNAs) in peripheral blood and renal tissue samples obtained from patients who underwent renal transplantation and developed DGF which is associated with lesions of ischemia and reperfusion injuries, after renal transplantation.

**Methods:** This is controlled cross-sectional study involving transplant recipients, between March 2013 and April 2017, that underwent DGF and received a graft biopsy. Patients had their tissue and peripheral blood samples stored and latter analyzed for the expression of the micro-RNA: miR-146a-5p in renal tissue and blood.

**Results:** In graft tissue samples a statistically significant increase in miR-146a-5p expression in the initial graft dysfunction group (DIE, n=33) was observed in the comparison with the group of stable patients (STA, n=13) group,  $P=0,019$ . The difference wasn't significant in the comparison with the acute rejection (AR, n=9) group versus group DIE,  $P=0,106$ , as well stable patients group versus AR we didn't observe a significant difference,  $P=1,000$ . Overall group significance  $P=0.008$ . However, in peripheral blood samples we found an increase in miR-146a-5p gene expression in the DIE group versus STA patients, however, it was not statistically significant,  $P = 0.083$ . There was no correlation between expression miR-146a-5p in the renal tissue and peripheral blood samples,  $P=0,541$ .

**Conclusion:** We concluded that miR-146a-5p expression has a distinct pattern of expression in the setting of DGF and has the potential of becoming a biomarker for ischemia and reperfusion injury in kidney transplant recipients.

**Keywords:** Kidney transplantation, gene expression, acute rejection, micro-RNAs.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADCC - Citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos

IRA - Injúria Renal Aguda

ATP - Adenosina trifosfato

cAMP - Adenosina monofosfato cíclico

cDNA - Molécula complementar de DNA

DIE - Disfunção Inicial do Enxerto

HIFs - Fator indutor da hipóxia (*hypoxia-inducible factor*)

HLA - Antígenos leucocitários humanos (*human leucocyte antigens*)

ICAM - Molécula de adesão intercelular (*intercellular adhesion molecule*)

IL-1 – Interleucina-1

LFA - Antígeno associado à função leucocitária (*leukocyte function–associated antigen*)

LIR - Lesão de Isquemia e Reperfusão

MHC - Complexo principal de histocompatibilidade (*major histocompatibility complex*)

miRNAs – Micro RNAs

mRNA - RNA mensageiro

NF- $\kappa$ B - Fator Nuclear Kappa B

NK - *Natural Killer*

PCR - Reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)

PMN – Polimorfonucleares

RA - Rejeição aguda

RFE - Retardo na Função do Enxerto

RISC - Complexo silenciador RNA-induzido

RNase III Drosha e Parsha/DGCR8 - (DiGeorge syndrome critical region gene 8)

RT-qPCR-Reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real (*real-time polymerase chain reaction*)

STA- Estáveis

TIF- Tempo de Isquemia Fria

TLR - receptores de células “toll-like” (*toll-like receptors*)

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Estratégia de busca de referências bibliográficas.....	13
<b>Tabela 2:</b> Principais estudos que testaram micro RNAs como ferramentas de diagnóstico em transplante renal clínico.....	26



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Biogêneses de microRNAs.....	15
<b>Figura 2:</b> Fenômenos envolvidos na Isquemia e Reperfusão em Transplante Renal.....	18
<b>Figura 3:</b> Interação entre Linfócito T e Célula apresentadora de antígeno dendrítica.....	21
<b>Figura 4:</b> Gráfico de Fluorescência por números de ciclos.....	29
<b>Figura 5:</b> Esquema ilustrativo do processo de transcrição reversa de miRNA utilizando o kit TaqManMicroRNA RT-AppliedBiosystem e interação da sonda e <i>primers</i> (TaqMan™ MicroRNAAssay).....	30
<b>Figura 6:</b> Mapa Conceitual do Estudo.....	33

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>12</b>
2.1 DEFINIÇÃO E HISTÓRIADOS MICRO RNAS .....	13
2.2 BIOGÊNESIS DOS MICRO RNAS.....	14
2.3 ASPECTOS GERAIS DO TRANSPLANTE RENAL.....	16
2.4 ISQUEMIA E REPERFUSÃO EM TRANSPLANTE RENAL .....	16
2.5 SISTEMA IMUNE AOS ALOENXERTOS .....	18
2.6 REJEIÇÃO EM TRANSPLANTES RENAIIS.....	21
2.7 MICRO RNAs .....	23
2.7.1 Estudos Prévios com miRNAs em Transplante Renal.....	24
2.7.2 miRNA -146-a-5p.....	26
2.8 REAÇÃO EM CADEIA POLIMERASE E MICRO RNAS .....	27
2.8.1 Amplificação de micro RNAs por RT-qPCR.....	29
2.8.2 Escolha do Controle Endógeno.....	30
<b>3. MAPACONCEITUAL.....</b>	<b>32</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
4.1. OBJETIVO GERAL .....	34
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	34
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>35</b>
<b>6. ARTIGO EM INGLÊS.....</b>	<b>42</b>
<b>7. ARTIGO DE REVISÃO SUBMETIDO.....</b>	<b>65</b>
<b>8. CONCLUSÕES.....</b>	<b>84</b>
<b>9. PESPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>85</b>
<b>10. ANEXO 1: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....</b>	<b>86</b>
<b>11. ANEXO 2: STROBE.....</b>	<b>87</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O transplante renal é o tratamento de escolha para muitos pacientes com perda crônica terminal da função renal (1,2), oferece um significativo aumento na expectativa e na qualidade de vida desses pacientes (3). Porém, como evidenciado desde o início da prática de transplantes entre indivíduos geneticamente distintos, tecidos e órgãos perdem suas funções por um processo mediado pelo sistema imune que é denominado rejeição. Este processo é parcialmente controlado pela modificação da resposta imune do receptor com fármacos e agentes biológicos imunossupressores (3).

Os fenômenos de isquemia e reperfusão que ocorrem após o transplante renal podem ter como consequências a não função primária do enxerto, o retardo na sua função, aumento no tempo de hospitalização e dos custos, aumento no risco de rejeição aguda e potencial impacto negativo na sobrevida em longo prazo (3-5). Essas injúrias agem ativando o sistema imune, suscitando a resposta inata e a resposta adaptativa e levando a processos com grande potencial de afetar a integridade celular. O fenótipo clínico mais frequente é o da disfunção inicial do enxerto (DIE) que é caracterizada histopatologicamente pela necrose tubular aguda, que está associada a uma maior incidência de rejeição aguda (RA) e que desencadeia alterações gênicas, metabólicas e teciduais que culminam nos processos de fibrose dos enxertos e sua perda crônica (6,7).

A injúria da isquemia e reperfusão e a decorrente DIE é um dos maiores problemas do transplante renal, associada a aumento de morbidade e mortalidade (7,8). A sua patofisiologia é multifatorial e apenas parcialmente elucidada (8). Adicionalmente, a frequência de DIE no Brasil (Porto Alegre – 71%) é em torno de três vezes mais elevada do que a encontrada em outros países como Estados Unidos (24%) e Espanha (37%) (8).

A RA é um importante fator de risco para a perda de enxertos, sendo uma frequente e grave complicação pós-transplante (9). As expressões fenotípicas e os mecanismos das rejeições estão bem elucidados. Na prática clínica a RA é usualmente evidenciada pela disfunção orgânica ou por alterações histológicas sendo classificada pelo tipo de alteração histológica demonstrado na biópsia do enxerto (10). Sua evolução é de difícil predição e os achados histológicos observados nos tecidos renais obtidos ainda são considerados os melhores preditores, padrão ouro para diagnóstico (10,11). Por outro lado, a biópsia é um procedimento associado a complicações que incluem sangramento, fístulas arteriovenosa, obstrução por coágulo, perda do enxerto e até mesmo óbito. Além disso, é onerosa e tem problemas relacionados à representatividade e variabilidade de interpretação (12).

Estudos com biomarcadores não invasivos acurados que apresentam alta sensibilidade e especificidade a situação do aloenxerto são necessários para o aprimoramento da prática dos transplantes. Uma importante descoberta da biologia molecular nos últimos anos foi os micro RNAs (miRNAs) (13,14), pequenos fragmentos conservados e não codificadores de RNA com 18-25 nucleotídeos, responsáveis por regular a expressão gênica (15-17). Um único miRNA é capaz de regular a expressão de centenas de RNAs mensageiros e proteínas, eles demonstram ter controle de processos como o desenvolvimento, a diferenciação e proliferação celular, e portanto têm habilidades como modular ambas respostas imunes, a inata e a adaptativa (18). A desregulação dos miRNAs pode levar a alteração e supressão de genes que operam na sinalização de cascatas intracelulares, propiciando condições de doença ou progressão das mesmas. Diversas doenças já foram relacionadas a distúrbios desta sinalização, incluindo-se doenças renais (18).

Considerada a atual etapa de conhecimento sobre os miRNAs no contexto do transplante renal, este estudo avaliou a expressão do miR-146a-5p como mediador de resposta da injúria renal que limita as consequências da inflamação no desenvolvimento de doença renal aguda e doença renal crônica, por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) (13,16). O estudo foi executado em amostras de tecido renal e em células sanguíneas linfóides obtidas em pacientes transplantados renais com DIE e objetivou contribuir para o desenvolvimento de estratégias que permitam o diagnóstico acurado da etiologia da disfunção do enxerto renal.

A estrutura da apresentação da tese segue as normas do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Esta tese originou um artigo a ser submetido ao *American Journal of Transplantation*.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

Na revisão da literatura, buscamos ressaltar os principais aspectos relacionados com o fator em estudo (transplante renal, isquemia e reperfusão, disfunção inicial do enxerto) e o desfecho de interesse (miRNA e isquemia, injúria e reperfusão) utilizando-se as palavras-chave: “*miRNAs*”, “*Rejection Acute*”, “*kidney Transplantation*”, “*Ischaemia*” and “*Reperfusion*”, “*microRNAs*”, “*miRNAs*” and “*Kidney Transplantation*”, “*miRNAs*” and “*Ischaemia*” and “*Reperfusion*”, “*miRNA*” and “*Acute Rejection Kidney*”, “*miRNA*” and “*Genic Expression*”, “*miRNA*” in “*Kidney Transplantation*” and “*Ischaemia*” and “*Reperfusion*”, “*miRNA 146a-5*”p in “*microRNA 146a-5p*” in “*Acute Rejection*”, “*microRNA 146a-5p*” in “*Kidney Transplantation*”, “*miRNA*” in “*Biopsy*” and “*Plasma*” in “*Kidney Transplantation*”.

A estratégia de busca da pesquisa em humanos envolveu as seguintes bases de dados: MEDLINE (site PubMed), LILACS, *SciELO*, COCHRANE.

Em relação ao termo “*microRNAs*” até a data de 01 de agosto de 2017 foram encontrados 37655 artigos no PUBMED, 1 no COCHRANE, 122 no LILACS, 90 no SciELO. Com relação ao o termo “*Ischaemia and Reperfusion*” e foram localizados 14656 artigos no PUBMED, 9 no COCHRANE, 21 no LILACS e 21 no SciELO.

A tabela 1 sumariza a estratégia de busca das referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam os objetivos do estudo até a data de 01 de agosto de 2017.

**Tabela 1:** Estratégia de busca de referências bibliográficas.

<b>Palavras-chave</b>	<b>PUBMED</b>	<b>COCHRANE</b>	<b>LILACS</b>	<b>SciELO</b>
“miRNAs”	37655	1	104	63
“Rejection Acute”	19323	34	247	229
“Kidney Transplantation”	97757	58	1953	701
“Ischaemia” and “Reperfusion”	14656	9	21	21
“microRNAs”	37655	1	122	90
“miRNAs” and “Kidney Transplantation”	126	1	0	0
“miRNAs” and “Ischaemia and Reperfusion”	136	0	0	0
“miRNAs” and “Acute Rejection Kidney”	27	0	0	0
“miRNA” and “Genic Expression”	6	1	0	0
“miRNA” in “Kidney Transplantation” and “Ischaemia and Reperfusion”	16	0	0	0
“miRNA 146a-5p”	47	2	0	1
“miRNA 146a-5p” in “Acute Rejection”	0	0	0	0
“miRNA 146a-5p” in “Kidney Transplantation”	0	0	0	0
“miRNA” in “Biopsy” and “Plasma” in “Kidney Transplantation”	4	0	0	0

## 2.1 DEFINIÇÃO E HISTÓRIA DOS MICRO RNAS

Os micro RNAs (miRNAs) são pequenos RNAs, na sua maioria não codificantes, com aproximadamente 18 a 25 nucleotídeos de extensão, envolvidos na regulação da expressão gênica. Eles foram descobertos cerca de duas décadas atrás por Lee e colaboradores, enquanto estudavam o desenvolvimento do gene *lin-14* em nematódeos *Caenorhabditis elegans* (19). Os investigadores observaram uma mutação com o desenvolvimento de formas anormais e o

primeiro micro RNA no gene *lin-4*, identificado em 1993, era o responsável pelo fenótipo modificado, o mesmo tinha dois transcritos, um longo (61 nt) e outro curto (21 nt), sendo que este último tinha a sequência específica “*antisense*” inibida e a tradução do mRNA da *lin-14* bloqueada, provocando então a mutação (19).

No ano 2000, foi descrito o segundo miRNA (*let-7*) identificado e, também encontrado em humanos, que apresenta a importante característica de estar conservado através das espécies (20). Estas descobertas chamaram a atenção dos pesquisadores iniciando vastas pesquisas nesta área.

Atualmente acredita-se que o genoma humano codifica mais de 2000 miRNAs expressos em quase todas as células humanas. A nomenclatura do miRNA tem as 3 letras iniciais conforme o organismo e o número após o miR, refere-se a sequência da descoberta (21). Como exemplo: *hsa-miR-21*, é um miRNA humano codificado pelo gene *miR-21*, um dos primeiros a ser sequenciado em 2001.

## 2.2 BIOGÊNESES DOS MICRO RNAS

A transcrição genética ocorre pela RNA polymerase II, enzima responsável pela transcrição dos genes que codificam proteínas, os nucleotídeos transcritos primários-primiRNAs, possuem estrutura cap5'; ligação 5'-5' trifosfato com a molécula precursora e um nucleotídeo para proteção contra ribonuclease e cauda poli (A). Na parte interna do núcleo, regiões não pareadas são clivadas pela RNase III Drosha e Parsha/DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*); as regiões *stem* e *loop* com aproximadamente 70 nucleotídeos, os pré-miRNAs, estes que transportados pelo citoplasma via Exportina-5, clivados pela RNase II Dicer/Argonauta, removendo a alça terminal (estrutura *loop*) em uma dupla de miRNAs com aproximadamente 22 nucleotídeos. A fita complementar é degradada e a incorporada ao complexo silenciador RNA-induzido (RISC), iniciando a regulação do RNA (22,23).Figura 1.

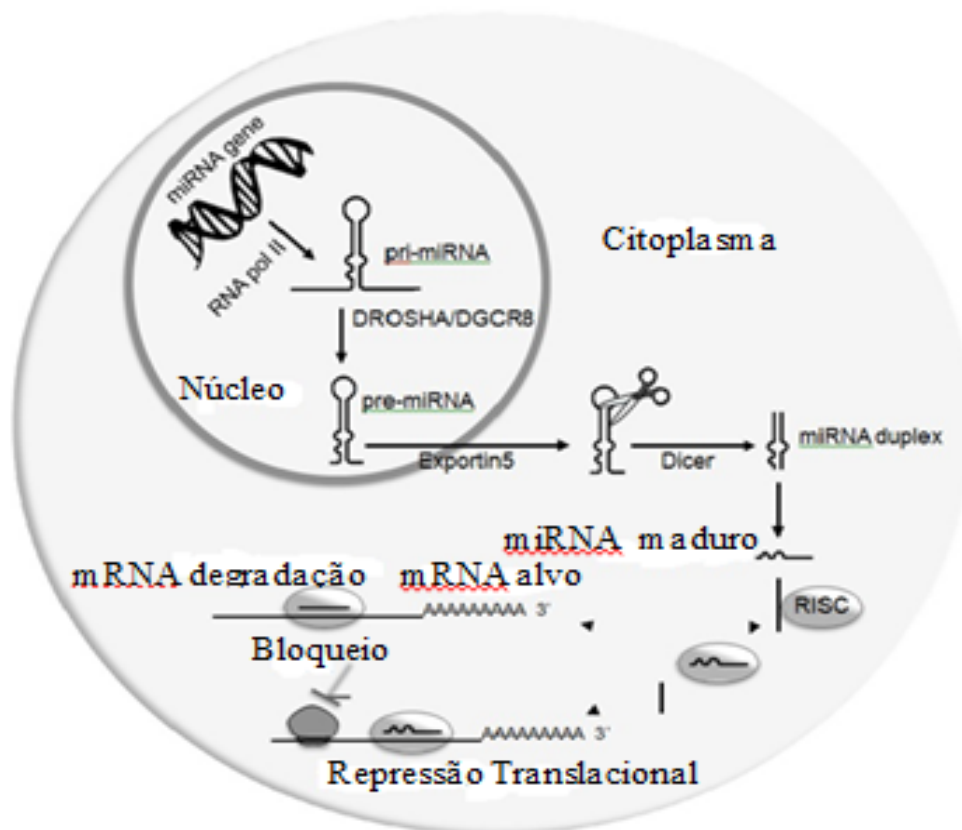
A porção 5' do miRNA, equivale aos nucleotídeos 2 a 8, essencial para manter a estabilidade e transporte da molécula ao RISC. Os miRNAs possuem múltiplos alvos e um único miRNA pode regular negativamente centenas de RNAs mensageiros com funções distintas e, a expressão de um único mRNA pode ser regulada por vários miRNAs distintos (24-26).

Os pequenos fragmentos de RNA apresentam controle de processos como desenvolvimento, proliferação celular, diferenciação, apoptose, metabolismo e oncogênese

(27-29).

Um único miRNA também é capaz de regular a expressão de proteínas e os miRNAs apresentam habilidades de como modular respostas imunes. Tanto a inata quanto adaptativa. A desregulação dos miRNAs pode levar a perturbação e supressão de genes que operam em cascatas intracelulares, levando a condição de doença ou a progressão das mesmas (30- 32).

**Figura 1.**



**Figura 1.** Representação esquemática da biogênese dos microRNAs. Genes que codificam miRNAs são transcritos em pri-miRNAs pela RNA polimerase II e processados por uma endonuclease (Drosha e Parsha/DGCR8) em fragmentos com estrutura de haste e alça de aproximadamente 70 nucleotídeos, denominados pré-miRNAs. Estas moléculas são transportadas para o citoplasma via exportina-5 e processadas em formas maduras duplas pela enzima Dicer, uma RNase III. A fita complementar é degradada e a funcional é incorporada ao complexo silenciador RNA-induzido (RISC), iniciando a regulação do RNA mensageiro (Adaptação da referência 33).



### 2.3 ASPECTOS GERAIS DO TRANSPLANTE RENAL

O transplante renal é o tratamento de escolha quando uma doença irreversível esgota a função renal. O transplante de órgãos e células hematopoiéticas surgiu como uma evolução para muitas patologias. O primeiro transplante de órgão sólido com sucesso foi realizado em 1954, na cidade de Boston, e ocorreu entre gêmeos idênticos, sendo realizado por Joseph Eduard Murray (34). Em 1961, foi com o conhecimento e uso insipiente de drogas imunossupressoras, tornou-se possível a realização de transplantes envolvendo doadores e receptores não idênticos (34,35).

Os transplantes de células, órgãos e tecidos vêm se consolidando como uma abordagem de sucesso no tratamento de falência permanente de órgãos ou tecidos. Os transplantes renais são os mais frequentes, sob o ponto de vista clínico e biológico, respondendo pelo número mais elevado de transplantes realizados em todo o mundo. A maior parte dos conhecimentos sobre imunobiologia dos transplantes e muitos dos conhecimentos atuais sobre imunologia em geral, devem-se aos estudos envolvendo esse tipo de transplante (35).

Mesmo com melhorias na sobrevida do enxerto renal no primeiro ano após o transplante, com uma gama de drogas imunossupressoras, ainda há grandes problemas em relação às perdas dos enxertos em longo prazo, assim como o desenvolvimento de novas patologias relacionadas ao uso dessas drogas imunossupressoras (35,36). Atualmente, pesquisas conduzidas com drogas menos danosas e mais eficazes, com a minimização do tratamento imunossupressor, busca-se diminuir os efeitos colaterais da imunossupressão em receptores de transplantes (36).

### 2.4 ISQUEMIA E REPERFUSÃO EM TRANSPLANTE RENAL

A lesão de isquemia e reperfusão (LIR) é uma das causas mais comuns de injúria renal aguda (IRA) associada a altas taxas de morbidade e mortalidade. É um evento inevitável no transplante do rim, causando muitas vezes retardo na função do enxerto, aumento do tempo de hospitalização e dos custos, aumento no risco de rejeição aguda e potencial impacto negativo na evolução dos enxertos em longo prazo (37). A marca histopatológica de LIR é a necrose e a apoptose de células epiteliais tubulares renais, que pode suscitar um processo de reparação defeituosa culminando em fibrose tecidual (38). Esses fenômenos decorrem da hipóxia, que com a reperfusão provoca estresse oxidativo, suscitando os mecanismos supracitados.

Além disso, os fenômenos envolvidos nos processos de isquemia e reperfusão ativam a cascata inflamatória caracterizada pela intensa infiltração linfocitária com injúria ao parênquima, causando danos aos enxertos (37,38). Figura 2.

Entre a retirada do órgão do doador até a reperfusão no receptor, o tecido renal é exposto a dois processos denominados isquemia quente e isquemia fria. O tempo de isquemia quente é definido pelo período entre o clampeamento da artéria no doador até a perfusão com solução de preservação. Durante a isquemia quente, ocorre a interrupção abrupta do suprimento de oxigênio para as células, reduzindo o metabolismo aeróbico, suspensão da oxidação de glicose e ácidos graxos, transferência da glicólise para a via anaeróbica, reduzindo significativamente a quantidade da adenosina trifosfato (ATP) intracelular. Ocorre também redução da atividade da Na/K/ATPase, com desbalanço hidroeletrólítico entre os compartimentos intra e extracelular, levando à edema celular (37,39,40). O período correspondente à perfusão do enxerto com solução de preservação, seu armazenamento nessa solução até o desclampeamento da anastomose no receptor é o chamado tempo de isquemia fria (TIF) (39).

Muitas vezes a LIR no transplante renal, manifesta-se clinicamente pela disfunção inicial do enxerto (DIE), que tem como definição mais aceita a necessidade de diálise na primeira semana após o transplante, sendo a complicação mais comum no período pós-transplante imediato com doador falecido (37). Assim sendo, a LIR envolve: (a) redução da atividade aeróbica; (b) lesão causada pelos radicais livres de oxigênio na reperfusão; (c) envolvimento de sistemas hormonais; (d) envolvimento do sistema imune com papel central de células T e moléculas de superfície. Clinicamente manejo adequado de doadores, a redução nos tempos de isquemia quente e fria, estratégias de armazenagem mais fisiológicas estão relacionadas à redução do impacto da LIR na evolução do transplante renal (37).

A perfusão em máquina reduz a prevalência de retardo na função do enxerto e o tempo de hospitalização, além de melhorar a sobrevida do enxerto a longo prazo (37). O manejo adequado de doadores, a redução nos tempos de isquemia quente e fria, e as estratégias mais fisiológicas de armazenagem dos rins estão relacionados com redução do impacto da lesão de isquemia e reperfusão na evolução do transplante renal (37). De igual modo, o bloqueio do sistema imune por meio da depleção das células T ativadas, bem como a neutralização das moléculas de superfície dessas células, com o uso de anticorpos policlonais depletadores de linfócitos, pode ter um papel protetor dos enxertos e este ainda é um campo de exploração para melhorar os desfechos em curto e longo prazo, sobretudo no transplante renal de doador falecido (37).

Figura 2.

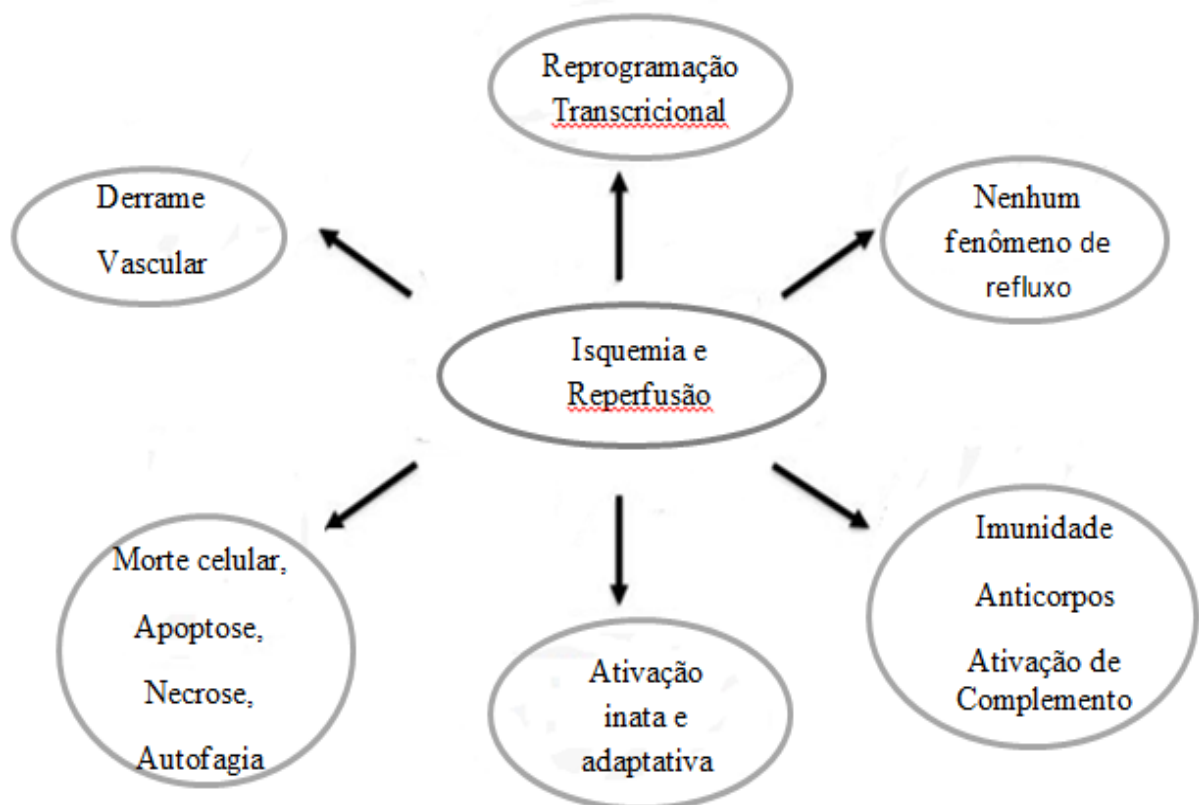


Figura 2. Fenômenos envolvidos na Isquemia e Reperusão em Transplante Renal. Isquemia e reperusão conduzem à ativação de morte celular programada, incluindo apoptose (fragmentação nuclear, membrana plasmática, redução celular e perda do potencial da membrana mitocondrial e integridade, autofagia associada à morte celular) (vacuolização citoplasmática, perda de organelas e acumulação de vacúolos com membrana espiral) e necrose (aumento progressivo de células e organelas, ruptura da membrana plasmática e perda de proteases e lisossomos extracelulares) (Adaptação da referência 41).

## 2.5 RESPOSTA IMUNE AOS ALOENXERTOS

O sistema imune atua protegendo o organismo contra substâncias patogênicas; a resposta depende da capacidade desse sistema em reconhecer moléculas estranhas, ou antígenos, desencadeando reações que objetivam a eliminação de patógenos (39). Imunógeno denomina-se substância que consegue induzir uma resposta imune detectável mediada anticorpos, células ou ambos que é reconhecida como “não próprio,” pelo organismo. Aloantígenos são substâncias que quando isoladas de um organismo de uma espécie, induzem resposta imune em indivíduos da mesma espécie, como exemplo que ocorre no transplante e

em grupos sanguíneos (42).

Para a realização do transplante é necessário o doador que cederá o órgão ou tecido a ser enxertado no receptor, o grau de resposta imunológica depende em parte do grau de disparidade genética do órgão enxertado e do hospedeiro. Na prática clínica, os transplantes renais são classificados como alogênicos quando realizados entre indivíduos da mesma espécie, porém, com uma bagagem genética distinta (43).

O transplante alogênico distingue-se por três tipos de doadores, o doador vivo aparentado que é representado por familiares consanguíneos. De um modo geral, quanto mais próximo o grau de parentesco, maior a semelhança genética entre doador e receptor. O doador vivo não aparentado pode ser qualquer pessoa que não esteja geneticamente relacionada com o receptor, e com maior frequência, órgãos provenientes de indivíduos em morte encefálica recente, desde que clinicamente aptos à doação, referidos como doadores falecidos (43). A resposta imunológica de um órgão transplantado consiste em dois mecanismos, celular (mediada predominantemente por linfócitos) e humoral (mediada por anticorpos) (44).

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) em humanos é denominado Sistema HLA. Os genes que codificam esse sistema que são glicoproteínas de membrana celular, e são codificados por genes presentes no braço curto do cromossomo. Esse sistema é polimórfico e suas proteínas classificadas em: classe I, classe II e classe III, sendo que os antígenos das classes I e II apresentam proteínas expressas na superfície celular, e são chamados antígenos dos transplantes. No transplante renal, os *loci* de maior relevância pertencem as classes I e a II, sendo os mais importantes, HLA-A, HLA-B, HLA-DR, HLA-DQ e HLA-DP (45).

As células envolvidas na resposta imune são derivadas de uma célula matriz pluripotente, geradoras das linhagens linfóide e mieloide (46). Os linfócitos T, por sua vez, originam-se da maturação de células linfóides primordiais do timo, constituindo cerca de 60% a 70% dos linfócitos periféricos (47). Cada célula T expressa em sua superfície um receptor T antígeno específico, este composto por um heterodímero formado de uma cadeia polipeptídica  $\alpha$  e outra  $\beta$  ligados por ponte dissulfeto. Estes heterodímeros estão acoplados a um grupo de 5 cadeias polipeptídicas, chamado de complexo macromolecular CD3 participantes da transdução de sinais para o interior de células T (47). O complexo CD4 dirige o reconhecimento antigênico do linfócito T apenas aos peptídeos antigênicos associados as moléculas do MHC da classe II, a molécula CD4 atua também em com outras células T, células B, macrófagos e células NK. Já a molécula CD8 age como células T citotóxicas, e sua presença orienta o reconhecimento de antígenos associados às moléculas MHC de classe I

(47).

Quando o antígeno entra no organismo, as células apresentadoras de antígenos agem reconhecendo como estranho e diferenciando o “próprio” e “não próprio”, a eficácia da resposta imune deve-se a especificidade que estas células apresentam em relação ao antígeno, chamadas de células apresentadoras de antígenos, ligados às moléculas do MHC (45). As células dendríticas são responsáveis pela ativação das células T através da apresentação direta de antígenos. Fragmentos capturados no tecido afetado são transportados para os órgãos linfoides secundários por células dendríticas que processam esses antígenos e os apresentam, sob a forma de pequenos peptídeos, na fenda do MHC de classe II, formando o complexo alopeptídeo-MHC, ao receptor da célula T CD3+ (45-48).

Quando esse complexo se dá com moléculas da classe II do MHC são ativadas as células T helper CD4+ (auxiliares) do receptor. Essas células entram em expansão clonal e migram para o enxerto onde irão exercer sua função efetora. Quando se dá com moléculas MHC classe I, esse complexo é identificado por células T CD8+ (citotóxicas), que são os principais efetores no reconhecimento e ataque de células alvo, ativando na fase inflamatória uma variedade de mecanismos citolíticos através da liberação de Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$ , Perforina, Granzima B e espécies reativas de oxigênio. Sob ataque, a célula alvo pode morrer por necrose, caracterizada por ruptura da membrana plasmática e destruição das organelas ou por apoptose, caracterizada por condensação da cromatina, fragmentação do DNA e bolhas de membrana com citoplasma condensado (45-48). Figura 3.

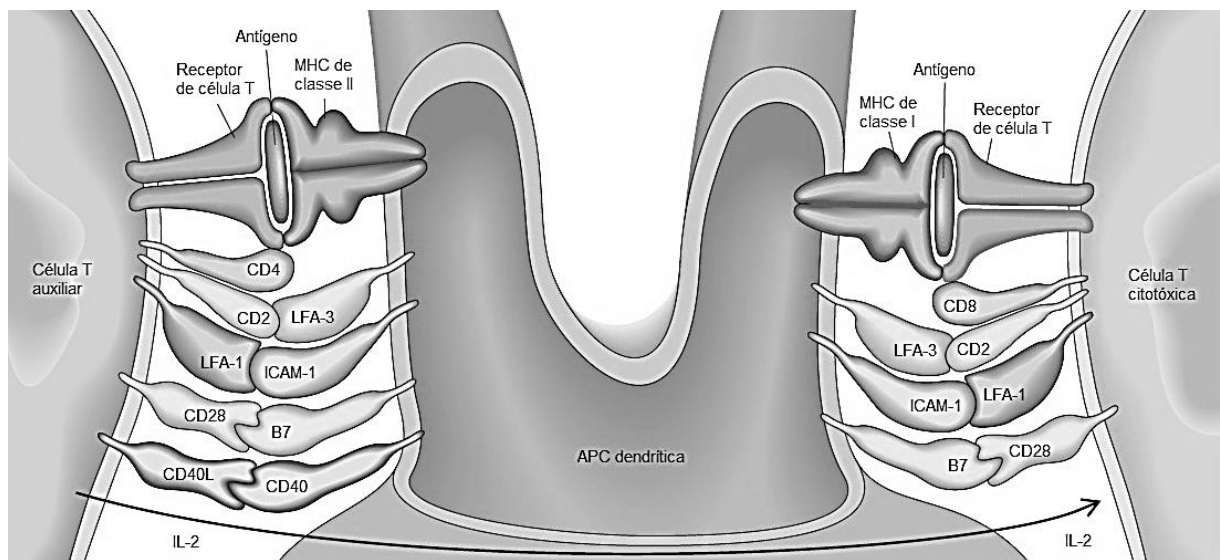
**Figura 3.**

Figura 3. Interação entre Linfócito T e Célula apresentadora de antígeno dendrítica. As células T auxiliares reconhecem antígenos associados ao MHC de classe II. As células T citotóxicas reconhecem antígenos associados ao MHC de classe I. ICAM = molécula de adesão intercelular (intercellular adhesion molecule); LFA = antígeno associado à função leucocitária (leukocyte function-associated antigen) (Adaptação da referência 48).

## 2.6 REJEIÇÃO DE TRANSPLANTES RENAIIS

Após o transplante de órgãos diferentes tipos de rejeição podem ocorrer: a rejeição hiperaguda causada pela presença de anticorpos anti-HLA em geral, pré-formados no soro do receptor, ela se caracteriza pelo grande número de células polimorfonucleares (PMN) na vasculatura com intensa formação de microtrombos e acúmulo de plaquetas. Isso ocorre quando anticorpos anti-HLA ou isohemaglutininas (ABO) circulantes ligam-se ao endotélio vascular e desencadeiam uma reação de hipersensibilidade citotóxica (tipo II) (21,42). Os anticorpos que reagem com antígenos presentes no endotélio fixam componentes do sistema complemento, ocorrendo intensa infiltração de células PMN nos vasos do enxerto. Então, estes componentes provocam lesão da parede vascular, ativando a cascata de coagulação em vários pontos, com deposição de plaquetas e formação de microtrombos nos capilares do órgão. Este processo impede a vascularização do órgão transplantado ocasionando isquemia severa seguida de necrose do enxerto (21,42).

A rejeição hiperaguda ocorre minutos ou horas após o transplante, dependendo do tipo

e concentração de anticorpos presentes na circulação. Esse processo não pode ser interrompido por medicamentos ou agentes biológicos assim, a conduta se restringe à prevenção da reação pela realização de provas cruzadas pré-transplante que sejam sensíveis e bem executadas (21,42).

A rejeição aguda é a forma mais comum encontrada nos transplantes clínicos podendo ocorrer dias, semanas ou meses após o transplante (49). Caracterizada pela presença de macrófagos e linfócitos no interstício do enxerto, enquanto as células PMN são raramente encontradas. A classificação do dano histopatológico é feito através da padronização por um consenso internacional de nomenclaturas e critérios específicos para a caracterização histológica de rejeição do órgão, denominado classificação *Banff*, no qual a rejeição mediada por células T ou a rejeição mediada por anticorpos é diagnosticada com base em regras empíricas e as lesões são graduadas de maneira semi-quantitativa. Os diagnósticos segundo essa classificação podem ser agrupados como rejeição borderline, rejeições celulares agudas, tubulointersticial ou vascular, de diferentes severidades ou como rejeição aguda mediada por anticorpos, caracterizada pelos achados histológicos, presença de anticorpos anti-HLA do doador e pela marcação de C4d nos capilares peritubulares (49,54).

Como visto anteriormente os leucócitos passageiros presentes no órgão transplantado são capazes de prover o estímulo primário do sistema imune do receptor. Para uma resposta imune ser desencadeada eficientemente, é necessária a internalização, processamento e reapresentação do antígeno, em associação com determinantes de histocompatibilidade, função exercida por macrófagos, linfócitos B e células dendríticas (APCs). Os antígenos da classe I e II do doador são vistos pelo sistema imune do receptor como o “próprio-modificado”. Estas células apresentam antígenos de classe II estranhos, interagem com linfócitos T auxiliares o que é denominado sinal 1 da ativação linfocitária. O sinal 2 é propiciado pelas moléculas co-estimulatórias, B7-CD23 e CD-40- CD40L principalmente. A essas interações celulares associam-se os mediadores solúveis representados principalmente por diferentes citocinas (49-53).

Os anticorpos anti-HLA produzidos podem ter suma importância e atuam de forma complementar à resposta celular. O seu envolvimento na destruição pode ser mediado através da ativação do sistema complemento pela via clássica, ou através do fenômeno de ADCC (citotoxicidade celular mediada por anticorpo) (49-53). Pelo mecanismo de ADCC, o processo de destruição é potencializado devido à possibilidade de interação dos anticorpos com elementos celulares não específicos, como monócitos, células *killer* e células *natural killer* (49-53).

O dano histopatológico é classificado através da padronização por um consenso internacional de nomenclaturas e critérios específicos para a caracterização histológica de rejeição do órgão, denominado classificação *Banff*, no qual a rejeição mediada por células T ou a rejeição mediada por anticorpos é diagnosticada com base em regras empíricas e as lesões são graduadas de maneira semi-quantitativa (54). Os diagnósticos segundo essa classificação podem ser agrupados como rejeição *borderline*, rejeições celulares agudas, tubulointersticial ou vascular, de diferentes severidades ou como rejeição aguda mediada por anticorpos, caracterizada pelos achados histológicos, presença de anticorpos anti-HLA do doador e pela marcação da Fração C4d nos capilares peritubulares (54).

C4d consiste em um dos produtos gerados pela ativação do sistema do complemento, através da ativação da proteína C4, a qual, no fim do processo de ativação, gera dois produtos, um fragmento maior não funcional, o C4c e um fragmento menor, (com peso molecular de aproximadamente 42 kDa) que possui um grupo tioéster reativo que rapidamente se liga as estruturas do alvo, ocasionando o depósito dessas moléculas nos capilares (55).

A rejeição crônica costuma ocorrer iniciando-se meses ou anos após o transplante e normalmente caracteriza-se por fibrose e anormalidades vasculares, com perda da função do enxerto. A fibrose da rejeição crônica pode resultar de reações imunes e da produção de citocinas que estimulam os fibroblastos, ou pode representar a reparação de danos após a necrose celular parenquimatosa da rejeição aguda. Talvez a principal causa da rejeição crônica seja a aterosclerose acelerada com oclusão arterial, resultado da proliferação de células musculares lisas. Além disso, vários estudos correlacionam, também, a presença de anticorpos anti-HLA na circulação com a rejeição crônica e perda do enxerto (9,36).

Mesmo sendo considerado o padrão-ouro para diagnóstico de disfunções renais e rejeições a biópsia implica na remoção de fragmentos corticais de natureza focal intra-enxerto, sendo um método invasivo, está associado a complicações como, sangramento, formação de fístulas arteriovenosas, perda do enxerto e óbito. Além de onerosa, ela tem problemas relacionados à representatividade e variabilidade de interpretação (53,57,58). Adicionalmente, acurácia nunca pôde ser validada devido ao fato de não haver outra metodologia independente para a avaliação da existência de rejeição (56).

## 2.7 MICRO RNAS

Os biomarcadores são moléculas que podem ser medidos ou avaliados objetivamente



como indicador de um processo biológico normal ou patogênico, ou uma resposta farmacológica para uma intervenção terapêutica. Atualmente biópsia do enxerto é o único meio confiável de determinar o status do enxerto, porém esse procedimento invasivo não é adequado para monitorar o enxerto, pelas razões anteriormente descritas (64).

Os micro RNAs apresentam grande importância em muitos processos biológicos, como o desenvolvimento de órgãos, homeostase e mecanismos fisiopatológicos. Seu estudo como biomarcadores ganha espaço e cresce como área da pesquisa e investigação de novos alvos diagnósticos e terapêuticos durante os últimos anos (59-63).

Pesquisas com maior ênfase da camada de regulação da expressão gênica, recentemente descoberta, e o reconhecimento de miRNAs diferencialmente expressos em tecidos normais e patológicos poderão proporcionar o entendimento de como essas moléculas participam no desenvolvimento nas mais variadas patologias, abrindo uma nova e ampla perspectiva nas áreas diagnóstica, prognóstica e terapêutica das doenças a nível molecular (62).

### 2.7.1 Estudos prévios com miRNAs em transplante renal

Nas últimas duas décadas estudos com pesquisas de biomarcadores moleculares vêm crescendo ativamente em transplantes de órgãos, através da análise de microRNAs em tecidos como a biópsia, urina, plasma ou soro utilizando o método quantitativa de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real (RT-qPCR) (54,65,66).

Após a descoberta destes biomarcadores, alguns grupos de pesquisa estudaram estes como marcadores de lesões no enxerto renal. A Tabela 2 apresenta um resumo dos principais estudos com micro RNAs, descritos a seguir.

Lorenz e colaboradores avaliaram a expressão de microRNAs em receptores de transplante renal no sedimento urinário por RT-qPCR e descobriram que o miR-10a, miR-10b e o miR-210 eram expressos de maneira diferente em pacientes com RA comparados com os pacientes em DIE. O miR-210 difere de pacientes com RA comparados aos pacientes estáveis, baixos níveis de miR-210 estão associados ao declínio da filtração glomerular 1 ano após o transplante, podendo ser um preditor de declínio da taxa de filtração glomerular após o transplante (67).

Anglicheau e colegas investigaram a expressão de miRNAs em tecido renal e em células mononucleares do sangue periférico através de RT-qPCR. Os miRNAs (miR-142-5p, miR-155 e miR-223) são expressos em biópsia renal de pacientes com RA, e também

expressão aumentada em células mononucleares no sangue periférico. Este estudo sugere que a expressão destes biomarcadores demonstra a situação do enxerto renal (68).

Soltaninejad e colaboradores estudaram a expressão dos miR-142-5p, miR-142-3p, miR-155 e miR-223 em amostras de biópsias e em células mononucleares do sangue periférico em pacientes com rejeição mediada por células T comparadas com normais, por RT-qPCR. Os resultados mostraram que a expressão gênica destes biomarcadores no enxerto era relativamente alta em amostras com rejeição mediada por células T comparadas aos normais. A expressão dos miR-142-3p e miR-223 em amostras de sangue periférico também era mais alta em amostras com rejeição mediada por células T. Os miR-142-5p, miR-142-3p, miR-155 e miR-223 têm expressão diferenciada em biópsias de pacientes com rejeição mediada por células T. No intuito de diagnosticar rejeição mediada por células T, os autores sugerem usar estes biomarcadores como ferramentas sugestivas para discriminar pacientes com rejeição mediada por células T dos normais (69).

O estudo de Tao e colaboradores pesquisaram o perfil de miRNAs, o miR-99a, miR-100, miR-151a, let-7a, let-7c, let-7f por RT-qPCR, em amostras de soro de pacientes transplantados renais, utilizando RT-qPCR para analisar a expressão gênica. O miR-99a apresentou expressão diferenciada em pacientes com RA frente a pacientes estáveis e com DIE, o mesmo pode ser utilizado como biomarcador para RA em pacientes renais transplantados (70).

Sui e colaboradores comparavam a expressão de miRNAs, o miR-320 e o miR-324-3p em biópsias de pacientes com RA após transplante renal com biópsias sem RA, por *microarray* e validados por RT-qPCR. O miR-320 apresentava expressão aumentada, enquanto que o miR-324-3p apontava expressão diminuída na RA versus Controles. Estes, sugestivos como biomarcadores úteis para diagnóstico de RA envolvidos na patogênese deste processo (71).

Lucille e colaboradores estudaram “in vitro” e “in vivo” o biomarcador miR-146a como mediador na isquemia e reperfusão, em amostras humanas de urina e biópsia após transplante renal utilizando a metodologia de RT-qPCR. O aumento da expressão em ambos sítios é indicativo que este biomarcador é um intermediário da resposta tubular renal a LIR, limitando consequências da inflamação, fundamental para o desenvolvimento de doença renal aguda. Em ratos, o miR146a apresenta expressão aumentada 7 a 14 dias após LIR (72).

A pesquisa por biomarcadores não invasivos que destacam os eventos intra-enxertos favorece importantes oportunidades diagnósticas e prognósticas. Em recente estudo de Di Domênico e colaboradores, avaliaram-se três biomarcadores diagnósticos para RA de

transplantes renais, o miR-142-3p, miR-155 e miR-210 no sangue periférico, sedimento urinário e tecido de enxerto renal por RT-qPCR. Observou-se uma diferença estatisticamente significativa, o aumento na expressão do miR-142-3p no sangue, biomarcador em potencial para diferenciar pacientes com outras disfunções de pacientes com rejeição aguda. Os demais alvos testados, miR-155 e miR-210 não apresentaram resultados estatisticamente significativos (73).

**Tabela 2.** Principais estudos que testaram microRNAs como ferramentas de diagnóstico em transplante renal clínico.

<b>Autor (Ano)</b>	<b>Plataforma</b>	<b>Amostra(s)</b>	<b>micro-RNAs</b>	<b>Principais resultados</b>
Lorenzen (2011)	RT-qPCR	Urina	miR-210, miR-10a, miR-10b	Potencial biomarcador de Rejeição Aguda e preditor de disfunção inicial do enxerto em longo prazo (67)
Anglicheau (2009)	RT-qPCR	Biópsia	miR-124-5p, miR-155, miR-223, miR-30a-3p, miR-10b, let-7c	Associação de rejeição aguda com mudanças significativas na expressão de miRNAs em biópsias renais (68)
Soltaninejad (2015)	RT-qPCR	Biópsia, Sangue	miR-142-5p, miR-142-3p, miR-155, miR-223	Biomarcadores de diagnósticos e preditivos de rejeição aguda mediada por células T (69)
Tao (2015)	RT-qPCR	Soro	miR-99 a, miR-100	Biomarcadores de rejeição aguda em biópsias renais (70)
Sui (2008)	<i>Microarray</i> RT-qPCR	Biópsia	miR-320, miR-324	Biomarcadores diagnósticos envolvidos na patogênese de rejeição aguda (71)
Lucille (2016)	RT-qPCR	Biópsia, Urina	miR-146a	Potencial biomarcador de lesão de isquemia e reperfusão renal (72)
Domênico (2017)	RT-q PCR	Biópsia, Sangue, Urina	miR-142-3p, miR-155 e miR-210	Potencial biomarcador de rejeição aguda em plasma (73)

### 2.7.2 miRNA-146-a-5p

O miR-146 a precursor do miR-146a-5p é altamente expresso em tecido renal, atua como mediador de resposta da injúria renal que limita as consequências da inflamação no desenvolvimento de doença renal aguda e doença renal crônica. A inflamação é necessária para indução do reparo do dano tecidual, porém a mesma descontrolada leva a fibrose renal progressiva com perda da função do órgão. A lesão de isquemia-reperfusão renal parece estar associada ao aumento da expressão deste biomarcador em aloenxertos e urina de humanos (72).

Nos processos inflamatórios, pouco se sabe sobre as interações existentes entre inflamação, resposta imune inata e a expressão de miRNAs (29). As análises do promotor do gene miR-146, demonstraram que esse gene está relacionado com NF- $\kappa$ B, o qual está diretamente ligado à resposta imunológica. Essas observações sugerem que a família de miRNAs miR-146a/b, possa funcionar como um regulador da resposta imune (74).

Muitos estudos por RT-qPCR reconhecem o aumento da expressão gênica do miRNA 146a-5p em biópsia renal na glomeruloesclerose focal segmentar (GFS) em relação aos controles, que é uma das formas mais comuns de doença glomerular adquirida do enxerto renal levando ao estágio final da doença (75,76) .

Em um estudo piloto o miR-146a-5p foi identificado no soro de pacientes na unidade de cuidados intensivos e cirurgia cardíaca na injúria renal aguda. A expressão gênica deste biomarcador foi observada antes do aumento da creatinina sérica, caracterizando diagnóstico precoce e útil na prática clínica com alto valor diagnóstico identificando pacientes em risco (77).

## 2.8 REAÇÃO EM CADEIA POLIMERASE E MICRO RNAS

A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) foi desenvolvida por Karry Mullis em 1983, que recebeu o prêmio Nobel em química no ano de 1993. O desenvolvimento da técnica de amplificação dos segmentos de DNA utilizou-se a enzima DNA polimerase da *E.coli*, com temperatura de polimerização de 37° C. O passo decisivo para a expansão da PCR foi a descoberta da enzima TaqDNA polimerase, extraída da bactéria *Thermus aquaticus*, sendo que esse organismo vive em fontes termais e muitas de suas enzimas são termoestáveis

(78).

A técnica convencional de PCR apresentava resultados meramente qualitativos, exceto no PCR competitivo. Um avanço importante foi o desenvolvimento de metodologias que possibilitaram o acompanhamento da amplificação do DNA em todo o processo e não somente em seu final, como no caso da PCR convencional (78). A técnica de PCR em tempo real analisa a expressão gênica, sendo necessária a extração do material genético (RNA) do tecido de interesse. O RNA de fita simples é instável e necessita ser sintetizado em uma molécula complementar (cDNA) através da ação de uma transcriptase reversa, utilizando-se para tal a enzima Taq polimerase, desoxinucleotídeos, íons e *primers*, (sequências de DNA iniciadoras específicas do gene de interesse que sinalizarão a partir de qual ponto a enzima iniciará a sequência) (78).

A TaqMan (*Perkin Elmer Applied Biosystems*) consiste na atividade de exonucleásica 5'-3' da TaqMan® DNA polimerase. A enzima digere uma sonda marcada que anela especificamente na parte interna do seguimento a ser amplificado entre dois *primers*. A sonda TaqMan possui na extremidade 5' uma molécula fluorescente- “*repórter*” e na extremidade 3', a molécula “*quencher*” que inibe a fluorescência natural emitida pela “*repórter*”. Em determinada temperatura do ciclo essa sonda anela os *primers* sendo posteriormente clivada pela enzima quando esta sintetiza a fita complementar. Ao serem clivadas, as sondas se afastam e a molécula “*repórter*” emite sua fluorescência. Esse processo passa a acontecer seriadamente, através da variação de temperatura, os ciclos consistem na quebra das pontes de hidrogênio da fita dupla, do anelamento dos *primers* e da sonda e a sintetização de uma nova fita pela a enzima que cliva a sonda que passa a emitir fluorescência, ao término de um ciclo, retorna-se ao passo inicial (78,79).

Com o passar dos ciclos o sinal fluorescente aumenta proporcionalmente e passa a ser detectados pela máquina, que une um termociclador e um leitor de fluorescência. À medida que os ciclos se completam os sinais produzidos são detectados pelo sistema óptico, processados por um *software* que expressa graficamente a intensidade de fluorescência por número de ciclos (Figura 4) (78). A quantificação do produto pode ser absoluta quando esse é comparado com uma curva padrão ou relativa quando se relaciona o produto de interesse com um calibrador, amostra utilizada como comparativa. A partir desses dados é aplicado o método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  descrita por Livak e colaboradores em 2001 (80).

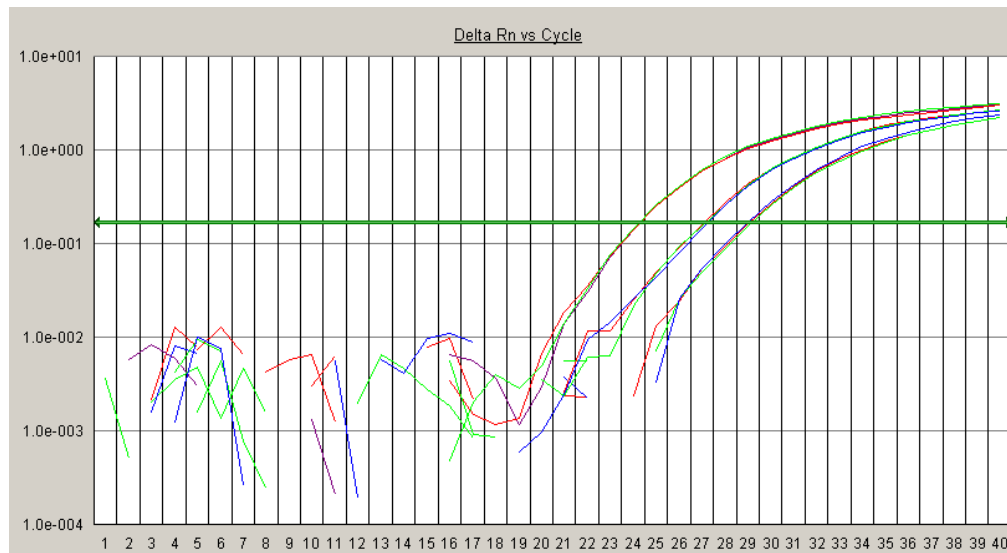
**Figura 4.**

Figura 4. Figura representativa da RT-qPCR demonstrando a detecção de fluorescência durante a reação como indicador do produto amplificado em cada ciclo de PCR em tempo real determinado em um experimento para analisar a expressão gênica de biópsia renal (Adaptação da fonte: autora).

### 2.8.1 Amplificação de micro RNAs por PCR-RT

A síntese de DNA complementar é efetuada a partir do RNA extraído das amostras, via transcrição reversa, utilizando um kit específico para microRNAs (*TaqMan MicroRNA RT*, Applied Biosystems Foster City, CA, USA), onde são utilizados RT *primers* para cada microRNA estudado, permitindo a conversão do fragmento específico correspondente ao microRNA de interesse (Figura 5), utiliza-se um *primer* com estrutura do tipo *stem-loop*. Tal conformação visa solucionar um ponto crítico em relação à detecção do miRNA maduro, que é o seu pequeno tamanho. O *stem-loop* do *primer* possui uma especificidade apenas para o miRNA maduro, permitindo a formação de uma junção primer-miRNA, estendendo a extremidade 5' do miRNA. Esse processo resulta em um amplicon maior, possibilitando o uso de um TaqMan Assay™ (*TaqMan MicroRNA Assay*, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) para quantificar a expressão do miRNA por q-RT-PCR quantitativo em Tempo Real.

Além disso, o fato de o TaqMan Assay™ possuir dois *primers* e uma sonda para PCR faz também com que o ensaio seja altamente específico, sendo capaz de distinguir miRNAs com alta similaridade entre si, até mesmo quando há diferenças de apenas uma base entre eles (79-81).

Para quantificação da expressão de miRNAs pode-se utilizar o *Step-One Real Time PCR* 48-wellplate (Applied Biosystems Foster City, CA, USA) mediante quantificação relativa pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (80). Esse método de quantificação relativa descreve a mudança na expressão de um gene alvo em um grupo de amostra estudada, normalizada com um gene constitutivo, comparado com um grupo de referência (Applied Biosystems User Bulletin Nº 2-P/N 4303859). Análises com esse método são amplamente usadas em estudos de expressão gênica (84,85).

**Figura 5.**

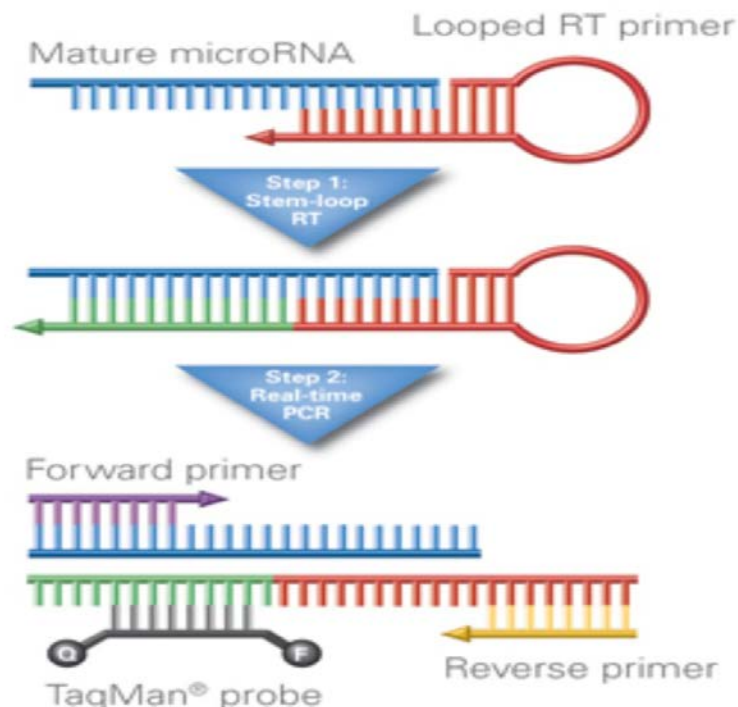


Figura 5. Esquema ilustrativo do processo de transcrição reversa de miRNA o Kit TaqMan MicroRNA RT – Applied Biosystem e interação da sonda e *primers* (TaqMan™ MicroRNA Assay) (Adaptação da referência 82).

### 2.8.2 Escolha do Controle Endógeno

A expressão de um gene constitutivo como controle endógeno na reação de PCR quantitativo é utilizado como fator de normalização das amostras. Um dos requisitos mais importantes para a escolha de um gene candidato a controle endógeno é a sua presença constante em todas as amostras testadas com pouca variação na expressão por influência de estímulos externos ou mudanças no metabolismo celular. As flutuações decorrentes a variações de pipetagem e na concentração final dos reagentes, da amostra, ou variações nas condições das reações de tempo real ou de PCR podem ser corrigidas pela expressão do gene constitutivo (83).

Essa ausência de variação na expressão do gene controle endógeno também pode ser interpretada como um indicador da integridade do RNA extraído, da adequada síntese de cDNA na reação de transcrição reversa e da boa amplificação do produto durante a PCR (84,85).



### 3. MAPA CONCEITUAL

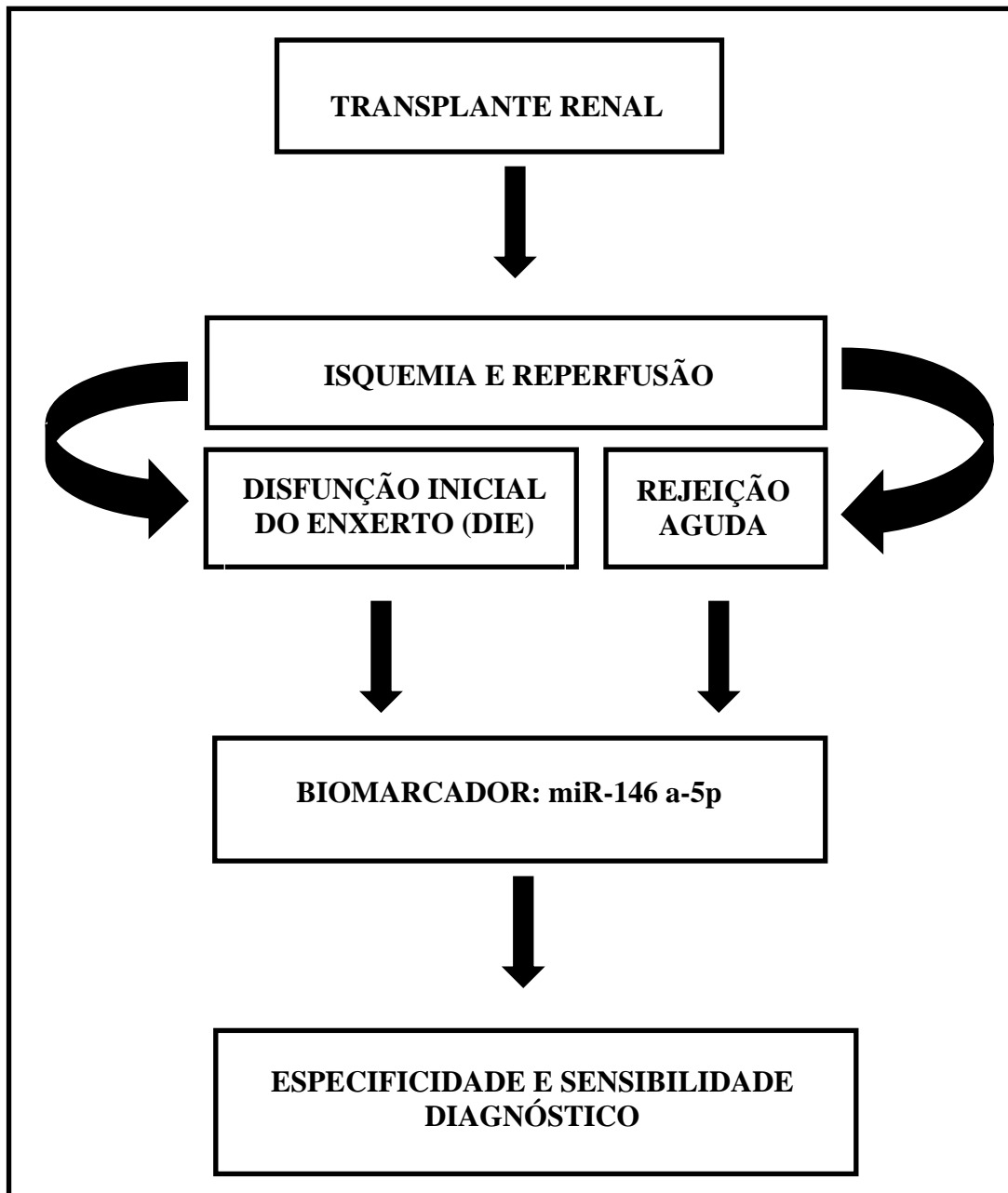
O transplante renal é o tratamento de escolha para muitos pacientes com perda crônica terminal da função renal já que oferece um significativo aumento na expectativa e na qualidade de vida dos pacientes. Como já mencionado e evidenciado desde o início da prática de transplantes entre indivíduos geneticamente distintos, tecidos e órgãos perdem suas funções por um processo mediado pelo sistema imune que é denominado rejeição. Tal processo é parcialmente controlado pela modificação da resposta imune do receptor com fármacos e agentes biológicos imunossupressores.

A lesão de isquemia e reperfusão é um processo inevitável no transplante renal, tendo entre suas consequências retardo na função do enxerto. Essas injúrias, principais responsáveis pela disfunção inicial do enxerto (DIE), por desencadear ou facilitar os mecanismos que propiciam a rejeição aguda (RA) e por programar alterações gênicas, metabólicas e teciduais que culminam no processo de fibrose dos enxertos e sua perda crônica propiciam a ativação do sistema imune, estimulando ambas as respostas, inata e a adaptativa.

A RA é um importante fator de risco para a perda de enxertos, sendo uma frequente e séria complicação pós-transplante. A biópsia é onerosa e tem problemas relacionados à representatividade e variabilidade de interpretação. Apesar disso, na prática atual, ela ainda é o padrão ouro para o diagnóstico das disfunções dos enxertos renais.

Biomarcadores não invasivos acurados que possam afirmar com alta sensibilidade e especificidade a situação do aloenxerto são necessários para aprimorar a prática dos transplantes. Uma importante descoberta da biologia molecular nos últimos anos são os micro RNAs (miRNAs), sendo que a análise da expressão do miR-146a-5p em pacientes transplantados renais pode constituir em uma ferramenta útil para o estabelecimento etiológico da DIE.

A figura 6 representa esquematicamente o marco conceitual do estudo. Este esquema foi desenvolvido com o objetivo de elencar, explicitar e articular a base teórica pertinente ao processo e contexto do estudo.

**Figura 6:** Mapa Conceitual do Estudo

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GERAL**

Analisar e quantificar a expressão do miRNA-146a-5p em amostras de sangue periférico e de tecido renal coletadas de pacientes transplantados renais que apresentam disfunção inicial do enxerto associada a lesão de isquemia e reperfusão.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Comparar a expressão do miRNA 146a-5p em pacientes com LIR à expressão observada na rejeição aguda e em enxertos estáveis;
2. Avaliar os parâmetros diagnósticos resultantes da avaliação da expressão genética do miRNA-146a-5p em tecido renal e células mononucleares sanguíneas de rins transplantados em grupos de pacientes estáveis, pacientes com disfunção e com rejeição aguda.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Harmath CB, Wood CG. 3rd, Berggruen SM., Tantisattamo E. Renal Pretransplantation Work-up, Donor, Recipient, Surgical Techniques. *Radiol Clin North Am.* 2016; 54(2):217-34.
2. Wilflingseder J, Regele H, Perco P, Kainz A, Soleiman A, Mühlbacher F, et al. miRNA profiling discriminates types of rejection and injury in human renal allografts. *Transplantation.* 2013; 95(6):835-41.
3. Muduma G, Shupo FC, Dam S, Hawken NA, Aballéa S, Odeyemi I, et al. Patient survey to identify reasons for non-adherence and elicitation of quality of life concepts associated with immunosuppressant therapy in kidney transplant recipients. *Patient Prefer Adherence.* 2016; 10:27-36.
4. Doi K, Rabb H. Impact of acute kidney injury on distant organ function: recent findings and potential therapeutic targets. *Kidney Int.* 2016; 89(3):555-64.
5. Saat TC, van den Akker EK, IJzermans JN, Dor FJ, de Bruin RW. Improving the outcome of kidney transplantation by ameliorating renal ischemia reperfusion injury: lost in translation? *J Transl Med.* 2016; 14:20.
6. Denecke C, Tullius SG. Innate and adaptive immune responses subsequent to ischemia-reperfusion injury in the kidney. *Prog. Urol.* 2014; 1:1S13-9.
7. Menon MC, Keung KL, Murphy B, O'Connell PJ. The Use of Genomics and Pathway Analysis in Our Understanding and Prediction of Clinical Renal Transplant Injury, *Transplantation.* 2016; 100(7):1405-14.
8. Helfer M, Vicari AR, Spuldaro F, Gonçalves LF, Manfro RC. Incidence, risk factors, and outcomes of delayed graft function in deceased donor kidney transplantation in a Brazilian center. *Transplantation Proc.* 2014; 46 (6):1727-29.
9. Nankivell BJ, Alexander SI. Rejection of the kidney allograft. *N Engl J Med.* 2010; 363(15):1451-62.
10. Bandari J, Fuller TW, Turner Li RM, D' Agostino LA. Renal biopsy for medical renal disease: indications and contraindications. *Can J Urol.* 2016; 23(1):8121-26.
11. Broecker V, Mengel M. The significance of Histological Diagnosis in Renal Allograft Biopsies in 2014. *Transpl. Int.* 2014; 28(2):136-43.
12. Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, Chang J, Hidalgo LG, Beuscart T, et al. Molecular microscope strategy to improve risk stratification in early antibody-mediated kidney allograft rejection. *J Am Soc Nephrol.* 2014; 10:2267-77.

13. Bhatt K, Kato M, Natarajan R. Mini-Review: emerging roles of micro-RNAs in the pathophysiology of renal diseases. *Am. J. Physiol Renal Physiol.* 2016; 310(2): F109-18.
14. Matignon M, Ding R, Dadhania DM, Mueller FB, Hartono C, Snopkowski C, et al. Urinary cell mRNA profiles and differential diagnosis of acute kidney graft dysfunction. *J Am Soc Nephrol.* 2014; 7:1586-97.
15. Suthanthiran M, Schwartz JE, Ding R, Abecassis M, Dadhania D, Samstein B, et al. Urinary-cell mRNA profile and acute cellular rejection in kidney allografts. *N Eng J Med.* 2013; 369(1):20-31.
16. Schena FP, Serino G, Sallustio F. MicroRNAs in kidney diseases: newpromising biomarkers for diagnosis and monitoring. *Nephrol Dial Transplant.* 2014; 4:755-63.
17. Wei Q, Mi QS, Dong Z. The regulation and function of microRNAs in kidney diseases. *IUBMB Life.* 2013; 65 (7):602–14.
18. Hou J, Zhao D. MicroRNA regulation in renal pathophysiology. *Int J Mol Sci.* 2013; 7:13078–92.
19. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvié AE, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 2000; 403(6772):901–6.
20. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Carrington JC, et al. A uniform system for microRNA annotation. *RNA.* 2003; (9)3:277–9.
21. Spiegel JC, Lorenzen JM, Thum T. Role of microRNAs in immunity and organ transplantation. *Expert Reviews in Molecular Medicine.* 2011:13-e37.
22. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004; 116 (2):281-97.
23. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* 2009; 136 (2):215-33.
24. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009; 2:126–39.
25. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNAs biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014; 8: 509-24.
26. Sarma NJ, Tiriveedhi V, Ramachandran S, Crippin J, Chapman W, Mohanakumar T. Modulation of immune responses following solid organ transplantation by microRNA. *Exp Mol Pathol.* 2012; 3:378-85.

27. Aquino-Dias EC, Joelsons G, da Silva DM, Berdichevski RH, Ribeiro AR, Veronese FJ, et al. Non-invasive diagnosis of acute rejection in kidney transplants with delayed graft function. *Kidney Int.* 2008; 73(7):877–84.
28. Hartono C, Muthukumar T, Suthanthiran M. Noninvasive diagnosis of acute rejection of renal allografts. *Curr Opin Organ Transplant.* 2010; 1:35-41.
29. O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 5:1604-9.
30. Li JY, Yong TY, Michael MZ, Gleadle JM. Review: The role of microRNAs in kidney disease. *Nephrology (Carlton).* 2010; 15(6):599-608.
31. Banerjee A, Schambach F, DeJong CS, Hammond SM, Reiner SL. Micro-RNA-155 inhibits IFN-gamma signaling in CD4+ T cells. *Eur J Immunol.* 2010;1:225-31.
32. Macfarlane LA, Murphy PR MicroRNAs: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics.* 2010; 7:537-61.
33. Bath K, Mi QS, Dong Z. microRNAs n kidneys: biogenesis, regulation, and pathophysiological roles. *American J of Physiol Renal Physiol.* 2011; 3: F602-10.
34. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N England J M.* 1999; 23:1725-30.
35. Hamilton D. Kidney transplantation: A history. In: Morris P, Knechtle SJ, editors. *Kidney Transplantation: Principles and Practice.* 7<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Souders Eselvier, 2008. 1-9.
36. Nankivell BJ, Kuypers DRJ. Diagnosis and prevention of chronic kidney allograft loss. *Lancet.* 2011; 378: 1428-37.
37. Requião-Moura LR, Durão Junior Mde S, Matos AC, Pacheco-Silva A. Ischaemia and reperfusion injury in renal transplantation: hemodynamic and immunological paradigms. *Einstein.* 2015; 1:129-35.
38. Chawla LS, Egger PW, Star RA, Kimmel PL. Acute injury and chronic disease as interconnected syndromes. *N Engl J Med.* 2014; 1:58-66.
39. Tilney NL, Guttman RD. Effects of initial ischemia/reperfusion injury on the transplanted kidney. *Transplantation.* 1997; 64(7):945-7.

40. Molitoris BA. Ischemic acute renal failure: exciting times at our fingertips. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1998; 4:405-6.
41. Harris A, Krams SM, Martinez OM. MicroRNAs as immune regulators: implications for transplantation. *Am J Transplant*. 2010; 4:713-9.
42. Neumann J; Filho MA; Garcia VD. *Transplante de Órgãos e Tecidos*. São Paulo: Sarvier, 1997.
43. Danovitch GM. *Handbook of kidney Transplantation*. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1996.
44. Clarkson MR, Sayegh MH. T-cell costimulatory pathways in allograft rejection and tolerance. *Transplantation*. 2005; 80(5):555-63.
45. Shankarkumar U. The Human Leukocyte Antigen (HLA) *Int J Hum Genet*. 2004; 4(2): 91-103.
46. Stites DPE; Terra AI. *Imunologia Básica*. Ed. Prentice-Hall do Brasil LTDA. Rio de Janeiro, 1992.
47. Cotran RS; Vinay K; Tucker C. *Patologia Estrutural e Funciona*. 6<sup>a</sup> edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
48. Carter LL, Zhang X, Dubey C, Rogers P, Tsui L, Swain SL. Regulation of T cell subsets from naive to memory. *J Immunother*. 1998; 21(3):181-7.
49. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant*. 2008; 8(4):753-60.
50. Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. T (H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol*. 2007; 4:345-50.
51. Moll S, Pascual M. Humoral rejection of organ allografts. *Am J Transplantat*. 2005; 11:2611-8.
52. Muthukumar T, Ding R, Dadhania D, Medeiros M, Li B, Sharma VK, et al. Serine proteinase inhibitor-9, an endogenous blocker of granzyme B/perforin lytic pathway, is hyperexpressed during acute rejection of renal allografts. *Transplantation*. 2003; 9:1565-70.
53. Muthukumar T, Dadhania D, Ding R, Snopkowski C, Naqvi R, Lee JB, et al. Messenger RNA for FOX P3 in the urine of renal-allograft recipients. *N Engl J Med*. 2005; 22: 2342-51.

54. Haas M, Sis B., Racusen LC, Solez K, Glotz D, Colvin RB et al. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d -negative antibody - mediated rejection and antibody -associated arterial lesions. *Am J Transplant.* 2014; 2:272-83.
55. Vongwiwatana A, Tasanarong A, Hidalgo LG, Halloran PF. The role of B cells and alloantibody in the host response to human organ allografts. *Immunol Rev.* 2003; 196:197-218
56. Colvin RB, Cohen AH, Saiontz C, Bonsib S, Buick M, Burke B, et al. Evaluation of pathologic criteria for acute renal allograft rejection: reproducibility, sensitivity, and clinical correlation. *J Am Soc Nephrol.* 1997; 12:1930-41.
57. Geddes CC, Woo YM, Jardine AG. The impact of delayed graft function on the long-term outcome of renal transplantation. *J Nephrol.* 2002; 1:17-21.
58. Serón D, Alexopoulos E, Raftery M., Hartley RB, Cameron JS. Diagnosis of rejection in renal allograft biopsies using the presence of activated and proliferating cells. *Transplantation.* 1989; 5:811-6.
59. Ha TY. The Role of MicroRNAs in Regulatory T Cells and in the Immune Response. *Immune Netw.* 2011; 1:11-41.
60. Baltimore D, Boldin MP, O'Connell RM, Rao DS, Taganov KD. MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nat Immunol.* 2008; 8:839-45.
61. Pauley KM, Chan EKL. MicroRNAs and their emerging roles in immunology. *Ann NY Acad Sci.* 2008; 1143:226-39.
62. Costa EBO; Pacheco C. Micro-RNAs: Perspectivas atuais da regulação da expressão gênica em eucariotos. v. 14, n. 2, Londrina: Biosaúde, 2012. 81-92.
63. Sethi A, Kulkarni N, Sonar S, Lal G. Role of miRNAs in CD4 T cell plasticity during inflammation and tolerance. *Front Genet.* 2013; 4:1-8.
64. Heidt S, Wood KJ. Biomarkers of operational tolerance in solid organ transplantation. *Expert Opin Med Diagn.* 2012; 4:281-93.
65. Kato M, Putta S, Wang M, et al. TGF- $\beta$  activates Akt kinase through a microRNA-dependent amplifying circuit targeting PTEN. *Nat Cell Biol.* 2009; 7:881-9.
66. Lee SO, Masyuk T, Splinter P, Banales JM, Masyuk A, Stroope A, et al. MicroRNA15a modulates expression of the cell-cycle regulator Cdc25a and affects hepatic cystogenesis in a rat model of polycystic kidney disease. *J of Clin Invest.* 2008; 11:3714-24.



67. Lorenzen JM, Volkmann I, Fiedler J, Schmidt M, Scheffner I, Haller H, et al. Urinary miR-210 as a mediator of acute T-cell mediated rejection in renal allograft recipients. *Am J Transplant.* 2011; 10:2221-7.
68. Anglicheau D, Sharma VK, Ding R, Hummel A, Snopkowski C, Dadhania D, et al. MicroRNA expression profiles predictive of human renal allograft status. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 2009; 106(13):5330-35.
69. Soltaninejad E, Nicknam MH, Nafar M, Ahmadpoor P, Pourrezaghali F, Sharbafi MH, et al. Differential expression of microRNAs in renal transplant patients with acute T-cell mediated rejection. *Transpl Immunol.* 2015; 33(1):1-6.
70. Tao J, Yang X, Han Z, Lu P, Wang J, Liu X et al. Serum MicroRNA-99a Helps Detect Acute Rejection in Renal Transplantation. *Transplant Proc.* 2015; 6:1683-7.
71. Sui W, Dai Y, Huang Y, Lan H, Yan Q, Huang H. Microarray analysis of MicroRNA expression in acute rejection after renal transplantation. *Transpl Immunol.* 2008; 19(1):81-5.
72. Amrouche L, Desbuissons G, Rabant M, Sauvaget V, Nguyen C, Benon A, et al. MicroRNA-146a in Human and Experimental Ischemic AKI: CXCL8-Dependent Mechanism of Action. *J Am Soc Nephrol.* 2017; 28 (2):479-93.
73. Domênico TD, Joelsons G, Montenegro RM, Manfro RC. Upregulation of microRNA 142-3p in the peripheral blood and urinary cells of kidney transplant recipients with post-transplant graft dysfunction. *Braz J Med Biol Res.* 2017; 50(4):1-7.
74. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF- $\kappa$ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor target to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103(33):12481-6.
75. Kiffel J, Rahimzada Y, Trachtman H. Focal segmental glomerulosclerosis and chronic kidney disease in pediatric patients. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2011; 5:332-8.
76. Baker AM, Davis SJ, Liu P, Pan X, Williams AM, Iczkowski KA, et al. Tissue specific microRNA expression patterns in four types of kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2017; 28:1-8.
77. Aguado-Fraile E, Ramos E, Conde E, Rodríguez M, Martín-Gómez L, Lieter A et al. A pilot study identifying a set of microRNAs as precise diagnostic biomarkers of acute kidney injury. *PLoS One,* 2015; 10(6):2-15.
78. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 2006; 27(2-3):95-125.
79. Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR- a perspective. *J Mol Endocrinol.* 2005; 34(3):597-601.

80. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> Method. *Methods*. 2001; 25(4):402-8.
81. Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol*. 2002; 30(6):503-12.
82. Balcells I, Cirera S, Busk PK. Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers. *BMC Biotechnology*. 2011: 11-70.
83. Shi R, Chiang VL. Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR. *Biotechniques*. 2005; 39(4):519-25.
84. Applied Biosystems. Guide to performing relative quantitation of gene expression using Real-Time quantitative PCR. 2004. Disponível em: <<http://www3.appliedbiosystems.com/sup/gl/search.htm>>. Acesso em: Jan. 2017.
85. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR by the comparative Ct method. *Nat Protoc*. 2008; 3 (6):1101-08.

## 6. ARTIGO ORIGINAL EM LÍGUA INGLESA

### AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO MICRO RNA-146a-5p EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS COM DISFUNÇÃO INICIAL DO ENXERTO

(Formatado para submissão à revista *American Journal of Transplantation*)

### EXPRESSION OF MICRO RNA 146a-5p IN KIDNEY TRANSPLANT RECIPIENTS WITH DELAYED GRAFT FUNCTION

Milhoransa P.<sup>1</sup>, Montanari C.C.<sup>1</sup>, Montenegro R.M.<sup>2</sup>, Manfro R.C.<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, School of Medicine.

<sup>2</sup> Renal Transplantation Unit, Division of Nephrology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

**Running title:** Micro RNA 146a-5p expression in delayed graft function

**Keywords:** microRNA, graft dysfunction, renal transplantation, gene expression

**\*Corresponding author**

Roberto C. Manfro MD, PhD  
Renal Transplant Unit, Division of Nephrology  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre  
Av. Ramiro Barcelos 2350 – CEP 90040-003, Porto Alegre/RS, Brazil  
Phone: 55 (51) 3359-8295 Fax: 55 (51) 3359-8121.  
E-mail: rmanfro@hcpa.edu.br

## ABSTRACT

**Introduction:** The development of novel non-invasive biomarkers of kidney graft dysfunction, especially in the course of the delayed graft function period would be an important step forward in the clinical practice of kidney transplantation.

**Methods:** We evaluated by RT-PCR the expression of miRNA-146 to -5p ribonucleic microacids (miRNAs) in the peripheral blood and renal tissue obtained from kidney transplant recipients who underwent a surveillance graft biopsy during the period of delayed graft function.

**Results:** In biopsy samples the expression of miR-146a-5p was significantly increased in the group of patients with delayed graft function (DGF) group (n=33) versus stable patients (STA) group (n=13) and patients with acute rejection (AR) group (n=9) (P=0.008). In peripheral blood samples a non-significant increase of miR-146a-5p expression was found in the DGF group versus STA and AR groups (P=0.083). No significant correlation was found between levels of expression at biopsy and plasma groups. ROC curve analysis revealed an AUC of 0.75 (95% CI: 0.62–0.88) for the renal tissue amounts of expression and 0.67 (95% CI 0.52–0.81) for the peripheral blood amounts of expression.

**Conclusion:** We conclude that miR-146a-5p expression has a distinct pattern in the renal tissue and perhaps in the peripheral blood in the setting of DGF. Further refinements and strategies for studies are worth developing in the field of non-invasive molecular diagnosis of kidney graft dysfunction.

## INTRODUCTION

Renal transplantation is the treatment of choice for many patients with end-stage renal impairment (1,2). It offers a significant increase in the expectation and quality of life of patients with end-stage renal function (3). However, as evidenced from the beginning of the practice of transplants between genetically distinct individuals, tissues and organs lose their functions through a rejection process that is mediated by the immune system. Such process is only partially controlled by modifying the receptor immune response with immunosuppressive drugs and biological agents (3-5).

In the last century the mechanisms of alloimmune response were elucidated and immunosuppressive drugs capable of preventing rejection were developed turning organ transplantation into a clinical reality (6,7).

In transplantation injury due to ischemia and reperfusion is an inevitable process resulting many times in delayed graft function (DGF) that is currently characterized by the need of dialysis within the first week after transplantation. Ischemia and reperfusion injury (IRI) also promotes activation of the innate and adaptive responses of the immune system, leading to processes with great potential to produce significant graft harm. It is believed that these injuries also facilitate mechanisms of acute rejection (AR) and act by programming gene, metabolic and tissue changes that culminate in tissue graft fibrosis and chronic loss of function (8,9).

AR a frequent and ominous complication of organ transplantation is still considered a risk factor for early and late graft loss (10). Currently the clinical phenotypes types of rejection are well elucidated and in clinical practice. Rejection is usually evidenced by the organic dysfunction, which leads to a graft biopsy that is classified by the types of histological alterations (11). Its evolution is difficult to predict and the histological findings observed in renal tissue obtained are still considered the best predictors (11,12). Biopsy on the other hand is associated with a variety of complications, in addition, it is costly, has representativeness issues and is subject to variability of interpretation. Nevertheless, in current practice, it is still the gold standard for the diagnosis of renal graft dysfunctions (12,13).

The classification of the graft damage is done through the standardization by an international consensus of nomenclatures and specific criteria for the histological characterization of organ rejection, denominated *Banff* classification, in which T cell mediated rejection or antibody mediated rejection are diagnosed based on empirical rules and the lesions are graded semi-quantitatively (14). Briefly, diagnoses according to this classification

may be grouped as borderline rejection, acute, tubulointerstitial or vascular cell rejections of different severities or as antibody-mediated acute rejection, characterized by histological findings, presence of antibodies donor anti-HLA and by the labeling of C4d in the peritubular capillaries (14).

Accurate non-invasive biomarkers are an unmet need in the clinical practice of organ transplantation. Most of the work with molecular biomarkers has been done analyzing messenger RNA expression (15, 16). An important discovery of molecular biology in recent years are the micro-RNAs (miRNAs) (17, 18). They consist of small conserved and non-RNA coding fragments of approximately 25 nucleotides, inhibiting transcription of mRNA, inducing by translational depression or degradation of mRNA, that are responsible for regulating gene expression (18-20).

MicroRNA 146a-5p acts as a mediator of the renal tubular response to the injury of ischemia-reperfusion limiting the inflammatory process in this setting (21). In the present study we quantitatively assessed, miR-146a-5p in the renal tissues and peripheral blood lymphocytes of kidney transplant recipients with delayed graft function. We hypothesized that miR-146a-5p would present enhanced transcription signaling in recipients with DGF as compared to patients with stable function and those with AR at two compartments, peripheral blood and renal graft tissue.

## **METHODS**

### **Patients**

Fifty-five patients that underwent renal graft biopsies were enrolled in the study. Peripheral blood was also obtained from these patients for miRNA analysis. Thirty-three patients were on delayed graft function (DGF) when the biopsies were performed (surveillance biopsies), nine were having acute graft dysfunction (indication biopsies) that was attributed to acute rejection (AR) and 13 were normal protocol biopsies obtained at three months after transplantation. The study was conducted at the Renal Transplantation Unit, Division of Nephrology, *Hospital de Clínicas de Porto Alegre*, Brazil, between May 2013 and April 2017. All patients provided written informed consent for their participation.

All patients were on immunosuppression consisting of a combination of corticosteroids, sodium mycophenolate, and calcineurin inhibitors. Either anti IL2 receptor antibodies (Basiliximab®) or rabbit anti-thymocyte globulin (Thymoglobulin®) induction

therapy was used in all deceased-donor graft recipients and for all living-donor graft recipients considered at increased risk of rejection.

The ethical and methodological aspects of this study were approved by the Hospital de Clínicas de Porto Alegre Research Ethics.

## **Samples**

Biopsies were performed percutaneously, under real-time ultrasound guidance, using a semi-automatic biopsy gun with a 16G needle. At the time of biopsy, all patients had well-controlled blood pressure and all parameters of a coagulation panel (obtained no more than 24 hours before) within normal limits. Before renal biopsy, a comprehensive workup was performed to rule out obstructive or vascular issues, urinary fistula, infection, or drug toxicity as causes of graft dysfunction.

## **Specimen collection and preparation**

Two renal cortex fragments were collected during each biopsy procedure. One-third of one of these fragments was placed in a microtube, flash-frozen by submerging in liquid nitrogen, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Peripheral blood samples (5 mL collected into EDTA-containing tubes) were obtained immediately before the biopsies.

For cell separation, both sample types were rinsed and processed so as to concentrate the cells of interest (blood). In the case of blood samples, 2-mL aliquots were transferred to sterile, 12-mL Falcon tubes to which 10 mL of erythrocyte-lysing Buffer EL (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA) were added, followed by 21 minutes of incubation on ice with intermittent vortexing every 7 minutes. After this step, the samples were centrifuged at 1800 rpm for 10 minutes, leaving a pellet that contains the cells of interest at the bottom of the tube. The pellet was preserved and the supernatant discarded. The pellet was then resuspended in 1.5 mL of Buffer EL, transferred to microtubes, further centrifuged for 10 minutes at 10000 rpm, the supernatant discarded, and the resulting cell concentrate frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## Micro RNA processing

Micro RNAs were extracted from samples using the *mirVana*<sup>TM</sup> PARIS<sup>TM</sup> commercial kit (Ambion®, Life Technologies Corporation). Briefly, cell concentrate/ sediment was dissolved or tissue fragmented with 500µL of buffer in a dispersing machine (ULTRA-TURRAX T 10 basic – IKA, Campinas, SP, Brazil) and eluted in 60µL of water for injection preheated to 95°C, in accordance with manufacturer instructions.

Samples were resuspended in 500µL of ice-cold Cell Disruption Buffer and homogenized with a pipette. The lysate was transferred to 2-mL microtubes to which 500µL of denaturing solution preheated to 37°C was added, homogenized again, and incubated in ice for 5 minutes. After incubation, 1 mL of the lower phase of the acid-phenol: chloroform provided in the kit was added, the lysate vigorously vortexed for 1 minute, and then centrifuged at 13000 rpm for 5 minutes for organic phase separation. The phase of interest (the upper phase) was then collected, measured (maximum volume 600µL), and transferred to a fresh microtube, to which was added 100% ethanol at room temperature corresponding to one-third of the obtained volume. The resulting solution was homogenized and 700µL transferred to the filtering apparatus provided in the kit. This apparatus was then centrifuged at 10000 rpm for 30 seconds. The resulting filtrate contains the desired miRNAs. Ethanol (466µL) was added to this fluid, which was passed through a second filter, and the washing process begun. This process consists of the addition of 700µL of Wash Solution 1, centrifuging for 15 seconds at 10000 rpm, addition of 500µL of Wash Solution 2/3, and repeating the two preceding steps. After discarding the flow-through, the apparatus is centrifuged for 1 minute to remove any residual reagent, the column is transferred into a fresh collection tube, and the miRNAs are collected by eluting with 60µL of water for injection heated to 95°C. The eluate is then centrifuged at 10000 rpm for 50 seconds and stored at -80°C until the next stage.

The concentration of extracted miRNA was quantified in a full-spectrum spectrophotometer (220-750nm) with sample retention technology (Nanodrop 1000, Thermo Fischer Scientific, Wilmington, DE, USA). The nucleic acid concentration is expressed in ng/µL based on optical density at 260 nm, and purity is calculated on the basis of the A260/280 and A260/230 ratios. A ratio of approximately 2.0 is generally accepted as “pure” RNA. Samples were considered viable if they had a concentration of at least 2ng/µL. All samples with a higher concentration were diluted to this concentration in a 50µL volume of nuclease-free water.



## **Amplification and detection**

The following specific TaqMan primers (Applied Biosystems®) were used for real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR): miR146a-5p 4427975/000468; RNU-48 4427975/001006 and Cel-miR-39-5p 4427975/464312. The endogenous control used for sample normalization was synthetic exogenous control Cel-miR-39 from *C. elegans* (Qiagen, catalog number MSY0000010), which was spiked into samples before the reverse transcription stage in a 0.5µL volume at a 50 pM concentration.

## **Complementary DNA**

The complementary DNA (cDNA) formation stage was carried out with the TaqMan MicroRNA RT kit (Applied Biosystems®) as per manufacturer instructions, using 8µL of reaction mix: 0.12µL of 100mM dNTPs, 0.8µL of MultiScribe™ reverse transcriptase (50 U/µL), 1.2µL of enzyme buffer, 0.144µL of RNase inhibitor (20 U/µL), 3.40µL of nuclease-free water, and 2.4µL of target-specific primer, to which 4µL of miRNA were added, finalizing a total volume of 12µL. For synthesis, the samples were incubated at 16°C for 30 minutes, at 42°C for 30 minutes, and at 85°C for 5 minutes, then stored at -20°C until the time of RT-PCR.

## **Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction**

RT-qPCR which consisted of the amplification of 2µL cDNA using 5.0µL of TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems®), 0.5µL of specific primers, and 2.5µL of nuclease-free water, in a final reaction volume of 10µL. Analyses of miRNA expression were performed using TaqMan MicroRNA Assay and individual TaqMan MicroRNA Assays (TaqManMicroRNA Assay, Applied Biosystems, Foster City CA, USA) for miR-146a-5p a Step-One Real Time PCR 48-welloptical plate (Applied Biosystems, Foster City CA, USA) (22).

One endogenous miRNAs (RNU48) is analyzed and, the expression biopsy data were normalized against RNU48. The data were presented as the relative quantity of target miRNA normalized to endogenous. The exogenous control used was a cel-miR-39 of blood samples.

The cycle threshold (Ct) was calculated automatically using software. miRNAs

expression was normalized using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method described by Livak and Schmittgen (22).

### Statistical Analyses

Asymmetrically distributed variables were expressed as medians and interquartile ranges, whereas symmetrically distributed variables were expressed as means  $\pm$  standard deviations. The Kruskal–Wallis and Mann–Whitney *U* tests were used for paired-samples analysis of variance and for between-group analysis. Spearman's correlation was used to see the association between two variables. Qualitative data were expressed as absolute and relative counts, and the chi-square or Fisher's exact tests were used for between-group analyses. All tests were two-tailed and a P-value  $<0.05$  was defined as statistically significant. All analyses were carried out in PASW Statistics 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## RESULTS

Diagnostic classification was achieved by a combination of the clinical assessment, response to specific therapy and biopsy findings, as interpreted per the Banff 2013 classification (14). Fifty-five patients were divided between three groups in accordance with the established diagnosis. Thirty-three patients were on DGF, nine were having an AR episode and thirteen were patients with stable graft function that underwent a protocol biopsy. For all patients a biopsy and a peripheral blood sample were obtained and processed for miRNA 146a-5p expression. Demographic data are shown in Table 1. Only serum creatinine levels ( $P=0.022$ ) and time elapsed from transplant to biopsy ( $P=0.001$ ) differed significantly between groups. Serum creatinine was significantly elevated in the DGF group and time to biopsy was longer in the DGF group as compared to the stable group. As expected time to biopsy was also longer in the stable group, that underwent protocol biopsies, as compared to the other two groups. The differences observed in the initial immunosuppression regimens did not reach statistical significance ( $P=0.069$ ).

**Table 1**

In the renal tissue analysis of microRNA 146a-5p was differentially expressed between groups. It was enhanced in the DGF group (median [IQR], 3.23 [1.46–5.74]) as

compared to the stable group (median [IQR], 0.78 [0.57–1.99];  $P=0.019$ ). The differences observed in the comparisons between the DGF group (median [IQR], 3.23 [1.46–5.74]) and the AR group (median [IQR], 1.07 [0.43–2.11];  $P=0.106$ ) and the comparison between the AR group and the stable group (median [IQR], 0.78 [0.57–1.99];  $P=1.0$ ) were not statistically significant (Table 2 and Figure 1A).

In the peripheral blood analysis of microRNA 146a-5p even though the expression was heightened in the DGF group (median [IQR], 0.96 [0.46–3.88]) as compared to AR group (median [IQR], 0.27 [0.15–1.47]) and the stable group (median [IQR], 0.62 [0.31–0.90]) the differences observed were not statistically significant ( $P=0.083$ ) (Table 2 and Figure 1B).

### **Table 2 and Figure 1**

As illustrated in Figure 2, no significant correlation was found between expression level of miR-146a-5p in different compartments, biopsy and peripheral blood ( $r=0.084$ ;  $P=0.541$ ).

### **Figure 2**

Receiver operating characteristic (ROC) curve of the biopsy analysis was plotted for assessment of diagnostic parameters of miRNA 146a-5p gene expression for the DGF diagnosis. The area under the curve (AUC) was 0.75 (95% CI: 0.62–0.88). Using a cutoff point of 1.64 at the ROC curve, i.e., a 64% increase in gene expression relative to controls, the obtained parameters were: sensitivity, 67.0%; specificity, 64.0%; positive predictive value, 73.3%; and negative predictive value, 56% ( $P=0.002$ , Pearson's chi-square test) (Figure 3A). ROC curve of the peripheral blood analysis was plotted for assessment of diagnostic parameters of miRNA 146a-5p gene expression for the DGF diagnosis. The AUC for miR-146a-5p was 0.67 (95% CI 0.52–0.81). Using a cutoff point of 0.63 on the ROC curve, i.e., a 63% increase in gene expression relative to controls, the obtained parameters were: sensitivity, 64%; specificity, 64%; positive predictive value, 72.4%; and negative predictive value, 53.8% ( $P=0.036$ , Pearson's chi-square test) (Figure 3B).

### **Figure 3**

## DISCUSSION

Delayed graft function is a peculiar and very frequent form of acute kidney injury (AKI) that occurs immediately after renal transplantation. Its incidence is of around 25% in the United Network for Organ Sharing (UNOS) in North America but is substantially higher in Brazil (8), besides it carries a worst graft prognosis in terms of graft and perhaps patient survival. Similar to native kidney AKI survivors DGF exhibit a significant risk of developing chronic kidney graft disease (CKD), with a course to accelerated end-stage renal disease (8,25,26).

The phenomena of ischemia and reperfusion injury (IRI) that occur after renal transplantation is the main driver of the DGF clinical phenotype and perhaps in its more serious forms may lead to graft primary non function. IRI also promotes activation of the innate and adaptive responses of the immune system, leading to processes with are potentially harmful to the kidney graft. It is believed that these injuries may also facilitate or trigger mechanisms of acute rejection (AR) and later, by gene reprogramming, metabolic and tissue changes may culminate in tissue graft fibrosis and chronic loss of function (8,9).

Accurate and clinically useful biomarkers in AKI and IRI remain to be discovered. Early expression and accuracy are therefore critical parameters to be sought in AKI/IRI biomarker discovery (27). Many disease states with significant inflammation, such as IRI and acute rejection have been associated with alterations in miR expression profiles (27). MicroRNAs are key regulators of cell responses to many stimuli and can be secreted to the extracellular environment. Therefore, they can be detected in body fluids and this characteristic, among others, are contributing to the emerging studies as disease biomarkers in many situations (27). The search for noninvasive biomarkers reflecting intra-graft events opens important avenues for diagnosis, prognosis and therapeutic monitoring in transplantation science. In the present study miR-146a-5p was assessed as potential biomarker of IRI that occurs in DGF after renal transplantation (21,27).

The precursor pri-miR, miR-146a has being shown to be modulated in an experimental model of renal IRI in mice and in patients with IgA nephropathy. In this study the Mir levels in the renal tissue were found to be correlated with injury severity (21). This precursor is processed into mature miR-146a-5p which has being shown to be related to ischemia and renal IRI.

In the analysis of the renal tissue in present study, expression of miR-146a-5p, was found to be significantly increased in biopsies of the group of patients with DGF. In the sub

group analyses comparison of the DGF group presented higher expression as compared with patients with the group of patients with stable graft function. A statistically non-significant difference was found in the comparison between the DGF and AR groups and very similar levels of expression were found in the comparison between the AR and stable groups. In the analysis of the miR-146a-5p obtained from the peripheral blood samples we observed that the levels of expression were also higher in the DGF group, in comparison with the group of stable patients. In this analysis the differences however were of borderline statistical significance. Numerically the DGF group presented higher levels of expression.

Amrouche and colleagues evaluating this molecule found that it may act as general regulator of the innate immune response in not only immune cells but also cells that are targeted by inflammation in human renal tissue and urine. They observed an increase in expression of this biomarker the patients with acute tubular necrosis early after transplantation as compared with those patients who displayed normal allograft biopsy results (21). Experimentally they were able to demonstrate that renal ischemia induces tubular miR-146a expression in mouse kidneys after unilateral IRI and that, in comparison with the contralateral kidneys, the heightened levels of expression were still demonstrable up to 7 days after IRI. They also found that miR-146a was predominantly overexpressed in tubular cells. These results emphasize miR-146a as an important effector of the pathogenesis of the renal response to IRI injury (21).

Baker and collaborators studied the relative contributions of micro RNAs to the establishment of kidney disease. Analyzing human renal biopsies of patients with diabetic nephropathy, focal and segmental glomerulosclerosis, IGA nephropathy, membrane proliferative GN and controls they found that miR-146a-5p distinguished diabetic nephropathy from the other conditions and concluded that this molecule may be used as a biomarker of kidney diseases and is perhaps involved in disease mechanisms (28). Fraile and collaborators analyzed miR-146a-5p expression levels in the sera of AKI and control individuals. They found that that this microRNA is overexpressed in the serum of patients with AKI as compared to healthy controls. It was also found that its expression levels in the renal tissue and urine are correlated with injury severity (29-31).

Dziedic et al investigated the correlation between plasma renalase concentration and miR-146a-5p expression in hemodialysis patients. Patients with simultaneous low miR-146a expression and high level of renalase were found to have a significantly longer survival time compared with other patients and both miRNA-146a and renalase levels were estimated as independent prognostic factors of hemodialyzed patients' survival time (32). Micro RNA 146

has been shown to be involved in the regulation and control of inflammatory processes. It is also involved in regulation of the immune system acting in a negative regulatory loop or in a feedback system that interferes in the inflammatory responses (33,34). Renalase is secreted by many tissues besides including adipose tissue, cardiomyocytes, skeletal muscle, liver, central nervous system, and endothelium besides its production in the kidney (35). In putting these information together it is conceivable that miRNAs regulation of the renalase genes may participate in the physiopathogenesis, by altering its molecular basis, of cardiovascular and metabolic diseases (36).

Tang et al identified a miRNAs as regulators of target gene expression involved in shaping the immune response. These authors investigated the role of miR-146a in the the pathogenesis of systemic lupus erythematosus and found that this microRNA, among others, act as a negative regulator of innate immunity in these patients. Further analysis showed that underexpression of miR-146a negatively correlates with clinical disease activity and with interferon (IFN) scores in patients with systemic lupus erythematosus. The microRNA miR-146a is a negative regulator of the IFN pathway, underexpression of miR-146a contributes to alterations in the type I IFN pathway in lupus patients by targeting key signaling proteins. They suggested that their findings provide potential novel strategies for therapeutic intervention (37).

Previous research has shown that miRNAs can exit cells through exosomes and be transported in body fluids to other compartments, where they may act as local regulators (38,39). This biological property might, at least in part explain the discrepancies between tissue and peripheral blood expression found in the present study. Alternatively, and perhaps more plausible, it is possible that the higher amounts found in tissue allows a better and more reliable detection of the microRNA. It is also possible that the evaluation in the urine would provide interesting results in terms of applicability of this molecule expression as a non-invasive biomarker. However DGF recipients are frequently anuric and that would be a relevant limitation for its application as a non-invasive biomarker in renal transplantation.

Among the weaknesses of the present study perhaps the most important is the restricted number of individuals evaluated. That may have contributed to the negative results in the sub-group comparisons more importantly in the peripheral blood analyze.

Although a miRNA panel capable of distinguishing among the various etiologies of dysfunction that can affect renal allografts has yet to be established, we identified miR-146a-5p as a potential biomarker for differentiating IRI, with the DGF clinical phenotype, from

other conditions such as acute rejection. We suggest that the combined analysis of micro RNAs may lead to an accurate non-invasive diagnosis of kidney graft injuries.

In summary, further studies with other potential biomarkers of IRI and acute rejection, perhaps involving already surveyed microRNAs such as miR-146a-5p and miR-142-3 in different non-invasive samples might contribute to the development of accurate non-invasive biomarkers(s) for use in clinical organ transplantation (40).

### **Acknowledgements**

Financial support for this study was Medical Foundation RS, the Hospital de Clínicas de Porto Alegre Research Incentive Fund (FIPE-HCPA), and the Hospital de Clínicas de Porto Alegre Nephrology Research Fund.

### **Conflict of interest statement**

The authors declare no conflicts of interest.

## REFERENCES

1. Harmath CB, Wood CG 3rd, Berggruen SM, Tantisattamo E. Renal Pretransplantation Work-up, Donor, Recipient, Surgical Techniques. *Radiol Clin North Am.* 2016; 54(2):217-34.
2. Wilflingseder J, Regele H, Perco P, Kainz A, Soleiman A, Mühlbacher F, et. al. miRNA profiling discriminate stypes of rejection and injury in human renal allografts. *Transplantation.*2013; 95(6):835-41.
3. Muduma G, Shupo FC, Dam S, Hawken NA, Aballéa S, Odeyemi I, et. al. Patient survey to identify reasons for non-adherence and elicitation of quality of life concept associated with immunosuppressant therapy in kidney transplant recipients. *Patient Prefer Adherence.* 2016; 10:27-36
4. Doi K, Rabb H. Impact of acute kidney injury on distant organ function: recent findings and potential therapeutic targets. *Kidney Int.* 2016; 89(3):555-64.
5. Saat TC, van den Akker EK, IJzermans JN, Dor FJ, de Bruin RW. Improving the outcome of kidney transplantation by ameliorating renal ischemia reperfusion injury: lost in translation? *J Transl Med.* 2016; 14:20.
6. Denecke C, Tullius SG. Innate and adaptive immune responses subsequent to ischemia-reperfusion injury in the kidney. *Prog Urol.* 2014; 1:S13-9.
7. Menon MC, Keung KL, Murphy B, O'Connell PJ. The Use of Genomics and Pathway Analysis in Our Understanding and Prediction of Clinical Renal Transplant Injury. *Transplantation.* 2016; 100 (7):1405-14.
8. Helfer MS, Vicari AR, Spuldaro F, Gonçalves LF, Manfro RC. Incidence, risk factors, and outcomes of delayed graft function in deceased donor kidney transplantation in a Brazilian center. *Transplant Proc.* 2014; 46(6):1727-9.
9. Nankivell BJ, Alexander SI. Rejection of the kidney allograft. *N Engl J Med.* 2010; 363 (15):1451-62.
10. Bandari J, Fuller TW, Turner Ii RM, D'Agostino LA. Renal biopsy for medical renal disease: indications and contraindications. *Can J Urol.* 2016; 23(1):8121-6.
11. Broecker V, Mengel M. The significance of histological diagnosis in renal allograft biopsies in 2014. *Transpl Int.* 2015; 28(2):136-43.
12. Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, Chang J, Hidalgo LG, Beuscart T, et. al. Molecular microscope strategy to improve risk stratification in early antibody-mediated kidney allograft rejection. *J Am Soc Nephrol.* 2014; 25(10):2267-77.



13. Bhatt K, Kato M, Natarajan R. Mini-review: emerging roles of microRNAs in the pathophysiology of renal diseases. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016; 310(2):F109-18.
14. Haas M, Sis B, Racusen LC, Solez K, Glotz D, Colvin RB, et. al. Banff meeting report writing committee. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant*. 2014;2:272-83.
15. Aquino-Dias EC, Joelsons G, da Silva DM, Berdichevski RH, Ribeiro AR, Veronese FJ, et. al. Non-invasive diagnosis of acute rejection in kidney transplants with delayed graft function. *Kidney Int*. 2008; 73(7):877-84.
16. Suthanthiran M, Schwartz JE, Ding R, Abecassis M, Dadhania D, Samstein B, et. al. Clinical Trials in Organ Transplantation 04 (CTOT-04) Study Investigators. Urinary-cell mRNA profile and acute cellular rejection in kidney allografts. *N Engl J Med*. 2013; 369(1):20-31.
17. Liu J. Control of protein synthesis and mRNA degradation by microRNAs. *Curr Opin Cell Biol*. 2008; 20(2):214-21.
18. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004; 116(2):281-97.
19. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, et. al. A uniform system for microRNA annotation. *RNA*. 2003; 9(3):277-9.
20. Wei Q, Mi QS, Dong Z. The regulation and function of microRNAs in kidney diseases. *IUBMB Life*. 2013; 65(7):602-14.
21. Amrouche L, Desbuissons G, Rabant M, Sauvaget V, Nguyen C, Benon A, et. al. MicroRNA-146a in Human and Experimental Ischemic AKI: CXCL8-Dependent Mechanism of Action. *J Am Soc Nephrol*. 2017; 28(2):479-93.
22. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) *Method. Methods*. 2001; 25(4):402-8.
23. Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest*. 2011; 121(11):4210-21.
24. Srisawat N., Kellum J. A. Acute kidney injury: definition, epidemiology, and outcome. *Curr Opin Crit Care*,2011; 17(6):548–55.
25. de Sandes-Freitas TV, Felipe CR, Aguiar WF, Cristelli MP, Tedesco-Silva H, Medina-Pestana JO. Prolonged Delayed Graft Function Is Associated with Inferior Patient and Kidney Allograft Survivals. *PLoS One*. 2015; 10(12):e0144188.

26. Haase M, Shaw A. Acute kidney injury and cardiopulmonary bypass: special situation or same old problem? *Contrib Nephrol.* 2010; 165:33-8.
27. Li JY, Yong TY, Michael MZ, Gleadle JM. Review: The role of microRNAs in kidney disease. *Nephrology (Carlton).* 2010; 15(6):599-608.
28. Baker MA, Davis SJ, Liu P, Pan X, Williams AM, Iczkowski K A, et al. Tissue-Specific MicroRNA Expression Patterns in Four Types of Kidney Disease. *J Am Society Nephrology.* 2017; 28:1-8.
29. Aguado-Fraile E, Ramos E, Conde E, Rodríguez M, Martín-Gómez L, Lietor A, et. al. A Pilot Study Identifying a Set of microRNAs As Precise Diagnostic Biomarkers of Acute Kidney Injury. *PLoS One.* 2015; 10(6):2-15.
30. Wang G, Kwan BC, Lai FM, Chow KM, Li PK, Szeto CC. Elevated levels of miR-146<sup>a</sup> and miR-155 in kidney biopsy and urine from patients with IgA nephropathy. *Dis Markers.* 2011; 30(4):171-9.
31. Godwin JG, Ge X, Stephan K, Jurisch A, Tullius SG, Iacomini J. Identification of a microRNA signature of renal ischemia reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107(32):14339-44.
32. Dziejczak M, Powrózek T, Orłowska E, Koch W, Kukula-Koch W, Gawel K, et al. Relationship between microRNA-146a expression and plasma reninase levels in hemodialyzed patients. *PLoS One.* 2017; 12(6):e0179218.
33. Sonkoly E, Stähle M, Pivarcsi A. MicroRNAs and immunity: novel players in the regulation of normal immune function and inflammation. *Semin Cancer Biol.* 2008; 18(2):131-40.
34. Quinn SR, O'Neill LA. A trio of microRNAs that control Toll-like receptor signalling. *Int Immunol.* 2011; 23(7):421-5.
35. Zbroch E, Małyszko J, Małyszko J, Koc-Żórawska E, Myśliwiec M. Reninase, kidney function, and markers of endothelial dysfunction in renal transplant recipients. *Pol Arch Med Wewn.* 2012; 122(1-2):40-4.
36. Kalyani A, Sonawane P J, Khan AA, Subramanian L, Ehret GB, Mulasari AS, et al. Post-Transcriptional Regulation of Reninase Gene by miR-29 and miR-146 MicroRNAs: Implications for Cardiometabolic Disorders. *J Mol Biol.* 2015; 427(16):2629-46.
37. Tang Y, Luo X, Cui H, Ni X, Yuan M, Guo Y, et. al. MicroRNA-146A contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins. *Arthritis Rheum.* 2009; 60(4):1065-75.

38. Gibbins DJ, Ciaudo C, Erhardt M, Voinnet O. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol.* 2009; 11(9):1143-9.
39. D'Alessandra Y, Devanna P, Limana F, Straino S, Di Carlo A, Brambilla PG, et. al. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2010; 31(22):2765-73.
40. Domenico TD, Joelsons G, Montenegro RM, Manfro RC. Upregulation of microRNA 142-3p in the peripheral blood and urinary cells of kidney transplant recipients with post-transplant graft dysfunction. *Braz J Med Biol Res.* 2017; 50(4):1-7.

**Table 1.** Demographic profile studied Patients and Transplant Variables

Variables	Stable n=13	DGF n=33	AR n=9	P
Age (years; mean±SD)	48.3±12.2	46.8±14.5	42.8±11.6	0.632*
Sex (male/female)	9/4	15/18	4/5	0.318**
Race (white/nonwhite)	11/2	28/5	8/1	0.950**
Donor age (years; mean±SD)	45.6±10.4	46±16.9	42.8±17	0.864*
Donor sex (male/female)	4/9	17/16	4/5	0.444**
Early graft dysfunction (yes/group total)	9/4	29/4	7/2	0.434**
HLA mismatches (A, B, DR; mean±SD)	2.53±0.5	2.2±0.8	2.5±0.5	0.252*
Last PRA (%; median (IQR))				
Class I	1 (0–23.5) <sup>a</sup>	7.0 (0–21.5) <sup>a</sup>	11 (0–24.1) <sup>a</sup>	0.430*
Class II	2 (0–28.5) <sup>a</sup>	1.5 (0–22) <sup>a</sup>	2.5 (0–24) <sup>a</sup>	0.930*
Initial immunosuppression (n; %)				0.069**
No induction	6 (46.2)	10 (30.3)	4 (44.4)	0.518*
Rabbit anti-thymocyte globulin	1 (7.7.)	16 (50)	4 (44.4)	0.029*
Basiliximab	6 (46.2)	6 (18.8)	1 (11.1)	0.091*
Cold ischemia time (h; mean± SD)	20±5.1	25.2±7.7	21.8±7.4	0.196*
Underlying renal disease (n; %)				0.509**
Unknown	6 (46.2)	7 (22.6)	4 (50)	0.165*
HTN	5 (38.5)	13 (39.4)	4 (44.4)	0.955*
DM	3 (23.1)	8 (24.2)	0 (0)	0.259*
HTN+DM	1 (8.3)	4 (12.5)	0 (0)	0.554*
APKD	2 (16.7)	4 (12.5)	1 (12.5)	0.934*
Other	0 (0)	8 (25.8)	2 (25)	0.147*
Serum Creatinine at Biopsy (mg/dL; mean ± SD)	2.5±1.9 <sup>a</sup>	5.7±4 <sup>b</sup>	3.8±3.3 <sup>ab</sup>	0.022*
Time to biopsy (days; median [IQR])	99 [86–116] <sup>b</sup>	14 [12–26] <sup>a</sup>	58 [14–331] <sup>ab</sup>	0.001***

SD: standard deviation; HLA: human leukocyte antigen; HTN: hypertension; DM: diabetes mellitus; APKD: autosomal dominant polycystic kidney disease; \*Analysis of Variance (ANOVA); \*\* Pearson's chi-square; \*\*\* Kruskal-Wallis test; <sup>a,b</sup> Equal letters do not differ by the Tukey (ANOVA) or Dunn (Kruskal-Wallis) tests at the 5% level of significance.

**Table 2.** miR-146a-5p expression\*in the renal tissue, peripheral blood in the studied groups of patients

	<b>STABLE (n=13)</b>	<b>DGF (n=33)</b>	<b>AR (n=9)</b>	<b>P-value</b>
<b>Biopsy</b> miR-146a-5p	0.78 [0.57 –1.99]	3.23 [1.46 - 5.74]	1.07 [0.43 – 2.11]	0.008
<b>Peripheral Blood</b> miR-146a-5p	0.62 [0.31-0.90]	0.96 [0.46- 3.88]	0.27 [0.15 -1.47]	0.083

\*Median [IQR]; P-values determined by Kruskal–Wallis/Mann–Whitney *U* test.

Figure 1.

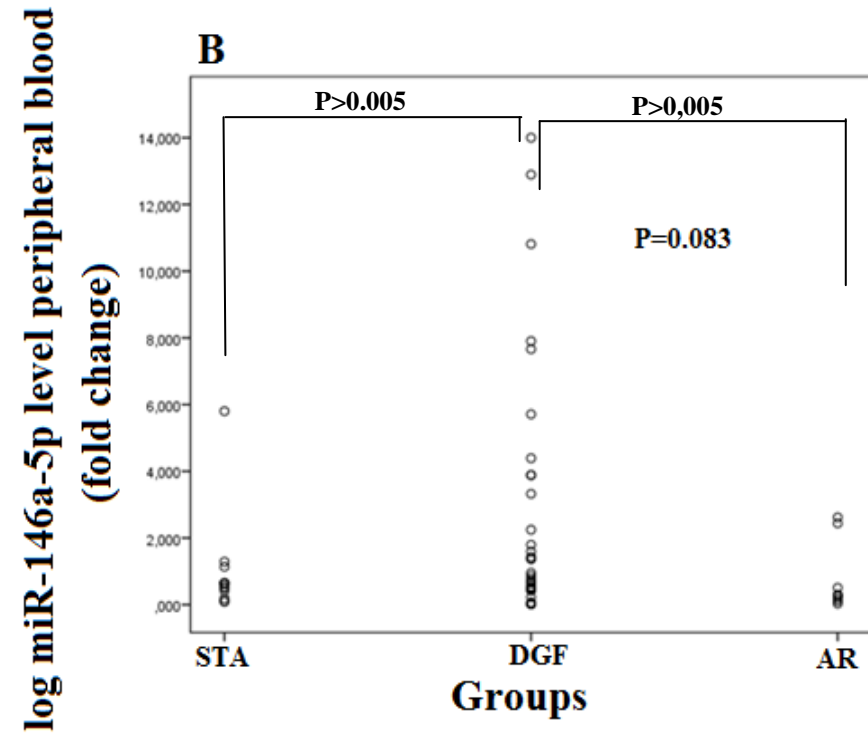
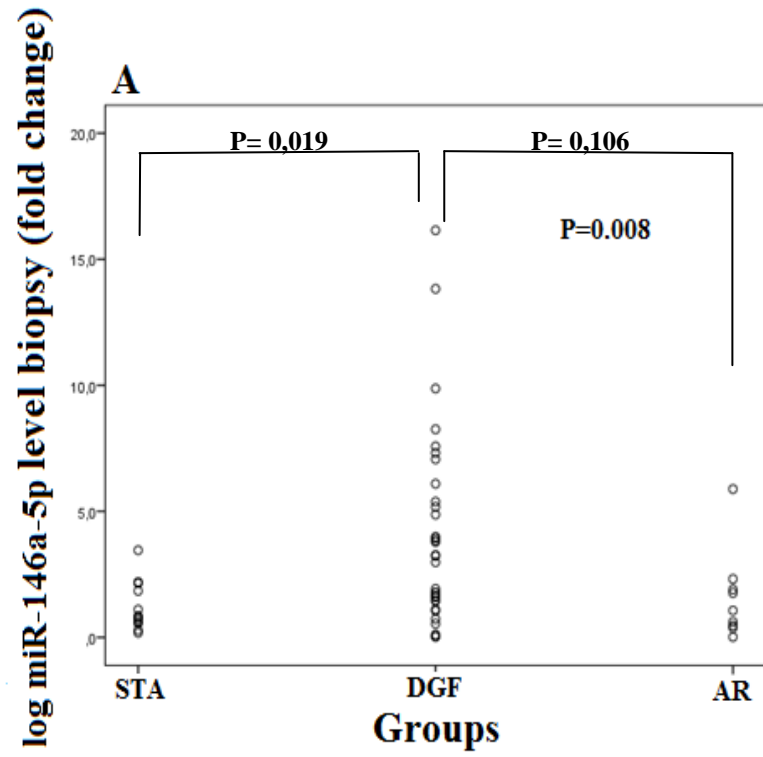


Figure 2.

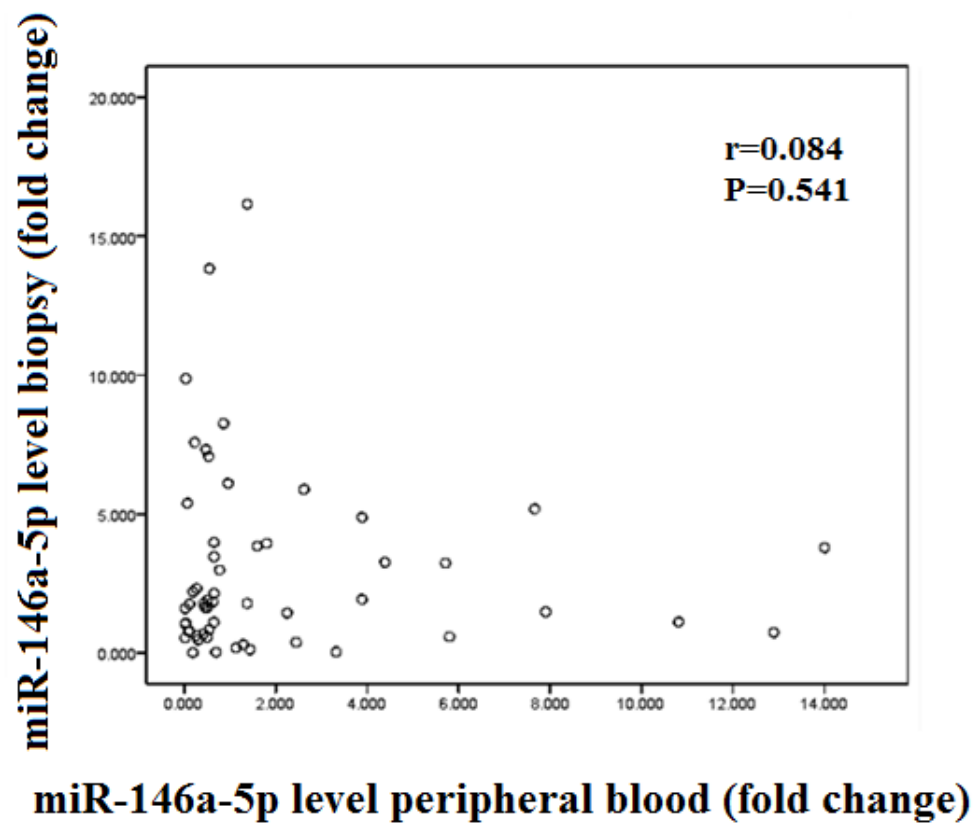
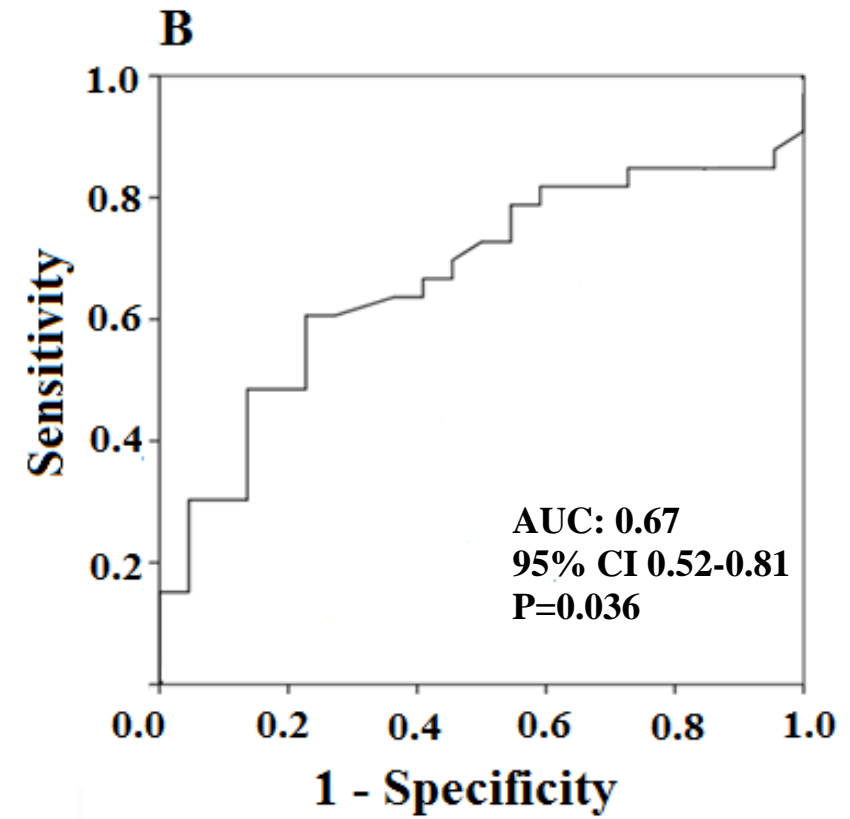
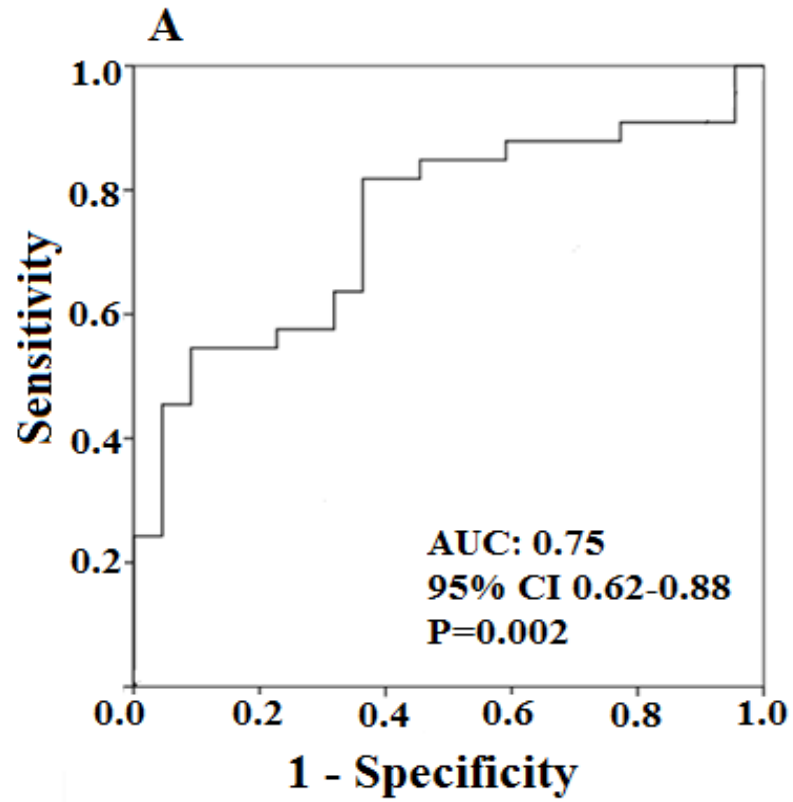


Figure 3.





**Figure 1.** (A) Comparison of expression levels of miR-146a-5p in the renal tissue in the diagnostic categories (B) Comparison of the expression of the miR-146a-5p in peripheral blood in diagnostic categories

**Figure 2.** Correlation between expression of miR-146a-5p levels at the renal tissue and peripheral blood.

**Figure 3.** (A) ROC curve of the miR-146a-5p expression levels do the diagnoses of delayed graft function at the renal tissue; (B) ROC curve of the miR-146a-5p expression levels do the diagnoses of delayed graft function at the peripheral blood.

## 7. ARTIGO DE REVISÃO SUBMETIDO

### MicroRNAs as Biomarkers in Kidney Transplantation and Acute Rejection

Patricia Milhoransa<sup>1,4</sup>

Marina Siebert<sup>2,3</sup>

Mariane dos Santos<sup>1,4</sup>

Roberto Ceratti Manfro<sup>1,3,4\*</sup>

<sup>1</sup>Post-Graduate Medical Sciences Program, School of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup>Molecular and Protein Analysis Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Experimental Research Center, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>3</sup>Post-Graduate Program in Gastroenterology and Hepatology, School Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>4</sup>Division of Nephrology, Renal Transplant Unit, Molecular Biology Laboratory Applied to Nephrology, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

**\*Corresponding author**

Roberto C. Manfro MD, PhD

Renal Transplant Unit, Division of Nephrology

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Av. Ramiro Barcelos 2350 – CEP 90040-003, Porto Alegre/RS, Brazil

Phone: 55 (51) 3359-8295 Fax: 55 (51) 3359-8121.

e-mail: rmanfro@hcpa.edu.br

## **Abstract**

Renal transplantation provides a significant increase in life expectancy for patients with end-stage kidney diseases. Despite the unequivocal progresses made in the last decades, many grafts injuries still jeopardize graft function leading to its loss. Currently, the allograft biopsy is the gold standard for diagnosing such conditions. However, it has many limitations including risk and cost. Therefore, it is desirable to develop non-invasive biomarkers able to lead to the diagnosis of graft injuries. This is particularly true during the delayed graft function (DGF) period in which the functional parameters are not available. MicroRNAs regulate their target genes through mechanisms of translational repression and messenger RNA (mRNA) degradation. A single miRNA can regulate the expression of hundreds of mRNAs and proteins, deregulation of miRNAs can lead to disruption and suppression of genes that operate in intracellular signaling cascades leading to disease conditions. Technological advances have allowed the accurate detection of miRNAs in biological fluids providing either qualitative or quantitative results. Here we reviewed the literature in which miRNAs were analyzed as injury markers in renal transplantation mainly for the diagnosis of acute rejection (AR). In cross sectional studies miRNAs were found to be useful markers of AR in renal transplant patients and their heightened expression may become useful on aiding the diagnosis of AR during the DGF period.

**Keywords:** kidney disease, kidney transplantation, acute kidney rejection, biomarker, microRNA.

## **Introduction**

Kidney transplantation has become the treatment of choice for many patients with end-stage renal failure. Compared to other forms of renal replacement therapy, transplantation provides a significant increase in life expectancy and quality of life. However, performing transplants between genetically distinct individuals, elicits a strong response of the recipients immune system that, unless modified by adequate immunosuppression, leads to irreversible organ failure. Acute rejection (AR) is a major complication following renal transplantation and may lead to its failure at any time during the post-transplant course. Under the currently employed immunosuppressive regimens, AR occurs in around 10-20% of patients during the first post-transplant year. Besides rejection many other injuries may jeopardize grafts function and survival, including mainly infections (fungal, bacterial and viral) and drug toxicities. For most situations the diagnosis relies on a biopsy that is performed to elucidate graft dysfunction and currently there are no reliable non-invasive tools to the diagnosis prior to the occurrence of graft dysfunction. Overtime non-invasive molecular diagnosis of allograft rejection have being developed by using body fluids, such as urine and peripheral blood, for mRNA and microRNAs evaluation as candidate biomarkers. The objective of this article is to review the current status of the studies involving microRNAs as biomarkers of kidney allograft injuries specially ischemia-reperfusion and acute rejection. The research for articles was carried out in the Pubmed database, the period for inclusion of articles had a limit of research in the last 10 years and research was in humans.

## **Discovery and biogenesis of microRNAs**

MicroRNAs (miRNAs) are endogenous small non-coding RNAs of approximately 18-22 nucleotides in length, involved in gene regulation, that play key roles in many biological pathways in plants, animals and viruses[6]. These molecules are specifically encoded by genes that are mainly located in intergenic or intronic regions of their target genes[2]. Since the discovery of miRNAs, in 1993, the knowledge on their biogenesis, mechanisms of action and biological functions has improved remarkably [6,10,36,40]

miRNAs are transcribed by RNA polymerase II into primary transcripts called pri-miRNAs. These are long structures that have 5' (a 5'-triphosphate bond between the 5'

precursor molecule, a nucleotide for protection against ribonucleases) and a poly(A) tail that allows protein binding and ensure stability of the molecule. Pri-miRNAs are arranged in a central stem, in which two RNA segments with complementary bases (by Watson-Crick pairing) are paired [4, 27]. This sequence is flanked at one side by other non-paired bases and across the loop region, where the base pairs are not complementary, forming circular handles, assuming the format of a "hair clip" (hairpin). Inside the core, non-paired regions are cleaved by RNaseIII Drosha and Parsha/DGCR8. As a result, only the stem and loop regions remain with approximately 70 nucleotides in length, called precursor miRNAs (pre-miRNAs) [4,47]. These pre-miRNAs are then transported to the cytoplasm via exportin-5 and cleaved by the RNase III Dicer enzyme complex/argonaut, which removes the terminal loop forming miRNAs-duplex of approximately 22 nucleotides with short 3'-overhangs. One strand of the miRNA is degraded by an ATP-dependent RNA helicase; the other strand, that remains functional, is incorporated into the RNA-induced silencing complex (RISC). RISC is composed of several proteins that guide the silencing machinery to the target messenger RNA (mRNA), inhibiting its transcription or promoting its degradation (Figure 1) [4, 27, 47].

### Figure 1

The miRNAs mechanisms of action involve their binding primarily to the 3'-untranslated region (UTR) of mRNA targets through position 2 to 8 nucleotides at the 5' end of miRNA' sequence, also known as seed sequence. miRNAs regulate their target genes through two mechanisms, repression of translation or mRNA degradation. Perfect or near-perfect match between miRNA and its target mRNA target leads to mRNA degradation, while imperfect pairing mediates mRNA translational repression.

However, there is still at lack of knowledge about the reasons why a specific miRNA choose one mechanism instead of the other one [19,23,45].

A unique miRNA can control hundreds of different mRNAs and related biological pathways. At the same time, several miRNAs may regulate a specific mRNA [51]. These small RNA molecules exert control of processes such as development, cell proliferation, differentiation, apoptosis, metabolism and oncogenesis [6]. The dysregulation of such processes can lead to disruption and suppression of the genes that operate in the intracellular cascade signaling, resulting in new diseases or progression of already existent diseases [23-

45]. Previous studies suggest that miRNAs actively participate in the development and regulation of immune cells. Specific miRNAs have been identified as having significant impact on the differentiation of B and T cells and on the cellular process required for innate and adaptive immunity, including inflammation, signaling through T cell receptors and "toll-like" cell receptors" (TLR), production of cytokines, cellular function of T regulatory cells and presentation [11, 19,37,38]. Several diseases have been linked to disorders of the signaling process [36].

### **Ischemia and reperfusion of kidney allografts**

After organ retrieval, especially in deceased donor transplantation, the kidney goes through a period of cold ischemia time while it is preserved by cold static storage or pulsatile machine perfusion. During this period there is no blood circulation, which is only restored after vascular sutures and release of the surgical clamps [28]. These processes lead to the ischemia and reperfusion injuries and trigger a non-specific inflammatory cascade, characterized by lymphocytic infiltration followed by injuries to the parenchymal tissue and causing damage to the graft [2,24,17,28]. Briefly, hypoxia due to low oxygen availability decreases adenylatecyclase activity, cyclic adenosine monophosphate (cAMP) levels and intracellular adenosine triphosphate (ATP) activity. Also, there is a dysregulation of calcium homeostasis that occurs concomitantly to an increment in vascular permeability [15,37]. These processes lead to the activation of cell death programs such as apoptosis, necrosis and autophagy as a result of significant changes in gene transcription [37]. During the DGF period the renal graft has poor or no function and this is mostly due to ischemia and reperfusion injury (IRI). This condition is associated with increased risk of allograft rejection, both acute and chronic, ultimately resulting in graft loss [3,39]. DGF is the most common complication in the immediate post-transplant period and is usually defined by the need for dialysis in the first week after transplantation [21].

As the blood flow to the graft is reestablished, right after the release of the vascular clamps, the reperfusion injuries start to take place. Reperfusion leads to the production of oxygen-free radicals and activates an inflammatory response [31]. Ischemia and reperfusion injury (IRI) is a complex situation involving renal vasoconstriction and tubular damage. The

proposed mechanisms of IRI include anoxia, release of reactive oxygen molecular species, especially superoxide, hydrogen peroxide and radical hydroxyl [9,41]. Neutrophils influx is followed by the release of oxygen free radicals [16,33]. Calcium is a mediator of injury of failure participating in the pathogenesis of vasoconstriction and mesangial constriction [8].

IRI injuries facilitate the activation of immune pathways, including the recognition of new antigens by antibodies and activation of the complement system [31,41]. These important and inevitable processes have the potential to affect cellular integrity and are major players in the initial injury to the graft. In the long term they are involved in the occurrence of structural changes, including interstitial fibrosis [8]. Figure 2 depicts schematically the steps involved in the ischemia and reperfusion injuries of organ grafts.

## **Figure 2.**

### **Acute rejection of kidney allografts**

Acute rejection (AR) is still a frequent and ominous complication in clinical kidney transplantation [33]. It poses a risk for allograft loss, partial or complete permanent loss of function and it may occur at any time after transplantation. AR involves cellular and antibody-mediated components and may affect several organ structures initiating by graft endothelium [16]. The process initiates by the recognition of HLA antigens of the donor by antigen presenting cells that present HLA peptides in the context of the Major Histocompatibility Complex (MHC) molecules to the T cell receptor-CD3 complex of CD4+ T lymphocytes of the recipient (signal 1). This signal is amplified by the interaction of co-stimulatory signals (signal 2) from which CD28-CD152 and CD40- CD40L are the better described molecules [7,8,21]. After the engagement of signals 1 and 2, a complex cascade of intracellular transduction signals events is activated leading to the activation of transcription factors, resulting in the activation of many cytokine genes, in special the interleukin-2 (IL-2) gene [5,46].

The major targets of the immune system are tubular epithelial cells and surrounding structures, glomerular capillaries and allograft vessels [43]. Acute cellular rejection may occur early after transplantation and is characterized predominantly by T lymphocytes infiltrate accompanied by B lymphocytes, macrophages, and granulocytes [26,34].

Antibody-mediated rejection may be acute, chronic or chronicin activity. It occurs through the activation of B lymphocytes differentiated into antibody- producing plasma cells, through release of soluble mediators by CD4+ lymphocytes [26,34]. Anti-HLA antibodies recognize specific sequences of amino acids present in the HLA antigens expressed on the surface of endothelial cells of the graft and activate the complement cascade, producing damage of the graft microcirculation [12,34]. Anti-allograft immunological reactions may exist sub-clinically and may also persist after a rejection treatment in both cases eliciting mechanisms that ultimately lead to progressive graft fibrosis followed by loss of function [25]. Rejections are usually clinically suspected on the scenario of graft dysfunction and currently graft biopsies interpreted according to the Banff 07 classification are the gold standard for the diagnosis [1]. However, the biopsy approach has many limitations such as insufficient sampling (as a consequence of the focal nature of the rejection processes), poor reproducibility of interpretation, complications (bleeding, hematomas, arterio-venous fistulas, graft loss and even death) and high cost. Finally, biopsies accuracy cannot be validated due to the fact that there is no other independent methodology for assessing the existence of rejection [12,34]. These limitations have encouraged the search for alternative methods for the diagnosis of graft injuries including acute rejection. To date, among the non-invasive molecular methods that are under development, miRNAs analyzes are shading new light as promising biomarkers for the diagnosis of injuries associated to renal transplantation [43].

As miRNAs play an important role in the regulation of protein synthesis, the assessment of their expression may provide information regarding organ physiology in normal and diseased states. In an expression atlas of human and mouse miRNAs, great similarity between species was found, and exclusive expression in a specific organ appeared to be very rare [20,34]. Most miRNAs were found in more than one organ. Finally, expression of most miRNAs was ubiquitous and some showed some degree of tissue specificity [20].

### **Molecular biomarkers studies involving miRNAs in renal transplantation**

In the last two decades molecular biomarkers have been actively searched in the field of organ transplantation. Most of the research in this field has being performed in renal



transplantation analyzing mRNA in biopsies, urine and peripheral blood lymphocytes utilizing either high-throughput platforms and/or quantitative real-time PCR. The great majority of these studies are cross-sectional studies with few follow-up studies[25,26,43]. More recently miRNAs analyzes have been proposed for aiding diagnosis, establishing prognosis and evaluate response to the therapy in renal diseases and transplantation and are thought to provide promising biomarker candidates due to their stability and presence in biological fluids such as urine and blood [20,34].

Upon the discovery of miRNAs, some research groups have studied them as possible biomarkers of renal allograft injuries. A summary of the relevant findings is shown in Table 1 and briefly described below.

Lorenzen and colleagues evaluated the expression of miRNAs in the urinary sediment of kidney transplant recipients and found that miR-10a, miR-10b and miR-210 were differentially expressed in patients with AR in comparison to patients with stable graft function. Micro R-210 was found to be decreased in renal transplant patients with AR and the analysis of its expression could predict the decline of glomerular filtration rate at one year after transplantation [30]. These authors suggested that miR-210 is a potential biomarker for acute renal rejection and long-term graft function [30].

Anglicheau and colleagues investigated the expression of miRNAs in the graft tissue and peripheral blood of kidney transplant recipients with AR. The authors also investigated whether these expressions would accurately predict AR of the renal graft. They found that certain miRNAs (miR-142-5p, miR-155 and miR-223) are overexpressed in renal biopsies of patients with AR and that these miRNAs are also present at higher levels in normal mononuclear cells obtained from peripheral blood. Other miRNAs were under expressed (miR-30a-3p, miR-10b or let-7c) in rejection.

Samples [1]. The authors reported that, among the 53 miRNAs differentially expressed in AR biopsies, 43 were under expressed and only 10 were overexpressed [1].

Soltaninejad and colleagues studied the expression levels of miR-142-5p, miR-142-3p, miR-155 and miR-223 in paired biopsy and peripheral blood mononuclear cell (PBMC) samples of renal allograft recipients with acute T-cell mediated rejection in comparison with normal allografts. The study revealed that evaluation of miR-142-3p and miR-223 expression levels in PBMC samples could be used as non-invasive predictive biomarkers of rejection and that miR-142-5p, miR-142-3p, miR-155 and miR-223 were also differentially expressed in

biopsies samples of patients with rejection. Moreover, the authors suggest that a combination of a miRNAs profile should be preferred as opposed to the analysis of a single miRNA as a diagnostic tool to identify AR [13].

Tao and co-workers, analyzed the miRNAs profile in serum samples from kidney transplant recipients aiming at the non-invasive detection of AR by using a miRNA array technique that was followed by quantitative real-time PCR validation.

Two miRNAs, miR-99a and miR-100, were found to be up-regulated in the sera of patients with AR [48]. Interestingly, miR-99a also exhibited a potential in discriminating patients with AR from those with DGF [48].

Sui and colleagues compared miRNA expression in renal biopsies of patients with acute rejection after renal transplantation with biopsies of kidney transplant recipients without rejection [44]. The authors reported an acute rejection signature of 20 miRNAs detected in 3 biopsies from patients with acute rejection as compared to 3 control renal biopsies. They found that 12 miRNAs were down-regulated and 8 miRNAs were up-regulated in the rejection samples. Furthermore, two miRNAs were validated by qRT-PCR, namely miR-320 and miR-324-3p, and were suggested to be potentially useful diagnostic biomarkers of acute rejection with perhaps a role on the pathogenesis of this process [44].

Finally, Lucille and colleagues performing *in vitro* and *in vivo* experiments, identified miR-146a as a mediator of the renal response to injury that limits the consequences of inflammation [32]. *In vitro* experiments in fibroblasts have shown that miR-146a is induced by senescence and acts as a negative regulator of excessive IL-6 and CXCL8 secretion, which is a hallmark of senescence [32]. *In vivo*, miR-146a contribute to response after renal IRI by influencing the tubular epithelia response to inflammation via NF- $\kappa$ B pathway down regulation, of CXCL8 secretion, limiting post ischemic renal fibrosis [32].

The up regulation of miR-146a in the kidney tissue and urine of kidney transplant recipients suggests a role of miR-146a in human renal IRI [32]. Collectively, these results emphasize miR-146a as an important effector in the pathogenesis of the renal response to IRI injury [32].

In conclusion the discovery of miRNA has produced a giant step forward in the molecular biology field. The stability of miRNAs make them excellent candidates for non-invasive monitoring of the kidney graft in the urine and/or in the peripheral blood. There is an accumulating knowledge about diseases-specific miRNA signatures of distinct kidney graft

injuries. Identification of biomarkers is crucial for improving organ allograft outcomes, as this may allow accurate prediction of an individual's risk of graft dysfunction and individualization of immunotherapy [18]. Various genome-based tools are under development to predict early graft dysfunction, disease recurrence and personalized treatment options [14,22,29,35,49,50]. It is expected that in the future miRNA biomarkers might become relevant, as injury markers in organ transplantation, particularly as non-invasive biomarkers of injury such as AR and IRI in kidney graft recipients. It is expected that in the future miRNA biomarkers might become relevant, as injury markers in organ transplantation, particularly as non-invasive biomarkers of injury such as AR and IRI in kidney graft recipients. Although there are so many microRNAs being studied, it is worth remembering the importance of selecting them for the study, considering important characteristics such as stability, presence in biological fluids, technique used and validation of the same, thus contributing to the research and new discoveries of targets for study.

### **Disclosures**

The authors have no conflicts of interest to disclose.

## REFERENCES

1. Anglicheau D, Sharma VK , Ding R, Hummel A, et al. MicroRNA expression profiles predictive of human renal allograft status. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106(13):5330-5.
2. Alarrayed S, El-Agroudy A, Al-Arrayed A, Ghareeb S, Farid E, Garadah T, et al. Why does kidney allograft fail? A long-term single-center experience. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 2011; 22(4):818-24.
3. Siedlecki A, Irish W; Brennan DC. Delayed graft function in the kidney transplant. *Am J Transplant*. 2011; (11):2279-96.
4. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004; (116)2:281-97.
5. Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR- a perspective. *J Mol Endocrinol*. 2005; 34(3):597-601.
6. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009; 136(2):215-33.
7. Balcells I, Cirera S, Busk PK. Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers. *BMC Biotechnol*. 2011;11:70.
8. Bhatt K, Mi QS, Dong Z. microRNAs in kidneys: biogenesis, regulation, and pathophysiological roles. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011; 300(3):F602-10.
9. Bijkerk R, van Solingen C, de Boer HC, de Vries DK, Monge M, vanOeveren-Rietdijk A, et al. Silencing of miRNA-126 in kidney ischemia reperfusion is associated with elevated SDF-1 levels and mobilization of Sca-1+/Lin- progenitor cells. *Microrna*. 2014; 3(3):144-9.
10. Chang TC, Mendell JT. microRNAs in vertebrate physiology and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2007; (8):215-39.
11. Aquino-Dias EC, Joelsons G, da Silva DM, Berdichevski RH, Ribeiro AR, Veronese FJ. et al. Non-invasive diagnosis of acute rejection in kidney transplants with delayed graft function. *Kidney Int*. 2008; 73(7):877-84.
12. Eltzschig, HK; Eckle, T. Ischemia and reperfusion – from mechanism to translation. *Nat Med*. 2011; 17:1391-401.
13. Soltaninejad E, Nicknam MH, Nafar M, Ahmadpoor P, Pourrezaghali F, Sharbafi MH, et al. Differential expression of microRNAs in renal transplant patients with acute T-cell

- mediated rejection. *Transpl Immunol.* 2015; 33(1):1-6.
14. Fleissner F, Goerzig Y, Haverich A, Thum T. Microvesicles as novel biomarkers and therapeutic targets in transplantation medicine. *Am J Transplant.* 2012; 12(2):289-97.
  15. Geddes CC, Woo YM, Jardine AG. The impact of delayed graft function on the long-term outcome of renal transplantation. *J Nephrol.* 2002; 15(1):17-21.
  16. Girlanda R, Kirk AD. Frontiers in nephrology: immune tolerance to allografts in humans. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18(8):2242-51.
  17. Gwinner W. Renal transplant rejection markers. *World J Urol.* 2007; 5:445-55.
  18. Godwin JG, Ge X, Stephan K, Jurisch A, Tullius SG, Iacomini J. Identification of a microRNA signature of renal ischemia reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; 107(32):14339-44.
  19. Harris A, Krams SM, Martinez OM. MicroRNAs as immune regulators: implications for transplantation. *Am J Transplant.* 2010; 10(4):713-9.
  20. Hartono C, Muthukumar T, Suthanthiran M. Noninvasive diagnosis of acute rejection of renal allografts. *Curr Opin Organ Transplant.* 2010; 15(1):35-41.
  21. Huang, X; Le QT; Giaccia AJ. Mir-210-micromanager of the hypoxia pathway. *Trends Mol Med.* 2010; (16):230-7.
  22. Bingaman AW, Farber DL. Memory T cells in transplantation: generation, function, and potential role in rejection. *Am J Transplant.* 2004; (4):846-52.
  23. Kim DH, Saetrom P, Snøve O Jr, Rossi JJ. MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(42):16230-5.
  24. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant.* 2008; 8(4):753-60.
  25. Kato M, Putta S, Wang M, Yuan H, Lanting L, Nair I, et al. TGF-beta activates Akt kinase through a microRNA-dependent amplifying circuit targeting PTEN. *Nat Cell Biol.* 2009; 11(7):881-9.
  26. Lee SO, Masyuk T, Splinter P, Banales JM, Masyuk A, Stroope A, et al. MicroRNA15a modulates expression of the cell-cycle regulator Cdc25A and affects hepatic cystogenesis in a rat model of polycystic kidney disease. *J Clin Invest.* 2008; 118(11):3714-24.

27. Li JY, Yong TY, Michael MZ, Gleadle JM. Review: The role of microRNAs in kidney disease. *Nephrology (Carlton)*. 2010; 15(6):599-608.
28. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; 25(4):402-8.
29. Lorenzen JM, Haller H, Thum T. MicroRNAs as mediators and therapeutic targets in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2011; 7(5):286-94.
30. Lorenzen JM, Volkmann I, Fiedler J, Schmidt M, Scheffner I, Haller H, et al. Urinary miR-210 as a mediator of acute T-cell mediated rejection in renal allograft recipients. *Am J Transplant*. 2011; 10:2221-7.
31. Lorenzen JM. Vascular and circulating microRNAs in renal ischaemia-reperfusion injury. *J Physiol*. 2015; 593(8):1777-84.
32. Lucile A, Geoffroy D, Marion R, Sauvaget V, Nguyen, C, Benon A, et al. MicroRNA-146a in Human and Experimental Ischemic AKI: CXCL8-Dependent Mechanism of Action. *J Am Soc Nephrol*. 2016; 28(2):479-93.
33. Meier-Kriesche HU, Ojo AO, Port FK, Arndorfer JA, Cibrik DM, Kaplan B. Survival improvement among patients with end-stage renal disease: trends overtime for transplant recipients and wait-listed patients. *J Am Soc Nephrol*. 2001; 12 (6):1293-6.
34. Melkonyan HS, Feaver WJ, Meyer E, Scheinker V, Shekhtman EM, Xin Z, et al. Transrenal nucleic acids: from proof of principle to clinical tests. *Ann N Y Acad Sci*. 2008; (1137):73-81.
35. Mas VR, Dumur CI, Scian MJ, Gehrau RC, Maluf DG. MicroRNAs as biomarkers in solid organ transplantation. *Am J Transplant*. 2013; 13(1):11-9.
36. Marí-Alexandre J, Sánchez-Izquierdo D, Gilabert-Estellés J, Barceló-Molina M, Braza-Boïls AS. miRNAs Regulation and Its Role as Biomarkers in Endometriosis. *Int J Mol Sci*. 2016; 17(1). pii: E93.
37. Newell KA, Asare A, Kirk AD, Gisler TD, Bourcier K, Suthanthiran M, et al. Immune Tolerance Network ST507 Study Group. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest*. 2010; 6:1836-47.
38. O'Connell, RM.; Tagano, KD; Boldin, MP, Cheng G, Baltimore D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; (104):1604-9.

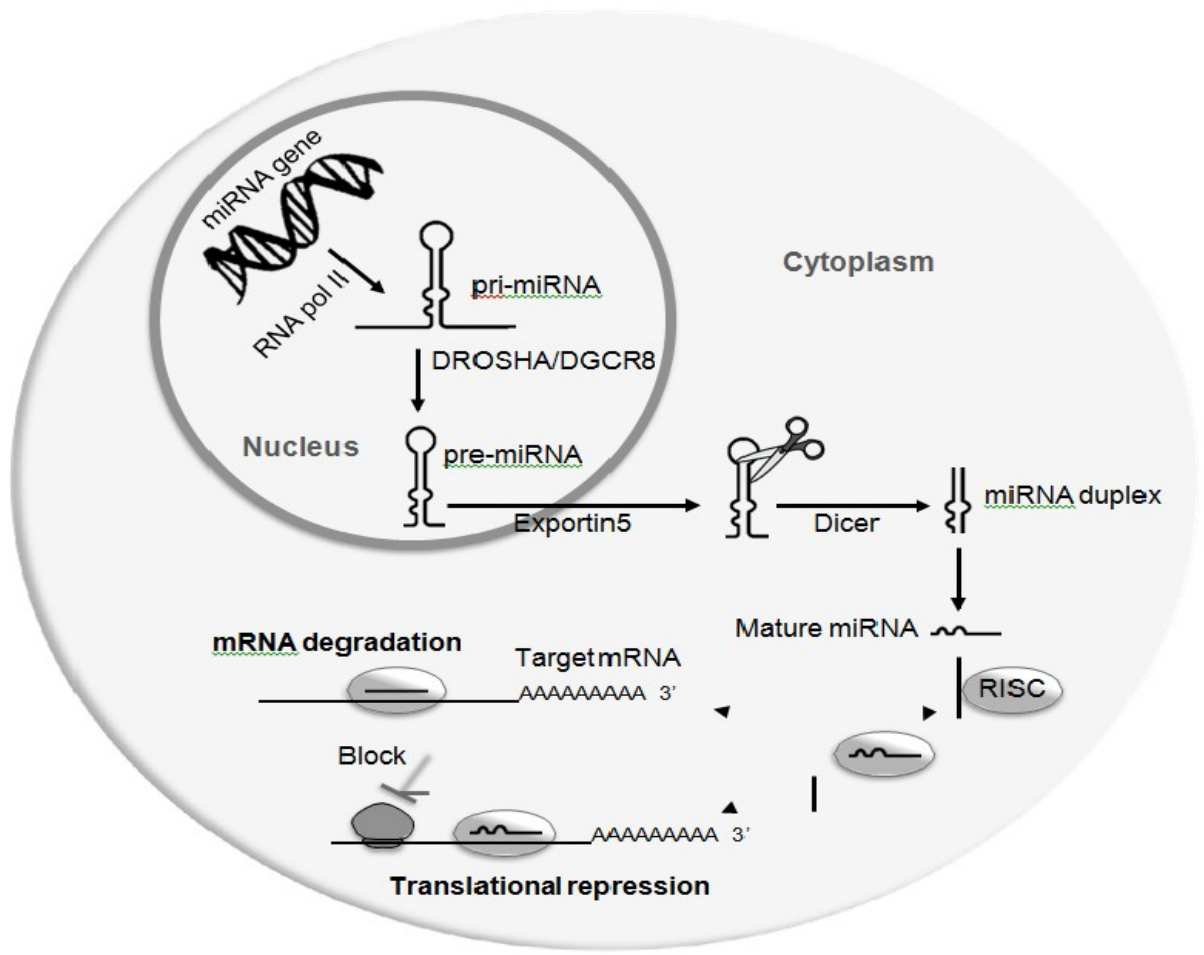
39. Grosso G, Corona D, Mistretta A, Zerbo D, Sinagra N, Giaquinta A, et al. Delayed graft function and long-term outcome in kidney transplantation. *Transplant Proc.* 2012;44:1879–83.
40. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 2000; 403(6772):901-6.
41. Serón D, Alexopoulos E, Raftery MJ, Hartley RB, Cameron JS. Diagnosis of rejection in renal allograft biopsies using the presence of activated and proliferating cells. *Transplantation.* 1989; (5):811-6.
42. Suthanthiran M. Human renal allograft rejection: molecular characterization. *Nephrol Dial Transplant.* 1998; (13):21– 4.
43. Haas M, Sis B, Racusen LC, Solez K, Glotz D, Colvin RB, et. al. Banff meeting report writing committee. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant.* 2014; 14(2):272-83.
44. Sui W, Dai Y, Huang Y, Lan H, Yan Q, Huang H. Microarray analysis of MicroRNA expression in acute rejection after renal transplantation. *Transpl Immunol.* 2008; 19(1):81– 5.
45. Shan J, Feng L, Luo L, Wu W, Li C, Li S, et al. MicroRNAs: Potential biomarker in organ transplantation. *Transplant Immunol.* 2011; (24):210-5.
46. Spiegel JC, Lorenzen JM, Thum T. Role of microRNAs in immunity and organ transplantation. *Expert Rev Mol Medicine,* 2011; (13):e37.
47. Sarma NJ, Tiriveedhi V, Ramachandran S, Crippin J, Chapman W, Mohanakumar T. Modulation of immune responses following solid organ transplantation by microRNA. *Exp Mol Pathol.* 2012; 3:378-85.
48. Tao J, Yang X, Han Z, Lu P, Wang J, Liu X, et al. Serum MicroRNA-99a Helps Detect Acute Rejection in Renal Transplantation. *Transplant Proceed.* 2015; (6):1683-7.
49. Van Aelst LN, Summer G, Li S, Gupta SK, Heggermont W, De Vusser K, et al. RNA Profiling in human and murine transplanted hearts: identification and validation of therapeutic targets for acute cardiac and renal allograft rejection. *Am J Transpl.* 2016; 16(1):99-110.
50. Wang E, Nie Y, Zhao Q, Wang W, Huang J, Liao Z, et al. Circulating miRNAs reflect early myocardial injury and recovery after heart transplantation. *J Cardiothorac Surgery.* 2013;8:1-26.

**Table 1.** Main studies that tested microRNAs as diagnostic tools in clinical renal transplantation.

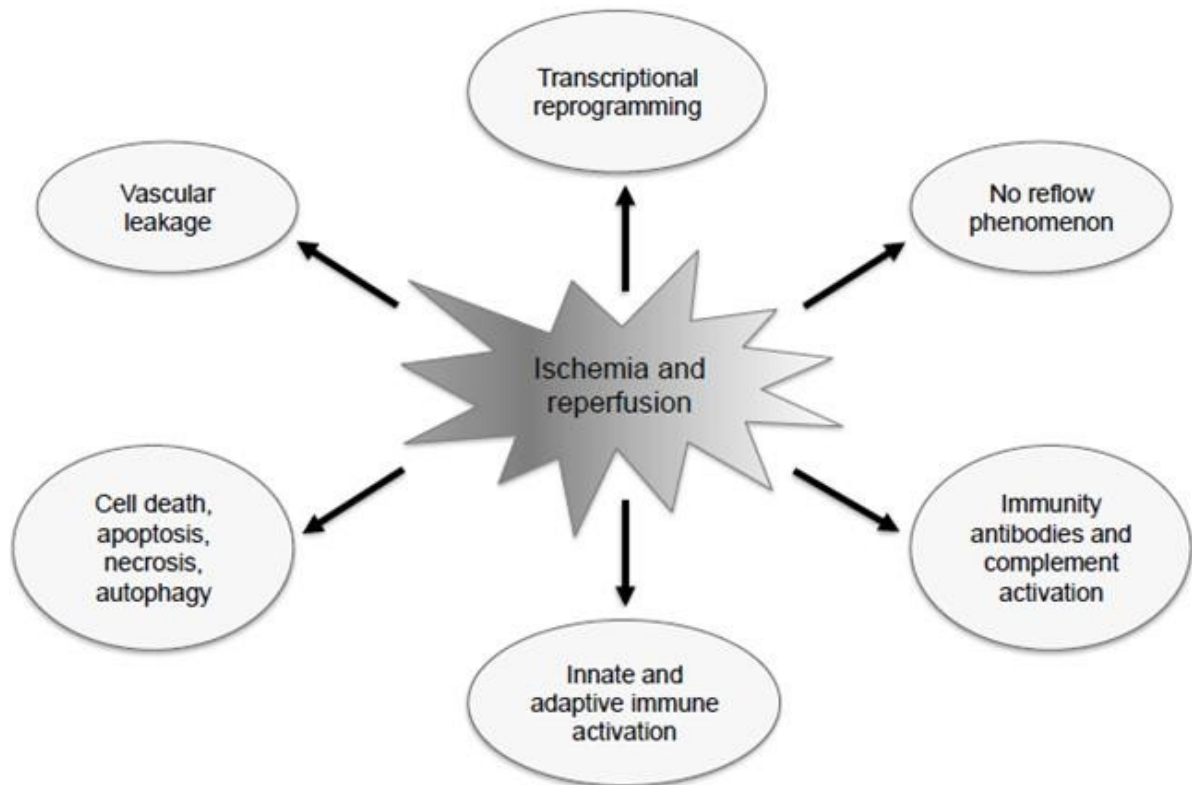
<b>Author (year)</b>	<b>Platform</b>	<b>Sample(s)</b>	<b>micro-</b>	<b>Main results</b>	<b>Reference</b>
Lorenzen (2011)	qPCR	Urine	miR-210, miR-10a, miR-10b	Potential biomarker for acute rejection and prediction of long-term GFR	[30]
Anglicheau (2009)	qPCR	Biopsy	miR-124-5p,miR-155, miR-223, miR-30a- 3p miR-10b, let-7c	Association of acute rejection with significant changes in expression miRNAs in renal tissue grafts	[1]
Soltaninejad (2015)	qPCR	Biopsy Blood	miR-142-5p, miR-142-3p, miR-155, miR-223	Diagnostics and predictive biomarkers of acute T-cell mediated rejection	[13]
Tao (2015)	qPCR	Serum	miR-99 a, miR-100	Biomarkers of AR of renal grafts	[48]
Sui (2008)	Microarray qPCR	Biopsy	miR-320, miR-324	Diagnostic biomarkers and probably involved in the pathogenesis of acute	[44]
Lucille (2016)	qPCR	Biopsy Urine	miR-146a	Potential biomarker for human renal ischemia-reperfusion injury	[32]



**Figure 1.** MicroRNA biogenesis (Adapted from Bath, K., 2011) [08].



**Figure 2.** Summarized phenomena involved in ischemia and reperfusion of organ allografts  
(Adapted from Harris, 2010) [19]



## Legend to the figures

**Figure 1.** Genes that encode miRNAs are transcribed into pri-miRNAs by RNA polymerase II and processed by an endonuclease (Parsha/Drosha and DGCR8) into fragments with stem and loop structures of about 70 nucleotides, called pre-miRNAs. These molecules are transported into the cytoplasm via Exportin-5 and processed in double mature forms by the Dicer enzyme, RNase III. The complementary strand is degraded and the functional one is incorporated into the RNA-Induced Silencing Complex (RISC), beginning the regulation of the messenger RNA (Adapted from Bath, K., 2011) [08].

**Figure 2.** Ischemia and reperfusion biological processes. Ischemia and reperfusion leads to the activation of cell death programs, including apoptosis (nuclear fragmentation, plasma membrane, cell shrinkage and loss of mitochondrial membrane potential and integrity), autophagy-associated cell death (cytoplasmic vacuolization, loss of organelles and accumulation of vacuoles with membrane whorls) and necrosis (progressive cell and organelle swelling, plasma membrane rupture and leakage of proteases and lysosomes into the extracellular (Adapted from Harris, 2010) [19].

← → ↻ 🏠 Seguro | <https://ees.elsevier.com/advms/default.asp> 🔑 ☆

## Advances in Medical Sciences

Contact us ✉  
Help ?

Username: milhoransa@ig.com.br  
Switch To: Author ▼ Go to: [My EES Hub](#)

Version: EES 2017.7

[home](#) | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#)

**Submissions Being Processed for Author PATRICIA MILHORANSA**

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 ▼ results per page.

Action ▲	Manuscript Number ▲▼	Title ▲▼	Initial Date Submitted ▲▼	Status Date ▲▼	Current Status ▲▼
<a href="#">Action Links</a>		MicroRNAs as Biomarker in Kidney Transplantation and Acute Rejection	May 31, 2017	May 31, 2017	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 ▼ results per page.

<< Author Main Menu

## 8. CONCLUSÕES

O transplante renal permanece sendo a melhor forma de tratamento para uma porção substancial dos pacientes com doenças renais em estágio final. Porém, muitas vezes diversas complicações surgem no seu curso, tais como a disfunção inicial, rejeições, infecções, toxicidades medicamentosas e neoplasias, entre outras. As bases moleculares de alguns desses processos tem sido analisadas em diferentes plataformas e perfis de expressão gênica vem sendo identificados, dessa forma contribuindo para o melhor entendimento dessas condições.

No presente estudo buscou-se validar um biomarcador da injúria de isquemia e reperfusão de transplantes renais e assim contribuir no difícil e oneroso manejo dessa condição. No tecido renal encontramos que o miR-146a-5p apresenta expressão diferenciada entre os grupos da classificação diagnóstica sem que no entanto tenha havido diferença significativa na comparação do grupo com disfunção inicial do enxerto com o grupo com rejeição aguda. Atribuímos esse resultado negativo na comparação dos subgrupos à falta de poder do estudo. Na avaliação não-invasiva, feita no sangue periférico, o miR-146a-5p apresentou diferenças não significativas de expressão entre os grupos. Novamente atribuímos esse resultado negativo na comparação dos subgrupos à falta de poder do estudo. Ademais, considerando-se a biologia e a quantidade do micro RNA em diferentes sítios é provável que análises em um número substancialmente maior de pacientes sejam necessárias para que diferenças sejam adequadamente identificadas.

Apesar de não termos estabelecido um perfil de miRNAs capaz de diferenciar a disfunção inicial do enxerto da rejeição aguda, nós identificamos o miR-146a-5p como um potencial biomarcador de lesão de isquemia e reperfusão em pacientes com disfunção inicial do enxerto na biópsia. Ressaltamos que a análise de outro biomarcador (miR-142-3p) previamente estudado pelo nosso grupo, mostrou potencial em diferenciar a rejeição aguda de outras causas de disfunções de enxertos renais, em análises no sangue periférico.

Concluimos que a análises da expressão molecular de micro RNAs, em especial as análises multigênicas, permanecem uma atraente e promissora área de estudo para a avaliação diagnóstica e entendimento fisiopatológico das disfunções dos enxertos renais.

## 9. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os miRNAs atuam basicamente na regulação da expressão do RNA mensageiro. Seus efeitos pleiotrópicos os tornam alvos atraentes para o melhor entendimento dos intrincados de mecanismos fisiopatológicos de patologias renais e de aspectos do transplante renal. Da mesma forma a sua validação como biomarcadores não invasivos pode auxiliar para diagnósticos mais precoces e prognósticos mais precisos fornecendo assim informações para o manejo de pacientes na prática clínica.

Ao concluir o presente estudo identificamos que avaliações mais robustas do o miR-146a-5p poderão levar ao desenvolvimento de estratégias não invasivas seguras para o manejo da disfunção inicial do enxerto renal talvez evitando a biópsia renal. Nós hipotetizamos que estudos bem desenhados em que se avaliem múltiplos micro RNAs, talvez em conjunto com a avaliação de RNAs mensageiros, possam vir a produzir estratégias de monitorização que mudem a atual prática clínica do transplante de órgãos.

Esta tese está inserida na temática de uma das linhas de pesquisa do Grupo de Pesquisa em Nefrologia e Transplante Renal e do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada à Nefrologia do HCPA-UFRGS. Este estudo deverá ter seguimento por outros que sigam a metodologia descrita no parágrafo anterior assim auxiliar no desenvolvimento de biomarcadores moleculares não-invasivos para uso em transplante renal e Nefrologia.

Torna-se relevante mencionar que a área de pesquisa do grupo está vinculada à assistência e educação na área de saúde o que nos estimula a busca de novas técnicas, protocolos e ferramentas para o diagnóstico das agressões aos aloenxertos renais. Desta forma, busca-se auxiliar no avanço da saúde e no fortalecimento da pesquisa clínica e translacional.

## 10. ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A unidade de Transplante Renal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo presente termo de consentimento convida a participar do estudo: Avaliação da Expressão de Testes de Rejeição Aguda durante a Disfunção Inicial do Transplante Renal. Este estudo foi elaborado com o objetivo de identificar alterações renais relacionadas ao seu transplante renal de forma a propiciar que no futuro se possa evitar a necessidade de realizar biópsias renais. Os procedimentos a que os (as) Sr (as) serão submetidos são uma coleta de sangue (5mL) e uma coleta de urina (colher uma amostra em horário aleatório), para auxiliar na identificação das alterações renais, proporcionando um diagnóstico eficaz e seguro. Adicionalmente em um pequeno fragmento de uma biópsia renal, indicada para o manejo do seu transplante, será examinada por técnicas utilizadas neste estudo. Estes materiais serão analisados no laboratório de biologia molecular do serviço de Nefrologia. As colheitas de sangue (por punção da veia do braço) e urina não oferecem risco, podendo ocorrer apenas um pequeno desconforto na colheita de sangue, hematoma na área da punção da veia e na urina, um desconforto na hora da colheita para armazenar a mesma dentro do frasco. A biópsia renal só será feita por indicação clínica, com finalidade assistencial, sendo assim, para fazer parte do estudo o participante deve permitir a utilização de um pedaço da biópsia renal necessárias ao atendimento do seu transplante, não sendo indicadas pelo estudo. Nenhum benefício financeiro será obtido na participação do presente estudo tanto para a unidade de transplante renal, quanto para os (as) Sr (as), mas sua ajuda será importante na pesquisa de tratamentos melhores para complicações associadas ao transplante renal de futuros pacientes.

Poderá entrar em contato com o membro da equipe da unidade de transplante renal: Patrícia Milhoransa, pelos telefones 3359-8295, 3359-8121, ou ainda pelo telefone do Pesquisador Responsável Dr. Roberto Ceratti Manfro, 3359-8121 na unidade de transplante renal.

Eu, \_\_\_\_\_ aceito participar do estudo, declaro que fui informado:

- A participação é voluntária;
- Da garantia de receber resposta a qualquer pergunta sobre o presente estudo;
- Da liberdade de retirar meu consentimento, a qualquer momento, sem que isto traga prejuízo à continuação de meu cuidado e tratamento;
- Do caráter confidencial das informações relacionadas com minha privacidade, onde o nome do participante não será revelado;
- De que não terei despesas por participar do estudo;
- Em caso necessidade de esclarecimentos sobre seus direitos e deveres, entrar em contato com o Comitê de Ética e Pesquisa (CEP): (51)3359-7640;
- Recebo cópia assinada deste termo de consentimento.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Participante

\_\_\_\_\_  
Nome do Pesquisador

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

Porto Alegre, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ 2017.

## 11. ANEXO 2 – STROBE

STROBE Statement—checklist of items that should be included in reports of observational studies

Title and abstract	Item No	Recommendation
	1	<p data-bbox="555 521 1390 658">“Avaliação da expressão do micro-RNA 146a-5p como biomarcador da lesão de isquemia e reperfusão na disfunção inicial do transplante renal”</p> <hr/> <p data-bbox="555 685 1390 1263">O transplante renal (TR) é o tratamento de escolha para uma significativa porção de pacientes com perda crônica terminal da função renal. Apesar dos progressos obtidos, a disfunção inicial do enxerto (DIE) permanece como uma importante complicação precoce muitas vezes levando à necessidade da biópsia renal. Essa, apesar de suas limitações, riscos e custos, é considerada padrão ouro para a avaliação das disfunções dos enxertos renais. Assim sendo é imprescindível estudar e buscar biomarcadores não invasivos capazes de diagnosticar as agressões aos transplantes renais, em especial na fase de DIE, quando os parâmetros funcionais não estão disponíveis.</p>

### Introduction

O transplante renal é o tratamento de escolha para muitos pacientes com perda crônica terminal da função renal oferece um significativo aumento na expectativa e na qualidade de vida desses pacientes. Porém, como evidenciado desde o início da prática de transplantes entre indivíduos geneticamente distintos, tecidos e órgãos perdem suas funções por um processo mediado pelo sistema imune que é denominado rejeição. Este processo é parcialmente controlado pela modificação da resposta imune do receptor com fármacos e agentes biológicos imunossupressores.

Os fenômenos de isquemia e reperfusão que ocorrem após o transplante renal podem ter como consequências a não função primária do enxerto, o retardo na sua função, aumento no tempo



de hospitalização e dos custos, aumento no risco de rejeição aguda e potencial impacto negativo na sobrevida em longo prazo. Essas injúrias agem ativando o sistema imune, suscitando a resposta inata e a resposta adaptativa e levando a processos com grande potencial de afetar a integridade celular. O fenótipo clínico mais frequente é o da disfunção inicial do enxerto (DIE) que é caracterizada histopatologicamente pela necrose tubular aguda, que está associada a uma maior incidência de rejeição aguda (RA) e que desencadeia alterações gênicas, metabólicas e teciduais que culminam nos processos de fibrose dos enxertos e sua perda crônica.

A injúria da isquemia e reperfusão e a decorrente DIE é um dos maiores problemas do transplante renal, associada a aumento de morbidade e mortalidade. A sua patofisiologia é multifatorial e apenas parcialmente elucidada. Adicionalmente, a frequência de DIE é em torno de três vezes mais elevada do que a encontrada em outros países.

A RA é um importante fator de risco para a perda de enxertos, sendo uma frequente e séria complicação pós-transplante. As expressões fenotípicas e os mecanismos das rejeições estão bem elucidados. Na prática clínica a RA é usualmente evidenciada pela disfunção orgânica ou por alterações histológicas sendo classificada pelo tipo de alteração histológica demonstrado na biópsia do enxerto. Sua evolução é de difícil predição e os achados histológicos observados nos tecidos renais obtidos ainda são considerados os melhores preditores, padrão ouro para diagnóstico. Por outro lado, a biópsia é um procedimento associado a complicações que incluem sangramento, fístulas arteriovenosa, obstrução por coágulo, perda do enxerto e até mesmo óbito. Além disso, é onerosa e tem problemas relacionados à representatividade e variabilidade de interpretação.

Estudos com biomarcadores não invasivos acurados que

apresentam alta sensibilidade e especificidade a situação do aloenxerto são necessários para o aprimoramento da prática dos transplantes. Uma importante descoberta da biologia molecular nos últimos anos foram os micro RNAs (miRNAs), pequenos fragmentos conservados e não codificadores de RNA com 18-25 nucleotídeos, responsáveis por regular a expressão gênica. Um único miRNA é capaz de regular a expressão de centenas de RNAs mensageiros e proteínas, eles demonstram ter controle de processos como o desenvolvimento, a diferenciação e proliferação celular, e portanto têm habilidades como modular ambas respostas imunes, a inata e a adaptativa. A desregulação dos miRNAs pode levar a perturbação e supressão de genes que operam na sinalização de cascatas intracelulares, propiciando condições de doença ou progressão das mesmas. Diversas doenças já foram relacionadas a distúrbios desta sinalização, incluindo-se doenças renais.

Considerada a atual etapa de conhecimento sobre os miRNAs no contexto do transplante renal, neste estudo avaliou a expressão do miR-146a-5p por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). O estudo foi executado em tecido renal e em células sanguíneas linfóides obtidas em pacientes transplantados renais com DIE e objetivou contribuir para o desenvolvimento de estratégias que permitam o diagnóstico acurado da etiologia da disfunção do enxerto renal.

Background/rationale	2	Espera-se que o estudo com o biomarcador miR-146a-5p contribua como potencial biomarcador de lesão de isquemia e reperfusão para avaliação diagnóstica e entendimento fisiopatológico das disfunções dos enxertos renais.
Objectives	3	Analisar e quantificar a expressão do miRNA-146a-5p em amostras de sangue periférico e de tecido renal coletadas de pacientes transplantados renais que apresentam disfunção inicial

do enxerto associada a lesão de isquemia e reperfusão.

Comparar a expressão do miRNA 146a-5p em pacientes com LIR à expressão observada na rejeição aguda e em enxertos estáveis; Avaliar os parâmetros diagnósticos resultantes da avaliação da expressão genética do miRNA-146a-5p em tecido renal e células mononucleares sanguíneas de rins transplantados em grupos de pacientes estáveis, pacientes com disfunção e com rejeição aguda.

---

### Methods

Study design	4	Estudo Transversal
Setting	5	Analisar e quantificar a expressão do micro Ácido Ribonucleico (miRNA) mi RNA-146a-5p em amostras de sangue periférico e tecido renal de pacientes que desenvolveram disfunção do enxerto associados a lesões de isquemia e reperfusão após transplante renal.
Participants	6	A amostra será composta 55 pacientes submetidos a biópsia de enxerto renal e a coleta de sangue periférico divididas em grupos : 33 pacientes com disfunção inicial do enxerto, 09 pacientes com Rejeição Aguda e 13 pacientes Estáveis, mediante assinatura do TCLE. O estudo foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular Aplicado à Nefrologia do HCPA.
Variables	7	Variáveis pré-analíticas (coleta da amostra, processamento e armazenamento) afetam a acurácia de miRNAs em fluidos biológicos, número baixo de pacientes, principalmente no grupo de rejeição aguda, análise de um único gene alvo.
Data sources/ measurement	8*	Biópsia e Plasma- o RNA total das amostras de plasma será isolado utilizando o kit <i>mirVana Paris</i> (cód. AM1556, Ambion), seguindo as orientações do fabricante.  Após o isolamento tanto do RNA total como dos miRNAs, prosseguiu -se com a etapa de síntese de cDNA e posterior armazenamento do produto da reação a -20°C (a fim de garantir

a estabilidade da amostra).

O RNA total, assim como os miRNAs, das diferentes amostras biológicas serão convertidos em cDNA utilizando um kit específico para cada mi RNA (*TaqMan microRNA RT, Thermo Fisher Scientific*). Cada ensaio contém um par de *primers* específicos para cada miRNA, permitindo a conversão do fragmento de RNA em cDNA correspondente ao miRNA de interesse. A PCR em tempo real quantitativa (Rt-qPCR) dos miRNAs realizada conforme o protocolo do kit comercial *TaqMan® MicroRNA Assays (Thermo Fisher Scientific)*, o qual possui sondas e *primers* específicos para cada miRNA. A RT-qPCR foi feita no *StepOne™ Real Time PCR Systems (Applied Biosystems)*. Para cada uma das amostras biológicas duplicatas experimentais foram incluídas.

Bias	9	Número baixo de pacientes, análise de um único gene alvo.
Study size	10	O número estimado de pacientes para este trabalho é de 55 pacientes representando o número total de 110 amostras analisadas em duplicata. De acordo com o banco histórico de biópsias de transplantes renais no HCPA aproximadamente 40% das amostras serão obtidas em pacientes com rejeição aguda, 30% em pacientes com necrose tubular aguda e 20% em outras condições tais como infecções e nefrotoxicidade por inibidores de calcineurina. Haverá também biópsias cujo diagnóstico será de rim transplantado normal que serão utilizadas como grupo controle. Considerando-se o delta de aproximadamente 50% p $\alpha$ de 5% e p $\beta$ 20% o número de amostras com RA 16. As amostras dos pacientes serão divididas em grupos de acordo com o diagnóstico do exame anátomo patológico das biópsias, utilizando-se a classificação de Banff 2013.
Quantitative variables	11	Variáveis assimétricas analisadas com medianas e intervalos interquartis, e as variáveis simétricas como médias $\pm$ desvios-padrão.
Statistical methods	12	Testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney U foram utilizados

para a análise de variância de amostras pareadas e para análises entre grupos. A correlação de Spearman foi usada para ver a associação entre duas variáveis. Os dados qualitativos foram expressos como frequência absoluta e relativa e o teste do qui-quadrado ou os testes exatos de Fisher foram utilizados para análises entre grupos. Todos os testes foram de dois a três e um valor de  $P < 0,05$  foi definido como estatisticamente significativo. Todas as análises foram realizadas no PASW Statistics 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

<b>Results</b>		
Participants	13*	(a) 55 pacientes, coletados amostras de enxerto renal e sangue periférico. (b) Os critérios de exclusão são: Pacientes cujos fragmentos de biópsias não sejam representativos, ou pacientes cujas amostras de sangue periférico não sejam coletadas.
Descriptive data	14*	55 pacientes, 13 pacientes estáveis, 33 pacientes com disfunção inicial do enxerto e 09 pacientes com rejeição aguda.
Outcome data	15*	<i>Cohort study—</i> <i>Case-control study—</i> <i>Cross-sectional study—</i> No perfil demográfico estudados nos diferentes grupos, somente os níveis séricos de creatinina ( $P = 0,022$ ) e o tempo decorrido do transplante para a biópsia ( $P = 0,001$ ) diferiram significativamente entre os grupos. A creatinina sérica foi significativamente elevada no grupo DGF e o tempo para a biópsia foi maior no grupo DGF em comparação com o grupo estável. Como o tempo esperado para a biópsia também foi maior no grupo estável, que foi submetido a biópsias de protocolo, em comparação com os outros dois grupos. As diferenças observadas nos regimes iniciais de imunossupressão não alcançaram significância estatística ( $P = 0,069$ ). Não foi encontrada correlação significativa entre o nível de expressão de miR-146a-5p em diferentes compartimentos, biópsia e sangue periférico ( $r = 0,084$ ; $P = 0,541$ ). A curva de característica operacional do receptor (ROC) da análise da biópsia foi plotada para

avaliação dos da expressão do gene miRNA- 146a-5p para o diagnóstico da DIE. A área sob a curva foi 0,75 (IC 95%: 0,62-0,88). Usando um ponto de corte de 1,64 na curva ROC, os parâmetros obtidos foram: sensibilidade, 67,0%; Especificidade, 64,0%; Valor preditivo positivo, 73,3%; E valor preditivo negativo, 56% (P = 0,002, teste de qui-quadrado de Pearson). A curva ROC da análise do sangue periférico foi planejada para avaliação dos parâmetros diagnósticos da expressão do gene miRNA 146a-5p para o diagnóstico da DIE. A área sob a curva para miR-146a-5p foi 0,67 (IC 95% 0,52-0,81). Usando um ponto de corte de 0,63 na curva ROC, os parâmetros obtidos foram: sensibilidade, 64%; Especificidade, 64%; Valor preditivo positivo, 72,4%; E valor preditivo negativo, 53,8% (P = 0,036, teste de qui-quadrado de Pearson)

Main results	16	Expressão gênica de miRNA-146a-5p apresentou diferença significativa em amostras de biópsia renal.
Other analyses	17-	
<b>Discussion</b>		
Key results	18	Potencial biomarcador de lesão de isquemia e reperfusão renal em amostras de enxertos renais.
Limitations	19	Número baixo de pacientes, análise de um único gene
Interpretation	20	Potencial biomarcador para lesão de isquemia e reperfusão renal, contribuindo no diagnóstico das disfunções de enxerto e auxiliando nos processos fisiopatológicos das mesmas.
Generalisability	21	Associar ao estudo outros biomarcadores, como o miR-142-3p que mostrou ser diferenciado na rejeição aguda e sugerir um perfil de miRNAs capaz de diferenciar a disfunção inicial do enxerto da rejeição aguda.
<b>Other information</b>		
Funding	22	A quantidade adicional de kits para o número total de dosagens será adquirida com verba da Fundação Médica do Rio Grande do Sul e do Fundo de pesquisa do Serviço de Nefrologia do HCPA.

\*Give information separately for cases and controls in case-control studies and, if applicable, for

exposed and unexposed groups in cohort and cross-sectional studies.

**Note:** An Explanation and Elaboration article discusses each checklist item and gives methodological background and published examples of transparent reporting. The STROBE checklist is best used in conjunction with this article (freely available on the Web sites of PLoS Medicine at <http://www.plosmedicine.org/>, Annals of Internal Medicine at <http://www.annals.org/>, and Epidemiology at <http://www.epidem.com/>). Information on the STROBE Initiative is available at [www.strobe-statement.org](http://www.strobe-statement.org).